



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACION
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO**

**Caracterización de la respuesta inmune de
anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes hasta
en un período de 5 años en mujeres vacunadas contra
HPV18**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR
QUE PRESENTA**

Biol. AISLINN CITLALI PÉREZ MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

Cuernavaca, Morelos, México a 7 junio, 2021.

Trabajo realizado en el periodo de enero-2019 a enero-2021.

Miembros del comité tutorial:

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Dra. Vera Lucia Petricevich

Dra. Judith González Christen

Dr. Armando Herrera Arellano

Miembros del jurado de examen:

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Dr. José Luis Montiel Hernández

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia †

Dra. María Angélica Santana Calderón

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios, por permitirme culminar los estudios de maestría, así como darme salud y fortaleza. También a mi mamá Rebeca y mis tíos Martha y Javier, por apoyarme a lo largo de este camino y por su amor incondicional.

A la Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl, por la confianza de permitir seguir trabajando en el laboratorio, por las enseñanzas, la paciencia y motivación para poder desarrollarme en este camino. Gracias por permitirme participar en otras actividades y proyectos.

A mis sinodales, por soportar mis insistentes correos y por sus correcciones, ya que fueron vitales para poder consolidar todas las ideas que teníamos alrededor del proyecto, así como esforzarme para entregar un trabajo satisfactorio.

Al Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, en donde realicé este trabajo.

A mis amigos presentes y pasados, quienes han compartido mis alegrías, tristezas, sueños, metas y comidas. Gracias por escucharme y por darme palabras de aliento.

* Este proyecto fue financiado a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social de CONACYT con No. 290022.

Lista de abreviaturas

CaCu: Cáncer Cérvico uterino

cLIA: Inmunoensayo competitivo Luminex

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (siglas en inglés)

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (siglas en inglés)

GSK: GlaxoSmithKlein

HSPG: Heparán Sulfato Proteoglicanos

HPV: Virus del Papiloma Humano (siglas en inglés)

HR: High risk (siglas en inglés)

IP: Índice de protección

LCR: Long Control Region (siglas en inglés)

LR: Low risk

ORFs: Marcos de lectura abierto (siglas en inglés)

pRB: Proteína Retinoblastoma

Pap: Papanicolaou

PC: Punto de corte

VLPs: Virus-like-particicle (siglas en inglés)

Tabla de contenido

Resumen.....	1
1. Introducción	3
2. Marco teórico	5
2.1 Aspectos epidemiológicos del Cáncer Cérvico Uterino.....	5
2.2 Historia natural del HPV	6
2.3 Progresión del cáncer debido a la desregulación del ciclo viral.....	9
2.4 Respuesta inmune contra HPV	10
2.5 Vacunas profilácticas contra HPV	12
3. Justificación.....	16
4. Preguntas de investigación	18
5. Hipótesis	18
6. Objetivos	19
6.1 Objetivo General.....	19
6.2 Objetivos específicos	19
7. Materiales y métodos.....	19
7.1 Tipo de estudio y diseño en general	19
7.2 Población de estudio.....	19
7.3 Criterios de inclusión y exclusión	21
7.4 Ensayos de ELISA.....	21
7.4.1 ELISA-L1.....	21
7.4.2 ELISA VLPs.....	22
7.4.3 Análisis estadístico.....	22
7.5 Consideraciones éticas	22
8. Resultados.....	23
8.1 Estandarización de ensayo ELISA-L1 y ELISA-VLPs HPV18	23
8.1.1. Titulación de suero de conejo positivo para Ac α L1-HPV18	23
8.1.2 Estandarización de cantidad de proteína L1-HPV18 por pozo.....	23
8.1.3 Estandarización de 2ª Ac cabra α -Conejo para α L1-HPV18 de conejo.....	24
8.1.4 Titulación de suero positivo α VLPs-HPV18 de conejo.....	25
8.1.5 Estandarización de concentración de proteína VLPs-HPV18 por pozo.....	26
8.1.6 Estandarización de 2do Ac cabra α -Conejo para α VLPs-HPV18 de conejo.....	27
8.1.7 Validación de los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs.	28
8.2 Determinación los niveles de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 contra HPV18 en el banco de suero de mujeres vacunadas.	32

8.3	<i>Determinación del índice de protección para HPV18 en el banco de suero de mujeres vacunadas</i>	40
8.3.1	Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 7.....	46
8.3.2	Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 61.....	49
8.3.3	Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección positivo al mes 0.....	52
8.3.4	Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 0.....	53
9.	<i>Discusión.</i>	54
10.	<i>Conclusiones</i>	60
11.	<i>Limitaciones del estudio.</i>	61
	<i>Bibliografía</i>	62
	Anexo 1	70
	Anexo 2	76
	Figura 1. Taxonomía de la familia <i>Papillomaviridae</i> y los cinco géneros representativos.....	7
	Figura 2. Organización del genoma viral de HPV.	8
	Figura 3. Ciclo de vida del HPV en cada uno de los grados de lesiones.	10
	Figura 4. Ensamblaje de las VLPs.....	12
	Figura 5. Tipos de HPV que conforman las vacunas bivalente, cuadrivalente y nonavalente, así como, el porcentaje de prevención de verrugas genitales y CaCU.	13
	Figura 6. Seguimiento de los títulos de anticuerpos contra HPV16 en el suero de mujeres vacunadas contra HPV16 y 18	14
	Figura 7. Diseño de la población de estudio.	20
	Figura 8. Titulación de α L1-HPV18 de conejo.....	23
	Figura 9. Estandarización de la cantidad óptima de proteína L1 por pozo.....	24
	Figura 10. Titulación de cabra α -Conejo para α L1-HPV18 de conejo.	25
	Figura 11. Titulación de α VLPs-HPV18 de conejo.	26
	Figura 12. Estandarización de la cantidad optima de proteína VLPs por pozo.	27
	Figura 13. Titulación de cabra α -Conejo para α VLPs-HPV18 de conejo.....	28
	Figura 14. Selección de sueros positivos y negativos para los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs.	30
	Figura 15. Razón de absorbancias de α L1-HPV18 y α VLPs-HPV18 de sueros humanos.	31
	Figura 16. Niveles de anticuerpos anti-VLPs-HPV18 en diferentes tiempos post-vacunación. ...	34
	Figura 17. Niveles de anticuerpos anti-L1-HPV18 en diferentes tiempos post-vacunación.	37
	Figura 18. Tendencia de las medianas de los niveles anti-VLPs-HPV18 y anti-L1-HPV18 en diferentes tiempos post-vacunación.	39
	Figura 19. Tendencia de la mediana del índice de protección en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación contra HPV.	41

Figura 20. Correlación del índice de protección con la resta de anti-VLPs vs anti-L1 y los niveles de anti-VLPs.	45
Figura 21. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 7 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación.	47
Figura 22. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 61 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación.	50
Figura 23. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección positivo al mes 0 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación.	52
Figura 24. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 0 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación.	54
Tabla 1. Ajuste de la dilución de α L1-HPV18 y de la concentración de proteína VLPs por pozo.	29
Tabla 2. Coeficiente de variación de sueros controles de ELISA-VLPs y ELISA-L1.	32
Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de los ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1.	32
Tabla 4. Puntos de corte para ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1 HPV18.	33
Tabla 5. Seroprevalencia de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 HPV18 en diferentes esquemas y tiempos post-vacunación.	35
Tabla 6. Índice de protección de las mujeres vacunadas en diferentes tiempos post-vacunación.	41
Tabla 7. Caracterización de mujeres vacunadas con un índice de protección negativo al mes 7 en diferentes tiempos post-vacunación.	46
Tabla 8. Mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 61 en diferentes tiempos post-vacunación.	49
Tabla 9. Mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo en el mes 0 en diferentes tiempos post-vacunación.	53

Resumen

Introducción: La vacuna contra HPV se desarrolló con VLPs (Virus Like Particles) las cuales han servido para proteger a mujeres y hombres contra infecciones y cánceres asociados con tipos de HPV de alto riesgo como 16 y 18. Los niveles de protección de la población vacunada contra HPV se realiza en base a anticuerpos neutralizantes, pero hasta ahora no existe un ensayo universal con el cual se pueda evaluar esta protección. Los anticuerpos neutralizantes se han evaluado a través de inhibición de la infección con pseudopartículas virales, un inmunoensayo por competencia Luminex, por hemaglutinación de eritrocitos y con ELISA-VLPs, pero mientras que los primeros son técnicamente complejos y costosos, el ELISA-VLPs es poco específico ya que este ensayo detecta anticuerpos contra epítopes conformacionales (anti-VLPs) y contra epítopes lineales (proteína L1). Por ellos en este estudio se implementó un doble ensayo de ELISA-VLPs y ELISA-L1 para HPV18, el cual permitió diferenciar la respuesta generada por adolescentes y jóvenes contra la vacuna tetravalente.

Objetivo: Comparar los niveles de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 contra HPV18 a 7, 21 y 61 meses después de la vacunación contra HPV en adolescentes y mujeres jóvenes.

Métodos: Se realizaron ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1 para HPV18 utilizando sueros humanos de adolescentes (9-13 años) y jóvenes (18-24 años) que recibieron la vacuna tetravalente con esquema de vacunación tradicional (0-2-6 meses) o extendido (0-6-60 meses) y seguidas hasta por 61 meses.

Resultados: Se evaluaron 178 adolescentes (esquema tradicional, n=124; esquema extendido, n=54), cada una tenía 3 muestras de seguimiento (7-21-61 meses post-vacunación); 116 mujeres jóvenes (esquema tradicional), cada una tenía 4 muestra de seguimiento (0-7-21-61 meses post-vacunación). Se analizaron un total de 998 muestras a través de ELISA-VLPs y L1 para HPV18. El coeficiente de variación entre ensayos fue de menos del 10% para ambos ensayos. La sensibilidad y especificidad del ELISA-VLPs fue del 100%. EL ELISA-L1 presento una sensibilidad del 100% y una especificidad del 71.93%. Las estimaciones obtenidas de los criterios antes mencionados validan los ensayos ELISA-VLPs y L1 utilizados en este trabajo. Los títulos de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 tienen un patrón similar al mes 7 del esquema de vacunación, observándose títulos altos en las adolescentes con el esquema tradicional (M~ 450,000 UE/mL; M~75,000 UE/mL,

respectivamente) y títulos bajos en las jóvenes con el mismo esquema (M~ 170,000 UE/mL; M~ 50,000 UE/mL, respectivamente), mientras que en las adolescentes con el esquema extendido se observaron títulos un poco más bajos que en el esquema tradicional para anti-VLPs (M~340,000 UE/mL), pero muy semejantes para anti-L1 (M~70,000 UE/mL), siendo la respuesta de anti-VLPs más robusta que la generada contra anti-L1. Todos los títulos de anticuerpos disminuyeron al mes 21 y se mantuvieron bajos hasta el mes 61 en las adolescentes y jóvenes con el esquema tradicional (M~ 20,000 a 50,000, anti-L1 y anti-VLPs, respectivamente). Sin embargo, las adolescentes que recibieron una reinmunización al mes 60 presentaron un aumento significativo en los títulos de anti-VLPs (M~ 350,000 UE/mL) mientras que los títulos de anti-L1 ya no aumenta con la reinmunización (M~ 30,000 UE/mL). Al realizar el análisis con el índice de protección (IP, anti-VLPs/ anti-L1) nos permitió determinar los niveles reales de anticuerpos neutralizantes (anti-VLPs) que presentan las adolescentes y jóvenes después de la vacunación contra HPV a lo largo del tiempo. Adolescentes y jóvenes que recibieron el esquema tradicional, mantuvieron un IP estable desde el mes 21 hasta el 61 (IP~ 4.5 y 3.5, respectivamente), mientras que las adolescentes que recibieron el esquema extendido, presentaron un IP mayor a 10, lo que sugiere altos títulos de anticuerpos anti-VLPs.

Conclusión: Después de la vacunación contra HPV, las adolescentes presentaron títulos de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 más altos que las jóvenes, pero la tendencia fue hacia la baja con el paso del tiempo en todos los grupos. Sin embargo, la reinmunización al mes 60 permite el incremento en los títulos de anticuerpos anti-VLPs, pero no así de anti-L1. Obtener el IP nos permitió determinar el grado de protección generado por la vacunación, observándose que la mayor protección se observó en las adolescentes con el esquema extendido. Este resultado apoya el uso del esquema de vacunación de 0-6-60 meses para las adolescentes y sugiere que debería de realizarse una prueba del esquema extendido de inmunización con el grupo de jóvenes de 18 a 24 años, con el que se pudiera mejorar la respuesta protectora anti-VLPs.

1. Introducción

En 1970, el virólogo alemán Harold zur Hausen, fue el primero en describir la asociación del virus de papiloma humano (HPV) con el cáncer cervicouterino (Burd & Dean, 2016; Hausen, 2002); mientras que en 1976, Meisels y Fortin, establecen que los HPV provocan diferentes tipos de lesiones en el cervix debido a la presencia de coilocitos en frotis cervicales (Meisels & Fortin, 1976). Los HPVs siguen siendo una de las causas más comunes de infecciones de transmisión sexual a nivel mundial. Los HPVs infectan células epiteliales, lo que provoca desde infecciones asintomáticas, verrugas, neoplasias hasta cáncer (Doorbar, 2006). A la fecha, se han identificado más de 200 tipos de HPVs, y alrededor de 40 infectan el tracto anogenital.

La vía más común de transmisión horizontal es por la actividad sexual, al tener contacto con el tejido mucoso de la vagina, cérvix, pene y ano. Otra forma es la transmisión vertical, en donde la madre transmite la infección al bebé al momento del parto, donde el HPV puede infectar la mucosa del tracto superior aerodigestivo. Algunos de los factores de riesgo para la infección por HPV, son el tener diferentes parejas sexuales, inicio temprano de actividad sexual, uso de anticonceptivos de barrera, fumar, presentar alguna infección de transmisión sexual o inmunosupresión (IARC, 2007).

Debido a esto, se han buscado desarrollar vacunas profilácticas y terapéuticas, para prevenir o tratar las lesiones provocadas por la infección. Al momento, existen 3 vacunas profilácticas, que están dirigidas contra la proteína mayoritaria de la cápside, o L1, tanto de tipos de HPVs que generan verrugas, así como los que generan lesiones en cérvix y cáncer. La vacunación induce la protección a través de la producción de anticuerpos neutralizantes, siendo los títulos de 10 a 100 veces más altos que los producidos por la infección natural (Burd, 2003; Stanley, Pinto, & Trimble, 2012).

Ensayos en ratones, conejos y macacos demuestran que concentraciones muy bajas de anticuerpos son protectores contra la infección por HPV, pero en los seres humanos, no se ha logrado establecer cuál es la concentración mínima para tener protección, debido a que los ensayos utilizados no discriminan entre anticuerpos

neutralizantes, que en su mayoría son contra epítopes conformacionales; de los anticuerpos no neutralizantes, que generalmente son contra epítopes lineales. En nuestro laboratorio se han seguido los niveles de anticuerpos anti-L1-HPV16 y anti-VLPs-HPV16 en mujeres vacunadas, para determinar el nivel real de protección a través de determinar un índice de protección (relación de anticuerpos anti-VLPs/ anti-L1). Actualmente, se desconocen los niveles de anticuerpos neutralizantes verdaderos contra los otros tipos de HPVs presentes en las vacunas. Por lo que este proyecto, tiene la finalidad de evaluar el nivel de protección de los anticuerpos dirigidos contra epítomos lineales y conformacionales de HPV18, a mediano y largo plazo, en una muestra de mujeres adolescentes (9-13 años) y jóvenes (18-24 años) que han sido vacunadas contra HPV.

2. Marco teórico

2.1 Aspectos epidemiológicos del Cáncer Cérvico Uterino.

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo el cuarto cáncer más común en mujeres de todas las edades y el quinto a nivel mundial. La incidencia de CaCu en el 2018 fue de 569,847, lo que representa el 6.6% del total de cánceres femeninos; la prevalencia (5 años), fue de 1,474,265 casos, que representa 6.5% del total de casos y la mortalidad fue de 311,365 muertes, que representa el 7.5% del total (Bray et al., 2018). Los países con mayor tasa de incidencia están ubicados en regiones en vías de desarrollo de los continentes de África, Asia y América. Mientras que los países desarrollados, muestran una tendencia en la disminución de la incidencia y mortalidad (Drain, Holmes, Hughes, & Koutsky, 2002; Hernández-Hernández, Apresa-García, & Patlán-Pérez, 2015; Läärä, Day, & Hakama, 1987; Vaccarella et al., 2014). La tasa de mortalidad también es más alta en los países en vías de desarrollo, lo cual se debe al diagnóstico tardío de la enfermedad, así como a factores culturales, sociales y religiosos de la población (Brookfield, Cheung, Lucci, Fleming, & Koniaris, 2009).

En México, en el 2018, el CaCu fue la segunda causa de muerte por cáncer, con 4,121 defunciones que representa el 9.6% del total. La incidencia, fue de 7,869 casos nuevos, representando el 7.5%, mientras que la prevalencia (5 años), fue de 22,769 casos, representando el 8.2%, ocupando el CaCu el cuarto lugar (Bray et al., 2018). De acuerdo a cifras del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el 2011, los estados con mayor mortalidad debido al CaCu, fueron Morelos, con una tasa de 9.2/100,000 mujeres derecho habientes, Tamaulipas y Quintana Roo de 9.0/100,000 mujeres; la media nacional fue de 5.4/100,000 mujeres y los estados con menor mortalidad, fueron Durango y Baja California Sur con una tasa de 1.5/100,000 y 1.3/100,000 mujeres, respectivamente (Hernández-Hernández et al., 2015).

El agente etiológico relacionado con el desarrollo de CaCu es el Virus de Papiloma Humano (HPV por sus siglas en inglés), que se transmite principalmente por vía sexual (Hausen, 2002), pero este virus también está relacionado con el desarrollo de otros tipos de cáncer en otros sitios anatómicos, como son el cáncer anogenital (vagina, ano, pene), tracto aerodigestivo (cavidad oral, orofaríngeo, esófago, laringe), nariz, pulmón, ovario, seno,

entre otros. En el 2012, se reportaron aproximadamente 630,000 casos de cáncer atribuidos a la infección por HPV de los tipos de alto-riesgo, a nivel mundial, y de estos casos aproximadamente 570,000 fueron reportados en mujeres y 60,000 en hombres. En el continente Americano, se presentaron 110,000 casos, de los cuales 96,000 casos fueron reportados en mujeres y 14,000 casos en hombres (Plummer et al., 2016).

Los tipos más prevalentes asociados al CaCu en el mundo son HPV16 y HPV18, con una prevalencia mundial entre 2.3% a 3.5% y de 0.7% a 1.2%, respectivamente (Bosch et al., 2008; de Sanjosé et al., 2007; Fleury et al., 2006; IARC, 2012). Las mujeres son más susceptibles a contraer una infección por HPV; la duración media de esta infección es de menos de un año, pero las infecciones con virus oncogénicos son más persistentes que aquellas con virus no oncogénicos, lo que permite el desarrollo de lesiones en el cérvix uterino, de manera que la persistencia de las infecciones por HPV de alto-riesgo son consideradas como un factor de riesgo para la enfermedad. En los hombres, las infecciones con virus no oncogénicos y oncogénicos presentan la misma duración y su eliminación se lleva a cabo en promedio entre 6 a 8 meses, más rápido que en las mujeres. Por lo que es de importancia entender la historia natural del HPV.

2.2 Historia natural del HPV

Los HPVs son un grupo diverso de virus que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Los virus que se asocian a humanos se dividen en 5 géneros que son Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Mu-papillomavirus, Nu-papillomavirus, y Gamma-papillomavirus, esto de acuerdo, con la secuencia del gen L1 del virus. Los tipos de HPV pertenecientes a estos 5 géneros presentan diferencias en el ciclo viral y en su tropismo (Figura 1) (Doorbar et al., 2012).

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18

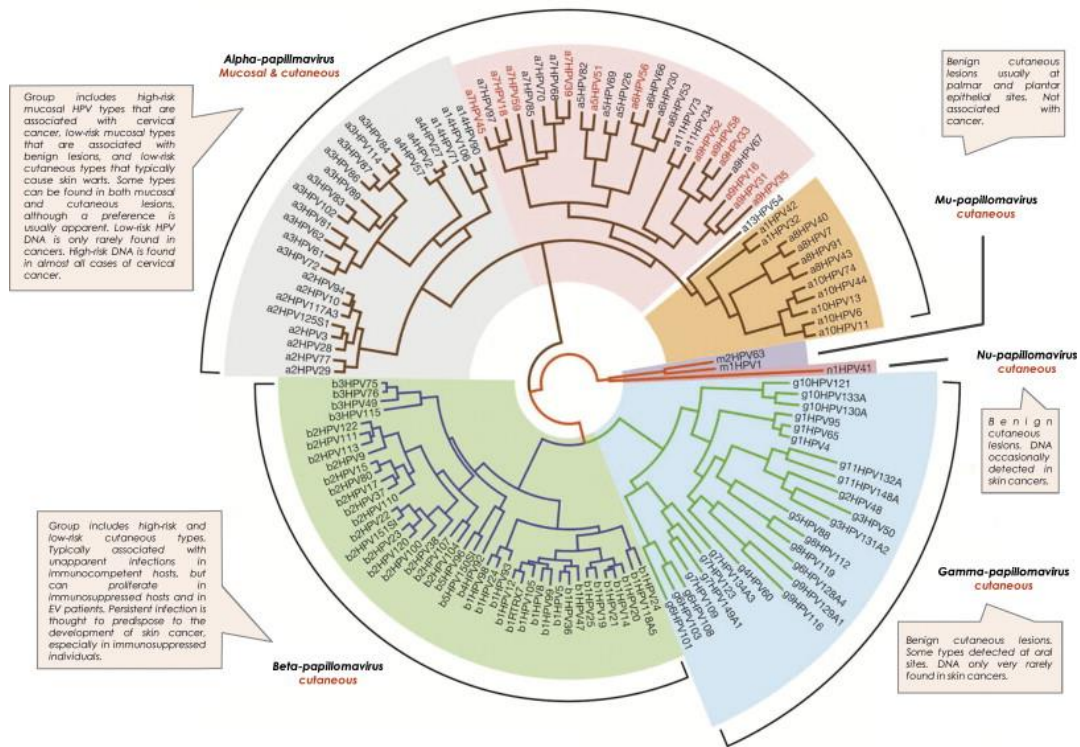


Figura 1. Taxonomía de la familia Papillomaviridae y los cinco géneros representativos. (Tomado de Doobar et. al, 2012).

Los tipos de HPV que pertenecen a los géneros Beta-papillomavirus, Mu-papillomavirus, Nu-papillomavirus, Gamma-papillomavirus son clasificados como cutáneos, infectando el tejido epidérmico de la boca, garganta, tracto respiratorio, entre otros (Hausen, 2002), y causan infecciones asintomáticas en pacientes inmunocomprometidos (Nindl, Gottschling, & Stockfleth, 2007). En cambio, los tipos de HPV del género Alpha-papillomavirus, provocan papilomas visibles y, de acuerdo al grado de lesión que generan, se clasifican o agrupan en HPVs de bajo riesgo (LR) y alto riesgo (HR). Los HPVs-LR están asociados al desarrollo de verrugas genitales, por ejemplo 6, 11, 42, 43 y 44. Mientras que los HPVs-HR que están relacionados con el desarrollo de CaCU, incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (Doorbar et al., 2012).

Los HPVs son virus pequeños, sin envoltura con una cápside icosaédrica, de 50-60 nm de diámetro, que contiene un DNA circular de doble cadena de entre 7,000- 8,000 pb que codifican para 8 marcos de lectura abiertos (ORFs) que transcriben las proteínas virales. Este DNA se divide en tres regiones: una región de control larga (LCR), que regula la replicación y la expresión de los genes virales; la región temprana (E), que codifica las

proteínas tempranas (no estructurales) E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que participan en la replicación, expresión, supervivencia y oncogénesis viral; y la región tardía (L), que codifica a las proteínas tardías (estructurales) L1 y L2, que conforman la cápside viral (Figura 2). La letras E y L hacen referencia a la parte del ciclo viral en que son expresadas (Doorbar, 2006; Doorbar et al., 2012; IARC & Sheets, 2017).

