



Revista GICOS
ISSN: 2610-797X
gicosrevista@gmail.com
Universidad de los Andes
Venezuela

Cañarte, Jorge; Giler, Miguel; Saavedra, Stefan; Téllez, Luis; Callejas, Diana
Detección, tipificación y carga viral del virus papiloma humano asociado a lesiones preinvasoras de cervix.
Revista GICOS, vol. 6, núm. 1, 2021, Enero-Junio, pp. 46-62
Universidad de los Andes
Venezuela

- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org



DETECCIÓN, TIPIFICACIÓN Y CARGA VIRAL DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO ASOCIADO A LESIONES PREINVASORAS DE CERVIX

DETECTION, TYPIFICATION AND VIRAL LOAD OF THE HUMAN PAPILOMA VIRUS ASSOCIATED WITH CERVIX PRE-INVASIVE INJURIES

Cañarte, Jorge¹; Giler, Miguel²; Saavedra, Stefan³; Téllez, Luis⁴; Callejas, Diana¹

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento Ciencias Biológicas, Universidad Técnica de Manabí. Portoviejo – Manabí – Ecuador.

² Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil, Guayaquil - Guayas – Ecuador.

³ Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, Seguro Social Campesino, Cuenca – Azuay – Ecuador.

⁴ Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Correo-e de correspondencia: jcanarte@utm.edu.ec

Recibido: 30-07-2020. **Aceptado:** 04-09-2020. **Publicado:** 19-03-2021

RESUMEN

El virus papiloma humano de alto riesgo (VPHAR) está relacionado al cáncer cervical. Se realizó un estudio clínico, epidemiológico, descriptivo, y transversal, en mujeres mayores de 15 años sexualmente activas, en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) en Mérida - Venezuela, para detectar la frecuencia de infección por Virus Papiloma Humano (VPH), genotipificar en grupos de alto y bajo riesgo oncogénico, semicuantificar la carga viral y relacionar esta variable con el reporte citológico y colposcópico, usando captura de híbridos 2 (Digene®). Las mujeres firmaron un consentimiento informado, y el protocolo fue evaluado por un comité de ética. 53/394 (13,5%) mujeres resultaron positivas para infección por VPH. 43 presentaron VPHAR (81%), y 10 (19%) VPH de bajo riesgo (VPHBR). La carga viral se cuantificó en 39 mujeres con VPHAR. 66,67% presentaron resultados citológicos negativos para lesiones intraepiteliales y/o malignidad, a pesar de que 46,16% de dichas pacientes mostraron cargas virales moderadas y altas. Un 30,77% mostraron citologías positivas para lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG), con 66,66% mostrando cargas virales moderadas y altas. 58,98% de estas pacientes presentaron resultados colposcópicos anormales. 56,42% DZT (Dentro de la zona de transformación), un 2,56% ZINCN (Zona iodo negativa de contornos netos), las pacientes con DZT mostraron en un 59,09% cargas virales moderadas y altas. A pesar de haber encontrado cargas virales predominantemente moderadas y altas en pacientes con LIEBG, y lesiones colposcópicas, no resultaron ser estadísticamente significativas, por lo que se precisa dilucidar el rol definitivo de este hallazgo.

Palabras clave: infección por VPH, carga viral, lesión intraepitelial escamosa cervical.

Cómo citar este artículo

Cañarte, J., Giler, M., Saavedra, S., Téllez, L. y Callejas, D. (2021). Detección, tipificación y carga viral del virus papiloma humano asociado a lesiones preinvasoras de cérvix. *GICOS*, 6(1), 46-62



La Revista Gicos se distribuye bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial Compartir Igual 3.0 Venezuela, por lo que el envío y la publicación de artículos a la revista es completamente gratuito. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/ve/>

ABSTRACT

High-risk human papillomavirus (HRHPV) is linked to cervical cancer. A clinical, epidemiological, descriptive, and cross-sectional study was carried out in sexually active women over 15 years of age at the Autonomous Institute Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) in Mérida - Venezuela, to detect the frequency of infection by Human Papilloma Virus (HPV), genotyping in groups of high and low oncogenic risk, semi-quantifying the viral load and relating this variable with the cytological and colposcopic report, using hybrid capture 2 (Digene®). The women signed an informed consent, and the protocol was evaluated by an ethics committee. 53/394 (13.5%) women tested positive for HPV infection. 43 had HRHPV (81%), and 10 (19%) had low-risk HPV (LRHPV). Viral load was quantified in 39 women with HRHPV. 66.67% presented negative cytological results for intraepithelial lesions and / or malignancy, despite the fact that 46.16% of these patients showed moderate and high viral loads. 30.77% showed positive cytologies for low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), with 66.66% showing moderate and high viral loads. 58.98% of these patients presented abnormal colposcopic results. 56.42% DZT (Within the transformation zone), 2.56% ZINCN (Iodine negative zone of net contours), the patients with DZT showed 59.09% moderate and high viral loads. Despite having found predominantly moderate and high viral loads in patients with LSIL, and colposcopic lesions, they were not statistically significant, so it is necessary to elucidate the definitive role of this finding.

Key words: papillomavirus infection, viral load, cervical squamous intraepithelial lesion.

INTRODUCCION

El VPHAR se considera como el principal factor de riesgo en el desarrollo de cáncer cervical (Ferenczy y Franco, 2002). La falta de sensibilidad y especificidad del Papanicolau para detectar la infección por VPH justificó la incorporación de la biología molecular, especialmente en pacientes sin lesiones aparentes, con estudios colposcópicos y citológicos normales (Xu et al., 2009). Los ensayos clínicos han demostrado que la detección con pruebas de VPH tiene una mayor sensibilidad para detectar lesiones de alto grado que las pruebas de citología (Malagón et al., 2019). Una de las causas de mortalidad por cáncer en la mujer venezolana sigue siendo el de cérvix, encontrándose los genotipos 16 y 18 como responsables del 70 % de casos, otros tipos de VPHAR también deben ser tomados en cuenta (31, 35, 45, 50, 52, 58, etc.) (Muñoz, Castellsagué, Berrington y Gissmann, 2006; Mao et al., 2006; Campbell, 2006; Castellsagué, 2008; Gravitt, 2011; Haghshenas et al., 2013). En el mundo anualmente 500.000 mujeres se infectan por VPH y en Venezuela se ha estimado más de 30.000 nuevos casos anuales de infección por este virus (Muñoz, Castellsagué, Berrington y Gissmann, 2006; Mao et al., 2006).

