



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO
TESIS**

**Evaluación de ensayos serológicos para la identificación de anticuerpos neutralizantes
contra HPV-16 en mujeres vacunadas contra HPV**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
“MAESTRÍA EN MEDICINA MOLECULAR”**

QUE PRESENTA

BIÓL. KENYA LORENZA SÁNCHEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicontecatl

Cuernavaca, Morelos, México a 15 de mayo, 2023.

Trabajo realizado en el periodo de agosto-2020 a agosto-2022 en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

Miembros del comité tutorial:

- Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl
- Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
- Dra. Judith González
- Dra. Vera Lucia Petricevich
- Dr. Armando Herrera Arellano

Miembros del jurado de examen:

- Dra. Vera Lucia Petricevich
- Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
- Dr. José Luis Montiel Hernández
- Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez
- María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

Este proyecto fue financiado por FOSISS-CONACYT con número de registro 290022

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a dios por bendecirme, darme salud y por permitirme concluir este importante paso en mi vida profesional a lado de mi familia y mis seres queridos.

Agradezco a mis padres, mi hermana y mi hermosa familia de cinco que ha estado conmigo de manera incondicional. A mi novio y a todos mis seres queridos que siempre han estado para apoyarme y alentarme en todo momento.

Doy gracias a la Dra. Lourdes Gutiérrez quien fue mi guía, mi inspiración y una gran maestra, valoro sus enseñanzas y paciencia para conmigo. También agradezco a mis compañeros del laboratorio 5 planta baja del Instituto Nacional de salud Pública: Mine, Aislinn por apoyarme con los experimentos y trabajo de laboratorio, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. Al Dr. Adolfo Pedroza que siempre estuvo ahí para resolver mis dudas y orientarme ¡muchas gracias!

Gracias al Dr. Mario, Dr. Judith y Dr. Armando por nutrir este trabajo con sus conocimientos y experiencia, lo valoro demasiado.

Finalmente agradezco a mi querido CISEI del Instituto Nacional de Salud Pública quien por tercera vez me abrió sus puertas para poder trabajar en sus instalaciones y a mi alma mater, “Universidad Autónoma del Estado de Morelos” por formarme profesionalmente.

Lista de abreviaturas

APC: células presentadoras de antígeno (siglas en inglés)

AUC: área bajo la curva (siglas en inglés)

CC: Cáncer de cuello uterino

CV: coeficiente de variación

DC: células dendríticas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (siglas en inglés)

ETS: Enfermedad de transmisión sexual

FP: falsos positivos

FN: falsos negativos

GM: media geométrica (siglas en inglés)

GSK: Glaxo Smith Kline (siglas en inglés)

HA: ensayo de hemaglutinación (siglas en inglés)

HPV: Human Papiloma Virus/Virus del papiloma humano

HSIL: Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (siglas en inglés)

LCR: Región larga de control

LgC: Células de Langerhans

LSIL: Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (siglas en inglés)

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (siglas en inglés)

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase 2 (siglas en inglés)

nAb: anticuerpos neutralizantes totales (siglas en inglés)

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

NKT: Células asesinas naturales (siglas en inglés)

OD: densidad óptica (siglas en inglés)

PBNA: ensayo de neutralización basado en pseudoviriones (siglas en inglés)

PC: punto de corte

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)

PsVs: pseudoviriones

ROC: característica operativa del receptor (siglas en inglés)

SD: desviación estándar (siglas en inglés)

TLR: receptores tipo toll (siglas en inglés)

Tc: linfocitos citotóxicos

TCR: receptores de las células T (siglas en inglés)

UE: unidades ELISA

VLP: Pseudo partículas virales

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

VP: verdaderos positivos

VN: verdaderos negativos

Contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Características generales del HPV	4
2.2. La respuesta Inmune frente a la infección por HPV	8
2.3. Función e importancia de la proteína L1	9
2.4. Características de las VLPs de HPV.	10
2.5. Vacunas como método de prevención contra la infección por HPV	11
2.6. Respuesta inmune generada por las vacunas profilácticas contra HPV	14
2.7. Sistemas de detección de anticuerpos neutralizantes en mujeres vacunadas contra HPV	
2.7.1. Ensayos de neutralización basados en pseudoviriones.....	18
2.7.2. Inmunoensayo competitivo Luminex	18
2.7.3. Ensayo de inhibición de la Hemaglutinación	19
2.7.4. Ensayo de Inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA)	19
2.8 Determinación de anticuerpos neutralizantes por ELISA indirecto de VLPs de HPV..	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos particulares	23
5. HIPÓTESIS.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Diseño experimental.....	24
6.2. Variables	25
6.3. Obtención de los sueros de mujeres vacunadas y no vacunadas contra HPV.....	26
6.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN E INCLUSIÓN.....	27
6.5. ENSAYOS DE ELISA	27
6.5.1. Ensayo de ELISA indirecto (ELISA-VLPs).....	28
6.5.2. ELISA de captura	28
6.6. Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	31
7.1. Estandarización y validación del ELISA indirecto de VLPs.....	31
.....	32

7.2. Estandarización y validación del ELISA de captura de VLPs.....	33
7.2.1. Estandarización de la concentración de anticuerpo policlonal de α-VLPs-16.....	33
7.2.2. Estandarización de segundo anticuerpo cabra α-IgG humano.....	33
7.3. Cálculo y evaluación de los puntos de corte del ELISA indirecto y de captura para VLPs.	34
7.4. Determinación de los títulos de anticuerpos anti-VLPs-16 de la población de adolescentes controles y vacunadas contra HPV	36
7.5. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los ELISA indirecto y de captura para la detección de anticuerpos neutralizantes (anti-VLPs).	39
8. DISCUSIÓN:.....	45
9. CONCLUSIONES	50
10. BIBLIOGRAFIA	51