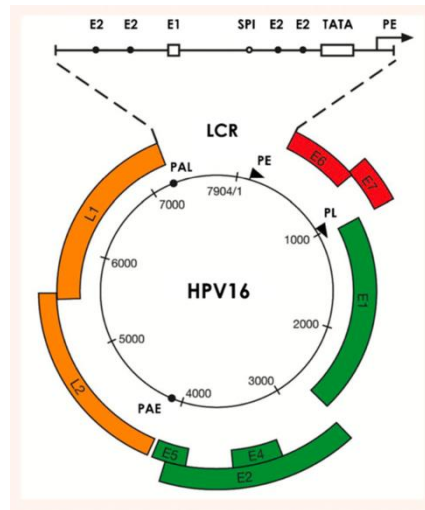


Figura 2. Organización del genoma viral de HPV. Función de las proteínas virales en el ciclo viral del HPV (Tomado de Doorbar et al., 2012)

Los primeros genes que son transcritos durante el ciclo viral son *E6* y *E7*, donde los factores celulares interactúan con el LCR del genoma viral, iniciando la transcripción de estas proteínas oncogénicas. La proteína *E6*, funciona en conjunto con la proteína *E7*, para proporcionar el ambiente idóneo para la replicación del DNA viral. La proteína *E6* se une a *p53* y lo dirige a ubiquitinación, provocando que el ciclo celular no pueda detenerse en *G1*, evitando la regulación celular en caso de daño. *E7* se asocia con la proteína de retinoblastoma (*pRB*) fosforilada separándola del factor de transcripción *E2F*, también interactúa con *p107* y *p130*. Todo esto promueve un ambiente favorable para la replicación viral, ya que mantiene a los queratinocitos en la fase *S* del ciclo celular por mayor tiempo (Doorbar et al., 2012).

No todos los tipos de HPVs presentan un ORF para *E5* en su genoma viral, pero al encontrarse, codifica a la proteína *E5* que también es oncogénica. *E5* interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidermal (*EGFR*), interfiriendo con la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (*MAPKs*). Por lo tanto, induce un incremento en

la actividad de las MAPKs, lo que genera un aumento en la proliferación y diferenciación celular (Doorbar et al., 2012).

Los siguientes ORFs expresan la proteína E1, que tiene actividad de helicasa. Al unirse al origen de replicación dentro del LCR, recluta toda la maquinaria de replicación de la célula huésped, para poder iniciar la replicación viral en la fase S del ciclo celular; y la proteína E2, ayuda a reclutar E1, formando complejos hexaméricos que mejoran la replicación viral. Además E2 tiene la capacidad de funcionar como un represor o activador transcripcional, o ayudando en la transferencia del DNA viral a células hijas de la célula huésped (Burd & Dean, 2016; Doorbar, 2006).

Posteriormente, se expresa la proteína E4 pero solo en las células diferenciadas del epitelio estratificado, una de sus funciones es detener el ciclo en la fase G2/M coadyuvando a la amplificación del DNA viral y posteriormente a la liberación de los viriones sintetizados mediante la ruptura de las redes de citoqueratina, pero el proceso de liberación no es citolítico, sino es por medio de la descamación de las células diferenciadas que se encuentran en la parte apical del epitelio. Además, se activan los ORFs de los genes tardíos, que codifican a las proteínas L1 y L2, que se ensamblarán formando una cápside icosaédrica alrededor del DNA viral para formar el virión maduro que será liberado (Burd, 2003; Doorbar, 2006; Doorbar et al., 2012; IARC, 2007, 2012).

2.3 Progresión del cáncer debido a la desregulación del ciclo viral.

Derivado de la persistencia de la infección por HPVs-HR, existe una integración del DNA viral al genoma celular, lo que produce la pérdida de la expresión de la proteína E2 que es el regulador natural de los oncogenes *E6* y *E7* permitiendo así, la transformación celular y la progresión hacia cáncer.

La progresión de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se clasifican en 3 niveles (NIC1 a NIC3), y en cada uno de ellos hay diferentes niveles de expresión de las proteínas virales que influyen en el desarrollo de la lesión. En el grado NIC1 (Infección productiva), se conserva la capacidad de completar el ciclo viral y la producción de viriones, debido a que el genoma viral se encuentra en forma episomal. La desregulación y el aumento de la expresión génica viral, en especial *E6* y *E7*, conduce al fenotipo NIC2, que contribuye a la progresión del cáncer, debido a la acumulación de cambios genéticos y

predispone la integración del episoma viral en el genoma celular. Pero la integración del episoma viral, conlleva a desregular aún más la expresión de E6 y E7 y la pérdida de expresión de E1, E2, E4, E5, L1 y L2, acumulando más cambios genéticos que conllevan a alteraciones de un tercio del epitelio en NIC3 y finalmente, esto puede conducir a CaCu. En algunos casos, el paso de NIC1 y NIC2 puede darse poco después de la infección, esto podría deberse a cambios en la señalización celular provocados por cambios hormonales (que modulan en LCR), lo que favorece la desregulación de la expresión génica viral (Figura 3) (Doorbar et al., 2012; Gariglio, Gutiérrez, Cortés, & Vázquez, 2009; Paavonen et al., 2007, 2009; Quint et al., 2012).

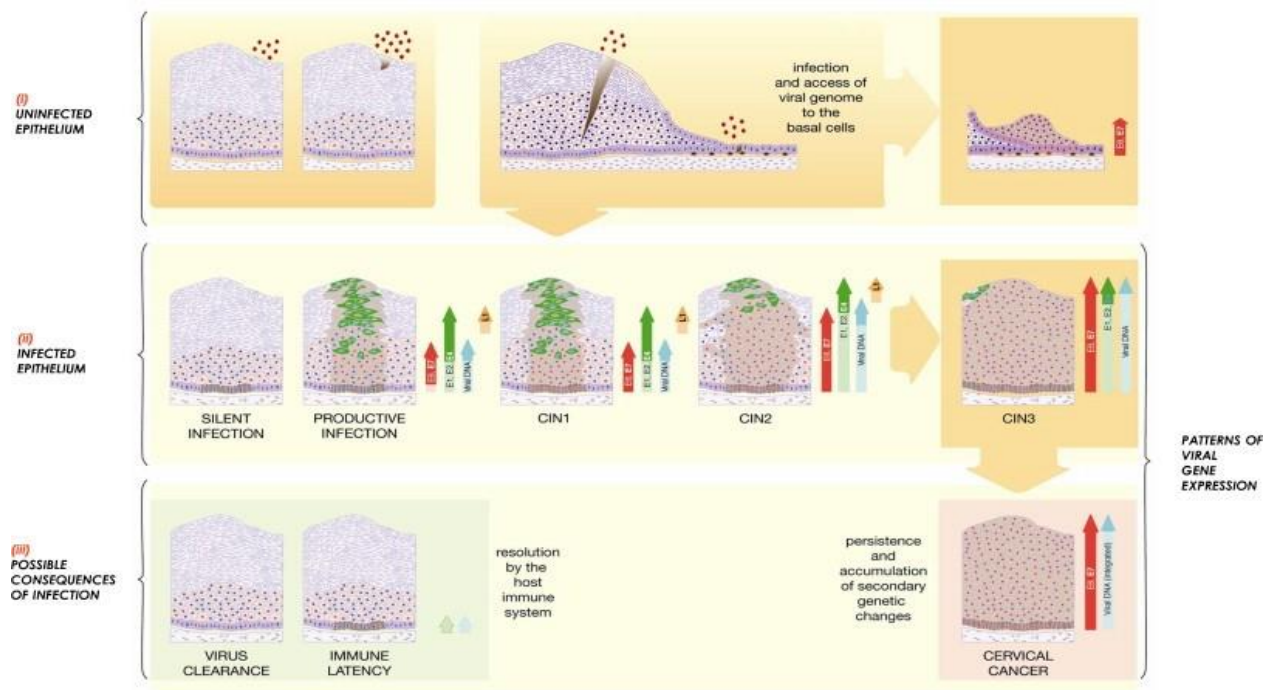


Figura 3. Ciclo de vida del HPV en cada uno de los grados de lesiones.

2.4 Respuesta inmune contra HPV

Si bien la mayoría de las personas se contagian en algún momento de su vida con HPV, el desarrollo de CaCU es el resultado de infecciones persistentes en las mujeres. La mayoría de las infecciones (80-90%) se eliminan sin una manifestación clínica como resultado de la respuesta inmune adaptativa mediada, al parecer, por células T CD4+ específicas de antígeno, por lo que, no persisten el tiempo suficiente para producir la

desregulación de la expresión génica, así como tampoco la acumulación de cambios genéticos en la célula huésped. La evasión del sistema inmune por parte del HPV está estrechamente relacionada con el ciclo de vida del virus, ya que es exclusivamente intracelular, sin viremia, citólisis o apoptosis inducida por el virus. Debido a esto, no hay una correcta presentación de antígeno necesaria para desarrollar la respuesta inmune adaptativa, además de que la replicación y liberación del virus no induce inflamación, por lo que, la respuesta inmune innata tarda en activarse (Westrich, Warren, & Pyeon, 2017).

El hecho de no lograr desarrollar una respuesta inmune mediada por células da como resultado una infección persistente y en caso de HPV18, que es un HPV-HR, hay una mayor probabilidad de desarrollar un NIC3 y cáncer invasivo (de Sanjose et al., 2010).

En caso de la respuesta adaptativa humoral por la infección, esta es lenta y de tipo específico, produciendo principalmente IgG, de tipo inmuno-dominante principalmente contra la proteína mayoritaria de la cápside L1, debido a que contiene epítomos repetitivos y complejos. Cuando se presenta el antígeno, el sistema inmune producirá una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes contra los epítomos más expuestos y conformacionales, a diferencia con epítomos menos expuestos y lineales, los cuales producirán anticuerpos no neutralizantes (Carpentier et al., 2005; N. D. Christensen et al., 1994; Giroglou et al., 2001; Rose et al., 1998; White et al., 1998). Sin embargo, en la infección natural con HPV los títulos de anticuerpos suelen ser bajos y al parecer se generan contra epítomos lineales de la cápside. Es por ello, que los anticuerpos anti-L1 son un marcador serológico de infecciones pasadas o presentes (Fleury et al., 2006). Otro aspecto que influye es la variabilidad en los epítomos más expuestos de cada tipo de HPV, por lo que la respuesta es tipo específico. La seroconversión de las mujeres infectadas es entre 50-70% y se da en un período de 8-9 meses (Carter et al., 2000), pero alrededor del 40% no presentan seroconversión (Mariani & Venuti, 2010). En el caso de la vacunación contra HPV utilizando VLPSs de la proteína L1 se detectó una respuesta humoral fuerte, en la cual la seroconversión se puede observar a partir del primer mes (Nygård et al., 2015). Por lo tanto, la vacunación mejora la respuesta inmune en comparación con la generada por la infección natural.

2.5 Vacunas profilácticas contra HPV

El virión posee una cápside icosaédrica formada en su mayor parte por 360 monómeros de la proteína L1, que están organizados en 72 capsómeros, y a su vez, cada capsómero está formado por 5 monómeros, formando así la cápside icosaédrica (Modis, Trus, & Harrison, 2002). El gen *L1* al ser clonado en células de insecto o levadura, expresa la proteína L1 la cual es capaz de auto-ensamblarse formando partículas semejantes a virus (VLPSs, virus-like-particicles), que son partículas morfológicamente similares al virión, no infecciosas ya que no contienen en el DNA viral. Estas VLPs son las utilizadas en las vacunas actuales para inducir memoria inmunológica dirigida por anticuerpos (Figura 4) (Westrich et al., 2017).

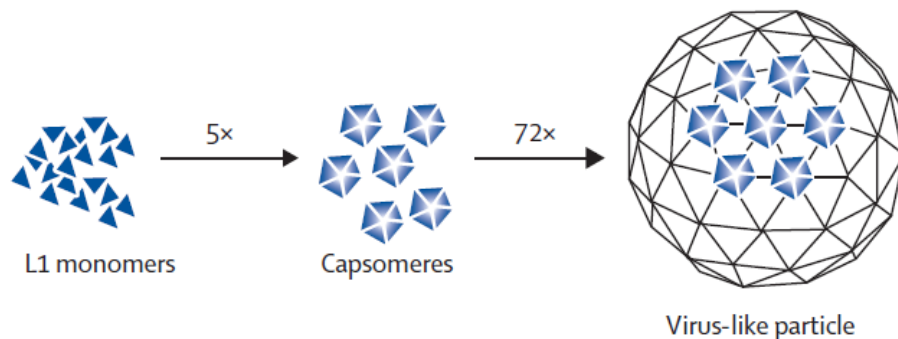


Figura 4. Ensamblaje de las VLPs. (Tomada de Stanley, 2012)

Las vacunas profilácticas actuales tienen como objetivo disminuir la incidencia de la infección por HPV y esto a su vez ha disminuido el desarrollo de CaCu a largo plazo. Existen actualmente tres vacunas profilácticas en el mercado: Cervarix®, Gardasil-4© y Gardasil-9®. La vacuna Cervarix®, incluye VLPSs de los tipos HPV16 y 18, generada en células de insecto, es manufacturada por la empresa GlaxoSmithKlein (GSK). La vacuna Gardasil-4© además de los HPV anteriores incluye los tipos 6 y 11 y Gardasil-9® adicionalmente contiene 31, 33, 45, 52 y 58, son manufacturadas por Merk, y las VLPSs son producidas en levaduras (Figura 5).

Para la aplicación de las vacunas se ha seguido el esquema de tres dosis (0, 1/2 y 6 meses), pero se está proponiendo que el esquema de vacunación cambie para las mujeres y hombres adolescentes (9-14 años) a solo dos dosis (0 y 6 meses) con un posible refuerzo a los 60 meses. Sin embargo, en el caso de jóvenes adultos (15-26 años) y personas

inmunocomprometidas se considera que deben de recibir el esquema original de tres dosis (Kim & Kim, 2017; Schiller & Müller, 2015).

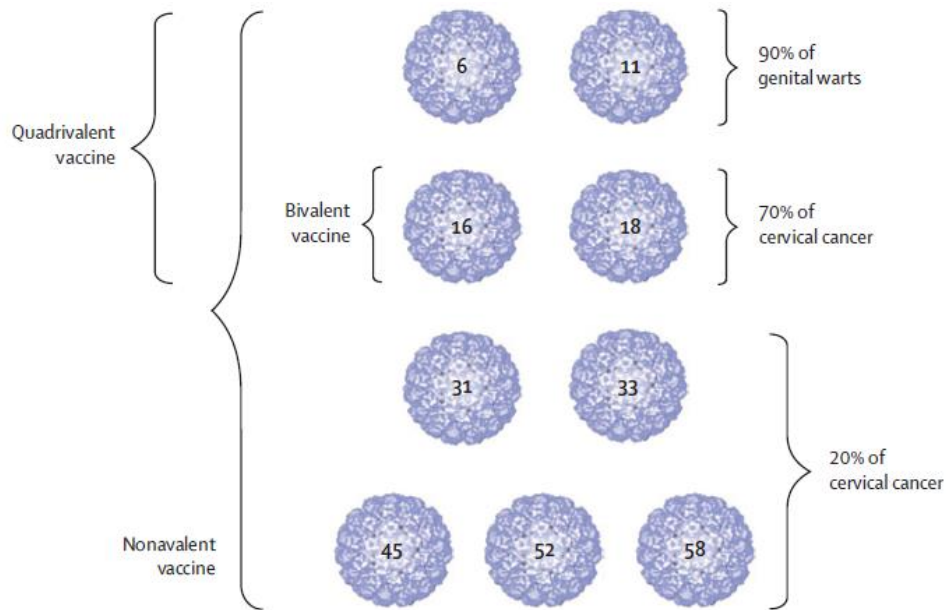


Figura 5. Tipos de HPV que conforman las vacunas bivalente, cuadrivalente y nonavalente, así como, el porcentaje de prevención de verrugas genitales y CaCU. (Tomada de Stanley, 2012).

Los ensayos clínicos muestran que los niveles de anticuerpos contra VLPSs HPV16 después de la vacunación Cervarix® se incrementan, siendo el nivel más alto de anticuerpos en el mes 7 post-vacunación con tres dosis, con títulos de anticuerpos entre 10 a 100 veces más altos que la infección natural. Sin embargo, hay una disminución de los títulos de anticuerpos entre los 18-24 meses post-vacunación. En ensayos *in-vitro* con pseudopartículas virales se mostró que los anticuerpos generados por la vacunación son de tipo neutralizante, lo cual correlacionó con la protección *in-vivo*. Asimismo, la vacunación induce una protección cerca del 100% y una seroconversión del 100%. Ninguna de estas vacunas presentó efectos adversos, más allá de un ligero dolor en el sitio de inmunización, por lo que se considera que son bien toleradas (Figura 6) (Schiller & Müller, 2015; Stanley et al., 2012).

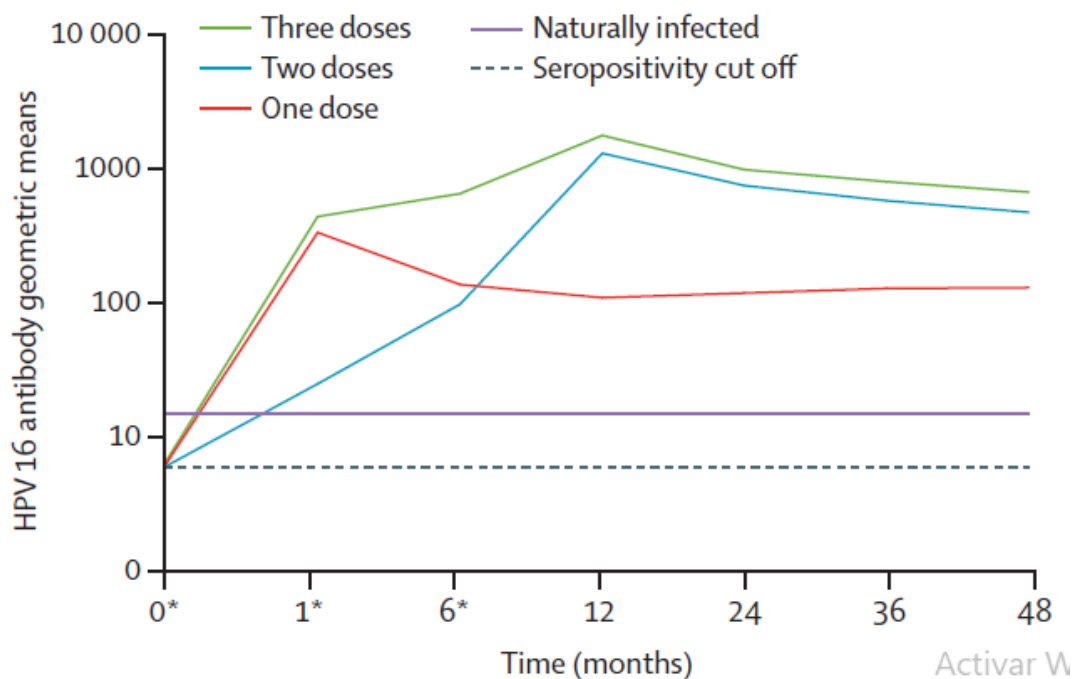


Figura 6. Seguimiento de los títulos de anticuerpos contra HPV16 en el suero de mujeres vacunadas contra HPV16 y 18 (Tomada de Schiller & Müller, 2015).

Se debe considerar que la inmunización con VLPs produce una respuesta policlonal generando anticuerpos contra todos los epítomos, tanto lineales como conformacionales, por lo cual se debe considerar que solo una parte de todos esos anticuerpos son neutralizantes y esto dependerá del grado de conservación del ensamblaje de las VLPs. Se han identificado algunos epítomos lineales y conformacionales sobre la superficie de las VLPs de HPV, pero sigue sin quedar claro si hay diferencias en el reconocimiento de epítomos en el virión y VLPs, y sí esto es de forma natural o por la inmunización. Es claro que la inmunización de VLPs completas generan anticuerpos contra epítomos conformacionales que son generalmente de tipo neutralizante, pero se desconoce qué proporción de anticuerpos reconocen epítomos lineales sobre las VLPs.

2.6 Ensayos para determinación de anticuerpos en mujeres vacunadas contra HPV.

Hasta ahora se desconoce cuál es el nivel mínimo necesario de anticuerpos neutralizantes que se necesitan para impedir o neutralizar una infección por HPV, o si la

exposición nuevamente al virus pueda desencadenar una respuesta de células B de memoria y llevar a un incremento de los títulos de anticuerpos. Por el momento queda claro que las vacunas son efectivas para inducir altos títulos de anticuerpos, pero no existe hasta el momento un ensayo que permita relacionar los títulos de anticuerpos y el grado de protección contra la infección por HPV (Stanley et al., 2012). Por lo que, es de importancia establecer pruebas de inmunogenicidad, ya que estos ensayos ayudan al control de calidad de los procesos de producción y estabilidad para el almacenamiento y distribución de las vacunas, para ayudar a predecir y establecer un índice de duración de la protección, así como, la correlación de protección. Cada fabricante ha utilizado diferentes ensayos para evaluar sus vacunas, por lo que es de importancia, entender en que consisten y lo que mide cada uno de ellos.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) utilizando VLPs como antígeno, es el utilizado por GSK. La ELISA-VLPs consiste en medir la unión de los anticuerpos a las VLPs pegadas a la placa. La detección es a través de un segundo anticuerpo asociado a una señal de color que reconoce a los anticuerpos humanos, y se mide el cambio de la señal de color con un espectrofotómetro a cierta densidad de onda. La ventaja es que es un ensayo sensible, reproducible y se puede automatizar, pero la desventaja, es que no discrimina entre anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, por lo que se podría sobreestimar la cantidad de anticuerpos neutralizantes (Schiller & Lowy, 2009).

En el caso de la compañía MERK, ellos utilizan el inmunoensayo competitivo Luminex (cLIA), que consiste en la fijación de 4 tipos de VLPs HPV a microesferas luminiscentes de diferentes colores, donde los sueros se evalúan al competir contra un anticuerpo monoclonal neutralizante con una etiqueta fluorescente de ficoeritrina y se mide la intensidad del anticuerpo monoclonal. La ventaja es que puede medir de forma individual la respuesta de los anticuerpos del suero a diferentes tipos de VLPs de forma específica en un mismo ensayo, sin embargo, este ensayo puede estar subestimando la respuesta, ya que solo se miden los anticuerpos que compiten con el monoclonal, y no se ve la respuesta policlonal neutralizante (Schiller & Lowy, 2009).

El ensayo de neutralización de pseudoviriones *in vitro*, que es utilizado por las empresas para correlacionar los ensayos anteriores, consiste en la producción de

pseudoviriones L1/L2 infecciosos que contienen un gen reportero que permite medir el nivel de infección, ya que al colocar junto con los sueros, permite medir todos los anticuerpos neutralizantes sin importar la clase. Este es un ensayo altamente sensible, tipo específico y se ha demostrado una correlación con los ensayos ELISA-VLPSs, el problema es que es un ensayo técnicamente laborioso y costoso (Schiller & Lowy, 2009).

3. Justificación

En la población mundial sexualmente activa más del 70% se infectaran con al menos un genotipo de *Alpha-papillomavirus* a lo largo de su vida (Beachler, Jenkins, Safaeian, Kreimer, & Wentzensen, 2016). De todos ellos, más del 90% logran controlar la infección, pero en los que la infección es persistente se encuentran en riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer asociado con HPV, siendo los tipos 16 y 18 los más prevalentes en el caso del CaCU.

La eliminación de la infección natural por HPV es a través de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra epítomos de la proteína L1 de la cápside, los cuales han sido identificados como tipo específicos (Carpentier et al., 2005; Fleury et al., 2006). En este caso, la vacunación profiláctica contra HPV genera títulos de anticuerpos que son entre 10 y 100 veces más altos que en una infección natural, y protegen al individuo de futuras infecciones contra los tipos vacunales, lo que disminuye la posibilidad de desarrollar cáncer (Hildesheim et al., 2016a). Sin embargo, las vacunas son más eficaces en individuos que no han estado expuestos a una infección con HPV, por lo que la vacunación se ha dirigido a los adolescentes entre 9-13 años. (Bruni, Serrano, Bosch, & Castellsagué, 2015; Scherer et al., 2016). En el caso de los individuos mayores de 15 años, que son sexualmente activos, y que ya han estado expuestos al virus, la eficacia de la vacunación contra HPV es menor en comparación con los adolescentes (Bruni et al., 2015). Esto sugiere que la respuesta de anticuerpos generada por la vacunación es diferente entre estas dos poblaciones.