La mayoría de mujeres infectadas resuelven la infección espontáneamente (alrededor del 90%), persistiendo solo en una pequeña fracción (Parkin, 2006; Téllez, et al., 2015). Es este grupo de acarreadoras crónicas de

VPHAR, quienes presentan un riesgo incrementado de desarrollar lesiones del tracto anogenital, asociadas al genotipo viral, variaciones intra-tipo de VPHAR, integración del genoma viral al genoma de la célula infectada y probablemente a la carga viral (Ford et al., 2002).

La carga viral es un biomarcador potencial que podría utilizarse para evaluar las pruebas de detección positivas para VPH, aunque ha recibido relativamente menos atención que otros biomarcadores de clasificación. Esto puede deberse en parte a que la asociación entre la carga viral y el grado de lesión ha sido inconsistente, y los métodos para medir la carga viral han variado entre los estudios. Sin embargo, debido a que la medición de la carga viral del VPH no requiere citología, puede ser útil para el triaje de pruebas de VPH auto-muestreadas en poblaciones difíciles de alcanzar (Malagón et al., 2019).

El objetivo de este análisis fue detectar la infección por VPH, tipificar los genotipos en grupos de bajo y alto riesgo oncogénico y semicuantificar la carga viral, así como relacionar el nivel de carga viral encontrado en las pacientes con sus hallazgos citológicos y colposcópicos, para conocer si el nivel de la carga viral del VPH, pudiera representar un predictor independiente de la enfermedad cervical subyacente y su precisión diagnóstica en mujeres con VPH.

METODOLOGIA

Estudio: Se realizó una investigación clínica, epidemiológica, descriptiva y de corte transversal.

Población y Muestra: Mujeres mayores de 15 años, sexualmente activas o que iniciaron actividad sexual, que acudieron a la consulta de ginecología del IAHULA durante 18 meses (enero 2016 a julio 2017). Se estudió una muestra de 394 mujeres. Se excluyeron del protocolo de estudio aquellas mujeres que para el momento de la toma de muestra presentaron: a) Sangramiento genital sea por menstruación normal, metrorragia o menorragia; b) Cambios en el cuello uterino producto de procedimientos quirúrgicos que impidieron la correcta toma de la muestra; c) Embarazo diagnosticado; d) Infección por VIH.

Variables estudiadas

Infección cervical por virus papiloma humano.

Genotipificación viral del virus papiloma humano en grupos de alto y bajo riesgo oncogénico.

Características citológicas y colposcópicas del cuello uterino de mujeres estudiadas.

Cuantificación de la carga viral de VPHAR.

Procedimientos aplicados

Se realizó toma de muestra exo y endocervical por el especialista en ginecología, las cuales fueron enviadas al Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes para la realización de citología según los criterios Bethesda. A todas las pacientes se les realizó estudio colposcópico. Los datos de la evaluación clínica fueron registrados en una ficha clínica diseñada para tal fin. Se tomaron cepillados con estuche DIGENE® de exo y endocervix y de la zona de transformación, para detección del ADN de VPH en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina. Las muestras permanecieron a una temperatura de -20 °C hasta su procesamiento, que incluyó la extracción y purificación del ADN.

El aislamiento de ADN se obtuvo a partir de las diferentes muestras cervicales obtenidas, realizándose mediante QIAamp ADN Mini Kit (QIAGEN®), de acuerdo con las instrucciones del laboratorio fabricante, las muestras obtenidas por escobillado se descongelaron y, al alcanzar la temperatura ambiente de 15 a 25 °C, fueron mezcladas en vortex por 1 minuto. Luego, se retiró el escobillón y se transfirieron 200 µL de muestra a un tubo Eppendorf estéril de 1,50 µL de capacidad, al cual se agregó 20 µL de solución stock de proteinasa K y 200 µL de buffer AL (buffer de lisis). Se mezcló en Vortex por 15 segundos. Después de la incubación durante 10 minutos a 56 °C, el tubo se centrifugó brevemente y se añadieron 200 µL de etanol puro (96,00-100,00 %). Se mezcló en Vortex durante 15 segundos y centrifugó brevemente. La mezcla resultante fue transferida a la columna de aislamiento, en un tubo de colección de 2 µL de capacidad, se centrifugó por 1 minuto a 8.000 rpm y se transfirió la columna a un nuevo tubo de colección de 2 µL de capacidad. La columna se abrió, agregándose 500 µL de buffer AW1, luego fue centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm. La columna fue transferida a un nuevo tubo de colección de 2 µL de capacidad y el tubo con el contenido del filtrado se descartó. Al sedimento incluido en la columna fue añadido 500 µL de buffer AW2; y se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm; el paso se repitió dos veces. La columna fue transferida a un nuevo tubo de colección estéril, de 1,50 µL de capacidad. Se abrió y se agregó 200 µL de buffer AE (buffer de elusión) o agua destilada, luego fue incubada durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 rpm. La columna fue extraída y descartada, el fluido que contiene el ADN extraído fue conservado a -20

°C hasta su posterior procesamiento. La genotipificación en grupos de alto y bajo riesgo oncológico, así como la cuantificación de carga viral, se realizó mediante la realización de la técnica molecular Captura de Híbridos 2 (CH2 DIGENE®) según descripción del inserto.