RESUMEN

Introducción: El cáncer de cuello uterino (CC) representa un problema de salud pública al estar entre los primeros lugares de incidencia y mortalidad a nivel mundial. En México, el CC representa la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, con una tasa de incidencia de 15.6/100,000 y una tasa de mortalidad de 13.9/100,000 mujeres, de acuerdo con lo reportado en Globocan 2020. El 99.7% de los casos de CC se asocian a la infección ocasionada por el papilomavirus humano (HPV), considerado como el agente etiológico más importante para el desarrollo de éste y otros carcinomas. De alrededor de 200 tipos de HPV que se han secuenciado, los tipos 16 y 18 suman aproximadamente el 85% de los casos de CC. La estructura del HPV consiste en tres regiones: LCR, early y low, siendo esta última la que codifica para las proteínas de la cápside viral L1 y L2 que tienen capacidad de auto-ensamblarse para formar VLPs que son utilizadas para la generación de vacunas profilácticas: GARDASIL® y CERVARIX®, las cuales presentan una alta inmunogenicidad y capacidad de protección mediada por anticuerpos neutralizantes, sin embargo, las pruebas con las que se evalúan los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación suelen ser costosas, complejas y difíciles de aplicar a nivel poblacional (ensayos de neutralización basado en pseudoviriones o Luminex Multiplex), o bien, pueden ser poco específicas para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV (ELISA-VLPs) En este sentido, se propuso evaluar y comparar dos diferentes ensayos serológicos: ELISA-VLPs y ELISA de captura con el objetivo de favorecer la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV.

Objetivo: Comparar dos diferentes ELISA (ELISA-VLPs y de captura) con base a su capacidad para identificar y diferenciar con mayor sensibilidad, los anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV.

Métodos: Se realizaron dos ensayos ELISA: ELISA-VLPs y ELISA de captura para HPV16, utilizando sueros de mujeres adolescentes vacunadas contra HPV (casos) y de adolescentes no vacunadas (controles), estos ensayos permitirán la identificación de anticuerpos neutralizantes utilizando un anti-VLP16 que proporcionará mayor especificidad y sensibilidad, posteriormente se comparó la sensibilidad y especificidad entre ambos ensayos utilizando el paquete estadístico

STATA® y mediante la correlación de Spearman se evaluó la concordancia del ELISA-VLPs vs el ELISA de captura.

Resultados: Se evaluaron 90 sueros de mujeres adolescentes (un grupo de 45 mujeres adolescentes vacunadas y otro grupo de 45 adolescentes no vacunadas) cada uno, a través de un ELISA indirecto y un ELISA de captura de HPV16 probando diferentes condiciones. Una vez que el ensayo quedó estandarizado se procesaron y analizaron ambos grupos. Posteriormente, se evaluó el coeficiente de variación y se obtuvo el punto de corte de cada uno de los ensayos. Ambos permitieron realizar la correcta seroclasificación de la población total. Los resultados obtenidos indicaron que el ELISA indirecto es 100% sensible con una especificidad del 97%, mientras que el ELISA de captura mostró un coeficiente de variación ≤ 13 % lo que nos indicó una buena reproducibilidad con un valor dentro del rango permitido. La seroclasificación fue de 4.4% de seronegativos, 95% de seropositivos, una sensibilidad y especificidad superior al 95%. Finalmente, se realizó una correlación de Spearman con el cual se evaluó la concordancia entre los dos ELISAs la cual demostró ser alta positiva con un valor Rho de 0.81 estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Conclusión: Los dos ensayos permitieron clasificar correctamente a la población de estudio. Se demostró que el ELISA indirecto considerado como el “gold estándar” del laboratorio presenta una alta sensibilidad y especificidad mayor al 95%. Lo mismo sucedió con el ELISA de captura, el cual tuvo una buena reproducibilidad, una alta especificidad y una sensibilidad superior al 95% con una Rho de 0.81 entre ambos ensayos. Sin embargo, el ELISA de captura permitió la identificación específica de anticuerpos neutralizantes (α -VLPs-16), además de que identificó que 20% de la población vacunada no presenta niveles detectables de anticuerpos neutralizantes.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino (CC) es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, de los cuales más del 80% de los casos corresponden a países en vías de desarrollo (Figura 1). El CC es la segunda neoplasia más común en mujeres mexicanas: se estima una incidencia de 15.6/ 100,000 con una tasa de mortalidad de 13.9/100,00 mujeres (Globocan, 2020; OMS, 2022).

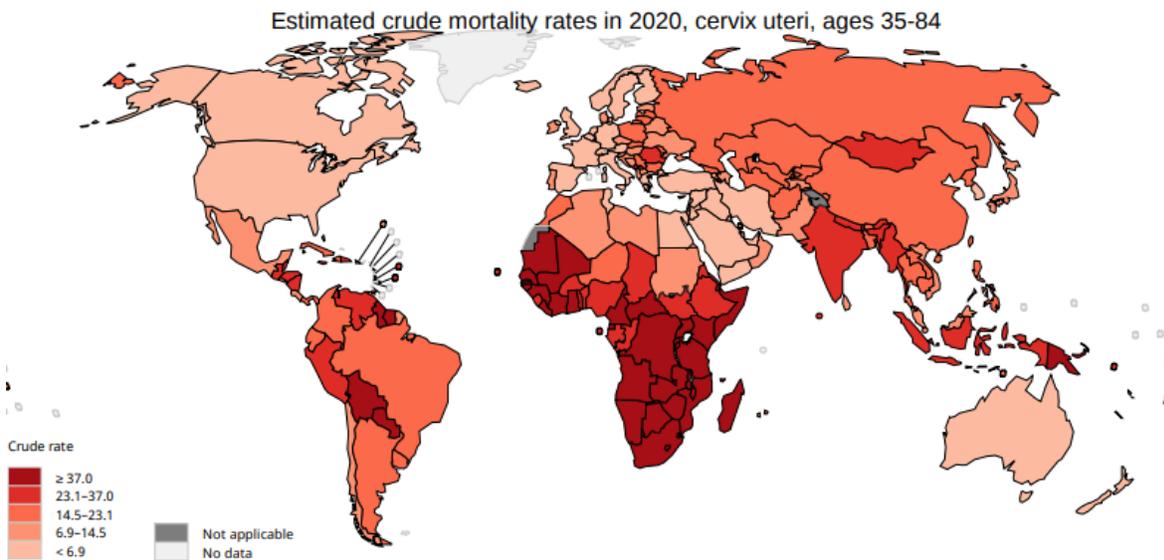


Figura 1. Tasa de mortalidad de CC a nivel mundial (Tomada de: www.Globocan 2020).