La mayoría de los estudios que han evaluado los títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación con ensayos de ELISA-VLPs, han sido para la vacuna bivalente y en especial para HPV16. En estos estudios se ha demostrado que la eficacia de la vacuna bivalente en mujeres de 18-25 años, que recibieron 3 dosis, previno la incidencia de infecciones por HPV16 y 18 persistente a lo largo de 4 años de seguimiento. Sin embargo, en mujeres que recibieron solo una dosis de la vacuna, los títulos de anticuerpos se mantuvieron por 3 años,

pero fueron cuatro veces menores que los observados en mujeres que recibieron tres dosis (Kreimer et al., 2011; Schiller & Müller, 2015).

La duración de los títulos de anticuerpos es importante para la prevención de la infección persistente por HPV. Es por ello, que se han seguido a las mujeres vacunadas por largos períodos para determinar los títulos de anticuerpos y evaluar el nivel de protección contra la infección por HPV vacunales. La vacuna bivalente ha mostrado altos títulos de anticuerpos contra VLPs de HPV16 y HPV18 (considerados neutralizantes) durante al menos 9 años de seguimiento, los cuales fueron evaluados por ELISA-VLPs (Harper & DeMars, 2017; Nygård et al., 2015). Mientras que, con la vacuna tetravalente los títulos de anti-HPV16, evaluados por cLIA (identifica epítoto neutralizante), han mostrado durante el seguimiento de 9 años, títulos 10 veces más altos que los producidos por infección natural. Sin embargo, los títulos de anti-HPV18 disminuyen a los 24 meses después de la vacunación, siendo casi parecidos a los de una infección natural (Harper & DeMars, 2017; Naud et al., 2014).

Debido a que los ensayos para evaluación de títulos de anticuerpos de las vacunas contra HPV miden diferentes tipos de anticuerpos, los resultados de niveles de anticuerpos no pueden ser extrapolados. El ensayo de ELISA-VLPs mide anticuerpos totales y no discrimina entre anticuerpos anti-VLPs y anti-L1, lo que puede sobrestimar el nivel de protección; mientras que el ensayo de cLIA solo mide un epítoto neutralizante, lo que puede subestimar los niveles de anticuerpos neutralizantes. Por lo que, es de suma importancia determinar los niveles reales de anticuerpos neutralizantes, para poder determinar el nivel de protección contra la infección por HPV que mantienen las mujeres con el paso de los años y de ser necesario llevar a cabo una reinmunización.

En nuestro laboratorio se implementó un ensayo combinado de ELISA-VLPs y ELISA-L1 para HPV16/18, en donde se observó que los anticuerpos α L1-16 se asociaron a mujeres con lesiones NIC3/CaCU (OR= 12.18), mientras que los anticuerpos α VLPs 16 y 18 se asociaron a mujeres vacunadas (OR= 2.11e+08 y 536.0, respectivamente) (Pedroza-Saavedra et al., 2021). En otro estudio en nuestro laboratorio se evaluó la proporción de anticuerpos α VLPs/ α L1 de HPV16 en mujeres mexicanas entre 18 y 24 años vacunadas con la vacuna tetravalente contra HPV para determinar el grado de protección a lo largo del tiempo. A partir de la relación entre los anticuerpos neutralizantes (anti-VLPs) y no

neutralizantes (anti-L1) (α VLPs/ α L1) nos permitió proponer un “índice de protección” (IP). Al considerar el IP permitió determinar que la protección contra infección por HPV16 en mujeres vacunadas fue del 91% en el mes 7 y disminuyó a 64% en el mes 21. La implementación del IP permitió discriminar los niveles de anticuerpos neutralizantes de los no neutralizantes en la población vacunada contra HPV, lo que permitió discriminar los anticuerpos verdaderamente protectores a largo plazo (Tesis Maestría Jenny Paola Sánchez Lancheros, 2018). Dado que los niveles de anticuerpos contra HPV18 son los que se reducen más rápidamente, se decidió realizar el seguimiento de los títulos de anticuerpos contra VLPs y L1 de HPV18 en mujeres de 9-13 años y de 18-24 años con seguimiento a diferentes tiempos (0, 7, 21 y 61 meses) para poder determinar si la respuesta inmune es diferente, como varían los títulos de anticuerpos, así como determinar un índice de protección que estará determinado por la razón entre anti-VLPs/ anti-L1.

4. Preguntas de investigación

Pregunta 1: ¿Qué tan diferentes serán los títulos de anticuerpos al discriminar entre anticuerpos contra epitopes conformacionales y lineales?

Pregunta 2: ¿Cuál es la diferencia de los títulos de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 generados por la vacunación contra HPV18 entre adolescentes y mujeres jóvenes por un periodo de hasta 5 años post-vacunación?

Pregunta 3: ¿En que población se obtendrá el índice de protección más alto?

5. Hipótesis

Hipótesis 1: Los títulos de anticuerpos anti-VLPs-18 serán más elevados que los títulos de anti-L1 HPV18 a los 7 meses y esta proporción se invertirá a los 61 meses.

Hipótesis 2: Los títulos de anti-VLPs-18 serán más altos en la población de adolescentes en comparación con mujeres jóvenes previamente expuestas a la infección por HPV.

Hipotesis 3: Los títulos anti-L1-18 se presentarán de forma inversa a lo observado con los anticuerpos anti-VLPs en estas dos poblaciones.

Hipotesis 4: El índice de protección obtenido será mayor y estable hasta el mes 61 para las adolescentes que para las mujeres jóvenes.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Comparar los niveles de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 contra HPV18 a 7, 21 y 61 meses después de la vacunación contra HPV en adolescentes y mujeres jóvenes.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Validar los ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1 contra HPV18 con sueros positivos para este antígeno.

6.2.2 Caracterizar la respuesta inmune de anticuerpos α VLPs-HPV18 y α L1-HPV18 en el banco de mujeres vacunadas a los 7, 21 y 61 meses después de la vacunación.

6.2.3 Determinar el grado de protección a los 7, 21 y 61 meses en mujeres de diferentes grupos de edad vacunadas contra HPV18.

7. Materiales y métodos

7.1 Tipo de estudio y diseño en general

Corresponde a un estudio retrospectivo anidado a un estudio de cohorte titulado “Evaluación de Niveles de Inmunogenicidad en Mujeres vacunadas contra HPV en México” (CISP/883), cuyo responsable técnico es el Dr. Eduardo Lazcano Ponce y del cual se cuenta con un banco de muestras de sueros de mujeres vacunadas contra HPV, insumo que se utilizó para este estudio.

7.2 Población de estudio

La población de mujeres que se evaluaron en este estudio fue reclutada entre los años 2010-2011 y han estado en seguimiento después de haber sido vacunadas con la vacuna tetravalente de HPV (Gardasil-4®) por 61 meses. Se generó una cohorte centinela de mujeres vacunadas contra el HPV en tres grupos de comparación:

1. Mujeres de 9-13 años con esquema de vacunación extendida (0-6-60 meses)
2. Mujeres de 9-13 años años con esquema de vacunación tradicional (0-1/2-6 meses)
3. Mujeres de 18 a 24 años con esquema de vacunación tradicional (0-1/2-6 meses)

Las muestras de sueros fueron recolectadas a los 0, 7, 21 y 61 meses después de la primera dosis. Las muestras de sueros permanecieron almacenadas en el banco de sueros a -80°C.

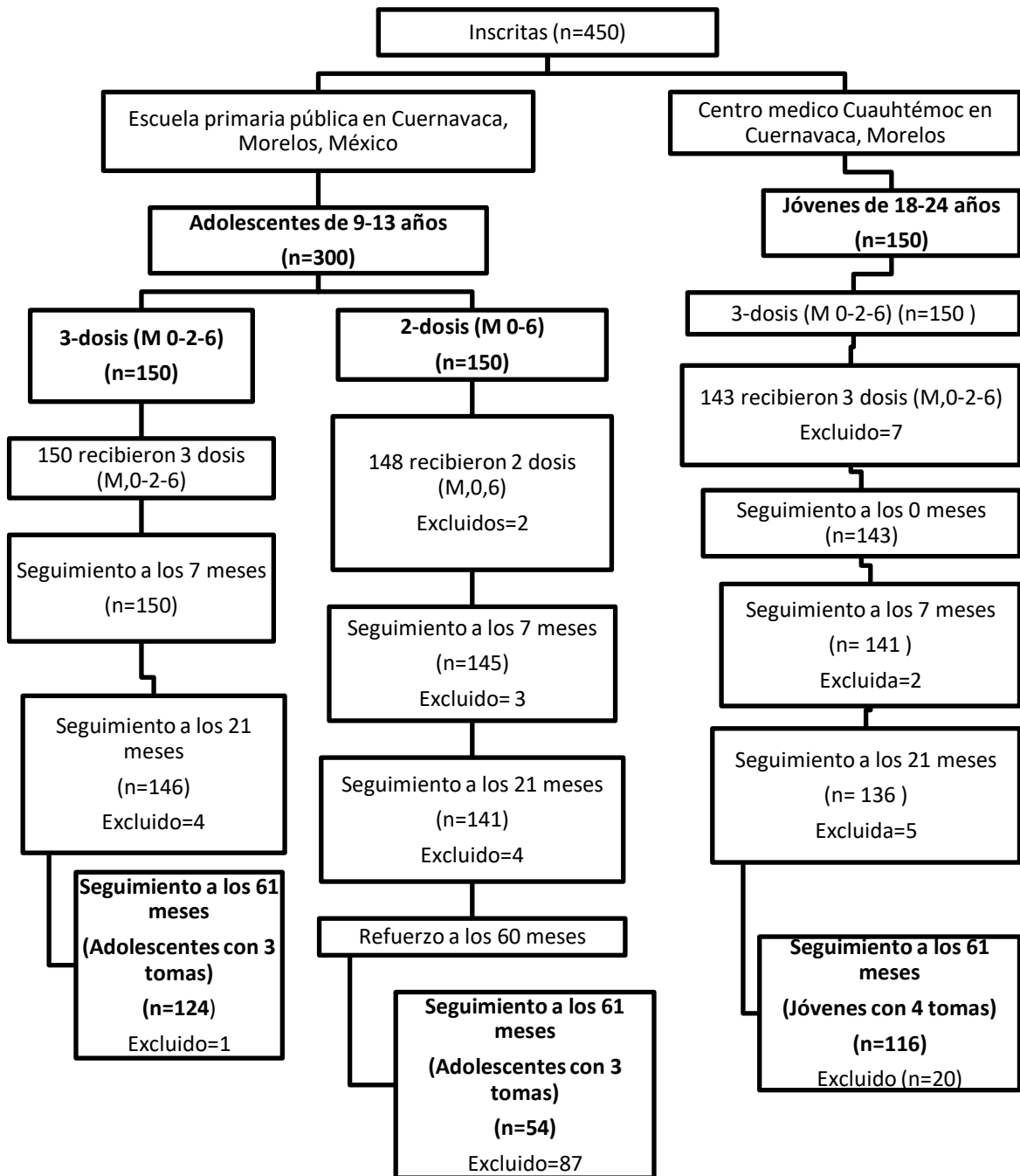


Figura 7. Diseño de la población de estudio.

7.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

Mujeres con edades comprendidas entre 9-13 años y 18-24 años que fueron vacunadas con la vacuna tetravalente, que aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron carta de asentimiento o consentimiento, respectivamente (Anexo 1).

Criterios de exclusión

Mujeres que presentaron fiebre en el momento de la vacunación, previa vacunación contra HPV u otra vacuna administrada 15 días antes de la vinculación al estudio, mujeres con inmunosupresión, mujeres alérgicas a los componentes de vacuna, mujeres con diarrea, vómito o alguna enfermedad de la sangre incluyendo trombocitopenia. Estas mujeres y aquellas que no cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de eliminación

Mujeres que se embaracen en el periodo de estudio, mujeres que no llegaron a la toma de muestras, mujeres que retiraron el consentimiento informado. Estas mujeres y aquellas que no cumplieron con los criterios de inclusión.

7.4 Ensayos de ELISA.

7.4.1 ELISA-L1

En una placa de ELISA de 96 pozos se colocaron por duplicado 280 ng/pozo de antígeno L1 de HPV18 en buffer de carbonatos/azida de sodio (AzNa) 0.02%, dejándose incubar a 4°C por 16 h. Al día siguiente, las placas se lavaron 4 veces con buffer de lavado (NaCl 0.9%, Tween 20 0.5%) (Lavador automático de placas ELISA, Thermo). Los lavados fueron realizados de esta forma al término de cada incubación. Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con buffer de bloqueo (PBS/ leche 1%, Tween 0.5%, AzNa 0.02%), e incubados por 2h a 37°C. Los sueros se diluyeron 1:100 y 1:300 en buffer de dilución (PBS-Tween 0.5%/ leche 2%+AzNa 0.02%) y se colocarán por duplicado en los pozos, se incubarán por 1.5 h a 37°C. Posteriormente, se agregó en los pozos el segundo anticuerpo conejo anti-IgGs humanas conjugados con HRP (horseradish peroxide, DAKO), diluido en buffer de dilución sin AzNa y se incubaron a 37°C durante 1 h. Finalmente se colocó el cromógeno tetrametilbenzidina (TMB Fitzgerald) 1:5 en acetato de sodio (0.1 M pH 6.0) y se incubó la placa por 1 h a temperatura ambiente protegida de la luz. La reacción

se detuvo agregando una solución 1M H₂SO₄. La actividad enzimática de la peroxidasa sobre el cromógeno se determinó midiendo la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 450 nm utilizando un lector de placas ELISA (Thermo Fisher Scientific) y a 630 nm para medir el fondo del sistema.

7.4.2 ELISA VLPs.

Se realizó el procedimiento de ELISA descrito anteriormente, pero el antígeno de las VLPs de HPV18, se colocó diluido en PBS pH 7 para mantener la estructura de este antígeno.

7.4.3 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en absorbancia de los niveles de anticuerpos anti-VLPs-HPV18 y anti-L1-HPV18 de los diferentes tiempos se convirtieron en unidades ELISA (UE) a partir de una curva de cuatro parámetros obtenida a través de un pool de sueros de mujeres positivas y negativas a VLPs y L1. Para realizar el análisis del índice de protección, se lleva a cabo la razón de anti-VLPs entre anti-L1, en donde un IP mayor a 1 representa mayor presencia de anti-VLPs y menor a 1, cuando los niveles de anti-L1 son mayores. El punto de corte se obtuvo con la media aritmética más tres desviaciones estandar de los valores comprendidos entre el percentil 5-95%. Posteriormente, se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, asimetría, kurtosis, gráfico de cuantiles teóricos, histograma) para seleccionar la prueba estadística adecuada. Se seleccionó la prueba de Kruskal-Wallis con ajuste de Dunnett para evaluar las diferencias entre los títulos de anti-VLPs y anti-L1 en los diferentes tiempos, así como entre esquemas y poblaciones.

7.5 Consideraciones éticas

El presente trabajo se realizó con muestras de un banco de sueros del proyecto titulado “Evaluación de Niveles de Inmunogenicidad en Mujeres vacunadas contra HPV en México”, el cual contó con la aprobación del comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) número CISP/883, por cumplir con todos los requisitos de ética y de confidencialidad que supone una investigación con sujetos humanos (Anexo 2).

8. Resultados

8.1 Estandarización de ensayo ELISA-L1 y ELISA-VLPs HPV18

8.1.1. Titulación de suero de conejo positivo para Ac α L1-HPV18

Para realizar el análisis de los sueros humanos fue necesario contar con un suero control para L1 que reconozca solo a los epítopes lineales. Para ello, se generó un suero policlonal en conejo contra L1 HPV18. Se analizó el aumento de los títulos de anticuerpo α L1-HPV18 que se produjo en el conejo después de cada inmunización (Figura 8A). Después de la tercera inmunización, se observó que el título de anticuerpo se encontraba arriba de la dilución 1:10,000, por lo que, se tomó un rango más amplio de las diluciones para encontrar el título óptimo para el ensayo, que se encuentra en la dilución 1:100,000, la cual es la dilución en donde se obtuvo una absorbancia alta sin saturar el sistema (Figura 8B).

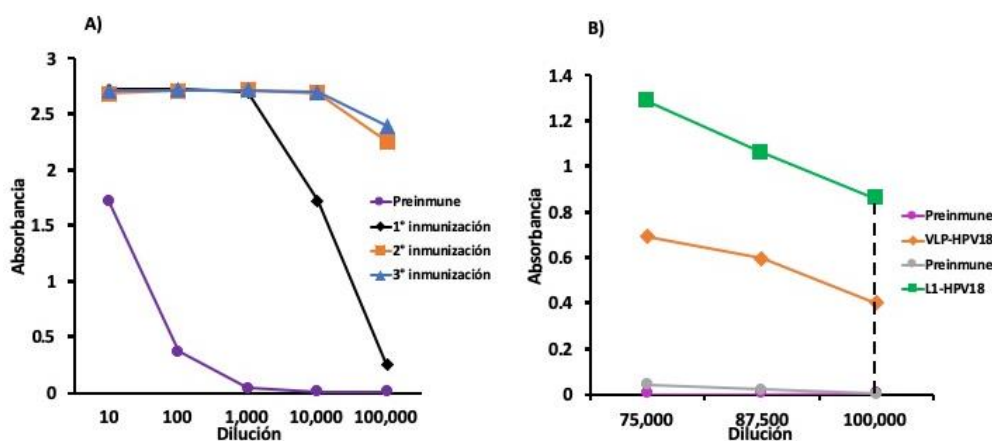


Figura 8. Titulación de α L1-HPV18 de conejo.

A) ELISA L1 colocando 280n/p de L1-HPV18 efectuando diluciones de 1:10 a 1:100,00 de los sueros obtenidos de cada inmunización, segundo Ac cabra α -Conejo 1:2,000. B) ELISA L1 colocando 1,250ng/pozo de VLPs-HPV18 y 500ng/pozo de L1-HPV18 con diferentes diluciones de α L1-HPV18. Cabra α -Conejo 1:12,500. La línea punteada representa el título del anticuerpo.

8.1.2 Estandarización de cantidad de proteína L1-HPV18 por pozo

Es necesario colocar la cantidad adecuada de proteína L1-HPV18 en los pozos para evitar saturar el sistema y obtener un fondo elevado. Por lo tanto, para la estandarización se requirió determinar la concentración óptima por pozo de proteína, la cual se define como aquella en la cual se observa la diferencia de reconocimiento de los sueros sobre proteína L1 desnaturalizada.

Se procedió a la estandarización de concentración de proteína por pozo colocando diferentes cantidades de proteína L1-HPV18 contra α L1-HPV18. Se observó que con 500 ng/pozo de proteína L1-HPV18 se obtuvo la mayor diferencia de reconocimiento en relación con un suero control. Por lo que, la cantidad óptima por pozo de la proteína L1 para trabajar los ensayos de ELISA se estableció en 500ng/pozo (Figura 9).

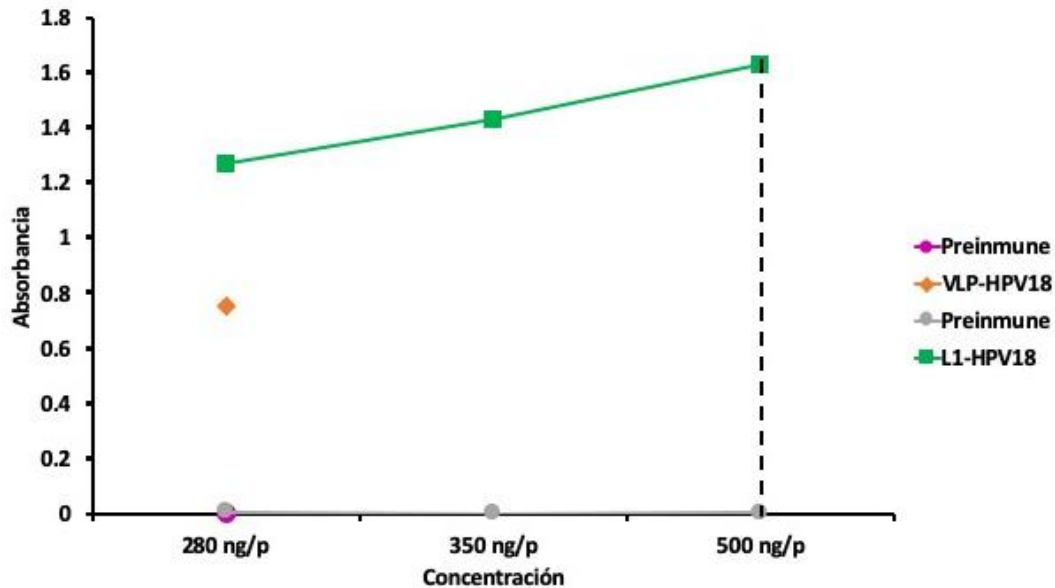


Figura 9. Estandarización de la cantidad óptima de proteína L1 por pozo.

ELISA L1 colocando diferentes cantidades por pozo de proteína L1-HPV18 y 1,250ng/pozo de VLPs-HPV18 como control, primer Ac α L1-HPV18. 1:100,000, segundo Ac cabra α -Conejo 1:7,000. La línea punteada representa la cantidad de proteína a usar por pozo.

8.1.3 Estandarización de 2ª Ac cabra α -Conejo para α L1-HPV18 de conejo

EL segundo Ac cabra α -Conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) reconoce inmunoglobulinas de conejo de todas las clases (Dako), que al entrar en contacto con el cromógeno del ensayo se genera una reacción colorimétrica que se mide a 450nm OD.

De esta forma, para la estandarización se requirió determinar la dilución óptima, en la cual se observa el menor fondo del sistema en el control negativo y a su vez, nos permita diferenciar el control positivo. Para la titulación del 2do Ac cabra α -Conejo para los ELISA-L1 y ELISA-VLPs, se realizaron diferentes diluciones y se pudo observar que la

dilución 1:15,000 fue la que mayor diferencia de reconocimiento de L1-HPV18 y el menor fondo del sistema (Figura 10).

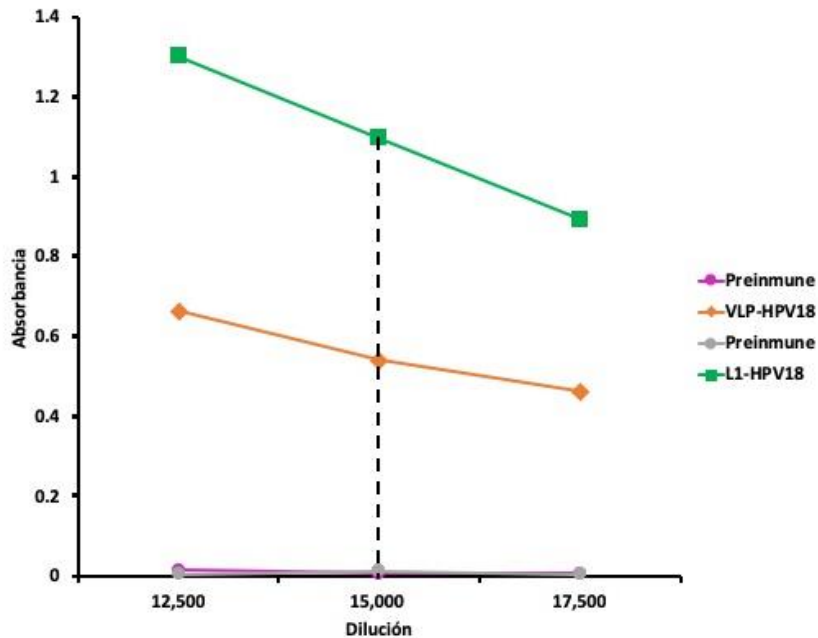


Figura 10. Titulación de cabra α -Conejo para α L1-HPV18 de conejo.

ELISA L1 colocando 1,250ng/pozo de VLPs-HPV18 y 500ng/pozo de L1-HPV18 efectuando diferentes diluciones del segundo Ac cabra α -Conejo, el primer Ac α L1-HPV18. 1:75,000. La línea punteada representa el título del anticuerpo.

8.1.4 Titulación de suero positivo α VLPs-HPV18 de conejo

Para realizar el análisis de los sueros humanos fue necesario contar con un suero control que reconociera los epítopes conformacionales de las VLPs. Para ello, se generó un suero policlonal en conejo contra VLPs HPV18. Después de varias inmunizaciones, se analizó el aumento de los títulos de anticuerpo α VLP-HPV18 que se produjeron en el conejo después de cada inmunización (Figura 11A). Después de la tercera inmunización, se observó que el título de anticuerpo se encontraba arriba de la dilución 1:100, por lo que, se tomó un rango de diluciones para encontrar el título óptimo para el ensayo, que se encontró en la dilución 1:250, la cual es la dilución en donde se obtuvo una absorbancia alta sin saturar el sistema (Figura 11B).