Para cuantificar la carga viral de VPHAR, se empleó una adaptación de la clasificación descrita por Xu y colaboradores, en relación a la cantidad de Unidades Relativas de LUZ (URL), describiéndose muy baja: de 0-5 URL, baja: de 5-10 URL, moderada: de 10-100 URL y alta: > 100 URL. (Xu et al., 2009)

Toda la información, así como los resultados obtenidos se analizaron a partir de una base de datos creada mediante la aplicación informática EPI Info versión 7.0 y expresados en tablas y gráficos de distribución de frecuencia.

Aspectos éticos

El protocolo de trabajo fue evaluado y avalado por un Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina del Ministerio del Poder Popular para la Salud de Venezuela. A las participantes se les solicitó su autorización mediante consentimiento informado para utilizar la información recabada y las muestras biológicas recolectadas. A todas las pacientes mayores de edad, y a los padres y/o representantes de las menores de edad, se les explicó acerca de la naturaleza e importancia del estudio, e informó que el mismo sería realizado siguiendo los principios establecidos por la Organización Mundial de la Salud para investigaciones médicas en seres humanos.

RESULTADOS

Tabla 1. Prevalencia de VPH, mediante Captura Híbrida 2, en mujeres atendidas en el Servicio de Ginecología, IAHULA, Mérida, Venezuela. Enero 2016- Julio 2017

VPH	Número	%
Positivo	53	13,50
Negativo	341	86,50
Total	394	100,00

Fuente: Laboratorio de Microbiología. Dpto. de Microbiología. Facultad de Medicina. ULA

De 394 mujeres estudiadas, 53 (13,5%) resultaron positivas para infección por VPH.

Tabla 2. Prevalencia de infección de VPHAR Y VPHBR, en mujeres positivas, atendidas en el Servicio de Ginecología, IAHULA, Mérida, Venezuela. Enero 2016-Julio 2017.

	Número	%
VPHAR	43	81
VPHBR	10	19
TOTAL	53	100

Fuente: Laboratorio de Microbiología. Dpto. de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes

De las pacientes positivas para infección con VPH, el 81% (43) presentaron VPHAR y un 19% (10) VPHBR.

Se realizó cuantificación de la carga viral en 39 mujeres positivas para VPHAR. Al relacionar esta variable con los resultados citológicos se encontró que el 66,6% (26/39) presentaron resultados citológicos normales o negativos para lesiones intraepiteliales y/o malignidad, a pesar de que 46,16% mostraron cargas virales moderadas y altas. Un 30,8% (12/39) mostraron citologías positivas para lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG), el 66,66% de estas mostraron cargas virales moderadas y altas. (Tabla 3)

Tabla 3. Relación entre la positividad de infección por VPHAR, resultados citológicos y carga viral, en mujeres que acudieron al Servicio de Ginecología, IAHULA, Mérida, Venezuela. Enero 2016- Julio 2017

DIGENE VPH AR	CARGA VIRAL									
	0-5		5-10		10-100		>100		TOTAL	
Resultado citología:	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativo para LIE o Malignidad	12	46,15	2	7,69	6	23,08	6	23,08	26	66,6
ASCUS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASC-H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIE-BG	3	25	1	8,33	4	33,33	4	33,33	12	30,8
LIE-AG	0	0	0	0	1	100	0	0	1	2,6
TOTAL	15	38,46	3	7,69	11	28,2	10	25,64	39	100

Fuente: Laboratorio de Microbiología. Dpto. de Microbiología. Facultad de Medicina. ULA.

Un 58,98% de estas pacientes presentaron resultados colposc6picos anormales. 56,40% DZT (Dentro de la zona de transformaci3n), un 2,6% ZINCN (Zona iodo negativa de contornos netos), las pacientes con DZT mostraron en un 59,09 % cargas virales moderadas y altas. (Tabla 4)

Tabla 4. Relaci3n entre la positividad de infecci3n por VPHAR, resultados colposc6picos y carga viral en mujeres, que acudieron al Servicio de Ginecolog6a, IAHULA, M6rida, Venezuela. Enero 2016- Julio 2017.

		CARGA VIRAL									
VPH AR		0-5		5-10		10-100		>100		TOTAL	
Colposcopia:	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Normal	7	46,66	0	0	5	33,33	3	20,0	15	38,40	
ZINCN	1	100	0	0	0	0	0	0	1	2,6	
DZT	7	31,82	2	9,10	6	27,27	7	31,82	22	56,40	
No registrado	0	0	1	100	0	0	0	0	1	2,6	
TOTAL	15	38,46	3	7,69	11	28,2	10	25,64	39	100,0	

Fuente: Laboratorio de Microbiolog6a. Dpto. de Microbiolog6a. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.

DISCUSI3N

Se necesitan con urgencia biomarcadores altamente predictivos de c6ncer cervical para evaluar a las mujeres positivas al virus del papiloma humano (Zhao et al., 2019). La prevalencia de infecci3n con VPH fue del 13,5%, resultados similares fueron reportados previamente en la ciudad de M6rida, 12,54%, en mujeres con y sin alteraciones citol3gicas (Mu1oz et al., 2003). Contrariamente, Correnti y colaboradores en Caracas, Venezuela, determinaron la presencia de infecci3n en 54,60% de 1.483 muestras cervicales procesadas por CH2, provenientes de mujeres con diagn3stico citol3gico anormal (Correnti, Cavazza, Herrera y Rodr6guez, 2010). Las diferencias antes mencionadas pueden ser debidas a que en la mayor6a de pacientes incluidas en el presente estudio positivas para VPHAR, la evaluaci3n citol3gica fue normal (66,67%), mientras que en la investigaci3n de Correnti y colaboradores, todas las pacientes estudiadas presentaron alg3n grado de alteraci3n citol3gica, siendo las m6s frecuentes las LIEBG y LIEAG.

Se ha descrito un incremento en la sensibilidad de la CH2 para la detecci3n de la infecci3n cervical por VPH, a medida que aumenta el grado de la lesi3n cervical (Coutl6e, Rouleau, Ferenczy y Franco, 2005; Kumar, Iyer,

Bhatla, Kriplani y Verma, 2007). Wang et al., reportaron que tanto la positividad para ADN de VPH como la carga viral, fue considerablemente superior en las pacientes con neoplasia intracervical (NIC) grado III, que con NIC grado I. (Wang et al., 2010).