2. MARCO TEÓRICO

En México el CC es una de las principales causas de mortalidad entre mujeres jóvenes de 35 a 59 años. En el 2020 se registró una tasa de incidencia de 15.6/100,000 mujeres. De acuerdo con la edad, el grupo de mujeres mayor de 35 años es en el que se registró una tasa de mortalidad bruta de 13.8/100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por CC reportadas fueron: Morelos, Chiapas y Veracruz (INEGI, 2017; Ferlay, 2020).

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que el 99.7% de los casos de CC se encuentran asociados a la infección por papilomavirus humano (HPV) de alto riesgo y, en menor

proporción, se asocia a los cánceres de ano, orofaríngeo, pene, vulva, vagina, entre otros (Forman et al., 2012). Se han descrito más de 200 diferentes tipos de HPV, de los cuales aproximadamente 30 infectan mucosas genitales y donde 16 tipos son considerados de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70), siendo los HPV16 y 18 los de mayor prevalencia en los casos de CC. Por su parte, los HPV:6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 81 se consideran de bajo riesgo y bajo potencial cancerígeno (Forman et al., 2012; Burd, 2003).

La infección por HPV es considerada una enfermedad de transmisión sexual (ETS) debido a que los factores asociados con la infección están relacionados con el comportamiento sexual, edad de inicio de vida sexual, alto número de parejas, contacto sexual con individuos de alto riesgo. Además de esto, otros factores están asociados con el desarrollo del CC, como la genética del huésped y factores ambientales e inmunológicos que favorecen el desarrollo de cáncer (Chaturvedi, 2010).

Las mujeres sexualmente activas de cualquier edad pueden infectarse con HPV's oncogénicos, sin embargo, las mujeres jóvenes son menos susceptibles a desarrollar CC; caso contrario con las mujeres mayores de 35 años, quienes presentan mayor incidencia de cáncer. Aun cuando en personas jóvenes la infección por HPV es muy frecuente (alrededor del 90%) las mujeres infectadas resuelven la infección espontáneamente debido a una respuesta inmune eficaz. En el 10% restante la infección será persistente y en riesgo de desarrollar cáncer (Adam, et al., 2000; Lopez, et al., 2017). Todos los casos de CC son causados por una infección persistente con tipos de HPV de alto riesgo. La infección inicial por lo general ocurre durante la adolescencia o la edad adulta temprana y la mayoría de las mujeres eliminan la infección dentro de los primeros 18 a 24 meses. Sin embargo, en 3-5% de las mujeres, la infección por HPV puede persistir y desarrollar una enfermedad pre-invasiva, donde menos del 1% podría desarrollar cáncer invasivo. (Lopez, et al., 2017).

2.1. Características generales del HPV

El HPV pertenece a la familia *Papillomaviridae* y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Los HPV se agrupan en más de 5 géneros, según el tropismo tisular, propiedades biológicas y la patología del huésped, siendo de mayor importancia clínica los *Papilomavirus* del género *alpha* (α) y *beta* (β). Particularmente, los *Papilomavirus* del género α

tienen una afinidad hacia el área genital e infectan únicamente células cutáneas y mucosas en humanos, que coincide con ser los tejidos donde se ha observado mayor prevalencia de la malignidad; por este motivo se considera como uno de los géneros de mayor riesgo (de Villiers et al., 2004).

El HPV es un virus icosaédrico no envuelto, presentan DNA de doble cadena circular bicatenario de alrededor de 8 Kb y con un tamaño que varía entre los 55-60 nm de diámetro (Figura 2). Este se divide en tres regiones:

1) **Una región temprana “E”** (Early), la cual codifica para los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que se encargan de controlar la transcripción y replicación del genoma viral, así como en el control de la carcinogénesis (Figura 2 y Tabla 1) (Yugawa & Kiyono, 2020).

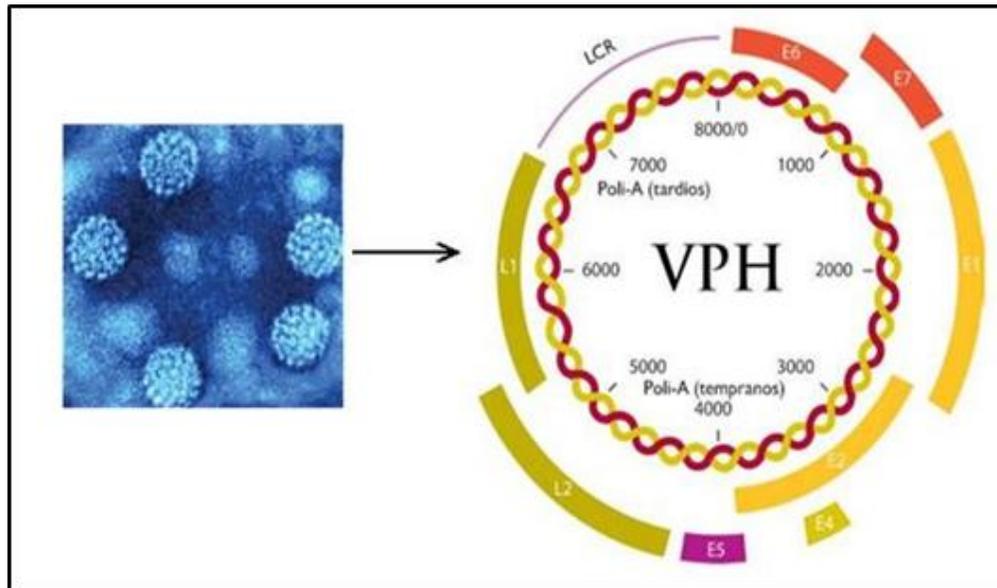


Figura 2. Genoma y estructura del HPV. A) El HPV presentan forma icosaédrica, con un diámetro de 55-60 nm y no posee envoltura. B) El genoma del HPV presenta un DNA de doble cadena circular con 8Kb, se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR), la región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y la región tardía (L1 y L2) (Tomado de López, 2006).