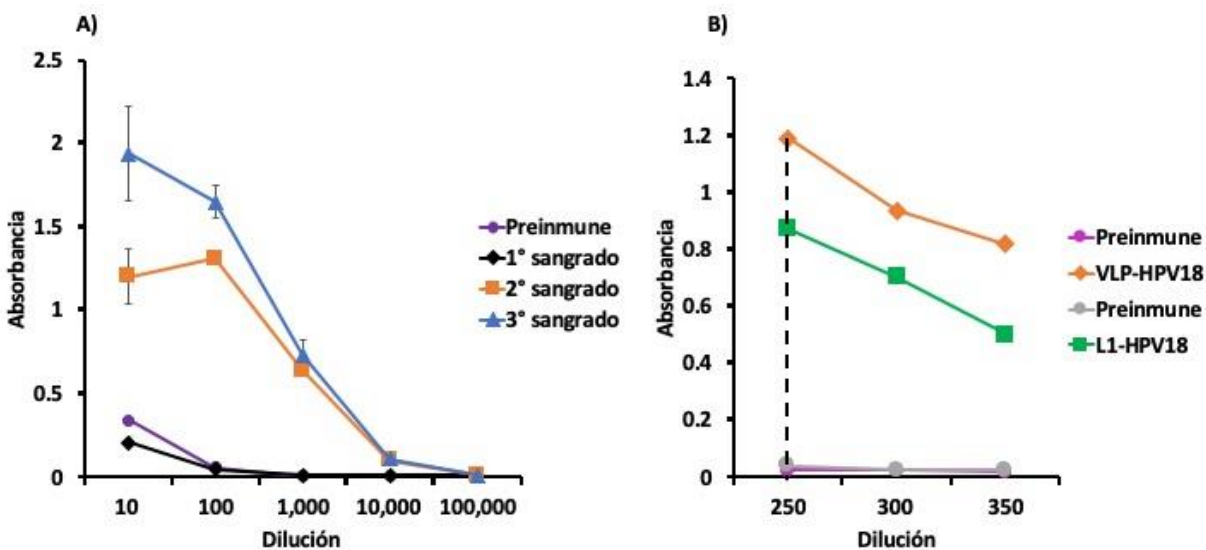


Figura 11. Titulación de α VLPs-HPV18 de

A) ELISA-VLPs colocando 280n/p de L1-HPV18 efectuando diluciones de 1:10 a 1:100,00 de los sueros obtenidos de cada inmunización, segundo Ac cabra α -Conejo 1:7,000. B) ELISA-VLPs colocando 1,250ng/pozo de VLPs-HPV18 y 500ng/pozo de L1-HPV18 con diferentes diluciones de α VLPs-HPV18, segundo Ac Cabra α -Conejo 1:12,500. La línea punteada representa el título del anticuerpo.

8.1.5 Estandarización de concentración de proteína VLPs-HPV18 por pozo

Como se mencionó anteriormente, debemos asegurarnos de colocar la concentración adecuada de proteína VLPs-HPV18 en los pozos para evitar saturar el sistema y obtener un fondo elevado. En la estandarización, se requirió determinar la concentración óptima por pozo de proteína, la cual se define como aquella en la cual se observa la diferencia de reconocimiento de los sueros sobre proteína VLPs-HPV18.

Se procedió a la estandarización de concentración de proteína por pozo colocando diferentes cantidades de proteína VLPs-HPV18 contra α VLPs-HPV18, se observó que, en 1,250 ng/p de proteína VLPs-HPV18 se observaba la mayor diferencia de reconocimiento con el suero control positivo. Por lo que, la cantidad óptima por pozo de la proteína VLPs para trabajar las ELISA-VLPs y ELISA-L1 fue de 1,250 ng/p (Figura 12).

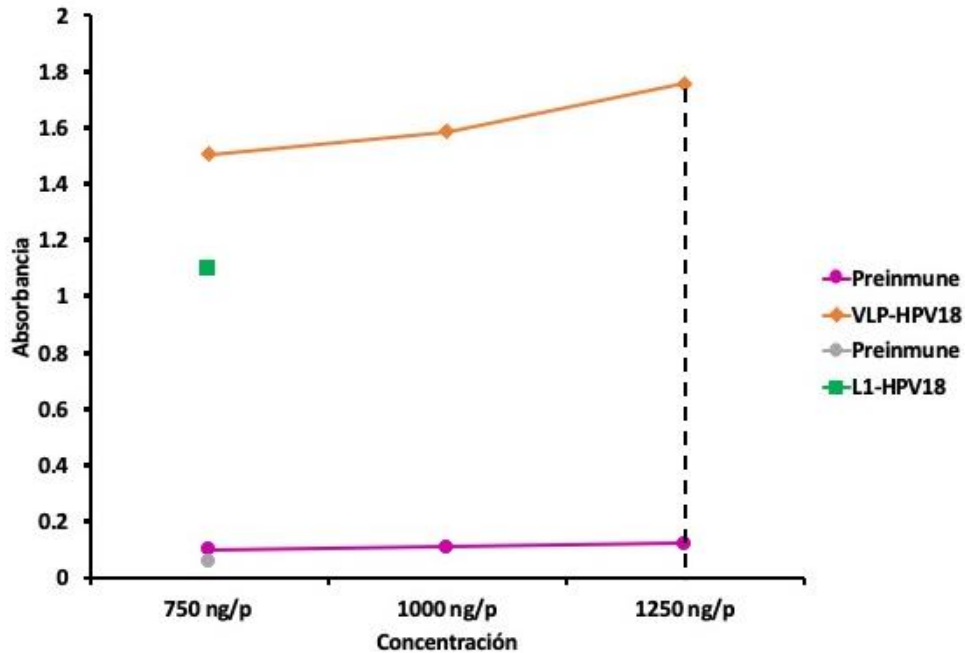


Figura 12. Estandarización de la cantidad óptima de proteína VLPs por pozo.

ELISA-VLPs colocando diferentes cantidades por pozo de proteína VLPs-HPV18 y 280ng/pozo de L1-HPV18 como control, primer Ac α VLPs-HPV18. 1:250, segundo Ac cabra α -Conejo 1:7000. La línea punteada representa la cantidad de proteína a usar por pozo.

8.1.6 Estandarización de 2do Ac cabra α -Conejo para α VLPs-HPV18 de conejo.

También fue necesario estandarizar el 2do Ac cabra α -Conejo para α VLPs-HPV18, por lo que se requirió determinar la dilución óptima, en la cual se produce menor reconocimiento inespecífico con el control negativo y a su vez, nos permita diferenciar el control positivo. Se realizaron diferentes diluciones de 2do Ac cabra α -Conejo y se observó que la dilución 1:12,500 fue la que mayor diferencia de reconocimiento para VLPs-HPV18 y menor fondo inespecífico se observó (Figura 13).

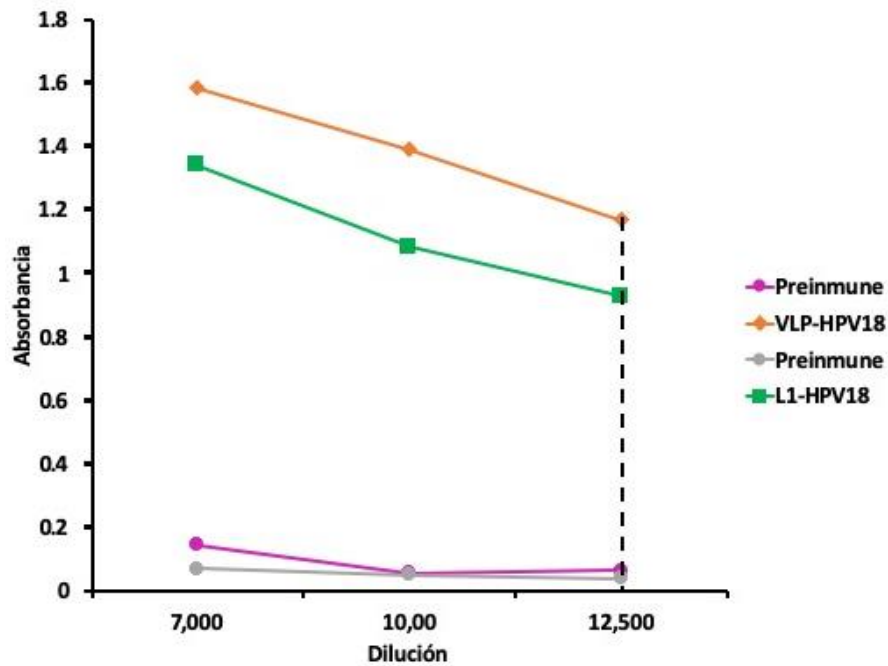


Figura 13. Titulación de cabra α -Conejo para α VLPs-HPV18 de conejo

ELISA-VLPs colocando 1,250ng/pozo de VLPs-HPV18 y 500ng/pozo de L1-HPV18 efectuando diferentes diluciones del segundo Ac cabra α -Conejo, el primer Ac α VLPs-HPV18. 1:250. La línea punteada representa el título del anticuerpo.

8.1.7 Validación de los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs.

Como se mostró anteriormente, se realizó la estandarización de los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs con sus respectivos sueros control, pero debido a que el suero α VLPs-HPV18 no mostró un reconocimiento diferencial importante entre la proteína L1-HPV18 y VLPs-HPV18, a su vez que se necesita una alta concentración de proteína VLPs-HPV18 para poder observar una diferencia de reconocimiento por parte del anticuerpo, posiblemente porque las VLPs-HPV18 se desnaturalizan o se degrada muy fácilmente a pesar de tener mucho cuidado en su tratamiento. Por tal motivo, se tuvo que descartar como control en los ensayos con los sueros humanos.

Posteriormente, se decidió ajustar la dilución del suero control α L1-HPV18 para los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs con los sueros humanos, por lo que, se disminuyó la dilución a usar a 1:75,000, permitiendo observar el reconocimiento diferencial entre la proteína L1-HPV18 y VLPs-HPV18, sin aumentar el fondo. A continuación, también se ajustó la concentración de proteína VLPs-HPV18 para la validación de los ensayos ELISAs

con los sueros humanos. Se observó que con 500 ng/pozo de proteína VLPs-HPV18 es suficiente para observar un reconocimiento diferencial de la proteína por parte del suero α L1-HPV18, así como por los sueros humanos en donde el suero 4 presentó una razón arriba de 5 (Tabla 1).

Tabla 1. Ajuste de la dilución de α L1-HPV18 y de la concentración de proteína VLPs por pozo.

Absorbancia (Promedio)			
Muestra	VLPs-HPV18	L1-HPV18	Razón L1/VLPs
αL1-HPV18	0.5944	1.3371	2.24
Suero humano 1	1.468	0.922	0.62
Suero humano 2	1.0115	0.868	0.85
Suero humano 3	0.42	0.526	1.25
Suero humano 4	0.224	1.223	5.45
Suero humano 5	1.12	0.8	0.71
Suero humano 6	0.3175	0.41	1.29

El promedio se obtuvo de dos duplicados. Se resalta en negro las absorbancias obtenidas en cada uno de los ensayos ELISA para el suero que presenta la razón más alta.

También se requirió buscar controles positivos de sueros humanos de mujeres con CaCU que presentaran altos niveles de Ac contra L1 y mujeres vacunadas que presentaran altos niveles de Ac contra VLPs. Se probaron 16 sueros de mujeres con CaCU (1-16) y 5 sueros de mujeres vacunadas (17-21), que fueron seleccionados al azar, en ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs para obtener sus absorbancias y seleccionar los controles positivos y negativos para cada ensayo.

Los sueros 5 y 15 presentaron la mayor diferencia de absorbancia de α L1-HPV18 con respecto a α VLPs-HPV18. Por otra parte, los sueros 20 y 21 presentaron la mayor diferencia de absorbancia de α VLPs-HPV con respecto a α L1-HPV18 (Figura 14).

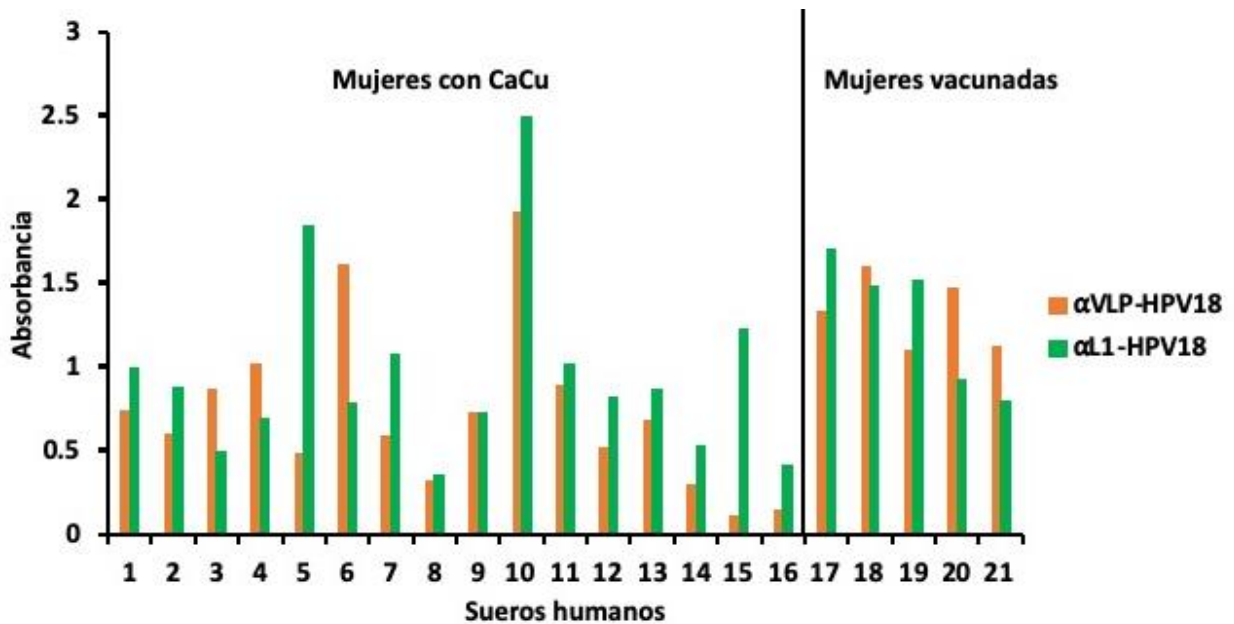


Figura 14. Selección de sueros positivos y negativos para los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLPs.

Absorbancias de α VLPs-HPV18 y α L1-HPV18 de los sueros de mujeres con CaCu (1-16) y 5 sueros de mujeres vacunadas (17-21).

Para mejorar la determinación de los controles positivos y negativos para α L1-HPV18 y α VLP-HPV18, se calculó la razón entre α VLP-HPV18/ α L1-HPV18 de los sueros humanos. En base a esto, se seleccionó al suero 15 como control positivo para α L1-HPV18, debido a que fue el suero que mostró la razón menor entre los dos resultados (Figura 15). Por su parte, se seleccionó al suero 20 como control positivo para α VLP-HPV18 debido a que fue el suero que mostró la razón mayor entre los dos resultados para las mujeres vacunadas. Hay que considerar que se seleccionó a una mujer vacunada más que un paciente con CaCu, a pesar de presentarse resultados con razones entre α VLP-HPV18/ α L1-HPV18 mayores (ver Figura 15). Por lo que es más confiable como control, a comparación de los sueros 3, 4 y 6, que a pesar de que, presentan una razón mayor a 1, son sueros de mujeres con CaCu.

Al analizar los resultados observamos que en el caso de las mujeres con CaCu, el 81% de los sueros presentaron una razón menor de 1, que indica que los niveles de α L1-HPV18 son mayores que los Ac α VLPs-HPV18, lo que sugiere ausencia de protección. En el caso de las mujeres vacunadas, el 60% de los sueros presentaron una razón mayor de 1, lo que indica altos niveles de α VLPs-HPV18 que de α L1-HPV18, lo que podría sugerir una mayor protección contra infecciones de HPV18 (Figura 15). Sin embargo, el número de

muestras es pequeño, pero nos permite darnos una idea de como analizar los datos del banco de sueros de mujeres vacunadas.

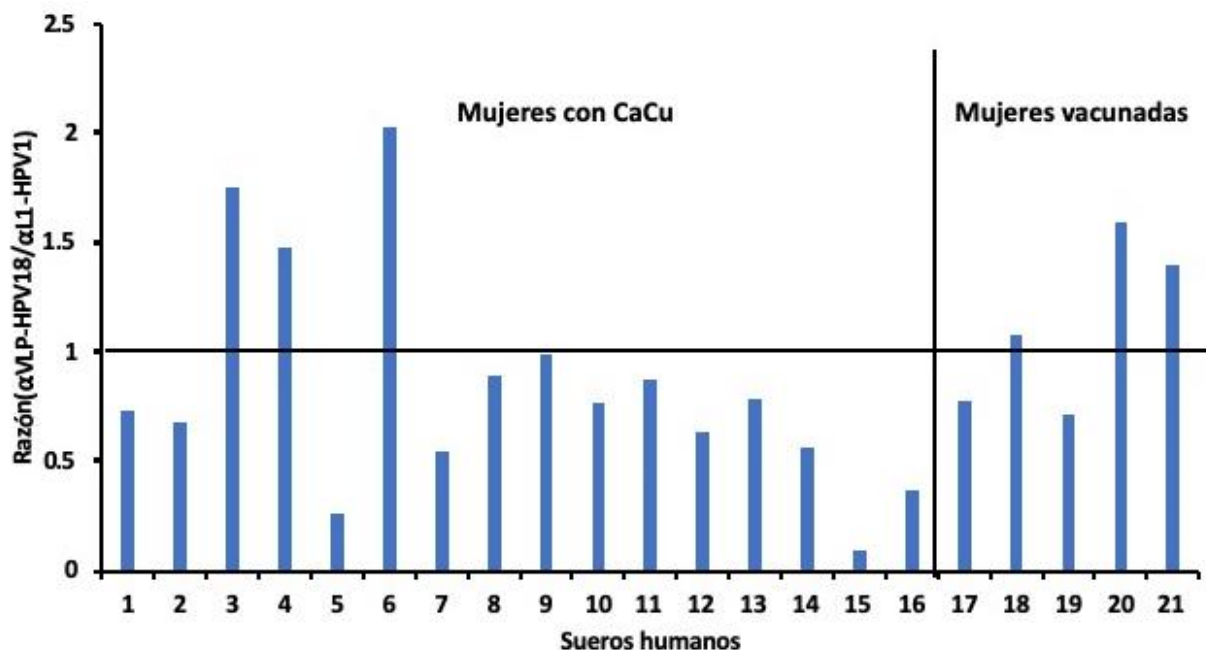


Figura 15. Razón de absorbancias de αL1-HPV18 y αVLPs-HPV18 de sueros humanos.

Se determinó la relación entre las absorbancias de αVLP-HPV18/αL1-HPV18 de cada uno de los sueros de mujeres con CaCu (-16) y 5 sueros de mujeres vacunadas (17-21).

Para la validación de nuestro ensayo ELISA-VLP y ELISA-L1 fue necesario demostrar la reproducibilidad del ensayo entre cada una de las placas realizadas, por lo que, procedimos a obtener el coeficiente de variación (CV%) de nuestros sueros controles (MV2, FLG y el anti-L1-HPV18 de conejo) con la siguiente formula:

$$cv\% = \frac{SD}{media} \times 100$$

El máximo óptimo del CV debe ser del 10%; nuestros resultados mostraron una variación de las absorbancias obtenidas de los controles positivos y negativos, entre placas, entre 1.7-9.9%, lo cual demuestra que nuestros resultados entre placas son confiables (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficiente de variación de sueros controles de ELISA-VLPs y ELISA-L1.

	VLP			L1		
	MV2	FLG	Conejo	MV2	FLG	Conejo
SD	0.025	0.026	0.029	0.027	0.029	0.024
Media	1.459	0.262	0.654	0.952	1.248	1.355
SD/MEDIA	0.017	0.099	0.045	0.029	0.023	0.018
CV%	1.739	9.926	4.471	2.865	2.285	1.753

* SD, Desviación Estándar; CV, Coeficiente de Variación

Además, evaluamos la sensibilidad, especificidad y curva ROC para la validación de cada uno de los ensayos ELISA. El ELISA-VLPs presento una sensibilidad y especificidad del 100%, con valor de la curva ROC de 1.00, lo que nos indica que el ensayo es adecuado para el reconocimiento de anticuerpos contra las VLPs. El ELISA-L1 presento una sensibilidad del 100% y una especificidad del 71.93% con valor de la curva ROC 0.86, mostrando que el ELISA-L1 es capaz de detectar anticuerpos, sin embargo, el valor de ROC y de la especificidad nos indica que su capacidad de discriminar entre positivos y negativos es menor a comparación del ELISA-VLPs.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de los ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1

Ensayo	Sensibilidad	Especificidad	ROC
ELISA-VLPs	100%	100%	1.00
ELISA-L1	100%	71.93%	0.85

8.2 Determinación los niveles de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 contra HPV18 en el banco de suero de mujeres vacunadas.

La población total analizada se compuso de 294 mujeres vacunadas con la vacuna tetravalente contra HPV. La población se dividió en dos grupos: 178 adolescentes con edades comprendidas entre 9 y 13 años. El grupo de adolescentes se subdividieron en dos grupos de acuerdo al esquema de vacunación que recibieron: 124 adolescentes recibieron el esquema tradicional de 0-2-6 meses y 54 adolescentes recibieron el esquema de 0-2-60 meses. A estos 2 grupos se les tomaron muestras de suero en los meses 7, 21 y 61. El segundo grupo está conformado por 116 jóvenes con edades entre 18 y 24 años, que fueron reclutadas en el “Centro Médico Cuauhtémoc” del Instituto Nacional de Salud Pública. Las

mujeres fueron vacunadas con el esquema tradicional 0,1/2 y 6 meses, y se tomaron muestras de suero en los meses 0, 7, 21 y 61. A toda la población de estudio se les midieron los niveles de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 HPV18 por ELISA de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología.

Todos los sueros fueron probados en el ensayo de ELISA-VLPs y -L1 por duplicado, en una sola dilución (1:100). Para obtener el punto de corte y normalizar los títulos de anticuerpos en la población se realizó una transformación de absorbancia a Unidades ELISA (UE/ mL) por medio de una curva de Cuatro parámetros. Para ello primero se obtuvo el punto de corte (PC) para anti-VLPs y anti-L1, a partir de un pool de sueros positivos de la población evaluada, seleccionados por sus absorbancias altas, y por otra parte se tomó un pool de sueros negativos de la población control de adolescentes sin vacunar. Estos “pools” se evaluaron en los ensayos ELISA-VLPs y -L1 en diluciones seriadas con factor de dilución 2. Se obtuvo el punto de corte en absorbancias a partir de la media aritmética de las diluciones más 3 desviaciones estándar. Los valores de las diluciones en logaritmo se utilizaron para la construcción de la curva de cuatro parámetros en la cual se obtuvieron los valores estadísticos para poder resolver la ecuación, la cual al multiplicar con el punto de corte en absorbancias (obtenido con el percentil 99), obtuvimos el punto de corte en UE (Tabla 3).

Tabla 4. Puntos de corte para ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1 HPV18.

	Anti-L1	Anti-VLP
Punto de corte en absorbancia	1.0809	1.187
Punto de corte en UE	11.47094879	12.321182

Los valores en absorbancias obtenidos en nuestros ensayos, se convirtieron a UE, a través del cálculo:

$$\frac{\text{Promedio} \times \text{PC de UE}}{\text{PC en absorbancia}}$$

Con los valores en UE/mL, se inició el análisis estadístico para determinar si existían diferencias entre los diferentes tiempos de la toma de muestra post-vacunación, así como entre los esquemas. Los niveles de anticuerpos anti-VLPs-HPV18 para cada uno de los esquemas de vacunación se muestran en la Figura 16.