Se encontró predominio del VPHAR sobre el VPHBR, esto es consistente con otros reportes en Venezuela, encontrándose mayormente infección por VPHAR. (Muñoz et al., 2003; Correnti, Cavazza, Herrera y Rodríguez, 2010; Núñez et al., 2009).

La cuantificación de la carga viral de VPHAR, mostró un rango entre 0 a >100 URL; en la mayoría de las muestras analizadas el valor fue de 10-100 (moderada) y >100 URL (alta). La asociación entre la carga viral y los distintos grados de alteración citológica y colposcópica, no evidenció una relación estadísticamente significativa entre la presencia de LIEBG/carga viral, ni entre la presencia de atipias colposcópicas/carga viral, resultados que difieren de otros estudios, en los cuales se ha determinado que una elevada carga viral se asocia con el aumento de la persistencia de la infección por VPH, y por tanto, con un incremento en el riesgo de desarrollo de lesiones cervicales, principalmente NIC II/III y/o cáncer cervical (CC). Asimismo, un incremento de la carga viral en mujeres persistentemente infectadas con VPHAR, también ha mostrado estar asociada con un incremento acumulativo de la prevalencia de lesiones pre-malignas de cuello uterino (Xu et al., 2009; Boulet et al., 2009; Saunier et al., 2008; Guo et al., 2007; Mongelós et al., 2013). Sin embargo, otros estudios han mostrado que a pesar de presentar reportes de citología y colposcopia negativos para lesiones cervicales en mujeres infectadas con VPH, casi la mitad (48.3%) de las lesiones NIC 2 y 80.4% de las lesiones NIC 3, omitidas o no diagnosticadas por colposcopia tenían carga viral en rangos intermedios a altos, y el riesgo de NIC 2 en el grupo de alta carga viral fue 46 veces mayor que las mujeres negativas para el VPH, incluso cuando la colposcopia era aparentemente normal. (Basu et al., 2016). En el presente trabajo se encontró un nivel de carga viral moderado y alto en muestras de mujeres con reporte de citología negativa para lesiones y colposcopia normal, lo que pudiera significar que estas mujeres ameritan la realización de múltiples biopsias por punción con el objetivo de lograr pesquisar de forma idónea la posible alteración del epitelio cervical.

Se ha reportado que valores de URL menores de 5 indica un pequeño número de copias virales por célula, pudiendo significar infección viral latente o en fase de remisión espontánea (Mongelós et al., 2013). En el presente trabajo se observaron 12 muestras citológicas negativas para LIE o malignidad, con carga viral entre 0-5 URL, y 7 reportes colposcópicos normales, con carga viral similar, en estas pacientes pudiese estar ocurriendo este proceso.

En China fueron evaluadas 1997 mujeres de 35 a 45 años reclutadas en 1999, y las visitas de seguimiento se llevaron a cabo en 2005, 2010 y 2014. La carga de VPH se midió mediante el ensayo Captura de Híbridos 2. Los hallazgos se determinaron por unidades de luz relativas / corte (RLU / CO) y al igual que en nuestro estudio se clasificaron en 4 grupos: negativo (<1.0), bajo (rango, 1.0 a <10.0), moderado (rango, 10.0 a <100.0) y alto (rango, 100.0 – ∞). Se calcularon las tasas de incidencia acumulada (IA) y las razones de riesgo ajustadas (RR) para NIC 2, para los subgrupos de carga viral, se utilizó análisis de supervivencia (Zhao et al., 2019).

En 1739 mujeres con hallazgos patológicos normales o NIC 1 al inicio del estudio, la IA en 15 años para NIC 2 para aquellos que tenían VPH negativo y aquellos con grupos de carga baja, moderada y alta de VPH fueron 3.1%, 8.4%, 19.9% y 22.0%, respectivamente ($p < 0.001$). En comparación con las mujeres que fueron negativas para el VPH desde el inicio hasta el seguimiento, aquellas que tuvieron cargas moderadas / altas decrecientes, crecientes o estables tuvieron una RR de 9.1, 38.7 o 379.7, respectivamente, para NIC 2. No hubo diferencias significativas entre la clasificación basada en los hallazgos citológicos (para aquellos con células escamosas atípicas de importancia indeterminada o hallazgos más graves) y la basada en una carga de VPH moderada / alta para la detección primaria de VPH ($P = 0.343$) (Zhao et al., 2019). Este último resultado fue similar a lo encontrado en este trabajo.

Wu et al., (2018) realizaron un estudio transversal multicéntrico para evaluar la asociación entre la carga de ADN del VPH de tipo específico y la presencia de proteína E6 en la neoplasia intraepitelial cervical y el cáncer. Se evaluaron 1717 mujeres [histopatología normal: 916; NIC 1: 94; NIC 2: 63; NIC 3: 130; CC: 474; adenocarcinoma: 40]. Se detectaron la carga de ADN del VPH y la presencia de proteína E6. La carga de ADN se midió como copias de registro / 10.000 células. Estos autores encontraron que las tasas de positividad de proteína E6 en VPH16 y VPH18, aumentaron de negativo al grado de carga más alto. En comparación con los negativos de ADN del VPH16, las mujeres con bajo (18.9-52.5), medio-bajo (77.3-230.7), medio-alto (134.9-455.6) y altas cargas de ADN (301.6-1523.7) tuvieron proporciones relativas cada vez más altas de expresión de E6 de VPH16. La asociación de E6 VPH18 con su carga de ADN también fue significativa para baja (10.4-74.9), media baja (32.8-241.3), media-alta (76.7-998.9) y alto grado (97.7-1992.4). Las tasas de positividad tanto del ADN del VPH16 como de la proteína E6 aumentaron consistentemente con la gravedad de las enfermedades desde la histopatología normal hasta el CC. A diferencia del VPH16, las tendencias del ADN del VPH18 y la proteína E6 fluctuaron constantemente entre las mujeres desde la histopatología normal hasta el cáncer. La carga de ADN en mujeres E6 positivas fue significativamente mayor que en mujeres E6 negativas para ambos tipos de VPH. Estos hallazgos permiten plantear que existe una asociación de tipo dependiente entre la carga de ADN de VPH16 / 18 y la oncoproteína E6; promoviéndose la comprensión de

la historia natural del cáncer cervical. Como parte de sus conclusiones estos autores describen que una carga de VPH moderada / alta puede acelerar la progresión de los precánceres cervicales y potencialmente podría usarse como un indicador de triaje para mujeres con detección positiva para VPH (Wu et al., 2018).