2) La región tardía “L” (Late) del HPV contiene los genes que expresan las proteínas L1 y L2 de la cápside viral. Particularmente la proteína L1 constituye en mayor proporción la cápside viral. El HPV presentan 360 moléculas de la proteína L1 dispuestas en 72 capsómeros pentaméricos. A su vez, cada cápside de virión contiene varias copias (aproximadamente 12 por virión) de la proteína minoritaria L2, localizada en el centro de los capsómeros pentavalentes, en los vértices del virión (Doorbar et al., 2012).

Tabla 1. Función de las proteínas del HPV. (Doorbar et al., 2012)	
Proteína viral	Función
E1	Acción helicasa y ATPasa. Replicación viral y control de la transcripción.
E2	Regulador principal de la transcripción de genes virales, recluta a E1 permitiendo la replicación del DNA y transfiere el genoma viral a células hijas durante la división en la célula huésped.
E4	Interacción con el citoesqueleto para el ensamblaje y liberación viral.
E5	Regulación en la señalización de factores de crecimiento y evasión de la respuesta inmune.
E6	Degradación de p53, activa la telomerasa, induce inestabilidad genómica e interacciona con los dominios proteicos PDZ.
E7	Induce la proliferación celular anormal; interactúa con histonas acetiltransferasas y con reguladores negativos del ciclo celular y supresores de tumores principalmente con la proteína pRb y desregula el ciclo celular en fase G1/S.
L1	Proteína mayor de la cápside viral, interacciona con L2, receptores celulares y codifica para epítopos neutralizantes.
L2	Proteína de la cápside menor, facilita el ensamblado de viriones.

3) La región larga de control (LCR) contiene sitios de unión para factores de transcripción celular, así como para las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación y la transcripción del ADN viral. La expresión de las proteínas del HPV durante el ciclo viral es importante para que el virus pueda replicarse y pueda evadir la respuesta inmune del huésped (Doorbar et al., 2012).

Cuando ocurre una infección persistente por HPV, existe una pérdida gradual de la regulación de los genes de expresión E6 y E7 que van a permitir el desarrollo de lesiones cervicales tempranas, conocidas como **Neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC)**, estas NIC serán clasificadas de acuerdo con el grado de la lesión. La NIC I se caracteriza por tener una gran actividad mitótica que origina continuos cambios metaplásicos, esta progresión dará como

resultado una NIC II que se caracteriza por la existencia de una metaplasia escamosa atípica y finalmente la NIC grado III en donde se llevará a cabo la replicación de células inmaduras y acumulación de anomalías genéticas que favorecerán la malignidad y el aumento de células inmortales (Woodman, et al., 2007). Sin embargo, más del 70% de las lesiones por NIC son eliminadas de manera natural por el sistema inmunológico, mientras que aquellas que progresan a CC ocurren por una sobre expresión de las oncoproteínas E6 y E7 y una integración del genoma viral a las células del huésped (Xue, 2012).

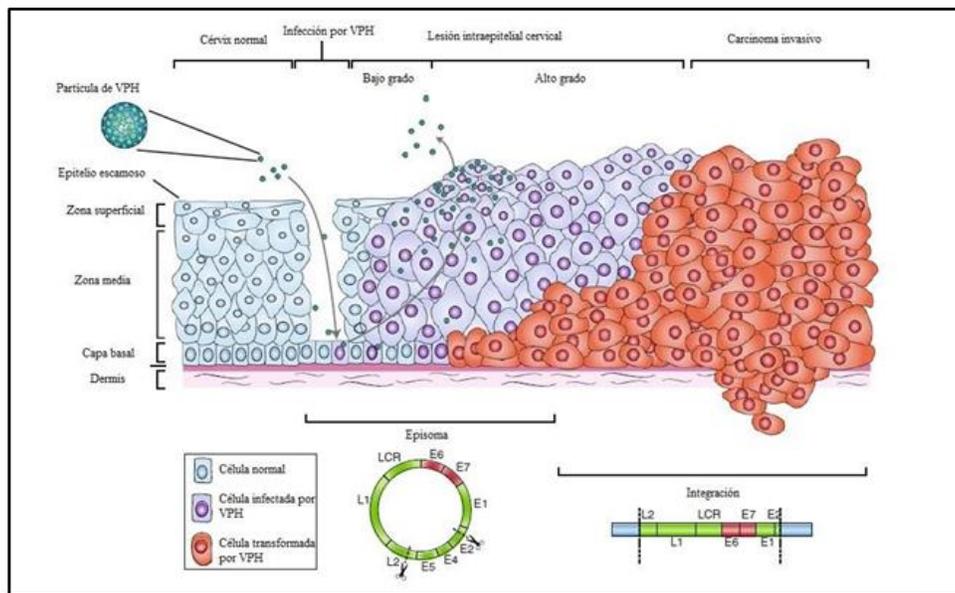


Figura 3. Proceso de infección por HPV en el epitelio cervical. La entrada del HPV se da a través de micro abrasiones en el epitelio cervical para posteriormente acceder a la capa basal epitelial e infectar las células basales. Durante el proceso de infección, las oncoproteínas E1-E7 se expresan y el DNA es replicado de manera episomal (Núcleo morado). Cuando el genoma viral es replicado completamente los genes tardíos L1 y L2 son expresados para encapsular el DNA viral y formar progenies de viriones en el núcleo (Tomado de Woodman, 2007).

Durante el proceso de carcinogénesis del CC se observa una sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 que son las encargadas de llevar a cabo la transformación e inmortalización celular. Estas proteínas también se encargan de detener la diferenciación celular que genera displasia y de llevar a cabo reordenamientos cromosómicos (Woodman, 2007). Por otro lado, se ha observado que la proteína E5 parece interferir con la apoptosis y da inicio a la transformación celular (Burd, et al., 2015; Doorbar, 2006).