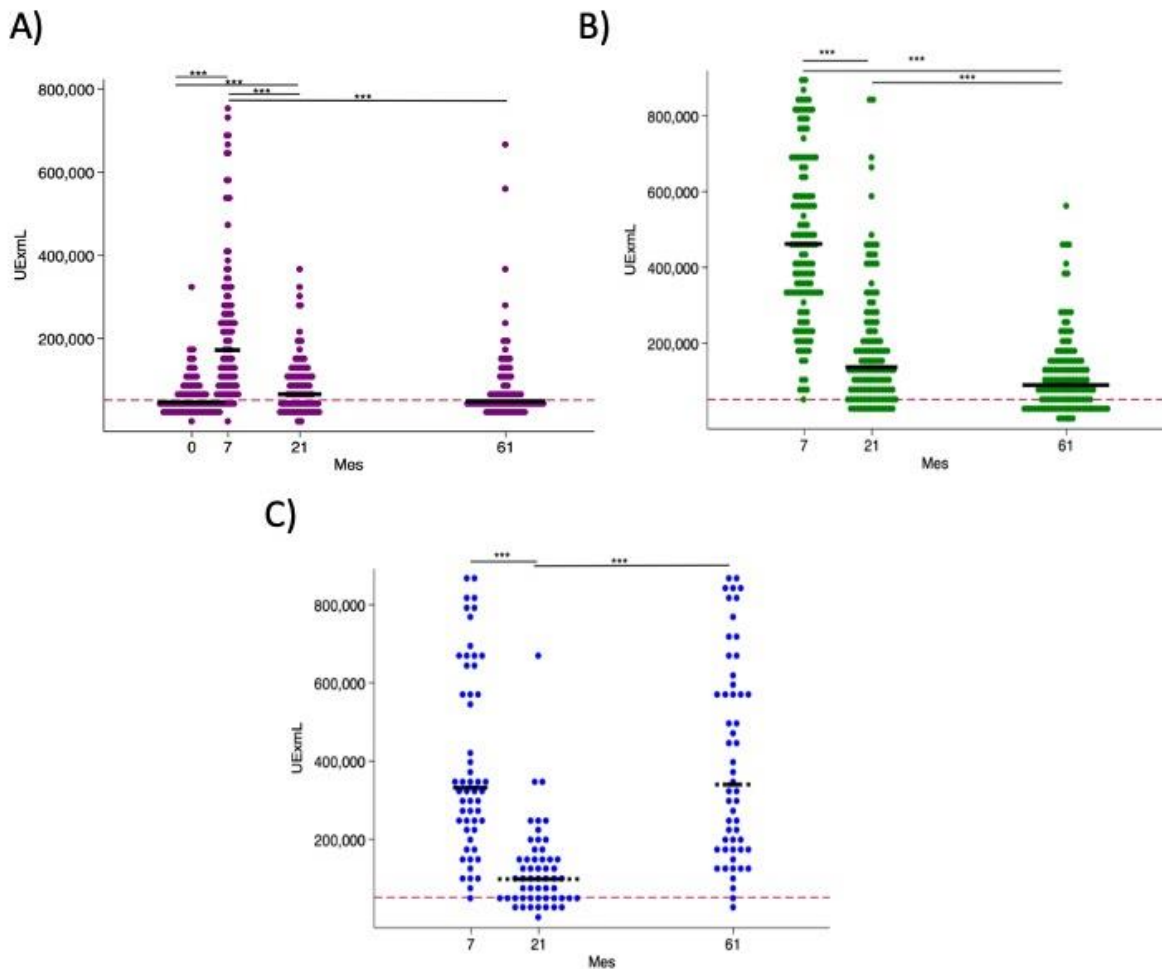


Figura 16. Niveles de anticuerpos anti-VLPs-HPV18 en diferentes tiempos post-vacunación.

A) Niveles de anticuerpos anti-VLP-HPV18 de jóvenes que recibieron el esquema tradicional 0-2-6 meses B) Niveles de anticuerpos anti-VLP-HPV18 de las adolescentes que recibieron el esquema tradicional 0-2-6 meses. C) Niveles de anticuerpos anti-VLP-HPV18 de las adolescentes que recibieron el esquema de reinmunización 0-2-60 meses. Línea roja indica el punto de corte. Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p fue ajustado con la prueba de Dunnett; (***) resultando altamente significativos $p < 0.000$

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18

Tabla 5. Seroprevalencia de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 HPV18 en diferentes esquemas y tiempos post-vacunación.

Esquema (Grupo)	Total	MES 0				MES 7				MES 21				MES 61				p									
		VLP		L1		VLP		L1		VLP		L1		VLP		L1		VLP	L1								
		n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%										
Adolescentes (0-2-6)	n= 124																										
Sero-negativos		0		0		16		12.9		18		14.52		63		50.81		38		30.65		85		68.55			
Sero-positivos		124		100		108		87.1		106		85.48		61		49.19		86		69.35		39		31.45			
																				0.00	0.00						
Adolescentes (0-6-60)	n=54																										
Sero-negativos		0		0		8		14.81		16		29.63		35		64.81		2		3.7		23		42.59			
Sero-positivos		54		100		46		85.19		38		70.37		19		35.19		52		96.3		31		57.41			
																				0.00	0.00						
Jóvenes (0-2-6)	n=116																										
Sero-negativos		64	55.17	78	67.24	6	5.17	21	18.10	45	38.79	71	61.21	62	53.45	89	76.72										
Sero-positivos		52	44.83	38	32.76	110	94.83	95	81.9	71	61.21	45	38.79	54	46.55	27	23.28										
p						0.01				0.53				0.00				0.12				0.00		0.00		0.00	

Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de *p* ajustado con la prueba de Dunnett.

En el grupo de las jóvenes con esquema tradicional (0-2-6), se obtuvo una muestra basal antes de la vacunación, con bajos títulos de anti-VLPs en el mes 0 (Mediana, M = 45,320.69) (Punto de Corte = 51,173.52), pero se tiene un 44.83% (52/116) de las mujeres que fueron sero-positivas. Posteriormente al mes 7 después de la vacunación los títulos de anticuerpos se incrementaron (M = 171,266.7) por encima del punto de corte alcanzando el 94.83% (110/116). En este grupo los títulos de anticuerpos disminuyeron sustancialmente hacia el mes 21 (M = 65,350.44) permaneciendo seropositivas solo el 61.21% (71/116), y hacia el mes 61, los títulos de anticuerpos siguieron disminuyendo (M = 47,917.84), así como la seropositividad, pero en menor proporción (46.55%; 54/116). Las diferencias de las medianas de los niveles de anticuerpo anti-VLPs-HPV18 fueron muy significativas para el mes 0 con respecto al mes 7 y 21, del mes 7 con respecto al mes 21 y 61. Lo que supone que los niveles de anticuerpo anti-VLPs aumentaron al mes de completar el esquema tradicional de vacunación (mes 7), al mes 21 disminuyeron, sin embargo, se mantienen por encima de los niveles de pre-vacunación (mes 0), pero al mes 61, los niveles de anti-VLPs son similares a los previos a la vacunación. Por otra parte, al no existir diferencias significativas entre el mes 21 y 61, se puede sugerir que se estabilizan los niveles de anticuerpos. (Figura 16A).

Se puede observar que en el grupo de adolescentes con el esquema tradicional (0-2-6), al mes 7 presentaron los títulos de anticuerpos anti-VLPs más altos ($M = 459,606.8$) con un 100% (124/124) de seropositividad. Hacia el mes 21 y 61 observamos que los títulos de anti-VLPs presentan una tendencia a disminuir ($M = 134,597.1$ y $87,639.4$, respectivamente) pero se mantienen por encima del PC (Punto de Corte = $51,173.52$) (con un 85.48% (106/124) y 69.35% (86/124) de seropositividad respectivamente). Las diferencias de los niveles de anticuerpos anti-VLPs-HPV18 fueron muy significativas entre el mes 7 con respecto al mes 21 y 61, y el mes 21 con respecto al 61. En el caso de las adolescentes, al mes de completar el esquema tradicional de vacunación todas las adolescentes son seropositivas; pero con el paso del tiempo, los niveles de anticuerpos disminuyen (Figura 16B).

En el caso de las adolescentes con el esquema de reinmunización (0-2-60), al mes 7, presentaron títulos de anti-VLPs ($M = 330,165$) que se ubican por debajo de lo observado en el grupo de las adolescentes con esquema tradicional, sin embargo, son superiores a las del grupo de las jóvenes; en cuanto a la seropositividad está también fue del 100% (54/54). Posteriormente al mes 21 observamos que los títulos de anti-VLPs disminuyeron considerablemente ($M = 96,614$), pero manteniéndose por encima del punto de corte y presentando una seropositividad de 70.37% (38/54). Sin embargo, después de la vacunación al mes 60, se observó un incremento de 3.5 veces en los títulos de anticuerpos ($M = 338,876$) con respecto al mes 21 y presentando una seropositividad del 96.3% (52/54). Las diferencias entre los niveles de anticuerpo anti-VLPs-HPV18 entre los diferentes tiempos fueron altamente significativas del mes 7 con respecto al mes 21, y del mes 21 con respecto al mes 61. Aunque los niveles de anticuerpo anti-VLPs disminuyeron al mes 21, estos volvieron a aumentar al mes 61 después de la reinmunización, lo que supone que se estimula la producción de anticuerpos anti-VLPs (Fig. 16C).

Al evaluar el punto de corte de UE para VLPs a través del modelo de regresión logística en nuestra población, se obtuvo una sensibilidad del 100%, especificidad de 0% y un valor de ROC de 0.66. Indicando que aunque no es tan bueno para clasificar seropositivos, es suficiente para realizar el análisis estadístico.

Los niveles de anticuerpos anti-L1-HPV18 para cada uno de los esquemas de vacunación en los diferentes grupos de edad se muestran en la Figura 17.

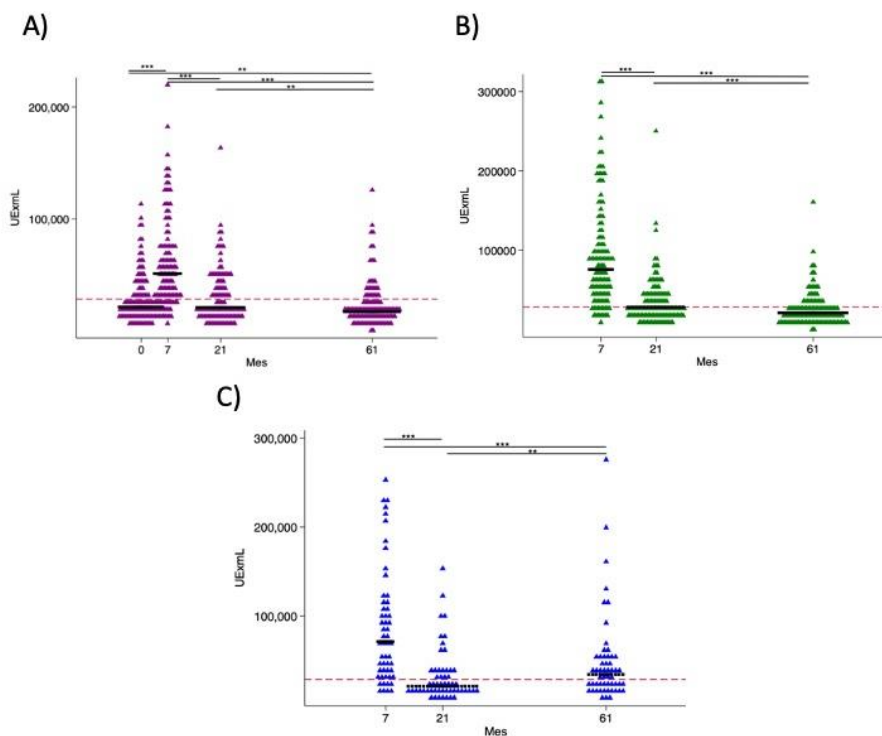


Figura 17. Niveles de anticuerpos anti-L1-HPV18 en diferentes tiempos post-vacunación.

A) Niveles de anticuerpos anti-L1-HPV18 de las jóvenes que recibieron el esquema tradicional 0-2-6 meses B) Niveles de anticuerpos anti-VLP-L118 de las adolescentes que recibieron el esquema tradicional 0-2-6 meses C) Niveles de anticuerpos anti-L1-HPV18 de las adolescentes que recibieron el esquema de reinmunización 0-2-60 meses. Línea roja indica el punto de corte. Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p fue ajustado con la prueba Dunnett; (**) fueron altamente significativos e indican un valor $p < 0.00$, (***) fueron significativos e indican un valor $p < 0.01$.

En el grupo de las jóvenes con esquema tradicional (0-2-6), en la muestra basal antes de la vacunación, los títulos de anti-L1 en general fueron bajos ($M = 21,043$) por debajo del punto del corte ($M = 28,385.70$), pero se observó que el 32.76% (38/116) de las mujeres fueron seropositivas. Después de la vacunación al mes 7 se observó un aumento de aproximadamente el doble en los títulos de anti-L1 ($M = 50,698.58$) y una seropositividad del 81.9% (95/116). Los títulos de anticuerpos al mes 21 disminuyeron a niveles similares del mes 0 ($M = 20,671.25$), con una seropositividad del 38.79% (45/116). Sin embargo, al mes 61 siguieron disminuyendo los niveles de anti-L1 ($M = 16,687.15$), ubicándose por debajo de los niveles del mes 0, presentando una seropositividad del 23.28% (27/116).

Asimismo, las diferencias en los títulos de anticuerpos anti-L1 HPV18 fueron altamente significativas del mes 0 con respecto al mes 7 y 61, el mes 7 con respecto al mes 21 y 61 y el mes 21 con respecto al mes 61. Lo que supone que los títulos de anticuerpo anti-L1 aumentan al mes de completar el esquema de vacunación (mes 7), pero disminuyeron con el paso del tiempo a niveles similares a la infección natural (Figura 17A).

Se puede observar que en el grupo de las adolescentes con el esquema tradicional (0-2-6), al mes 7 los títulos de anticuerpos anti-L1 se incrementan con la vacunación ($M = 75,645.55$) y se tiene un 87.1% (108/124) de sero-positividad. Posteriormente, observamos una tendencia a la disminución de los títulos de anti-L1 con respecto al tiempo (mes 21, $M = 28,006.32$; mes 61 $M = 20,621.28$) por debajo del PC, con seroprevalencias que disminuyeron al 49.19% (61/124) en el mes 21 y al 31.45% (39/124) en el mes 61. Las diferencias en los títulos de anticuerpos anti-L1-HPV18 fueron altamente significativas para el mes 7 con respecto al mes 21 y 61, y del mes 21 con respecto al mes 61. Lo que sugiere que los niveles de anticuerpo anti-L1 presentan un comportamiento similar al del grupo de las jóvenes con el esquema tradicional (Figura 17B).

Las adolescentes con el esquema de reinmunización (0-2-60), presentaron altos títulos de anticuerpos anti-L1 al mes 7 ($M = 70,406.34$), semejante a lo observado en el esquema tradicional, y con una seropositividad del 85.19% (46/54). Hacia el mes 21 los títulos de anticuerpos disminuyeron 3.4 veces ($M = 20,487.12$) ubicándose por debajo del punto de corte y con una seropositividad del 35.19% (19/54). Sin embargo, al mes 61 después de la reinmunización los títulos de anti-L1 se incrementan tan solo 1.6 veces ($M = 33,983.67$) con respecto al mes 21, lo cual fue por debajo de lo observado para anticuerpos anti-VLPs para este grupo. Asimismo, la seropositividad para anti-L1 es de 57.41% (31/54). Las diferencias entre los títulos de anticuerpos anti-L1 en este esquema de reinmunización fueron altamente significativas en el mes 7 con respecto al mes 21 y el mes 61, mientras que el mes 21 presenta diferencias significativas con respecto al mes 61. Aunque los títulos de anticuerpos anti-L1 disminuyeron al mes 21, estos aumentan después de la reinmunización al mes 61 pero en menor proporción que lo observado para anticuerpos anti-VLPs en este esquema extendido de vacunación, lo que sugiere que la

reinmunización no estimula tan eficientemente la producción de anticuerpos anti-L1 como lo hace para anti-VLPs (Figura 17C y 16C).

Para poder demostrar de una forma más esquemática estas variaciones en los títulos de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 de las diferentes poblaciones en los diferentes esquemas de vacunación, los datos de las medianas fueron graficados con respecto al tiempo de vacunación (Figura 18).

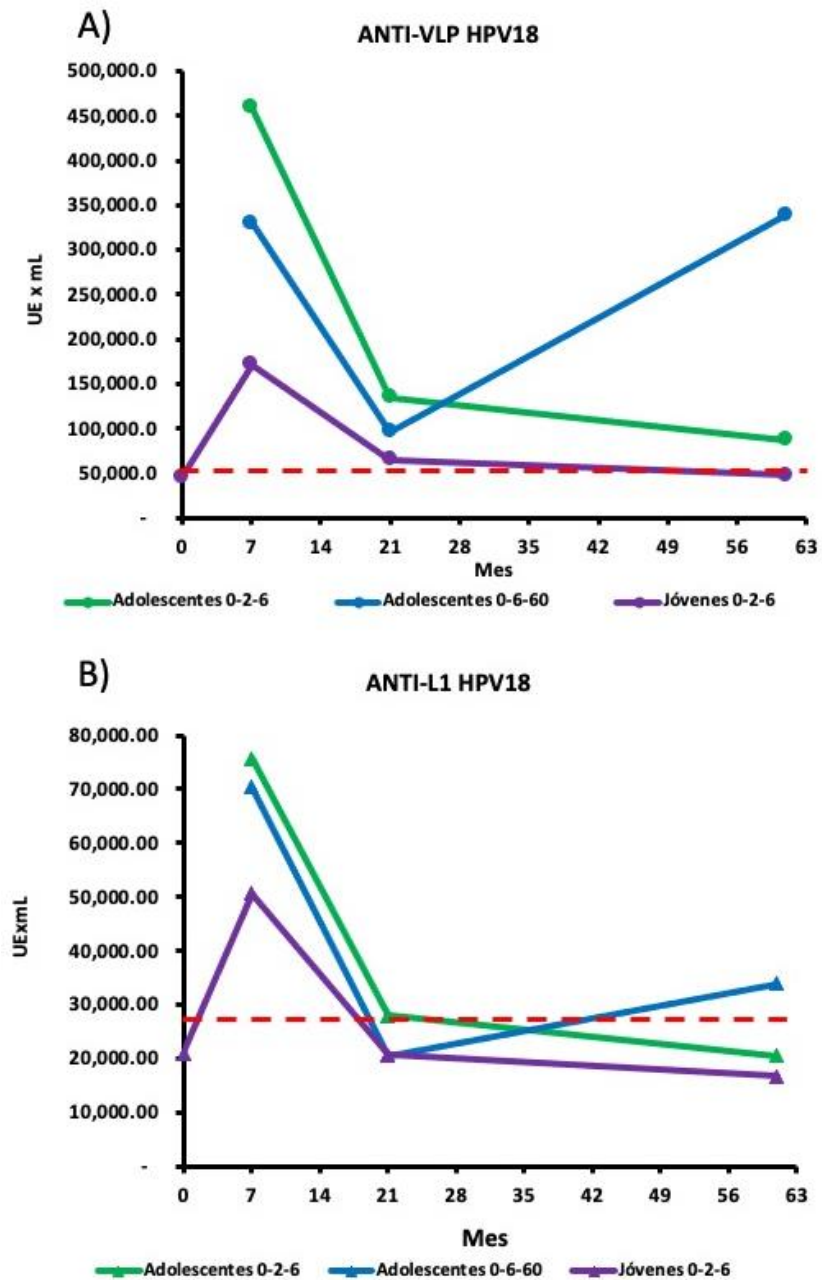


Figura 18. Tendencia de las medianas de los niveles anti-VLPs-HPV18 y anti-L1-HPV18 en diferentes tiempos post-vacunación.

A) Tendencia de medianas de los niveles anti-VLPs en los diferentes tiempos post-vacunación. Línea roja indica el punto de corte con valor de 51,173.52. B) Tendencia de medianas de los niveles anti-L1 en los diferentes tiempos post-vacunación. Línea roja indica el punto de corte con valor de 28,385.70.

En esta gráfica se puede observar que la tendencia en los títulos de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 tanto en las adolescentes como en el grupo de jóvenes con el esquema tradicional de vacunación (0-2-6 meses) presentan su punto más alto al mes 7 y tienden a disminuir con respecto al paso de los meses hasta llegar a su mínimo en el mes 61, aunque los títulos de anti-VLPs y anti-L1 son más bajos en el grupo de jóvenes (Figura 18A y B, líneas moradas). Sin embargo, al mes 61, solo las adolescentes que recibieron el esquema de 0-2-60 meses, aumentan sus niveles de anticuerpos anti-VLPs, mientras que los anti-L1 a pesar de que aumentan, esto es por debajo de lo observado para anti-VLPs (Figura 18A y B, línea azul). Sin embargo, es importante notar que las respuestas robustas del nivel de ambos tipos de anticuerpos se dan al mes 7 en ambos grupos de adolescentes.

8.3 Determinación del índice de protección para HPV18 en el banco de suero de mujeres vacunadas

Con el objeto de tratar de obtener un resultado más real en relación a la presencia de anticuerpos anti-VLPs asociados a protección, se decidió establecer lo que denominamos un Índice de Protección (IP), lo cual se refiere a dividir el título de anticuerpos anti-VLPs entre anti-L1. Esto se llevó a cabo para cada uno de los grupos con sus respectivos esquemas y tiempos de vacunación, para determinar la protección de las mujeres a lo largo del tiempo post-vacunación (Tabla 5). El punto de corte se obtuvo de un pool de adolescentes no vacunadas, utilizando los valores entre el percentil 5 al 95 más 3 desviaciones estándar, siendo su valor de 3.64145 (Figura 19).

Tabla 6. Índice de protección de las mujeres vacunadas en diferentes tiempos post-vacunación.

Grupo (esquema)	Total	Mes 0		Mes 7		Mes 21		Mes 61		p
	n=	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	
Adolescentes (0-2-6)	n= 124									
IP negativo				37	29.84	44	35.48	50	40.32	
IP positivo				87	70.16	80	64.52	74	59.68	
										0.22
Adolescentes (0-6-60)	n=54									
IP negativo				18	33.33	25	46.3	9	16.67	
IP positivo				36	66.67	29	53.7	45	83.33	
										0.00
Jóvenes (0-2-6)	n=116									
IP negativo		82	70.69	59	50.86	67	57.76	69	59.48	
IP positivo		34	29.31	57	49.14	49	42.24	47	40.52	
p				0.00		0.00		0.00		0.02

Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p ajustado con la prueba de Dunnett.

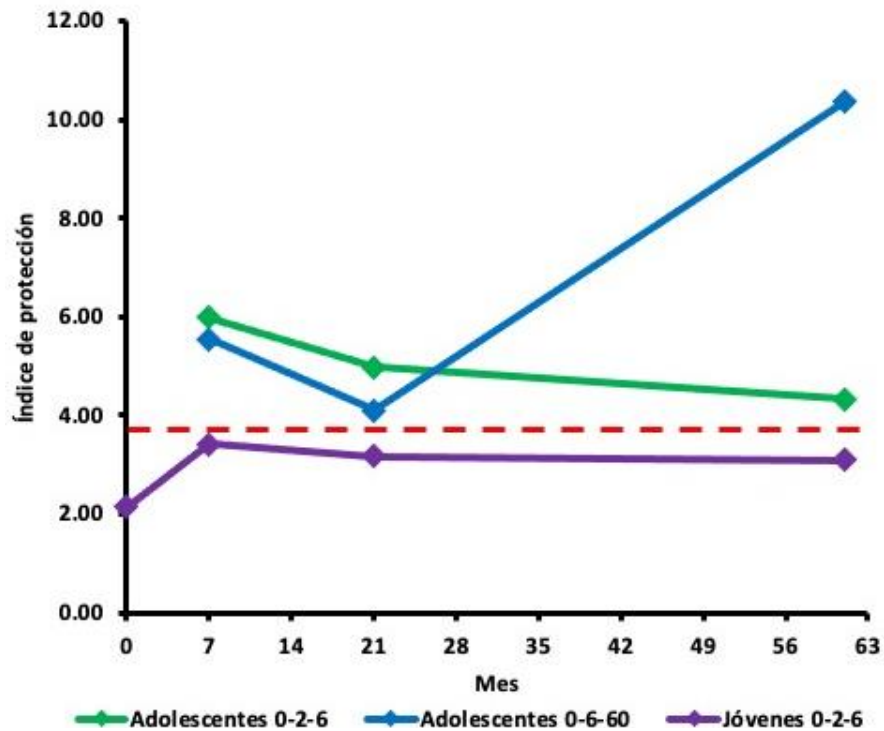


Figura 19. Tendencia de la mediana del índice de protección en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación contra HPV.

Línea roja indica el punto de corte del índice de protección con valor de 3.64145.