Un estudio transversal realizado en cinco centros médicos de China con un total de 2513 mujeres [1341 normales, 209 LIEBG, 392 LIEAG, 520 carcinomas de células escamosas y 51 adenocarcinoma], mostró un aumento lineal en la carga viral total de 14 VPH con grado histológico de normal a CC. Esta tendencia no se observó en la infección por VPH18 sino por VPH16. La carga viral para otros genotipos de alto riesgo oncogénico fue baja en casos de citología normal, alcanzó su punto máximo en LIEBG y LIEAG, y disminuyó en CC de células escamosas y adenocarcinoma. En la coinfección de VPH16 y VPH18, la carga viral de VPH16 fue significativamente mayor que la de VPH18 en LIEBG y LIEAG. En la coinfección de VPH16 y otros genotipos de alto riesgo, también se observó una mayor carga viral de VPH16 en CC. Estos resultados permiten considerar que la carga viral de VPH16 aumenta con el grado de lesión cervical y es predominante en el cáncer cervical. La carga viral del VPH18 es baja en lesiones precancerosas, pero aumenta en cáncer. La carga viral de otros VPH de alto riesgo oncogénico muestra una tendencia inversa del VPH18 (Wu et al., 2016).

Por otra parte, 15.518 mujeres estudiadas también en China, de las cuales 3.199 (20,61%) resultaron positivas para detección de VPH y cuya carga viral fue cuantificada, permitió reportar los siguientes hallazgos: Las cargas virales de VPH 16, 31, 35, 52, 58, 39 y 56 fueron más bajas para las mujeres con citología normal en comparación con aquellas con progresión de la enfermedad; las cargas virales no fueron apreciables para el VPH 33, 18, 45, 59, 68, 53, 66 y 51. La carga viral de la especie 9 parecía significativamente mayor para las mujeres con NIC 2 / NIC 3 en relación con las mujeres con LIEBG / NIC 1 ($P < 0.001$), y significativamente menor en comparación con aquellas con CC ($P < 0.001$). La carga viral de la especie 6 del VPH fue ligeramente mayor para las mujeres con NIC 2 / NIC 3 en comparación con las mujeres con reporte normal / LIEBG / NIC 1 ($P = 0.002$), y no significativamente diferente de las mujeres con CC ($P = 0.548$). Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las especies 5 o 7 del VPH ($P = 0,898$; $P = 0,136$). Estos autores refieren que es probable que el riesgo asociado con la carga viral del VPH para desarrollar NIC y CC sea dependiente de la especie y se restrinja principalmente a la especie 9 (tipos filogenéticamente cercanos al VPH16). (Wang et al., 2018).

Se han reportado datos relacionados a la carga viral y su asociación con la infección persistente por VPH. En un estudio con 227 infecciones por VPH16 y 111 por VPH18 a las cuales se les realizó seguimiento, se encontró

que para infecciones con genotipo 16 un 58% fueron persistentes y para VPH18 un 44 %. La carga viral inicial fue significativamente mayor en las infecciones persistentes que en las infecciones que no lo fueron tanto para el VPH16 ($p = 0.022$) como para el VPH18 ($p = 0.013$). Al inicio del estudio, solo la carga viral del VPH16 fue significativamente mayor en múltiples infecciones por VPH en comparación con infecciones únicas ($p = 0.003$). En el análisis de regresión logística, se encontró que la carga viral de ambos genotipos contribuye a la persistencia. Estos autores concluyen que la carga viral de VPH16 / 18 podría usarse como un marcador para infecciones persistentes y se ve afectada por la presencia de múltiples infecciones por VPH. La evaluación de estos parámetros a nivel de la población puede ser valiosa para evaluar la presencia de infecciones persistentes de estos genotipos de VPH como un marcador temprano, y que puede proporcionar información cuantitativa útil en estudios epidemiológicos de monitoreo de vacunas (van der Weele et al., 2016).

La interpretación de los valores de la carga viral puede ser complicada, por su asociación con el estado físico del genoma viral y con la forma de infección (individual o múltiple); se sugiere que dichas observaciones sean examinadas tomando en cuenta las diferencias tipo-específicas observadas para la incidencia de NIC II/III y CC (Gravitt et al., 2007; Cheung et al., 2009).

Un análisis de 8.556 mujeres, de las cuales 13.67% dieron positivo para infección por VPH de alto riesgo con una prevalencia de 2.72% para NIC 2 y 1.65% para NIC 3, permitió observar una correlación significativa entre el aumento de los valores relativos de unidades de luz / control (RLU / CO) y el empeoramiento de las lesiones cervicales. Los valores medios de RLU / CO para negativo, NIC 1, NIC 2, NIC 3 y CC fueron 6.86, 119.43, 410.90, 449.39 y 853.26, respectivamente. Se encontró una mayor proporción de infecciones por VPH con carga viral relativamente alta en lesiones de grado superior. Se reporta entonces que el nivel de carga viral del virus del papiloma humano se asocia positivamente con el grado de lesión cervical. Diez unidades de luz relativas / control o más es un umbral viable para la colposcopia inmediata de las pacientes infectadas con VPH (Luo et al., 2017).