2.2. La respuesta Inmune frente a la infección por HPV

La infección por HPV está restringida a las células epiteliales donde la presentación de antígenos virales al sistema inmune adaptativo será muy pobre; debido a esto, la respuesta inmune desencadenada por la infección será muy baja pero lo suficientemente detectable en la mayoría de los infectados (Morrison et al., 2015). Durante las infecciones por HPV, el virus logra pasar desapercibido como resultado de la ausencia de procesos celulares como la necrosis, citólisis o inflamación, lo que dará como resultado una nula liberación de citocinas del tipo proinflamatorio (Karim et al., 2011). Diversos estudios reportan que en más del 80% de las lesiones genitales causadas por infecciones por HPV, estos se eliminan como resultado de una respuesta inmune mediada por células. Particularmente, los queratinocitos, las células dendríticas (DC), las células de Langerhans (LgC), las células asesinas naturales (NK) y las células NKT parecen fungir un papel importante en la modulación del sistema inmune para combatir la infección por HPV (Sasagawa et al., 2012).

Los queratinocitos presentes en el tracto genital son capaces de expresar receptores tipo Toll-1, 2, 3, 4, 5 y 6 (TLR) en la superficie celular y en los endosomas. Particularmente, TLR-9 permite la secreción de interferones que promueven la activación de las células NK, que a su vez podrán ocasionar la muerte de las células infectadas por HPV. Sin embargo, en infecciones persistentes, la respuesta inmune innata es baja, lo que facilita que el virus pueda escapar. Este mecanismo se encuentra influenciado por los interferones, que a su vez son regulados por las proteínas E6 y E7, las cuales interfieren las vías de transducción de señales de las citocinas (Rincon-Orozco et al., 2009). Por otro lado, las LgC y las DC son responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa para eliminar la infección; esto sucede como consecuencia de la presentación de antígenos a las células T y B en los ganglios linfáticos. Durante este proceso, ocurre la liberación de citocinas proinflamatorias que participan en la activación de las células Tc (linfocitos T citotóxicos), específicas para las proteínas tempranas del HPV (E2, E6 y E7) (Woo et al., 2010). La respuesta inmune humoral está mediada por anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína L1 de la cápside, lo cual puede ocasionar la inhibición de la propagación de la infección viral (Stanley, 2014). También se ha reportado que las proteínas E2, E6 y E7 regulan la expresión de la IL-10 y TGF- β , al interactuar con sus promotores, lo cual favorece la inmunosupresión local (Stanley, 2014). Por otro lado, la proteína E5 se encarga de regular la supresión de antígenos a las células Tc para inhibir el MHC-I y la presentación de

antígenos al MHC-II (Campo et al., 2010).

En conclusión, la mayoría de las infecciones por HPV suelen ser transitorias y eliminadas por el sistema inmunológico. Sin embargo, su persistencia se asocia con el desequilibrio de la respuesta inmune celular y humoral, principalmente del ambiente de citocinas pro y antiinflamatorias, lo cual tendría como consecuencia el desarrollo de CC (Stanley, 2014).

2.3. Función e importancia de la proteína L1

L1 es la proteína más conservada y mayoritaria de la cápside del HPV, esta proteína es considerada como la base para la clasificación del HPV. Tiene un peso molecular de 53-57 kDa y conforma poco más del 80% de la cápside viral. En su estructura tridimensional se distinguen tres regiones definidas: núcleo y los extremos amino y carboxilo. Consta de 504 aminoácidos, 19 de los cuales son altamente conservados en los diferentes genotipos de HPV sugiriendo que cumplen un papel fundamental en el ensamblaje de las partículas virales (Figura 4) (Chen et al., 2000; Vidyasagar et al., 2014). L1 contiene 72 capsómeros pentaméricos que cuando son expresados en sistemas heterólogos son capaces de auto-ensamblarse y formar pseudo partículas virales (VLPs). Cada pentámero presenta un hueco cónico interior, el cual es ocupado por monómeros de L2 que podría conferir una reactividad cruzada entre diferentes tipos de HPV (Yue, et al., 2013; Vanegas, et al., 2008).

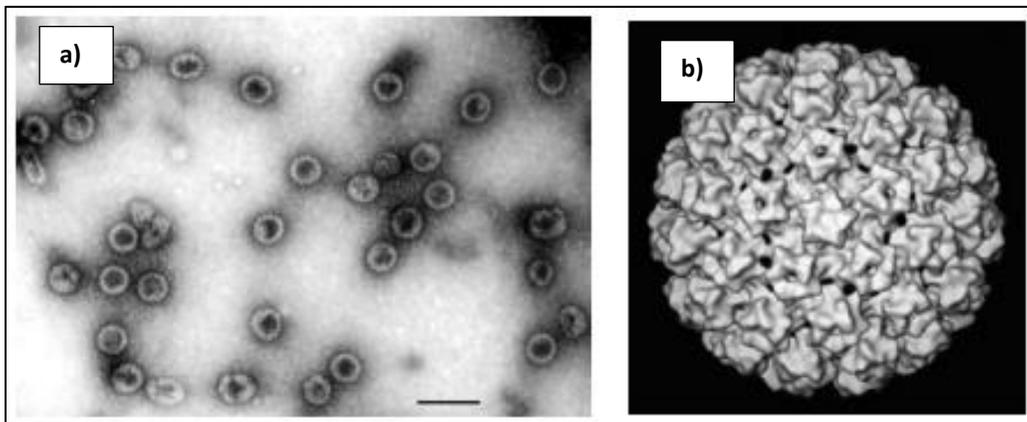


Figura 4. Estructura de las VLPs de HPV16. a) tinción de VLPs con solución de acetato de uranilo al 1% **b)** Micrografía electrónica de VLPs (capsómeros formados por L1 de HPV-16) (Tomado de Xu, et al., 2006).