Al analizar los IPs en los diferentes grupos se observó que en las jóvenes con el esquema tradicional (0-2-6), al mes 0 se observa que el 29.31% (34/116) presentan un índice de protección positivo ($M = 2.14$) pero por debajo del punto de corte (3.6414). El IP se incrementa hacia el mes 7 ($M = 3.41$) a 49.14% (57/116), y disminuyó a 42.24% (49/116) y 40.52% (47/116) en los meses 21 ($M = 3.16$) y 61 ($M = 3.09$), respectivamente, sin embargo, las medianas siempre se mantienen por debajo del punto de corte; aunque existen diferencias significativas ($p=0.02$) (Tabla 5). Los resultados sugieren que la vacunación aumenta la producción de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1, mejorando el índice de protección, sin embargo, los títulos de ambos anticuerpos disminuyen con el paso de tiempo, lo que se ve reflejado en el IP (Figura 19, línea morada). En el caso de las jóvenes, observamos que alrededor de un cuarto de la población muestra un IP positivo al mes 0, debido quizás a la exposición previa al virus. Sin embargo, los resultados sugieren que la vacunación aumenta la producción de anticuerpos anti-VLPs y anti-L1, aunque la mediana se mantiene por debajo del punto de corte, mejorando el IP (Figura 19, línea morada).

En el caso de las adolescentes con el esquema tradicional (0-2-6), al mes 7 ($M = 5.98$) se observa que el 70.16% (87/124) obtuvieron un IP positivo, ubicado por encima del punto de corte. Al mes 21 ($M = 4.98$), este IP se mantiene positivo con el 64.52% (80/124), mientras que en el mes 61 ($M = 4.33$), disminuyó a un 59.68% (74/124). Sin embargo, no existen diferencias significativas ($p= 0.22$) (Tabla 5), lo que sugiere que el IP es estable después de completar el esquema de vacunación (Figura 19, línea verde). Estos resultados sugieren que la vacunación induce anticuerpos anti-VLPs y anti-L1 en ambos grupos, pero la respuesta de las adolescentes es más robusta en comparación con las jóvenes que recibieron el mismo esquema de vacunación, ya que la mediana del IP en las adolescentes se mantiene por encima del punto de corte a pesar del tiempo.

En el caso de las adolescentes que recibieron el esquema con la reinmunización, se observó que al mes 7 ($M = 5.55$) (al mes de recibir la segunda dosis) un 66.67% (36/54) presentaron un IP positivo, ubicado por encima del punto de corte. Al mes 21 ($M = 4.1$) el IP disminuyó al 53.7% (29/54), de forma similar a los grupos con el esquema de vacunación tradicional, pero al mes 61 ($M = 10.35759$) (un mes después de la

reinmunización), la positividad del IP llegó hasta 83.33% (45/54), siendo la diferencia estadística altamente significativa ($p= 0.000$). Al graficar las medianas de los IPs de este grupo se observa claramente el incremento sustancial del IP positivo después de la vacunación al mes 60 (Figura 19, línea azul). Este resultado sugiere que los títulos de anticuerpos anti-VLPs después de la reinmunización al mes 60 fueron mucho más altos que los de anti-L1, es por esto que se observa el incremento favorable del IP.

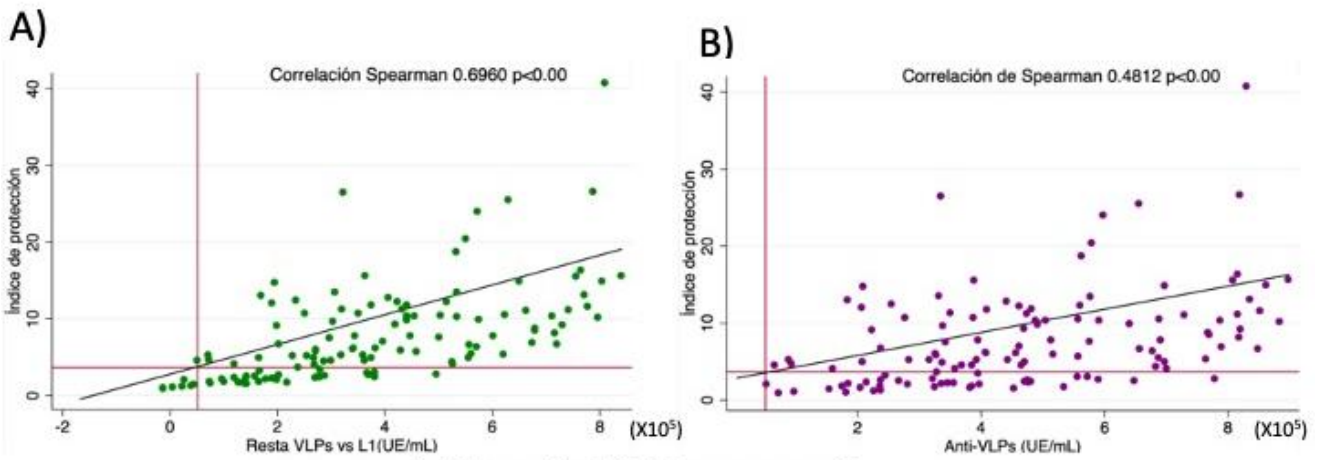
Al evaluar la capacidad del índice de protección para clasificar correctamente en positivos y negativos a las mujeres de nuestra población través del modelo de regresión logística, se obtuvo una sensibilidad del 65.24%, especificidad de 60.22% y valor ROC de 0.63, muy semejante a lo observado para UE VLPs. Sin embargo, aquí mejora la especificidad, indicando la capacidad de nuestro punto de corte de clasificar como positivos.

Para confirmar que obtener el índice de protección nos aporta mayor información para determinar la cantidad de anticuerpos neutralizantes generados por la vacunación, decidimos realizar una correlación de Spearman para determinar si el IP (dividir UE/mL de anti-VLPs entre las UE/mL de anti-L1), es el proceso adecuado, o si solo restar las UE/mL anti-VLPs menos UE/mL de anti-L1, puede ser útil para determinar la proporción total de anticuerpos neutralizantes o protectores generados por la vacunación. También para determinar si obtener el índice de protección es relevante a comparación de solo obtener las UE/mL de un ELISA-VLPs (Figura 20).

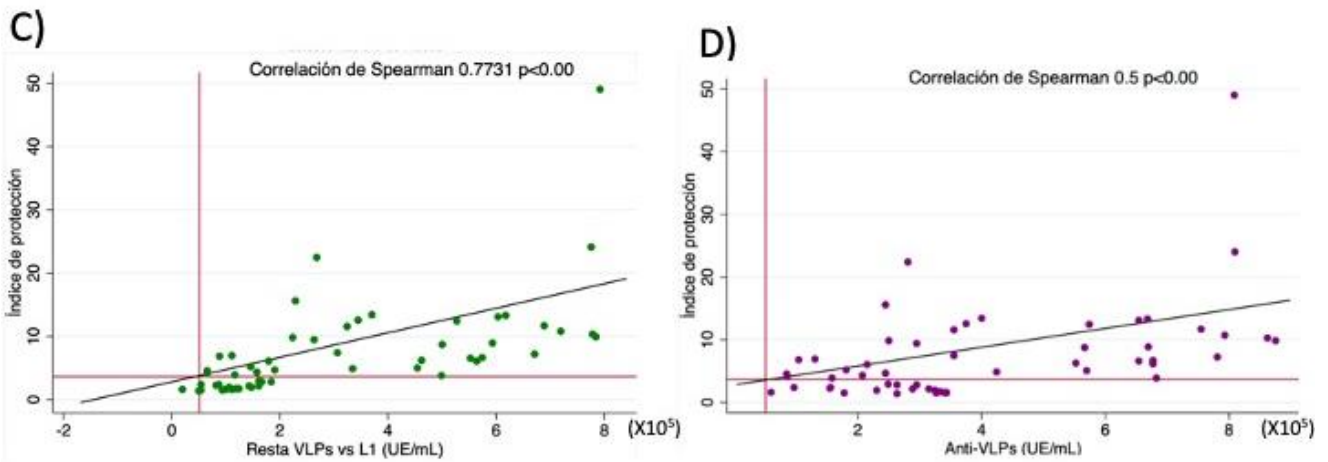
Se observó que al correlacionar el IP con la resta de las UE/mL de anti-VLPs y anti-L1 para cada grupo, estos presentaron una correlación cercana o mayor a 0.7, lo que nos indica que el IP y la resta de anti-VLPs y L1, son observaciones similares. Sin embargo, obtener el IP nos muestra de forma más clara, si estas mujeres presentan una mayor proporción de anticuerpos neutralizantes (anti-VLPs) (Figura 20A, C y E). En el caso de la correlación del IP con los niveles de anti-VLPs, las adolescentes con el esquema tradicional (0-2-6) y con el esquema de reinmunización (0-6-60) presentaron una correlación baja (0.4812 y 0.5, respectivamente), indicando que no existe correlación entre las variables, lo que significa que el IP nos permite determinar realmente los anticuerpos contra epítopes conformacionales (VLPs), lo que se ha sugerido que correlaciona con una respuesta protectora generada por la vacunación. Este resultado también indica que el ELISA-VLPs

estaría sobre estimando la respuesta de anticuerpos neutralizantes, ya que el ensayo ELISA-VLPs también está midiendo anticuerpos anti-L1 que son no neutralizantes (Figura 20B y D). Las jóvenes que recibieron el esquema tradicional presentaron una correlación de 0.6942, lo que nos indica que son comparables el IP con los niveles de anti-VLPs, esto debido a la proporción de mujeres que han estado previamente expuestas al virus (Figura 20F).

Adolescente 0-2-6 meses mes 7



Adolescente 0-6-60 meses mes 7



Jóvenes 0-2-6 meses mes 7

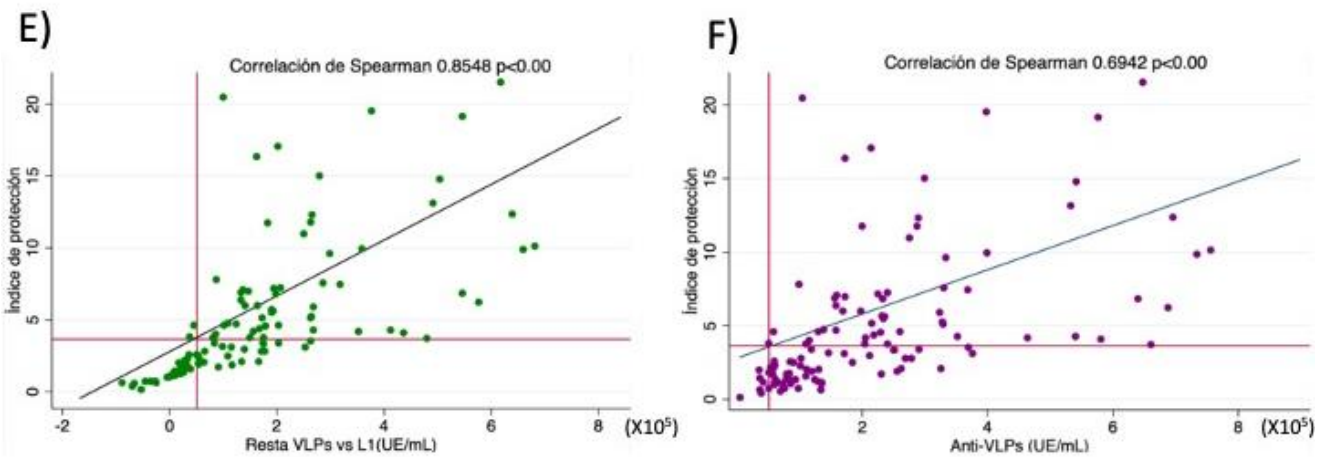


Figura 20. Correlación del índice de protección con la resta de anti-VLPs vs anti-L1 y los niveles de anti-VLPs.

8.3.1 Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 7

Se observó que algunas mujeres fueron negativas en su IP al mes de terminar el esquema de vacunación (mes 7), por lo que decidimos analizar este subgrupo para observar su comportamiento con respecto al tiempo (Tabla 6) (Figura 21).

Tabla 7. Caracterización de mujeres vacunadas con un índice de protección negativo al mes 7 en diferentes tiempos post-vacunación.

Grupo (esquema)	Total	Mes 0		Mes 7		Mes 21		Mes 61		p
	n=	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	
Adolescentes (0-2-6)	n= 37									
IP negativo				37	100	17	45.95	19	51.35	
IP positivo				0	0	20	54.05	18	48.65	
										0.00
Adolescentes (0-6-60)	n=18									
IP negativo				18	100	10	55.56	8	44.44	
IP positivo				0	0	8	44.44	10	55.56	
										0.00
Jóvenes (0-2-6)	n=59									
IP negativo		53	89.83	59	100	43	72.88	42	71.19	
IP positivo		6	10.17	0	0	16	27.12	17	28.81	
p							0.03		0.05	0.00

Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p ajustado con la prueba de Dunnett.

Del subgrupo de jóvenes (esquema tradicional 0-2-6) con IP negativo al mes 7 (n=59), 10.17% (6/59) iniciaron con un IP positivo al mes 0, al mes 7 todas estas mujeres presentan un IP negativo (59/59) y hacia el mes 21, 27.12% (16/59) presentaron un IP positivo, lo cual se mantuvo estable hacia el mes 61 (28.81%; 17/59) (Tabla 6). Se puede observar que a pesar de que estas mujeres presentaron un IP por debajo del punto de corte al mes 7, un 34% de estas mujeres presentaron un cambio en su IP que se ubica por encima del punto de corte (positivo) al mes 21 y de ahí se mantuvo estable esta proporción. Sin embargo, el 66% presentó un IP que a lo largo del tiempo se mantuvo por debajo del punto de corte (negativo).

En el caso de las adolescentes con el esquema tradicional 0-2-6 que presentaron IP negativo al mes 7 (n=37) se observa que el 54.05% (20/37) presentaron un IP positivo en el mes 21, porcentaje que siguió disminuyendo hacía el mes 61 (48.65%;18/37), presentando diferencias estadísticas que fueron altamente significativas ($p<0.00$) (Tabla 6). Sin

embargo, no existen diferencias significativas entre los porcentajes de mujeres que presentan un IP positivo entre los meses 21 y 61 ($p=0.64$, no mostrado). A pesar de que todas estas adolescentes presentaron al mes 7 un IP que se ubica por debajo del punto de corte (negativo) debido a que presentan una mayor proporción de anticuerpos anti-L1, al mes 21, la mitad presentó un IP positivo, indicando que en este mes la proporción de anti-VLPs fue mayor y se mantuvo estable hasta el mes 61.

En el caso de las adolescentes que recibieron el esquema con la reinmunización, pero presentaron un IP negativo al mes 7 ($n=18$), se observa que en el mes 21 aumenta a 44.44% (8/18) el IP positivo, y este se incrementa hasta 55.56% (10/18) al mes 61 después de la reinmunización, siendo las diferencias entre los tiempos de seguimiento altamente significativas ($p<0.00$) (Tabla 6). No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de las adolescentes que presentan un IP positivo entre los meses 21 y 61 ($p=0.51$, no mostrado). En este grupo, al mes 21, cerca de la mitad de las adolescentes presentaron un IP positivo de forma similar que las adolescentes que recibieron el esquema tradicional y se mantiene estable hasta el mes 61. Sin embargo, hay que recalcar que el porcentaje en el grupo de las adolescentes con el esquema tradicional disminuyó en el mes 61, mientras que en el grupo de las adolescentes con el esquema de reinmunización este porcentaje aumentó, aunque sin llegar a ser significativo.

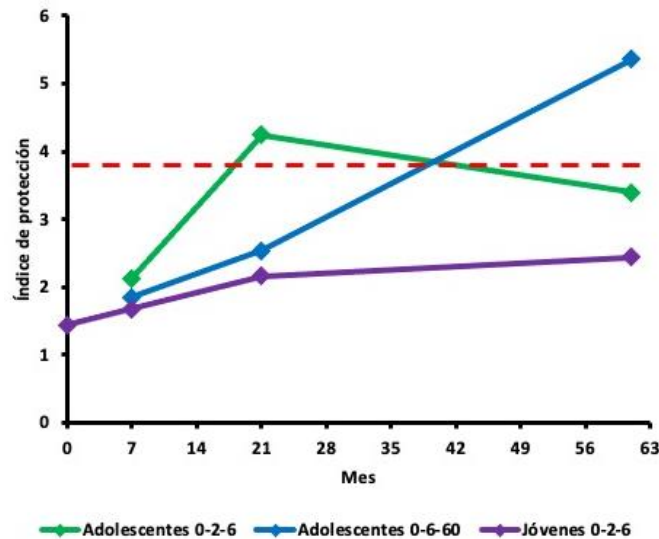


Figura 21. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 7 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación.

Línea roja indica el punto de corte del índice de protección con valor de 3.64.

Al analizar la tendencia de las medianas a lo largo del tiempo, se observó que el grupo de las jóvenes con el esquema tradicional, la mediana al mes 0 fue de 1.44, al mes 7 donde todas las jóvenes presentan un IP negativo, la mediana fue de 1.67, en el mes 21 aumentó a 2.16 y en el mes 61 fue de 2.44 (Figura 21). Al graficar las medianas se observó en el caso de las jóvenes, que hay un incremento lento y paulatino del IP con el paso del tiempo, sin embargo, las medianas se mantuvieron por debajo del punto de corte. Existen diferencias muy significativas ($p < 0.00$) entre las medianas, aunque no se observaron diferencias entre el mes 21 y 61, lo que indica estabilidad entre las medianas. Esto sugiere que estas jóvenes presentan una respuesta inmune hacia la producción de anti-L1, sin embargo, con la vacunación y posible exposición con el virus, algunas jóvenes fueron capaces de aumentar la proporción de anti-VLPs, mejorando el valor del IP, pero esta respuesta es débil y lenta (Figura 21, línea morada).

En el caso de las adolescentes con el esquema tradicional 0-2-6 que fueron negativas al mes 7 presentaron una mediana de 2.12, que se ubica por debajo del punto de corte, en el mes 21 fue de 4.24, ubicándose por encima del punto de corte, sin embargo, en el mes 61 disminuyó a 3.39 ubicándose ligeramente por debajo del punto de corte, y observándose diferencias altamente significativas ($p < 0.00$). No se observaron diferencias significativas entre los meses 21 y 61, a pesar de que hay una disminución del valor de la mediana, indicando estabilidad entre ellas (Figura 21, verde).

En el caso de las adolescentes que recibieron el esquema con la reinmunización, pero presentaron un índice de protección negativo al mes 7, la mediana fue de 1.85, en el mes 21, aumentó a 2.53, en ambos casos se mantiene por debajo del punto de corte, pero un mes después de la reinmunización, en el mes 61 la mediana aumenta hasta 5.36, observándose diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.00$) entre todas las medianas (Figura 21, línea azul).

8.3.2 Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 61

Posteriormente, decidimos analizar al subgrupo de las mujeres que obtuvieron un IP negativo al mes 61, para evaluar el comportamiento de la protección en el tiempo (Tabla 7) (Fig. 22).

Tabla 8. Mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 61 en diferentes tiempos post-vacunación.

Grupo (esquema)	Total	Mes 0		Mes 7		Mes 21		Mes 61		p
	n=	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	
Adolescentes (0-2-6)	n= 50									
IP negativo				19	38	35	70	50	100	
IP positivo				31	62	15	30	0	0	
										0.00
Adolescentes (0-6-60)	n=9									
IP negativo				8	88.89	5	55.56	9	100	
IP positivo				1	11.11	4	44.44	0	0	
										0.04
Jóvenes (0-2-6)	n=69									
IP negativo		60	86.96	42	60.87	54	78.26	69	100	
IP positivo		9	13.04	27	39.13	15	21.74	0	0	
p					0.00		0.27		-	0.00

Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p ajustado con la prueba de Dunnett.

Las jóvenes con el esquema tradicional de 0-2-6 que fueron negativas al mes 61 (n=69), mostraron que en el mes 0 el 13.04% (9/69) tenían un IP positivo, el cual aumentó al mes 7 a 39.13% (27/69), para posteriormente disminuir en el mes 21 a 21.74% (15/69) hasta llegar a ser negativas al mes 61, siendo esto estadísticamente significativo ($p < 0.00$) (Tabla 7). Se puede observar un aumento de mujeres que presentan un IP positivo al mes de completar el esquema de vacunación (39.13%), sin embargo, con el paso del tiempo este IP va cambiando a negativo hasta el mes 61 donde el 100% presentan un IP negativo.

En el grupo de adolescentes con el esquema tradicional 0-2-6 que fueron negativas al mes 61 (n=50), se observó que en el mes 7 el 62% (31/50) de estas jóvenes presentaron un IP positivo, que disminuyó al 30% (15/50) en el mes 21, hasta llegar a ser negativas al mes 61, siendo estas diferencias altamente significativas ($p < 0.00$) (Tabla 7).

En el caso de las adolescentes que recibieron el esquema con la reinmunización, y que presentaron un IP negativo al mes 61 ($n=9$), de este grupo solo el 11.11% (1/9) tuvieron un IP positivo al mes de recibir la segunda dosis (mes 7), el cual aumentó al 44.44% (4/9) hacia el mes 21, sin embargo, al mes 61 a pesar de haber sido reinmunizadas todas presentaron una IP negativo, presentando diferencias significativas entre los tiempos ($p<0.05$) (Tabla 7).

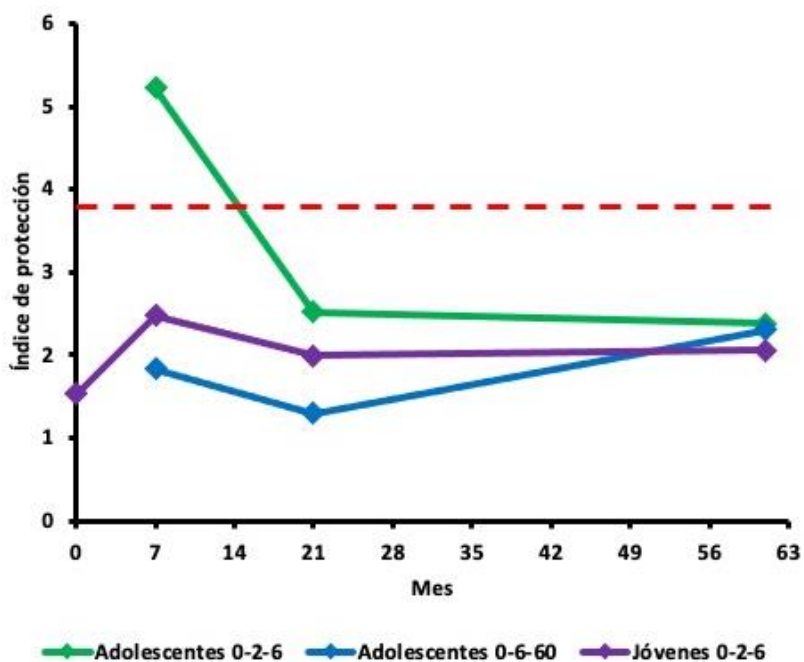


Figura 22. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 61 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación. Línea roja indica el punto de corte del índice de protección con valor de 3.64145.

Por otra parte, se graficaron las medianas del IP para evidenciar la tendencia en el comportamiento de éste grupo que fueron negativas al mes 61 (Figura 22). Las jóvenes con el esquema tradicional de 0-2-6 negativas al mes 61 ($n=69$) mostraron un incremento de la mediana del IP de 1.52 a 2.47 del mes 0 al mes 7, respectivamente para posteriormente disminuir a 1.99 en el mes 21 y mantenerse estable hasta el mes 61 (IP = 2.05). Al analizarlos por separado los datos, se observó que el mes 0 presenta diferencias muy significativas con el mes 7 ($p<0.00$, dato no mostrado) y significativas con el mes 21 ($p<0.05$, datos no mostrados), lo que nos indica que la vacunación aumenta la producción de anti-VLPs (aumento del IP). El mes 7 presenta diferencias muy significativas con el mes

21 y 61 ($p < 0.00$, datos no mostrados), demostrando que después del mes de concluir el esquema de vacunación, empieza a disminuir la proporción de anti-VLPs y aumenta la de anti-L1 con el paso del tiempo. Debe de recalcarse que todo este comportamiento, no logra sobrepasar el valor del punto de corte, por lo tanto, la respuesta de anti-VLPs de estas jóvenes se puede considerar baja (Figura 22, línea morada).

En el grupo de adolescentes con el esquema tradicional 0-2-6 (Figura 22 línea verde) con IP negativo al mes 61 ($n=50$), se observó que el IP fue de 5.21 al mes 7, esto por encima del punto de corte, pero disminuyó a 2.52 en el mes 21 y se mantuvo estable hasta el mes 61 (IP= 2.37). El mes 7 presenta diferencias muy significativas con los meses 21 y 61, al igual que el mes 21 con el 61 ($p < 0.00$, datos no mostrados). Esto sugiere que estas adolescentes al completar el esquema de vacunación presentaron una respuesta robusta de anti-VLPs lo que impacta en un alto IP, pero este va en disminución con respecto al tiempo, debido a una disminución de la proporción de anti-VLPs y un aumento de anti-L1 de manera similar que las jóvenes.