Un estudio analítico transversal incluyó 45 muestras positivas para VPH16 y 45 muestras positivas para VPH18 de pacientes con cáncer cervical o lesiones precursoras. Se empleó PCR en tiempo real para determinar el número de copias / 101 células. La carga viral se determinó en los dos grupos de pacientes correlacionándola con el grado tumoral. Los autores encontraron que la carga viral de VPH16 fue mayor que la del VPH18 ($p = 0.000$); a medida que progresaba la neoplasia maligna de la lesión cervical, la carga viral aumentó y el VPH16 mostró una asociación positiva moderada, mientras que el VPH18 mostró una correlación positiva débil. Se concluyó que la carga viral de VPH16 fue mayor que la de VPH18. La carga viral del genotipo 16 tuvo una

asociación positiva moderada en relación con la gravedad de la lesión cervical, mientras que la carga viral del genotipo 18 tuvo una correlación positiva débil con respecto al grado de lesión cervical (Ramírez et al., 2016).

En las infecciones de un solo tipo, las mediciones de la carga viral específicas del tipo de serie predicen la historia natural de infección. En infecciones con múltiples tipos de VPH, el perfil individual de carga viral específica del tipo podría distinguir las infecciones progresivas por VPH de las infecciones de regresión. Se realizó un estudio de cohorte utilizando muestras de mujeres no tratadas con múltiples infecciones por VPH que desarrollaron NIC 3 ($n = 57$) o eliminaron infecciones ($n = 88$). El sedimento celular enriquecido de muestras de citología basadas en líquido se sometió a un ensayo qPCR en tiempo real clínicamente validado (18 tipos de VPH). Mediante el uso de mediciones de carga viral específicas del tipo de serie (≥ 3) se calcularon las pendientes específicas del VPH y el coeficiente de determinación (R^2) por regresión lineal. Para cada mujer, se usaron pendientes y R^2 para calcular qué procesos inducidos por el VPH fueron de (progresión continua, regresión, transitorios en serie, transitorios). En las infecciones transitorias con múltiples tipos de VPH, cada tipo de VPH generó pendientes de carga viral crecientes (0.27 copias / célula / día) y decrecientes (-0.27 copias / célula / día). En NIC 3, al menos uno de los tipos de VPH tenía un curso progresivo clonal ($R^2 \geq 0.85$; 0.0025 copias / célula / día). En casos seleccionados de NIC 3 ($n = 6$) la detección de inmunotinción para VPH 16, 31, 33, 58 y 67 ARN específicos mostró una tinción uniforme en poblaciones clonales (NIC 3), mientras que en las infecciones transitorias productoras de viriones la tinción de ARN fue menor en la capa basal en comparación con la capa superior donde las células estaban listas para descamarse y liberar viriones recién formados. Los patrones de hibridación de ARN coincidieron con los procesos en curso calculados medidos por R^2 y la pendiente en las mediciones de carga viral específicas del tipo de serie que preceden a la biopsia. En las mujeres con múltiples tipos de VPH, las mediciones de la carga viral específica del tipo de serie predicen la historia natural de los diferentes tipos de VPH y aclaran la atribución del genotipo del VPH. (Depuydt et al., 2016).

La estimación semicuantitativa de la carga viral de VPH oncogénico por Captura Híbrida 2 se correlaciona bien con la carga viral estimada por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Se correlacionó la carga viral estimada por CH2 con la colposcopia y el diagnóstico histológico, para determinar si la alta carga viral podría detectar las lesiones NIC 2 o peores que no se diagnosticaron por la colposcopia en mujeres con VPH positivo. Se estudiaron 39.728 mujeres. Los resultados positivos se clasificaron en grupos de baja carga viral positiva, intermedia y alta, según las unidades relativas de luz / punto de corte. El VPH positivo y algunas mujeres negativas al VPH se sometieron a una colposcopia y una biopsia. Se detectaron un total de 278 lesiones NIC 2. La tasa de detección fue significativamente mayor en grupos de carga viral de nivel

intermedio y alta. Casi la mitad (48.3%) de las lesiones NIC 2 y 80.4% de las lesiones NIC 3, omitidas o no diagnosticadas por colposcopia tenían carga viral en rangos intermedios a altos. El riesgo de NIC 2 en el grupo de alta carga viral fue 46 veces mayor que las mujeres negativas para el VPH, incluso cuando la colposcopia era aparentemente normal. Estos hallazgos permitieron proponer que las mujeres que tienen una carga viral intermedia o alta deben someterse a múltiples biopsias por punción, incluso si la colposcopia es aparentemente normal o sugiere lesiones de bajo grado. Las mujeres con alta carga viral y sospecha de lesión de bajo grado en la colposcopia pueden ser consideradas para “ver y tratar”, ya que su riesgo de NIC 2 es casi 200 veces mayor que las mujeres con VPH negativo (Basu et al., 2016).

Un estudio realizado en la zona suroeste de China demostró que el VPH16 fue el subtipo de VPH cancerígeno más común, seguido de VPH58 y VPH33. Las cargas virales de estos subtipos están asociadas con la gravedad de las lesiones premalignas en el cuello uterino (Long et al., 2018).

CONCLUSIONES

Se observó una elevada prevalencia de infección por VPH, predominantemente de alto riesgo oncogénico; se evidencia que la citología no constituye un método útil para el diagnóstico de infección por VPH, debido a que un elevado porcentaje de mujeres positivas mostraron citologías normales o negativas para lesión o malignidad. A pesar de que no se encontró significancia estadística entre la carga viral y las lesiones citológicas y colposcópicas descritas, es de considerar que, en la mayoría de las muestras analizadas, la carga viral fue entre 10-100 (moderada) y >100 URL (alta) en muestras de mujeres con LIEBG y atipias colposcópicas DZT.

RECOMENDACIONES

Debido a que en diferentes trabajos relacionados al desarrollo de lesiones intraepiteliales y neoplasias intracervicales asociadas a infección por VPH, se ha descrito que los niveles moderados y elevados de carga viral de VPH de alto riesgo oncogénico pueden estar asociados a una rápida evolución o progresión de dichas lesiones, se recomienda la realización de trabajos de investigación en este tema que contribuyan a dilucidar el rol definitivo de este hallazgo.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declararon que no tienen ningún conflicto de interés.