La conformación de L1 dependerá del ciclo de vida del virión ya que, durante su proceso de ensamblaje, las interacciones de L1 deben ser flexibles para permitir la captación selectiva del DNA viral dentro del virión, contrario a la transmisión célula-célula donde el virión se mantendrá rígido como resultado del entrecruzamiento de los enlaces disulfuro de L1 (Burd et al., 2015).

Las partículas de L1 son altamente inmunogénicas ya que imita la superficie de los viriones del HPV nativo. Además, presentan una alta inmunogenicidad debido a que en la superficie de las VLPs se han identificado tanto epítomos conformacionales como epítomos lineales que pueden provocar la formación de anticuerpos neutralizantes (Vidyasagar, et al., 2014).

En conclusión, el reconocimiento de las múltiples propiedades de L1 como son la capacidad de autoensamblaje, alta inmunogenicidad, además de conferir una protección larga y específica de tipo han servido de base para el desarrollo e implementación de vacunas contra el HPV (Wang et., al 2011; Xu, et al., 2006; Buck, et al., 2013).

2.4. Características de las VLPs de HPV.

Las VLPs de HPV son generadas principalmente con la proteína L1 y, en menor proporción, se ha utilizado L2. La proteína L1 tiene una gran capacidad de auto-ensamblarse y formar cápsides virales, con una alta similitud a la morfología del HPV, pero con la diferencia de que no pueden replicarse y tampoco infectar a la célula hospedera debido a la ausencia de material genético. A pesar de carecer del genoma viral, las VLPs de HPV cuentan con las características morfológicas e inmunogénicas semejantes a las de los HPV nativos (Chen, et al., 2000; Xu, et al., 2006; Beltrán L., et al., 2014).

Las VLP son complejos multiméricos de proteínas que imitan la conformación y organización de los virus nativos, sus dimensiones pueden oscilar entre 50-60 nm (dependiendo de la proteína viral implicada en el proceso de ensamblaje). Asimismo, estas pueden usarse de forma vacías o bien, pueden ser empaquetadas con una carga de interés (DNA, proteínas o moléculas terapéuticas), y en este caso se denominarán pseudoviriones, los cuales conforman una estructura similar al HPV. Estas últimas pueden ser utilizadas en ensayos de neutralización en condiciones *in vitro* o para la entrega de moléculas en posibles tratamientos (Xu, et al., 2006).

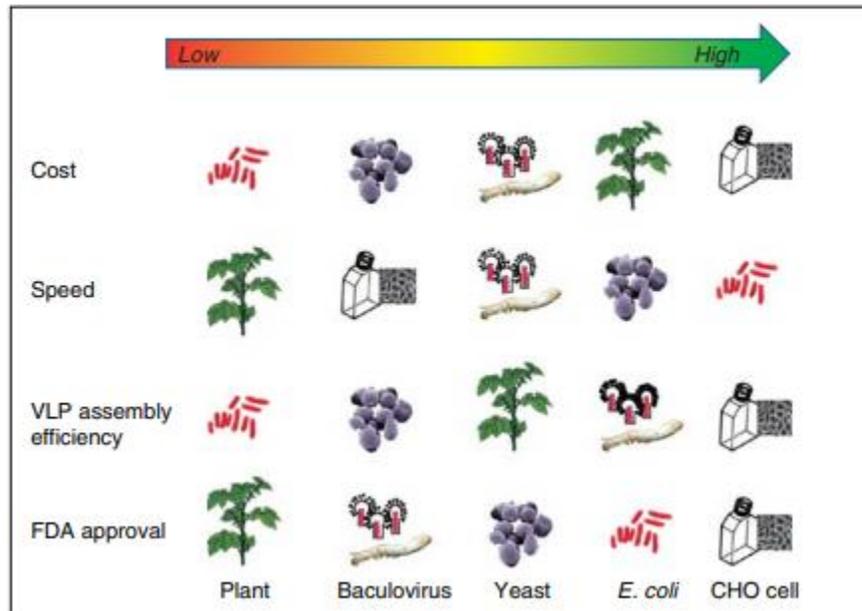


Figura 5. Comparación de los sistemas de producción de VLPs de HPV (Cho, et al., 2011).

En la actualidad, existen varios métodos *in vivo* para la producción de VLPs utilizando diferentes sistemas de expresión, entre los que se encuentran las levaduras, los baculovirus y sistemas basados en plantas (Figura 5) (Beltrán L., et al., 2013). La diferencia entre cada sistema se basa en los costos, procesos de fabricación, tiempo de producción, así como la conformación tridimensional durante la producción de los antígenos. En términos de conformación tridimensional, los sistemas de baculovirus son los que mejor funcionan dado que la conformación del antígeno es más similar al virus que infecta humanos, seguidos por los sistemas basados en levaduras y plantas. Para la expresión de altos niveles de antígenos de L1 de HPV, se ha recurrido a la optimización de codones ayudando a mejorar la producción de la proteína y manteniendo la conformación en las células huéspedes seleccionadas. Es por este motivo que las VLPs se consideran un vehículo para la entrega de epítopos a las células diana y, por ello, son usadas ampliamente para la generación de vacunas y, más recientemente, como vehículos para la entrega de genes (Chen, et al., 2000; Cho, et al., 2011).

2.5. Vacunas como método de prevención contra la infección por HPV

En la actualidad, el uso de vacunas profilácticas como prevención de distintas enfermedades ha sido clave para disminuir considerablemente el número de incidencia y mortalidad en la población. Particularmente, la infección por HPV que puede progresar a un CC puede prevenirse con la vacunación profiláctica de VLPs (Cho, et al., 2011).