En el caso de las adolescentes que recibieron el esquema con la reinmunización y con IP negativo al mes 61 ($n=9$) (Figura 22, línea azul), se observó que presentaron un IP de 1.83 en el mes 7, el cual disminuyó a 1.29 hacia el mes 21, pero aumentó hasta 2.3 en el mes 61, un mes después de la reinmunizadas. Sin embargo, el IP de este grupo se mantiene todo el tiempo por debajo del punto de corte. Existen diferencias muy significativas ($p < 0.00$, datos no mostrados) entre el mes 7 con respecto al mes 21, lo que indica la disminución de la mediana del IP, debido al aumento de la proporción de anti-L1, sin embargo, también existen diferencias significativas ($p < 0.05$, datos no mostrados) entre el mes 21 y 61, lo que indica que si existe un aumento de la mediana con el paso del tiempo.

Se puede observar que las medianas fueron similares en el mes 61 para los 3 grupos, por lo que puede sugerir que la respuesta débil y no sostenida de anti-VLPs no está relacionada con la edad y que posiblemente hay otros factores que influyen en esta respuesta baja de anticuerpos anti-VLPs, como pudiera ser la exposición previa.

8.3.3 Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección positivo al mes 0

Otro subgrupo de interés es el de las mujeres jóvenes que al tiempo 0 presentaron un IP positivo, para lo que analizamos este grupo en su comportamiento a lo largo del tiempo (Tabla 8).

Tabla 8. Mujeres vacunadas que presentan un índice de protección positivo en el mes 0 en diferentes tiempos post-vacunación.

Grupo (esquema)	Total	Mes 0		Mes 7		Mes 21		Mes 61		p
	n=	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	
Jóvenes (0-2-6)	n=34									
IP negativo		0	0	6	18.18	9	27.27	7	21.88	
IP positivo		34	100	27	81.82	24	72.73	25	78.12	
p										0.02

Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p ajustado con la prueba de Dunnett.

En este grupo existen 34 jóvenes que presentaron un IP positivo en el mes 0. Hacia el mes 7, el grupo de IP positivo disminuyó a 81.82% (27/34), y siguió reduciéndose a 72.73% (24/34) en el mes 21, el cual se mantuvo hasta el mes 61 (78.12%; 25/34) (Tabla 8).

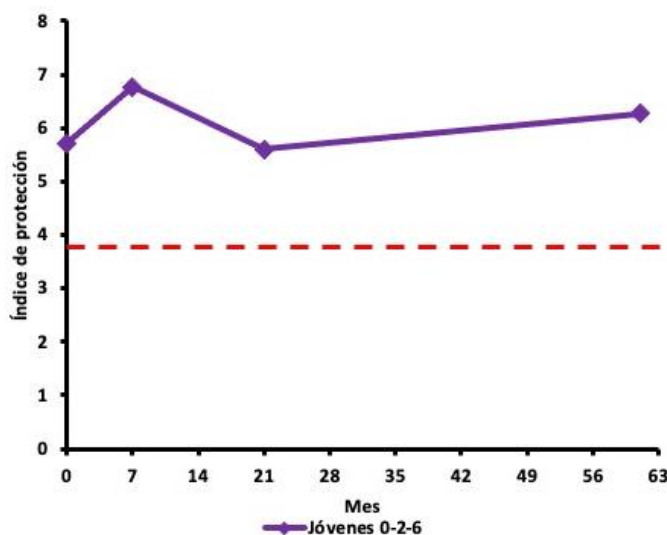


Figura 23. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección positivo al mes 0 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación

Línea roja indica el punto de corte del índice de protección con valor de 3.64145.

Al graficar las medianas del IP se observó que la mediana fue de 5.72 en el mes 0, la cual aumentó a 6.77 en el mes 7 al término del esquema de vacunación, pero con el paso

del tiempo disminuyó a 5.59 en el mes 21 y se mantuvo en un rango similar (IP = 6.26) hacia el mes 61. Es importante mencionar que la mediana se mantiene por encima del punto de corte todo el tiempo (Figura 23). Existen diferencias altamente significativas ($p < 0.00$, datos no mostrados) entre el mes 0 y 7, lo que nos indica que la vacunación produce una mayor proporción de anti-VLPs (reflejado por el aumento de la mediana). También existen diferencias muy significativas ($p < 0.00$, datos no mostrados) entre el mes 7 con los meses 21 y 61, pero no existen diferencias significativas entre los meses 21 y 61. La vacunación en este grupo de jóvenes que ya presentaban un IP por encima del punto de corte al mes 0, pareciera reforzar y mantener los niveles de anti-VLPs a lo largo del tiempo.

8.3.4 Respuesta de mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 0

Tomando en cuenta lo anterior, también nos interesó el comportamiento a lo largo del tiempo de las jóvenes que presentaron un IP negativo al mes 0 (Tabla 9).

Tabla 9. Mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo en el mes 0 en diferentes tiempos post-vacunación.

Grupo (esquema)	Total	Mes 0		Mes 7		Mes 21		Mes 61		p
	n=	n=	%	n=	%	n=	%	n=	%	
Jovenes (0-2-6)	n=82									
IP negativo		82	100	53	64.63	57	69.51	60	73.17	
IP positivo		0	0	29	35.37	25	30.49	22	26.83	
p										0.00

Las diferencias fueron obtenidas a través de la prueba Kruskal-Wallis y el valor de p ajustado con la prueba de Dunnett.

En este grupo se observa que 82 jóvenes presentaron un IP negativo en el mes 0. En el mes 7, la cantidad de jóvenes que presentaron un IP positivo aumentó a 35.37% (29/82), y posteriormente disminuye en los meses 21 (30.49%, 25/82) y 61 (26.83%, 22/82,) (Tabla 9). Podemos observar, que la gran mayoría de las mujeres se mantiene con un IP negativo a través del tiempo; solo en el mes 7 después de completar el esquema de vacunación, hay un aumento del porcentaje de mujeres positivas.

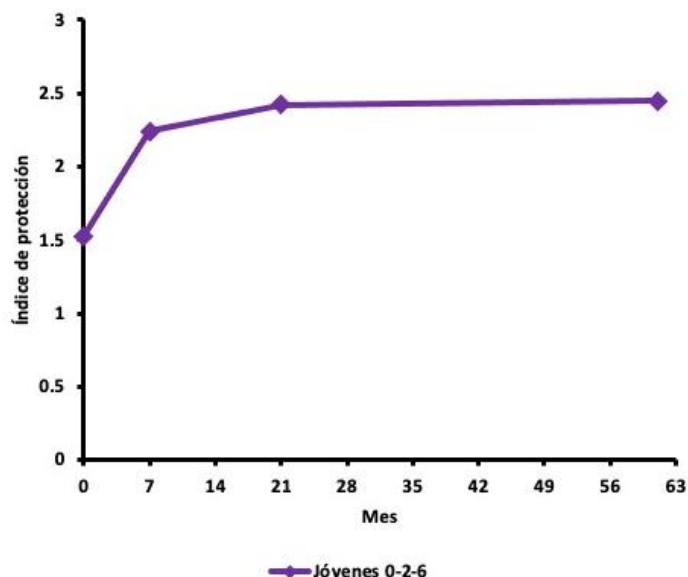


Figura 24. Tendencia de la mediana del índice de protección de las mujeres vacunadas que presentan un índice de protección negativo al mes 0 en los diferentes esquemas a diferentes tiempos post-vacunación

Al graficar las medianas del IP se observó que al mes 0 esta fue de 1.52, aumento a 2.24 en el mes 7 y siguió en aumento hasta 2.42 en el mes 21, lo cual se mantuvo hasta el mes 61 (IP = 2.44), sin embargo, estos valores se encuentran por debajo del punto de corte (Figura 24). El mes 0 presenta diferencias muy significativas ($p < 0.00$, datos no mostrados) con los meses 7 y 61, lo que indica que la vacunación mejora la proporción de anti-VLPs. El mes 7 presentan diferencias muy significativas ($p < 0.00$, datos no mostrados) con el mes 21 y 61 mientras que también existen diferencias significativas ($p < 0.05$, datos no mostrados) entre el mes 21 y 61.

9. Discusión.

Uno de los ensayos utilizados para la validación de la inmunogenicidad generada por las vacunas contra HPV son los ELISA-VLPs, que permiten medir los anticuerpos contra epítopes conformacionales unidos a una superficie sólida. La ventaja de este ensayo es que es muy sensible, reproducible, y económico en comparación con los ensayos de neutralización de pseudoviriones o el inmunoensayo competitivo Luminex (cLIA) (Schiller & Lowy, 2009).

La estandarización de los ensayos es indispensable para obtener resultados reproducibles y comparables entre diferentes placas de ELISA colocadas al mismo

tiempo o en diferentes tiempos (Miura et al., 2008). Para ello, se requiere de controles positivos y negativos para saber que las condiciones de cada placa son iguales entre si y que los resultados sean reproducibles y comparables entre placas (Ferguson et al., 2006). Por esa razón, estandarizamos los ensayos con sueros policlonales de conejo α L1-HPV18 y α VLP-HPV18 para usarlo como control de reconocimiento para los antígenos L1 y VLPs HPV18 de forma específica en cada ensayo. Una de las razones de utilizar un suero policlonal es debido a que nos permite ver todo el repertorio de anticuerpos generados por la inoculación repetitiva de la proteína completa de interés. En este caso, usamos los sueros de conejo producidos en nuestro laboratorio al inocular a cada conejo con la proteína L1 desnaturalizada o VLPs HPV18, controlando la estabilidad de la proteína al momento de inoculación, así como evaluar el comportamiento de la respuesta inmune específica del antígeno. Observamos, que en el suero policlonal α VLP-HPV18 de conejo reconoce de forma similar a las VLPs y a L1 a diferentes diluciones. Sin embargo, el policlonal anti-L1-18 si fue capaz de diferenciar entre VLPs y L1, con títulos muy altos. Una de las razones que podría explicar esta “deficiencia” en el reconocimiento del suero policlonal α VLP-HPV18 de conejo, es que se ha observado que en la preparación de las VLPs, hay moléculas mal ensambladas que podrían estar exponiendo epítopes lineales que se encuentran internamente en las VLPs (Ferguson et al., 2006; Sapp et al., 1994). Otra razón, es que se han observado epítopes tanto conformacionales como lineales en la superficie de las cápsides (Christensen et al., 1996). A pesar de que, en el laboratorio nos aseguramos, a través de microscopía electrónica, de que las VLPs producidas estuvieran bien conformadas y de mantener la cadena de frío al momento de la inoculación del conejo, es posible que las VLPs HPV18 son poco estables y sensibles a la degradación, explicando así la presencia de altos títulos de anticuerpos que reconocen a la proteína L1 desnaturalizada. Además, se validaron los ensayos con sueros humanos de mujeres con CaCU y vacunadas como controles (sueros que reconocen solo a uno de los 2 antígenos), que indica que la metodología esta optimizada y pueden diferenciarse claramente los anticuerpos anti-VLPs de anti-L1.

Para determinar la protección de la vacuna contra HPV es necesario realizar el seguimiento de los niveles de anticuerpos neutralizantes en mujeres vacunadas contra HPV por diferentes periodos de tiempo. En el 2016, se evaluó a través del ensayo cLIA los niveles de anticuerpos neutralizantes contra HPV18 generados por la vacuna tetravalente en adolescentes 9-10 años (un grupo recibió dos dosis 0-6 meses y las otras recibieron tres dosis 0-2-6 meses) y jóvenes 18-24 años (recibieron 3 dosis) en el cual, todas las vacunadas fueron seropositivas al mes 7. El primer seguimiento que se realizó de estos grupos fue a través de cLIA hasta el mes 21, en el cual la seropositividad de las adolescentes con 2 y 3 dosis fue de 70.2% y 86.3%, respectivamente; mientras que en las jóvenes fue del 56.6% (Hernández-Ávila et al., 2016). En el caso de ambos grupos de las adolescentes, los porcentajes de seropositividad coinciden con nuestros resultados, por lo que se puede decir que los ELISA-VLPs pueden correlacionarse con cLIA para indicar seropositividad, sin embargo, no para medir la magnitud de la respuesta inducida por la vacunación. En el grupo de las jóvenes, el porcentaje es menor aunque cercano al que nosotros obtuvimos, debido a que los ensayos cLIA solo miden los anticuerpos neutralizantes que compiten con el anticuerpo monoclonal específico por la unión a la superficie de las VLPs. Al comparar estos porcentajes con los obtenidos en el IP, existen diferencias ya que en el mes 7 la prevalencia de IP positivo es entre 49-70% en nuestros tres grupos mientras que en el cLIA fue de 100%. De igual forma en el mes 21 el IP positivo fue de 42-64% versus 56-86% del cLIA, observándose una gran diferencia entre los porcentajes obtenidos a través de cLIA y el IP (razón anti-VLPs entre anti-L1). Las diferencias observadas entre estos dos ensayos y la forma de evaluar por IP, puede ser debido a que estamos midiendo la respuesta policlonal contra todos los epítopes que existen sobre la VLPs mientras que los ensayos cLIA solo determinan la respuesta contra un epítope del antígeno.

El seguimiento de anticuerpos generados por vacunación contra HPV es de importancia para evaluar la eficacia y protección contra el virus. La tendencia de los anticuerpos después de completar el esquema de vacunación es disminuir con el paso del tiempo, quedando solo la respuesta de memoria (Kreimer et al., 2020; Luna et al., 2013). En nuestro estudio, nosotros observamos el mismo comportamiento al

discriminar entre anti-VLPs y anti-L1, así, como para el IP para los grupos de las adolescentes y las jóvenes que recibieron el esquema tradicional (0-2-6), demostrando que los niveles de anticuerpos contra HPV18 disminuyen con el paso del tiempo. Aunque los títulos de anticuerpos de las adolescentes siempre estuvo por encima de la generada por las jóvenes. Sin embargo, la respuesta que se mantiene hasta el mes 61 en ambos grupos posiblemente es debido a la generación de células B plasmáticas y de memoria de largo plazo (Stanley, Lowy, & Frazer, 2006) y se esperaría que la exposición al virus, permitiera el aumento de los niveles de IgG de memoria. Fue interesante observar que las adolescentes que recibieron el esquema extendido (0-2-60), presentaron un incremento de los niveles de anti-VLPs, pero no así de anti-L1, lo que permitió un aumento en el IP y sugiere que la respuesta que se potenció a largo plazo fue contra epítopes conformacionales y por ende de tipo neutralizante. Se ha demostrado que un intervalo de descanso más prolongado entre las dosis de vacuna de inicio y de refuerzo puede dar como resultado una respuesta de células plasmáticas y plasmoblastos más robusta y títulos de anticuerpos más altos después del refuerzo (Lai et al., 2020). Ya que la reexposición del antígeno, induce la rápida expansión de las células B de memoria y su diferenciación en células plasmáticas productoras de IgG de alta afinidad, en un proceso controlado por las células Th2 (Stanley et al., 2006). Estos resultados sugieren que la vacunación induce anticuerpos anti-VLP y anti-L1 en ambos grupos, pero la respuesta de las adolescentes es más robusta en comparación con las jóvenes que recibieron el mismo esquema de vacunación, ya que el IP de las adolescentes se mantiene por encima del punto de corte a pesar del tiempo. Este resultado demuestra que los títulos de anticuerpos anti-VLPs después de la reinmunización al mes 60 fueron mucho más altos que los de anti-L1, por lo que, se observa el incremento favorable del IP, lo que sugiere que el esquema extendido de vacunación pudiera ser el más recomendable para la población.

Lo interesante de nuestro trabajo, es que analizamos la respuesta generada contra la proteína L1 desnaturalizada, y pudimos observar que, aunque los niveles generados contra la proteína desnaturalizada son menores a la de la proteína conformacional (VLPs), sigue el mismo patrón de comportamiento, alcanzando el pico máximo al mes

7 y disminuyendo con el paso del tiempo en los grupos que recibieron el esquema tradicional (0-2-6 meses). Sin embargo, no hay estudios que evalúen la respuesta de anticuerpos anti-L1, ni lo que podría significar la presencia de estos anticuerpos en la respuesta inmune contra HPV. Además de que si se elimina este fondo del total de anticuerpos medidos en el ELISA-VLPs, se desconoce si los niveles restantes de anticuerpos serán suficientes para ser protectores.

Por si solos los títulos de anticuerpos anti-L1 no nos dan mucha más información, ya que su comportamiento durante la vacunación es semejante a lo observado con la variación en los niveles de anticuerpos anti-VLPs. Sin embargo, al realizar el análisis por IP, este valor nos ayuda a discriminar los niveles reales de anticuerpos anti-VLPs, que son los que se asocian con neutralización.

Actualmente se están probando diferentes esquemas de vacunación contra HPV en donde se está modificando el tiempo entre la primera y segunda dosis, y que reciban una reinmunización (tercera dosis) entre el mes 21 y 61 post-vacunación, para permitir la correcta maduración del sistema inmune, y favorecer la selección de clonas productoras de anticuerpos neutralizantes para prevenir y eliminar infecciones (Kreimer et al., 2015). Esto es acorde a nuestros resultados, ya que cuando se analizó el IP en los diferentes esquemas de vacunación se observó que las adolescentes con el esquema de reinmunización al mes 60, mostraron un aumento del IP al doble de lo observado en las adolescentes con el esquema tradicional, lo que sugiere que la reinmunización favoreció la selección clonal de anti-VLPs que son los anticuerpos asociados a neutralización. Este resultado apoya el que el esquema de vacunación para las adolescentes sea el de tipo extendido (hasta 60 meses) y sugiere que debería de realizarse una prueba con el esquema extendido de inmunización para el grupo de jóvenes de 18 a 24 años, con el que se pudiera mejorar la respuesta protectora anti-VLPs.

Por otra parte, de acuerdo a lo reportado en la literatura, las mujeres con exposiciones previas no responden a la vacunación (Hildesheim et al., 2016b). En este caso podemos decir que nuestros resultados son contrarios a esta información, ya que al

analizar a las jóvenes que presentaban un IP positivo al mes 0, lo que demuestra exposición previa al virus, se observa que estas mujeres aumentaron su IP al mes de completar el esquema de vacunación, de forma semejante al grupo de adolescentes con esquema tradicional de vacunación, IP que incluso aumento al final del seguimiento en el mes 61 (Figura 23), lo cual pudiera estar relacionado con la activación de células plasmáticas de vida larga. Sin embargo, al analizar a las jóvenes que presentaron un IP negativo al mes 0, es decir que han estado en contacto con el virus pero la exposición previa conlleva a orientar la respuesta a epitopes lineales (anti-L1), en estos casos el panorama es diferente. En estas jóvenes el IP se mantuvo por debajo del punto de corte, y aunque aumenta un poco después de la vacunación, este se mantiene estable a lo largo del tiempo, pero siempre por debajo del punto de corte, lo que sugiere mayor presencia de anticuerpos anti-L1, los cuales no son protectores y este grupo sería el que está asociado a una baja eficacia de la vacuna contra HPV. Es posible que en este grupo (IP negativo, mes 0) se genere el “pecado antigénico original”, en donde la exposición previa al HPV genera una respuesta de anticuerpos contra epitopes lineales privilegiando la producción de anti-L1, sobre anti-VLPs, y al ser vacunadas en este grupo de jóvenes se favorece la producción de anti-L1, como lo demuestran nuestros resultados (Figura 24). Pareciera que la infección previa puede inducir la producción de anti-VLPs y anti-L1, y la respuesta generada por la vacunación se polarizara hacia la producción de anticuerpos del tipo de antígeno (lineal o conformacional) que el sistema inmune haya reconocido originalmente. Es necesario, analizar la respuesta generada contra los otros tipos de HPV vacunales, para poder entender y asociar esta respuesta a la vacuna, infecciones, aspectos genéticos o estado de salud de las mujeres.

Otro grupo importante que analizamos fueron las mujeres que presentaron un IP negativo al mes 61, en donde se observó que ningún grupo tuvo una respuesta favorable a la vacunación a largo plazo. A pesar de que se observa un incremento del IP al mes 7, este fue alto para las adolescentes con el esquema tradicional (lo que indica que respondieron a la vacunación produciendo mayor proporción de anti-VLPs), pero muy por debajo del punto de corte tanto para las adolescentes con el esquema extendido, como para las jóvenes con el esquema tradicional. Sin embargo, con el paso del tiempo

este IP disminuyó a un nivel semejante en todos los grupos (IP~ 2.0) hacia el mes 61. Es importante mencionar que incluso las adolescentes que recibieron el esquema extendido de vacunación no lograron un IP mayor a 2.0, lo que sugiere que en estas adolescentes, la respuesta inmune no logró potenciarse hacia la producción de anti-VLPs. Una explicación, es que estas adolescentes hayan tenido una exposición previa en donde existe una mezcla de antígenos cápsides y L1 de manera natural, y con ello la respuesta inmune contra la vacuna contra HPV no fue tan eficiente como en adolescentes que son naïve para el virus. Debido a que no contamos con la muestra del mes 0 de las adolescentes, esta es una hipótesis que tendrá que ser probada en futuros estudios.

10. Conclusiones

- En un trabajo previo de nuestro laboratorio, donde se analizó la respuesta inmune inducida por la vacunación contra HPV16, se implementaron y estandarizaron los ensayos ELISA-L1 y ELISA-VLP para llevar a cabo la discriminación de los anticuerpos generados por la vacunación contra epítopes conformacionales y lineales de HPV16. En base a esto, desarrollamos nuestra estandarización para HPV18 y al compararla, podemos concluir que nuestras condiciones nos permitieron realizar la discriminación entre los anticuerpos anti-VLPs y -L1 generados por la vacunación y así determinar un índice de protección.
- La utilización de los ensayos ELISA-VLPs y ELISA-L1, así como la obtención del índice de protección nos permitieron medir y analizar de manera específica la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes generada por la vacunación.
- Los títulos de anticuerpos anti-VLPs-HPV18 y anti-L1-HPV18 presentan una tendencia de aumentar después de la vacunación de manera similar, sin embargo, la vacunación privilegia el incremento en los niveles de anti-VLPs con relación a los de anti-L1.
- La respuesta de anti-VLPs y anti-L1 generada por el esquema tradicional (0-2-6 meses) en el grupo de adolescentes y jóvenes, es similar, aunque la respuesta es más robusta para anti-VLPs en las adolescentes.

- El esquema con la reinmunización al mes 60, sugiere ser más efectiva para mantener niveles altos de anticuerpos anti-VLPs por períodos más largos, ya que favorece la producción de estos, después de la reinmunización.
- Las mujeres que presentaron un índice de protección positivo antes de la vacunación, si responden a ésta y sugieren que la vacunación ayuda al sistema inmune, para mantener la correcta producción de anticuerpos anti-VLPs que son los protectores.

11. Limitaciones del estudio.

- Para poder llevar a cabo un mejor análisis de nuestra población se requiere el tiempo 0 de las adolescentes, ya que esta fue una muestra que no se tomo en el estudio. Por lo tanto, no podemos asegurar que la respuesta de anticuerpos es debido completamente a la vacunación, o si, existe previa exposición al virus y si tiene alguna influencia en la respuesta inmune de las adolescentes.
- Ausencia de un grupo de jóvenes que hayan recibido el esquema extendido, para poder realizar la comparación, y determinar si la reinmunización en mujeres jóvenes genera una respuesta similar al de las adolescentes.
- Es necesario establecer un punto de corte que mejore la sensibilidad y especificidad de los ensayos para VLPs y para el IP.

Bibliografía.