AGRADECIMIENTO

Al personal médico y de enfermería del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA). Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos FONACIT-G- 2005000408 y FONACIT-G- 2007001088 financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela.

REFERENCIAS

- Basu, P., Muwonge, R., Mittal, S., Banerjee, D., Ghosh, I., Pya, C. y Sankaranarayanan, R. (2016). Implications of semi-quantitative HPV viral load estimation by Hybrid capture 2 in colposcopy practice. *J Med Screen*, 23(2):104-110. doi:10.1177/0969141315606483
- Boulet, G., Benoy, I., Depuydt, C., Horvath, C., Aerts, M., Hens, N. y Bogers, J. (2009). Human papillomavirus 16 load y E2/E6 ratio in VPH16-positive women: biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(11): 2992-99. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0025
- Campbell, K. (2006). The infectious causes of cancer. *Nurs Times*, 102(33):28-30.
- Castellsagué, X. (2008). Natural history y epidemiology of HPV infection y cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 110(3 Suppl 2):S4-7. doi:10.1016/j.ygyno.2008.07.045
- Cheung, J., Cheung, T., Ng, C., Yu, M., Wong, M., Siu, S. y Chan, P. (2009). Analysis of Human Papillomavirus Type 18 Load y Integration Status From Low-Grade Cervical Lesion to Invasive Cervical Cancer. *J Clin Microbiol*, 47(2):287-93. doi:10.1128/JCM.01531-08
- Correnti, M., Cavazza, M., Herrera, O. y Rodríguez, A. (2010). Presence of human Papillomavirus infection determined by hybrid capture assay in cervical lesions in a Venezuelan population. *Invest Clin*, 51(1):27-35.
- Coutlée, F., Rouleau, D., Ferenczy, A y Franco, E. (2005). The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 16(2):83-91. doi:10.1155/2005/798710
- Depuydt, C., Thys, S., Beert, J., Jonckheere, J., Salembier, G. y Bogers, J. (2016). Linear viral load increase of a single HPV-type in women with multiple HPV infections predicts progression to cervical cancer. *Int J Cancer*, 139(9):2021-2032. doi:10.1002/ijc.30238
- Ferenczy, A. y Franco, E. (2002). Persistent human papillomavirus infection y cervical neoplasia. *Lancet Oncol*, 3(1):11-6. doi:10.1016/s1470-2045(01)00617-9
- Ford, M., Mills, I., Peter, B., Vallis, Y., Praefcke, G., Evans, P. y McMahon, H. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905):361-6. doi:10.1038/nature01020

- Gravitt, P. (2011). The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest*, 121(12):4593-9. doi:10.1172/JCI57149
- Gravitt, P., Kovacic, M., Herrero, O., Schiffman, M., Bratti, C., Hildesheim, A. y Burk, R. (2007). High Load for Most High Risk Human Papillomavirus Genotypes Is Associated With Prevalent Cervical Cancer Precursors but Only HPV16 Load Predicts the Development of Incident Disease. *Int J Cancer*, 121(12):2787-93. doi:10.1002/ijc.23012
- Guo, M., Sneige, N., Silva, E., Jan, Y., Cogdell, D., Lin, E. y Zhang, W. (2007). Distribution y Viral Load of Eight Oncogenic Types of Human Papillomavirus (HPV) y HPV 16 Integration Status in Cervical Intraepithelial Neoplasia y Carcinoma. *Mod Pathol*, 20(2):256-66. doi:10.1038/modpathol.3800737
- Haghshenas, M., Golini, M., Rafiee, A., Emadeian, O., Shykhpour, A. y Ashrafi, G. (2013). Prevalence y type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study. *Infect Agent Cancer*, 8(1):20. doi:10.1186/1750-9378-8-20
- Kumar, K., Iyer, V., Bhatla, N., Kriplani, A. y Verma, K. (2007). Comparative evaluation of smear cytology & hybrid capture II for the diagnosis of cervical cancer. *Indian J Med Res*, 126(1):39-44.
- Long, W., Yang, Z., Li, X., Chen, M., Liu, J., Zhang, Y. y Sun, X. (2018). HPV-16, HPV-58, y HPV-33 are the most carcinogenic HPV genotypes in Southwestern China y their viral loads are associated with severity of premalignant lesions in the cervix. *Virol J*, 15(1):94. doi:10.1186/s12985-018-1003-x
- Luo, H., Belinson, J., Du, H., Liu, Z., Zhang, L., Wang, C. y Wu, R. (2017). Evaluation of Viral Load as a Triage Strategy with Primary High-Risk Human Papillomavirus Cervical Cancer Screening. *J Low Genit Tract Dis*, 21(1):12-16. doi:10.1097/LGT.0000000000000277
- Malagón, T., Louvanto, K., Ramanakumar, A., Koushik, A., Coutlée, F. y Franco, E. (2019). Viral Load of Human Papillomavirus Types 16/18/31/33/45 as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia y Cancer by Age. *Gynecol Oncol*, 155(2):245-253. doi:10.1016/j.ygyno.2019.09.010
- Mao, C., Koutsky, L., Ault, K., Wheeler, C., Brown, D., Wiley, D. y Barr, E. (2006). Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, 107(1):18-27. doi:10.1097/01.AOG.0000192397.41191.fb
- Mongelós, P., Páez, M., Rodríguez, I., Giménez, G., Castro, A. y Mendoza, L. (2013). Detección del virus del papiloma humano de alto riesgo por captura híbrida II® según hallazgos citológicos en mujeres tratadas por lesiones escamosas intraepiteliales de cuello uterino, período 2006/2010. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 16(1):40-48. doi:10.1590/S1415-790X2013000100004
- Muñoz, M., Mendoza, J., Téllez, L., Noguera, M., Moret, O. y López, M. (2003). Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cérvix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Rev Biomed*, 14(2):61-8.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington de González, A. y Gissmann, L. (2006). Chapter 1: VPH in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3:S3/1-10. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Núñez, J., Delgado, M., González, J., Mindiola, R., Velásquez, J., Conde, B. y Munroe, D. (2009). Prevalence y risk factors of human papillomavirus infection in asymptomatic women in a Venezuelan urban area. *Invest Clin*, 50(2):203-12.