El principal objetivo de las vacunas profilácticas contra HPV es disminuir la incidencia de la infección y, por ende, reducir el desarrollo de lesiones cervicales y el riesgo para el desarrollo de CC, lo cual se da con las actuales vacunas (bivalente y tetravalente); con las que se ha logrado inducción de anticuerpos neutralizantes que inhiben la infección por este virus. Particularmente, estas vacunas están enfocadas en inducir anticuerpos contra la cápside del HPV y son capaces de bloquear la interacción de los viriones con los queratinocitos previniendo así la entrada del virus. En el caso de la respuesta inmune que se origina en las infecciones naturales, primero ocurre la infección y después la expresión de las proteínas de la cápside L1 y L2 permite inducir una respuesta neutralizante. A pesar de sus bajos niveles de expresión tiene el potencial de eliminar cerca del 80-90% de las infecciones por HPV (Mariani&Venuti, 2010; Stanley, et al., 2008). Por el contrario, la respuesta inmune generada tras la administración de la vacuna contra HPV inicia con la aplicación intramuscular de las VLPs que genera altos niveles de anticuerpos neutralizantes séricos específicos contra L1 y, por lo tanto, que promueve la memoria inmunológica (Stanley, et al., 2008).

La tecnología de las VLPs de la vacuna profiláctica de HPV se originó en la Universidad de Queensland Australia, así como en el “National Cancer Institute”, E.U. (NCI), Universidad de Georgetown, E.U. y en la Universidad de Rochester, E.U. Los experimentos hechos por Frazer y colaboradores reportaron que la expresión de las proteínas L1 y L2 de HPV resultaba en la formación de pequeñas VLPs. Por su parte, Schlegel de la Universidad de Georgetown, demostró la capacidad que tenía L1 para auto-ensamblarse, formar VLPs y producir anticuerpos neutralizantes como se refiere en Cho, et al., 2011& Xu, et al., 2006.

Un suceso importante fue el que realizó Schiller del NCI, al demostrar que el correcto auto-ensamblaje de la proteína L1 de HPV inducía la generación de anticuerpos neutralizantes en animales inmunizados, mientras que por su parte Rose y colaboradores de la Universidad de Rochester, demostraron que la L1 de HPV-11 se expresaba a partir de células de insecto auto-

ensambladas e inducía anticuerpos neutralizantes sin necesidad de adyuvantes, esta tecnología dio pauta a que empresas previamente posicionadas en el área de investigación y salud patentaran las vacunas que actualmente están disponibles a nivel mundial (NIH, 2006; GSK, 2004).

Tabla 2: Composición de vacunas profilácticas contra HPV (Harper & DeMars, 2017).

Tipo	Fabricante y año de aprobación	Antígeno de la vacuna para la prevención del CC (µg)	Antígeno de la vacuna para prevenir las verrugas genitales(µg)	Esquema de vacunación y rango de edad	Sistemas de expresión para la producción de antígenos	Adyuvante (µg)
Cervarix (0,5 ml)	GSK (2007)	HPV16 (20) HPV18 (20)		9-25 años dosis: 0, 1 y 6 meses	baculovirus (Célula de insecto)	3- O -desacil-4'-monofosfril lípido (MPL, 50) Sal de hidróxido de aluminio (500)
Gardasil-4 (0,5 ml)	Merck (2006)	HPV16 (40) HPV18 (20)	HPV6 (20) HPV11 (40)	9-26 años dosis: 0, 2 y 6 meses	<i>S. cerevisiae</i>	Hidroxifosfato de aluminio amorfo (225)
Gardasil-9 (0,5 ml)	Merck (2014)	HPV16 (60) HPV18 (40) HPV31 (20) HPV33 (20) HPV45 (20) HPV52 (20) HPV58 (20)	HPV6 (30) HPV11 (40)	9-26 años dosis: 0, 2 y 6 meses	<i>S. cerevisiae</i>	Hidroxifosfato de aluminio amorfo (500)

Desde el año 2005 se patentó la tecnología de producción de VLPs. La empresa Merck, fabricante de GARDASIL® cuenta con la vacuna tetravalente (GARDASIL®4) destinada a prevenir la infección por los tipos de HPV 16, 18, 11 y 6. Esta vacuna está mezclada con un adyuvante que contiene aluminio y es eficaz en prevenir las infecciones por los tipos de HPVs ya mencionados hasta en un 99.5%. Este mismo laboratorio cuenta con la vacuna nonavalente

(GARDASIL®9), vacuna específica contra los HPV's 16, 18, 11, 6, 31, 33, 45, 52 y 58 pero sólo está disponible en E.U. (Bayas, et al., 2008; NIH, 2006).

Por su parte, GlaxoSmithKline (GSK), cuenta con CERVARIX®, una vacuna que consiste en VLPs recombinantes de HPV-16 y HPV-18 formulado con AS04 (3-O-desacyl-4-monophosphoryl lipid A) y con una eficacia de 95.3% en la prevención de infecciones por HPV-16/18. Todas las vacunas antes mencionadas presentan diferencias en el sistema de producción de las VLPs y el adyuvante empleado para su generación. GARDASIL® se produce en un sistema de levadura, mientras que CERVARIX® lo hace por baculovirus en células de insecto (Tabla 2) (Cho, et al., 2011; GSK, 2004).

Las vacunas contra HPV preparadas con VLPs están ahora autorizadas en más de 100 países. La función de las vacunas profilácticas actuales tiene como objetivo disminuir la incidencia de la infección por HPV, lo cual también ha disminuido el desarrollo de CC (Yue, et al., 2013).

La eficacia inmunológica de la vacuna se ha observado en un esquema de tres dosis (0, 1/2 y 6 meses) en mujeres y hombres adolescentes (9 a 14 años). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la seroconversión en un esquema de dos dosis y el esquema tradicional (tres dosis) es semejante. Por eso actualmente se recomiendan dos dosis a 0 y 6 meses en adolescentes y un esquema completo de tres dosis en personas jóvenes (15-26 años) y en personas inmunosuprimidas (Kreimer, et al., 2015; Kim & Kim, 2017; Bayas, et al., 2008).