- Beachler, D. C., Jenkins, G., Safaeian, M., Kreimer, A. R., & Wentzensen, N. (2016). Natural Acquired Immunity Against Subsequent Genital Human Papillomavirus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(9), 1444–1454. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv753>
- Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., ... Muñoz, N. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 26 Suppl 1(SUPPL. 10), K1-16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.064>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brookfield, K. F., Cheung, M. C., Lucci, J., Fleming, L. E., & Koniaris, L. G. (2009). Disparities in survival among women with invasive cervical cancer: a problem of access to care. *Cancer*, 115(1), 166–178. <https://doi.org/10.1002/cncr.24007>
- Bruni, L., Serrano, B., Bosch, X., & Castellsagué, X. (2015). Vacuna frente al virus del papiloma humano. Eficacia y seguridad. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(5), 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.018>
- Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.1.1-17.2003>
- Burd, E. M., & Dean, C. L. (2016). Human Papillomavirus. In *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host, Second Edition* (pp. 177–195). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0001-2015>
- Carpentier, G. S., Fleury, M. J. J., Touzé, A., Sadeyen, J.-R., Tourne, S., Sizaret, P.-Y., & Coursaget, P. (2005). Mutations on the FG surface loop of human papillomavirus type 16 major capsid protein affect recognition by both type-specific neutralizing antibodies and cross-reactive antibodies. *Journal of Medical Virology*, 77(4), 558–565. <https://doi.org/10.1002/jmv.20492>
- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N., & Galloway, D. A. (2000). Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid

- antibody responses following incident infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(6), 1911–1919. <https://doi.org/10.1086/315498>
- Christensen, N. D., Höpfl, R., DiAngelo, S. L., Cladel, N. M., Patrick, S. D., Welsh, P. A., ... Kreider, J. W. (1994). Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *The Journal of General Virology*, 75 (Pt 9)(9), 2271–2276. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-9-2271>
- Christensen, Neil D., Dillner, J., Eklund, C., Carter, J. J., Wipf, G. C., Reed, C. a., ... Galloway, D. a. (1996). Surface Conformational and Linear Epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 Virus-like Particles as Defined by Monoclonal Antibodies. *Virology*, 223(1), 174–184. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0466>
- de Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 7(7), 453–459. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70158-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70158-5)
- de Sanjose, S., Quint, W. G. V., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., ... Bosch, F. X. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*, 11(11), 1048–1056. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70230-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70230-8)
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 110(5), 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- Drain, P. K., Holmes, K. K., Hughes, J. P., & Koutsky, L. A. (2002). Determinants of cervical cancer rates in developing countries. *International Journal of Cancer*, 100(2), 199–205. <https://doi.org/10.1002/ijc.10453>
- Ferguson, M., Heath, A., Johnes, S., Pagliusi, S., Dillner, J., & Collaborative Study Participants. (2006). Results of the first WHO international collaborative study on the

- standardization of the detection of antibodies to human papillomaviruses. *International Journal of Cancer*, 118(6), 1508–1514. <https://doi.org/10.1002/ijc.21515>
- Fleury, M. J. J., Touzé, A., Alvarez, E., Carpentier, G., Clavel, C., Vautherot, J.-F., & Coursaget, P. (2006). Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Archives of Virology*, 151(8), 1511–1523. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0734-y>
- Gariglio, P., Gutiérrez, J., Cortés, E., & Vázquez, J. (2009). The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Archives of Medical Research*, 40(6), 449–465. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.08.002>
- Giroglou, T., Sapp, M., Lane, C., Fligge, C., Christensen, N. D., Streeck, R. E., & Rose, R. C. (2001). Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine*, 19(13–14), 1783–1793. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00370-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00370-4)
- Harper, D. M., & DeMars, L. R. (2017). HPV vaccines - A review of the first decade. *Gynecologic Oncology*, 146(1), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.04.004>
- Hausen, H. z. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>
- Hernández-Ávila, M., Torres-Ibarra, L., Stanley, M., Salmerón, J., Cruz-Valdez, A., Muñoz, N., ... Lazcano-Ponce, E. (2016). Evaluation of the immunogenicity of the quadrivalent HPV vaccine using 2 versus 3 doses at month 21: An epidemiological surveillance mechanism for alternate vaccination schemes. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(1), 30–38. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1058458>
- Hernández-Hernández, D. M., Apresa-García, T., & Patlán-Pérez, R. M. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Revista Medica Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53, S154-61. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152f.pdf>
- Hildesheim, A., Gonzalez, P., Kreimer, A. R., Wacholder, S., Schussler, J., Rodriguez, A. C., ... Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. (2016a). Impact of human papillomavirus (HPV) 16 and 18 vaccination on prevalent infections and rates of cervical lesions after excisional treatment. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(2), 212.e1-212.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.021>
- Hildesheim, A., Gonzalez, P., Kreimer, A. R., Wacholder, S., Schussler, J., Rodriguez, A.

- C., ... Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. (2016b). Impact of human papillomavirus (HPV) 16 and 18 vaccination on prevalent infections and rates of cervical lesions after excisional treatment. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(2), 212.e1-212.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.021>
- IARC. (2007). Human Papillomaviruses. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (Vol. 90). Retrieved from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90-6.pdf%5Cnhttp://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-11.pdf>
- IARC. (2012). Human papillomaviruses. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (Vol. 100B, pp. 255–313). Retrieved from <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100B-11.pdf>
- IARC, & Sheets, F. (2017). *El cáncer de cuello uterino estimado incidencia , mortalidad y prevalencia en el mundo. 2012*, 1–6. Retrieved from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx#
- Jenny Paola Sánchez Lancheros. Tesis para recibir el título de Maestría en Ciencias Inst. Nacional de Salud Pública. “Evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes a largo plazo contra la vacuna HPV en mujeres mexicanas” 22 Ago, 2018
- Kim, H. J., & Kim, H.-J. (2017). Current status and future prospects for human papillomavirus vaccines. *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0952-8>
- Kreimer, A. R., Rodriguez, A. C., Hildesheim, A., Herrero, R., Porras, C., Schiffman, M., ... CVT Vaccine Group. (2011). Proof-of-principle evaluation of the efficacy of fewer than three doses of a bivalent HPV16/18 vaccine. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(19), 1444–1451. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr319>
- Kreimer, A. R., Sampson, J. N., Porras, C., Schiller, J. T., Kemp, T., Herrero, R., ... Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. (2020). Evaluation of Durability of a Single Dose of the Bivalent HPV Vaccine: The CVT Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 112(10), 1038–1046. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa011>
- Kreimer, A. R., Struyf, F., Del Rosario-Raymundo, M. R., Hildesheim, A., Skinner, S. R., Wacholder, S., ... GSK Vaccines Clinical Study Support Group. (2015). Efficacy of fewer than three doses of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: combined analysis

- of data from the Costa Rica Vaccine and PATRICIA Trials. *The Lancet. Oncology*, 16(7), 775–786. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00047-9)
- Lăără, E., Day, N., & Hakama, M. (1987). TRENDS IN MORTALITY FROM CERVICAL CANCER IN THE NORDIC COUNTRIES: ASSOCIATION WITH ORGANISED SCREENING PROGRAMMES. *The Lancet*, 329(8544), 1247–1249. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92695-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92695-X)
- Lai, L., Ault, K., Roupahel, N., Beck, A., Domjahn, B., Xu, Y., ... Mulligan, M. J. (2020). Duration of Cellular and Humoral Responses after Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccination in Healthy Female Adults with or without Prior Type 16 and/or 18 Exposure. *Vaccines*, 8(3), 348. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030348>
- Luna, J., Plata, M., Gonzalez, M., Correa, A., Maldonado, I., Nossa, C., ... Saah, A. (2013). Long-Term Follow-up Observation of the Safety, Immunogenicity, and Effectiveness of Gardasil™ in Adult Women. *PLoS ONE*, 8(12), e83431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083431>
- Mariani, L., & Venuti, A. (2010). HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *Journal of Translational Medicine*, 8(1), 105. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-105>
- Meisels, A., & Fortin, R. (1976). Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytologica*, Vol. 20, pp. 505–509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1069445>
- Miura, K., Orcutt, A. C., Muratova, O. V, Miller, L. H., Saul, A., & Long, C. A. (2008). Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine*, 26(2), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.064>
- Modis, Y., Trus, B. L., & Harrison, S. C. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO Journal*, 21(18), 4754–4762. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf494>
- Naud, P. S., Roteli-Martins, C. M., De Carvalho, N. S., Teixeira, J. C., de Borba, P. C., Sanchez, N., ... Descamps, D. (2014). Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(8), 2147–2162. <https://doi.org/10.4161/hv.29532>
-

- Nindl, I., Gottschling, M., & Stockfleth, E. (2007). Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Disease Markers*, 23(4), 247–259. <https://doi.org/10.1155/2007/942650>
- Nygård, M., Saah, A., Munk, C., Tryggvadottir, L., Enerly, E., Hortlund, M., ... Dillner, J. (2015). Evaluation of the Long-Term Anti-Human Papillomavirus 6 (HPV6), 11, 16, and 18 Immune Responses Generated by the Quadrivalent HPV Vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(8), 943–948. <https://doi.org/10.1128/CVI.00133-15>
- Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmerón, J., Wheeler, C. M., ... Dubin, G. (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 369(9580), 2161–2170. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60946-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60946-5)
- Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Wheeler, C., Chow, S.-N., Apter, D., ... Dubin, G. (2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *The Lancet*, 374(9686), 301–314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61248-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61248-4)
- Pedroza-Saavedra, A., Rodriguez-Ocampo, A. N., Salazar-Piña, A., Perez-Morales, A. C., Chihu-Ampan, L., Maldonado-Gama, M., ... Gutierrez-Xicotencatl, L. (2021). Differential Antibody Response against Conformational and Linear Epitopes of the L1 Proteins from Human Papillomavirus Types 16/18 Is Observed in Vaccinated Women or with Uterine Cervical Lesions. *Vaccines*, 9(5), 442. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050442>
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet. Global Health*, 4(9), e609-16. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Quint, W., Jenkins, D., Molijn, A., Struijk, L., van de Sandt, M., Doorbar, J., ... Colau, B. (2012). One virus, one lesion-individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *The Journal of Pathology*, 227(1), 62–71. <https://doi.org/10.1002/path.3970>
- Rose, R. C., White, W. I., Li, M., Suzich, J. A., Lane, C., & Garcea, R. L. (1998). Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing

- antibodies. *Journal of Virology*, 72(7), 6151–6154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9621080>
- Sapp, M., Kraus, U., Volpers, C., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., & Streeck, R. E. (1994). Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein. *The Journal of General Virology*, 75 (Pt 12(12), 3375–3383. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3375>
- Sánchez-Lancheros, J.. Tesis para recibir el título de Maestría en Ciencias Inst. Nacional de Salud Pública. “Evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes a largo plazo contra la vacuna HPV en mujeres mexicanas” 22 Ago, 2018
- Scherer, E. M., Smith, R. A., Gallego, D. F., Carter, J. J., Wipf, G. C., Hoyos, M., ... Galloway, D. A. (2016). A Single Human Papillomavirus Vaccine Dose Improves B Cell Memory in Previously Infected Subjects. *EBioMedicine*, 10, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.042>
- Schiller, J. T., & Lowy, D. R. (2009). Immunogenicity testing in human papillomavirus virus-like-particle vaccine trials. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(2), 166–171. <https://doi.org/10.1086/599988>
- Schiller, J. T., & Müller, M. (2015). Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet. Oncology*, 16(5), e217-25. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71179-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71179-9)
- Stanley, M., Lowy, D. R., & Frazer, I. (2006). Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine*, 24 Suppl 3(SUPPL. 3), S3/106-13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.110>
- Stanley, M., Pinto, L. A., & Trimble, C. (2012). Human papillomavirus vaccines--immune responses. *Vaccine*, 30 Suppl 5(SUPPL.5), F83-7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.106>
- Vaccarella, S., Franceschi, S., Engholm, G., Lönnberg, S., Khan, S., & Bray, F. (2014). 50 years of screening in the Nordic countries: quantifying the effects on cervical cancer incidence. *British Journal of Cancer*, 111(5), 965–969. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.362>
- Westrich, J. A., Warren, C. J., & Pyeon, D. (2017). Evasion of host immune defenses by

human papillomavirus. *Virus Research*, 231, 21–33.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.023>

White, W. I., Wilson, S. D., Bonnez, W., Rose, R. C., Koenig, S., & Suzich, J. a. (1998). In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, 72(2), 959–964. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Anexo 1



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS

CENTRO MÉDICO CUAUHTEMOC

INFORMED CONSENT

Consent Form for 9 to 10 Year Old Girls

Your daughter is invited to participate in a Human Papilloma Virus (HPV) vaccination program. This document describes the study's objective.

What Is The Human Papilloma Virus?

Human Papilloma Viruses (HPV) are viruses that may cause non cancerous warts on the genitals. These viruses may provoke lesions on a woman's cervix suffering of them and in some cases HPV infection may cause cervix cancer in women, also known as cervical cancer.

Currently there is no effective treatment against HPV. In most of the cases, the infection disappears by itself and since there are no symptoms, you do not know when it appears. There are more than 30 types of HPV and a person may get infected with more than one type. Types 6 and 11 of HPV cause in the majority of the cases genital warts. HPV infection of types 16 and 18 may lead to cervical cancer in women.

Why Is This Study Being Done?

There are two vaccines currently on sale, both are safe and effective to prevent becoming infected with this virus.

The objective of this study is to monitor the antibody levels reached by the HPV vaccine with two vaccination schemes:

- Schemes
 - Extended (0, 6, 60 months)
 - Traditional (0, 1 and/or 2, 6)

What Does The Study Consist Of?

For the aforementioned, three thousand girls between 9 and 10 years of age will be invited; they will receive the three indicated doses of the vaccine, obtaining a blood sample (two to three tablespoonfuls approximately) before applying the second and third doses, and each subsequent year until completing 5 years.

For vaccination it is considered the traditional scheme or rather the modified one, as described below:

Cervarix		Gardasil	
Traditional Scheme	Modified Scheme	Traditional Scheme	Modified Scheme
0, month 1, month 6	1, month 6, month 60	0, month 2, month 6	1, month 6, month 60



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS

CENTRO MÉDICO CUAUHEMOC

What Benefits May You Expect From the Study?

When applying the vaccine the result obtained is protection against the Human Papilloma Virus types, Gardasil (6, 11, 16 and 18) and Cervarix (16 and 18), for which it is necessary to complete the full vaccination scheme.

Who Can I Call If I Have Questions?

Dr. Aurelio Cruz Valdez 3293000 Ext. 3110
Study physicians Dr. Janet Lizette Pacheco Flores 0447771877961, Dr. Saul Díaz Flores 0447771354275 and to the Centro Medico Cuauhtemoc telephone numbers 1028864 and 1028056 from 9:00 to 17:00 hrs.

I have read and understood this Informed Consent form. All my questions have been answered. I am volunteering for this study.

I received a copy of this consent.

Name of Participant

Date

Name and Signature of Reviewer

Date

Name and Signature of the Father or Tutor

Date

Name and Signature of the Mother

Date



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS

CENTRO MÉDICO CUAUHEMOC

INFORMED CONSENT

Consent Form for 18 to 24 Year Old Women

You are invited to participate in a Human Papilloma Virus (HPV) vaccination program. This document describes the study's objective.

What is the Human Papilloma Virus?

Human Papilloma Viruses (HPV) are viruses that may cause non cancerous warts on the genitals. These viruses may provoke lesions on a woman's cervix suffering of them and in some cases HPV infection may cause cervix cancer in women, also known as cervical cancer.

Currently there is no effective treatment against HPV. In most of the cases, the infection disappears by itself and since there are no symptoms, you do not know when it appears. There are more than 30 types of HPV and a person may get infected with more than one type. Types 6 and 11 of HPV cause in the majority of the cases genital warts. HPV infection of types 16 and 18 may lead to cervical cancer in women.

Why Is This Study Being Done?

The Human Papilloma Virus (HPV) causes cervical cancer in women, as well as causing warts (condylomata) on the genital area. For its prevention there are two vaccine types currently on sale, both vaccines are safe and effective to prevent infection with virus of types 16 and 18. The vaccines are Cervarix (for types 16 and 18) and Gardasil (for types 6, 11, 16 and 18).

The objective of this study is to compare both vaccines with respect to development of antibodies that protect against the types 16 and 18; for this 1,000 women between 18 and 24 years of age will be invited to participate; they will receive the 3 indicated doses, obtaining a blood sample (about 2-3 tablespoonfuls) from one arm vein to test if there are HPV antibodies. On the first application of the vaccine a blood sample will be taken from 100 participants; on the second and third vaccine dose application a blood sample will be taken from all the study participants before applying each vaccine; and for each subsequent year until completing 5 years. It is important that you know that HPV types other than 16 and 18 may also cause infection and cervical cancer.

HPV vaccines do not contain any type of live HPV virus, so you cannot get genital warts or cervical cancer from these vaccines.

Who Cannot Participate In This Study?

- You have received a HPV vaccine in the past.
- You have suffered a severe allergic reaction (for example swelling of the mouth and throat, difficulty to breathe, low blood pressure or shock) which required medical attention.
- You are pregnant or plan to become pregnant in the period of the study.
- You plan to move permanently from the area before the study is finished, or to be absent for a long period when the study visits need to be scheduled.

If you are younger than 18 years you will not be able to participate in this study.

What Will They Ask Me To Do? What Are The Conditions For My Participation?

You will be injected either the Gardasil vaccine in a scheme day 0 (first dose), month 2 (second dose), month 6 (third dose), or the Cervarix vaccine in a scheme day 0 (first dose), month 1 (second dose) and month 6 (third dose). HPV vaccines will be applied on the deltoid muscle of the non-dominant arm.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS

CENTRO MÉDICO CUAUHTEMOC

What Personal Information Will I Be Asked And How Will It Be Used Or Protected?

If you agree to take part in this study, the study physician and personnel will collect personal information on you, which may include:

- Name, address, telephone number, and electronic mail address, as well as:
- Medical history, medical records, and other health information
- Sexual and pregnancy history and birth control methods
- Menstrual situation
- Tobacco consumption

Who Can I Call If I Have Questions?

Dr. Aurelio Cruz Valdez 3293000 Ext. 3110
Study physicians Dr. Janet Lizette Pacheco Flores 0447771877961, Dr. Saul Díaz Flores 0447771354275 and to the Centro Medico Cuauhtemoc telephone numbers 1028864 and 1028056 from 9:00 to 17:00 hrs.

Can I Refuse To Be In The Study And Can They Ask Me To Leave The Study?

Your participation in this study is voluntary. You may choose not to participate in the study or you may leave it at any moment. If you choose not to participate in this study, the benefits you enjoy currently will not be affected.

I received a copy of this consent.

Name of Participant

Date

Name of Person In Charge of this IC

Date

Remember that we are always willing to help you at the following telephone numbers:

Attention module:

1-02-88-64

1-02-80-56

Dr. Janet Pacheco:

044 777 1 87 79 61

Dr. Saúl Díaz Flores:

044 777 135 42 75

L.E. Steyce Aguilar:

044 777 374 04 11

CENTRO MÉDICO CUAUHTÉMOC

Av. Universidad No.1299

Esq. Priv. Pinos; Col. Loma Bonita

Cuernavaca, Morelos



Instituto Nacional de Salud Pública
Dirección de Enfermedades Crónicas

APPOINTMENT CONTROL

NAME: _____

RECORD No. _____

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18

Your next appointment is on day:

Date	Time	Reason	Procedures

Observations/Comments

Anexo 2



COMISIÓN DE ÉTICA
Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Presidenta

Cuernavaca, Mor., 13 de octubre, 2010
CI: 883

Eduardo César Lázcano Ponce
Investigador responsable
Presente

En relación al **addendum** de su proyecto titulado " *Una cohorte centinela para evaluar niveles de inmunogenicidad, seguridad e incidencia tipo-específica en mujeres vacunadas contra VPH en México- (Evaluación de Niveles de Inmunogenicidad en Mujeres vacunadas contra VPH en México)*" me permito informarle que los miembros de la Comisión de ética le han otorgado el dictamen de:

Aprobado

Para los siguientes documentos:

- a) Enmienda 1 al protocolo
- b) Enmienda 1 al Consentimiento Informado, México, Instituto Nacional de Salud Pública, 14 de septiembre 2010
- c) Enmienda 1 al Formato de Asentimiento para niñas de 9 a 10 años de edad, México, Instituto Nacional de Salud Pública, 14 de septiembre de 2010
- d) Enmienda 1 al Formato de Consentimiento Informado y Autorización Paterna, México, Instituto Nacional de Salud Pública, 14 de Septiembre de 2010.

Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión, previo a su implementación, utilizando el sistema de *Modificaciones a Proyectos en Desarrollo* que se encuentra dentro del sistema SIIID. Si Usted tiene dudas sobre el registro de modificaciones menores, favor de comunicarse con esta Comisión para su consideración.

Atentamente



Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 04 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes hasta en un periodo de 5 años en mujeres vacunadas contra HPV18**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Aislinn Citlali Pérez Morales. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL | Fecha:2021-05-05 13:42:11 | Firmante
cPWmHyFzNA3GRDx43UItlesyn7VTIaLgkRyEkQCRM57KqRSLH52rACFq7HieSt/WCLPSt9f8C+Qx/RAmbSoYXHhjkJZr9aig18ykDWdjet7+L1/f/Hr/bbLLv3ZJ8HIEQF/m1KOtdi
MMINsgoxIYyHydNuNN87jesmEPD4wkiEhhzIU97E03a5YCYMO9h98UnhsR8S1haRig4gixUUPzsgKeh4j/wLNSfs6w820dbC+pYHy5hIKrPGaOcvWHt5dntpkWJq8gvJIGvpeXU
gllpLyiNUauXkoSdqCldOn+5bNRhsqOWrvrgumhbJtVova335sw9T8bveomKJRaNew==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



s9vFnm

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Y4msq34bdzKrBRhe7Ibtuggp5WYDFcIbp>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 04 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes hasta en un periodo de 5 años en mujeres vacunadas contra HPV18**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Aislinn Citlali Pérez Morales. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2021-06-04 01:01:41 | Firmante
ZY+IDSGRMKmhSab9yh3P1kaL5jne5H6meEVDQ77das8oEjWkgfPhLCwaoF0Yz7sMszwc7E8IX0/oZL7rsekL0oRhpvPICRzunQGKkrw5rX0vjgi3mL5rvUZ3covUXMPvup03W59
PXRYxBVJpZYXB+PMmJjmt1NlQz5ZY4aQ0nGszk8Rg5RJdpc7tab2VupJhOskvV+ixXSWNLCsdxedfeLIL/wGu4T5gplsKKdhV/8tuflgYdixRg+bK6LhuvHe0QvVa0SX3c8SNAh3u
jCTIZVt6E8y1dMk5wme3hmt9F0IDreddC6YLT/HNqMljeHgVujkPlevgvMeQJEAmP9w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ByZSwa

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IDgTwesawcnUyhHhBDqBzxmWWg1BG7gh>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 04 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes hasta en un periodo de 5 años en mujeres vacunadas contra HPV18**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Aislinn Citlali Pérez Morales. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. José Luis Montiel Hernández

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha: 2021-06-03 21:38:31 | Firmante

IqW1qjCnBS1RIPGKLiXkxtdhFsJuZqmujSQQzW6d0IBjPLJU2wE56CbXTZDaPIUki/WDb8SSa0wxC3NjVDjOv/V6rIUfbjeyKFPiMC8eYfhYwmhdKON8NcPXAwdj9T8N2py1Wka4EzVlugEgWA4GfEEw0CUIJUEK5KQH5DhptNRcHZpoSbJfJXmitOWXCULQOyOOJk3H4rYe/QCF42bFpkGbcRkLIMVRKxAhQ4JzXWnLj9hwKI09OvgkPnxtZk82WjOBvszeHwT7TlyDSKg83FM6dPtGcSHbh34JyVlgf+YfNw0rQ40xQIU3oDx0735IG3a8cdhGKO2+oToU1yQ2VUQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



vTpLNe

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wmUR7TfpyANxKIOVWhxdJ6A3lvG5ggeF>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 04 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich
Directora
Facultad de Medicina
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes hasta en un periodo de 5 años en mujeres vacunadas contra HPV18**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Aislinn Citlali Pérez Morales. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. María Angélica Santana Calderón

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes a largo plazo en mujeres vacunadas contra HPV18



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-05-04 17:03:40 | Firmante
t1XVnySLzs1QAMAIqI5WbVM1p86ymbte2gWijmQgLGZFt3Be0S8TJ2G9TPo4RIM4d2AmicwRUEgY4H4jYlZSgzXKUge7zhQ8Pz:OJF5yo2pLG+gDLI2TxlW04igtLULB/pHggA
fRXXZyIoKVRddIu6QR5A2X0xxJzGXuGwD/ocMTbnrkRvVD0bRCWDMGC+h5pL9XGjRUhMKZok/AvM8K5Eth/b6JKtz/qQMjli1NXE6owU6WJgJ8nibq8zHeZrJ6yJYz+DPuwdx
ZUHtHf7otWMguk76gHZ5heF8A0ZgPXnTgg7GDqKEPY8Gd1N9bECdxqUPrVWBn6iWfdV66Rlw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



DvGUiF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3UeH50Ov8xMc3gWSS3VS3TanAwrsmNB>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023