- Parkin, D. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118(12):3030-44. doi:10.1002/ijc.21731
- Ramirez-Flores, M., Delgado-Enciso, I., Fernyez-Salinas, A., Valdez-Velazquez, L., Guzman-Esquivel, J. y Baltazar-Rodriguez, L. (2016). HPV 16 y 18 viral loads are greater in patients with high-grade cervical epithelial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*, 37(5):644-648.
- Saunier, M., Monnier-Benoit, S., Mauny, F., Dalstein, V., Briolat, J., Riethmuller, D. y Pr  tet, J. (2008). Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load y Physical State for Identification of HPV16-infected Women With High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. *J Clin Microbiol*, 46(11):3678-85. doi:10.1128/JCM.01212-08
- Téllez, L., Michelli, E., Mendoza, J., Vielma, S., Noguera, M., Callejas, D., Cavazza, M., y Correnti, M. (2015). Persistent infection with high-risk human papilloma viruses: cohort study, Mérida, Venezuela. *ecancer*, 9:579. doi: 10.3332/ecancer.2015.579
- van der Weele, P., van Logchem, E., Wolffs, P., van den Broek, I., Feltkamp, M., de Melker, H. y King, A. (2016). Correlation between viral load, multiplicity of infection, y persistence of HPV16 y HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *J Clin Virol*, 83:6-11. doi:10.1016/j.jcv.2016.07.020
- Wang, Q., Xu, P., Zhang, B., Dong, Y., Yang, Y., Cao, F. y Yu, B. (2010). Human papiloma virus screening by hybrid capture II in Chinese women of Jiangsu Province. *West Indian Med J*, 59(5):469-72.
- Wang, W., Zhang, X., Li, M., Hao, C., Zhao, Z. y Liang, H. (2018). Association Between Viral Loads of Different Oncogenic Human Papillomavirus Types y the Degree of Cervical Lesions in the Progression of Cervical Cancer. *Clin Chim Acta*, 483:249-255. doi:10.1016/j.cca.2018.05.016
- Wu, Z., Qin, Y., Yu, L., Lin, C., Wang, H., Cui, J. y Chen, W. (2016). Association Between Human Papillomavirus (HPV) 16, HPV18, y Other HR-HPV Viral Load y the Histological Classification of Cervical Lesions: Results From a Large-Scale Cross-Sectional Study. *J Med Virol*, 89(3):535-541. doi:10.1002/jmv.24645
- Wu, Z., Yu, L., Lei, X., Qin, Y., Zhang, X., Chen, W. y Qiao, Y. (2018). The Association Between Human Papillomavirus 16, 18 DNA Load y E6 Protein Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia y Cancer. *J Clin Virol*, 108:6-11. doi:10.1016/j.jcv.2018.08.008
- Xu, Y., Dotto, J., Hui, Y., Lawton, K., Schofield, K. y Hui, P. (2009). High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia y Viral Load of High-Risk Human Papillomavirus: Significant Correlations in Patients of 22 Years Old or Younger. *Int J Clin Pathol*, 2(2):169-75.
- Zhao, X., Zhao, S., Hu, S., Zhao, K., Zhang, Q., Zhang, X. y Zhao, F. (2019). Role of Human Papillomavirus DNA Load in Predicting the Long-term Risk of Cervical Cancer: A 15-Year Prospective Cohort Study in China. *J Infect Dis*, 219(2):215-222. doi:10.1093/infdis/jiy507

Autores:

Cañarte, Jorge

MD Medicina y Cirugía. Especialista en Inmunología Clínica Magister en Investigación Clínica y Epidemiológica. Universidad de Guayaquil. Doctor en Salud Pública. Docente investigador Universidad Técnica de (UTM).
Publicación de 3 Libros y varios artículos en el área de Inmunología Clínica.
Correo-e: jcanarte@utm.edu.ec
ORCID: <https://orcid.org/000-0003-3364-0306>

Giler, Miguel

Doctor en Medicina General. Docente/tutor / Universidad de Guayaquil, tutor de internado rotativo en medicina familiar y comunitaria. Médico de primer nivel de atención Instituto Ecuatoriano de Seguridad Consulta externa de medicina general y emergencia, medico supervisor del SSC zonal 6. Médico de primer nivel de atención IES
Correo-e: miguel_giler3@hotmail.com
ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1739-3926>

Saavedra, Stefan

Médico Universidad Católica de Cuenca. Residente Hospital San Juan de Dios, Interno Medicina General. Pasante de Medicina Hospital del IESS. Capacitación en Colposcopia y Cáncer de Cuello Uterino. Urgencias Médicas
Correo-e: stefansaa_24@hotmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2688-8648>

Téllez, Luis

Profesor Titular e Investigador del Departamento de Microbiología de la Universidad de Los Andes (ULA), con diversas publicaciones en el área de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Tutorías y Formación de Personal, Coordinador de Proyectos y Reconocimiento a Mejor Publicación y Posters en Congresos Internacionales.
Correo-e: letellezenator@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6470-7564>

Callejas, Diana

Licenciada en Biología, M. Sc. Inmunología Básica, Especialista en Virología, Doctora en Inmunología, Inflamación y Cáncer. Docente e investigadora, Universidad del Zulia, Universidad de Los Andes y Universidad Técnica de Manabí. Coordinadora del Laboratorio Regional de Referencia Viroológica. Numerosas publicaciones en revistas arbitradas y presentaciones en eventos científicos
Correo-e: callejas.diana60@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7864-5357>