Por otra parte, durante la última década se han desarrollado otras vacunas profilácticas contra el HPV, utilizando VLPs para los tipos HPV 16, 18, 6 y 11 pero con vectores de expresión distintos a los ya mencionados (células CHO y *E. coli*). Además, se sigue trabajando en la generación de vacunas profilácticas de segunda generación que sean eficaces, confiables y seguras, así como en vacunas terapéuticas que tengan un potencial considerable para el tratamiento seguro y no invasivo contra el CC (Harper & DeMars, 2017; Kim & Kim, 2017).

2.6. Respuesta inmune generada por las vacunas profilácticas contra HPV

La respuesta de anticuerpos provocada por las vacunas GARDASIL® y CERVARIX® es de 10 a 100 veces más elevada que las que genera una infección natural por HPV (seroconversión media de 8-12 meses) (Kim & Kim, 2017).

De acuerdo con estudios realizados en modelos animales, se ha demostrado que la protección conferida por las vacunas de HPV es mediada por una respuesta policlonal de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína L1. Los ensayos clínicos con esta vacuna reportan que la mayor concentración de anticuerpos se ha observado cuatro semanas después de la tercera dosis, disminuyendo durante el primer año y estabilizándose en una fase de meseta al cabo de 18 meses (Harper & DeMars, 2017). En los ensayos clínicos con un seguimiento de hasta 8 años, se corrobora para ambas vacunas una eficacia superior al 95% para la prevención de las lesiones preneoplásicas de alto grado (NIC2+/NIC3+) y, adenocarcinoma *in situ* (AIS), esto a pesar de las diferencias en la inmunogenicidad de las vacunas. Además, también se ha identificado que estas vacunas previenen lesiones preneoplásicas vulvovaginales, ocasionadas por los HPV oncogénicos 16 y 18, principalmente en mujeres mayores de 25 años. (Harper & DeMars, 2017). Se sabe que una vez que la vacuna contra HPV entra por vía intramuscular al tejido, las partículas de VLPs son reconocidas por las APCs (células presentadoras de antígeno) estromales y las células de Langerhans musculares, para, posteriormente, a través de los canales linfáticos migrar a los ganglios linfáticos periféricos, sitio donde tiene lugar la activación de las células B. Posteriormente, éstas últimas iniciarán su diferenciación hacia células plasmáticas para la producción de anticuerpos. Siendo los plasmocitos de vida prolongada, que residen en la médula ósea, los que producen constantemente anticuerpos IgG que son los responsables de los anticuerpos a largo plazo de tipo específicos contra HPV (IARC, 2007; Ault, 2007).

Las VLPs son moléculas altamente inmunogénicas, que tienen la capacidad de activar la respuesta inmune celular y humoral. Ensayos en ratones mostraron que el mecanismo de acción de las VLPs es a través de su unión a las células dendríticas mieloides mediante los receptores de las células T, dependientes de la vía MYD88, la cual es esencial en la activación de las células B para la generación de anticuerpos (Stanley, et al., 2008). A continuación, la respuesta de células T es dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), presente en las DC, que gracias al microambiente inmunológico se favorece la diferenciación hacia el fenotipo Th2 las cuales liberan citocinas (IL-4/IL-10), que llevará a la activación de células B. La efectividad con la que se activa la respuesta T es variable, ya que depende del haplotipo específico de MHC que cada individuo posee, de la cantidad y vía de administración del inmunógeno, además de la modulación de moléculas co-estimuladoras y citocinas proinflamatorias que estén involucradas en la activación de la respuesta T (Fig. 6).

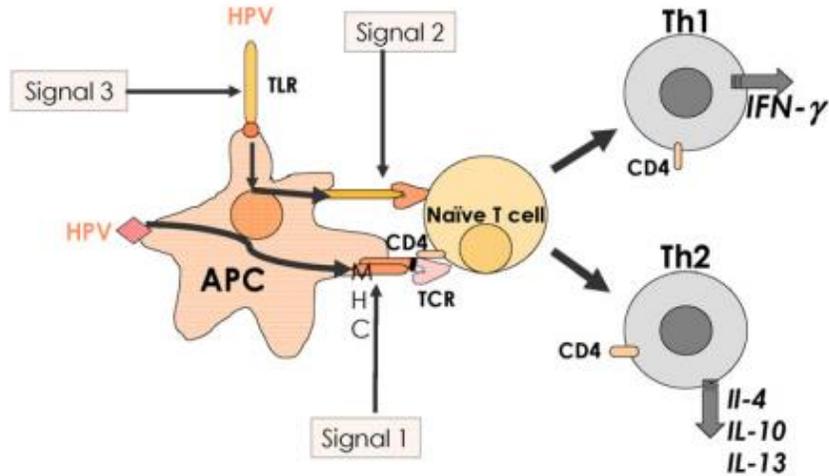


Figura 6. Mecanismo de señalización de células T para la activación de células B. La señalización de eventos que emanan del TCR (señal 1), moléculas co-estimuladoras (señal 2), y citocinas proinflamatorias producidas por las APC activadas, actúan directamente en las células T (señal 3). En infecciones naturales, las señales 2 y 3 son generadas por el reconocimiento de antígeno por las APC y los TLR. En la vacunación, la activación de las señales 2 y 3 se puede lograr mediante el uso de adyuvantes (Stanley, et al., 2008).

Para fortalecer la activación de las células T, se emplean vacunas con adyuvantes, en su mayoría derivados de sales de aluminio, cuya función es aumentar o modular la inmunogenicidad intrínseca del antígeno (Stanley, et al., 2008; Ault, 2007).

Una de las ventajas asociadas a la vacunación con VLPs es la generación de anticuerpos a largo plazo contra los tipos de HPV a los que va dirigida la vacuna, pero además se ha demostrado la existencia de protección cruzada contra otros tipos que no se encuentren incluidos en la vacuna. Debido a la naturaleza compleja de las VLPs presentes en las vacunas se ha observado la presencia de multi-epitopes y demás determinantes antigénicos que activan diferentes respuestas T dependientes, que culminan con la producción de diferentes anticuerpos, algunos de ellos inmunodominantes o tipo específicos y algunos otros que corresponden a subpoblaciones de anticuerpos compartidos por otros tipos de HPV (Christensen, et al., 1996; Ault, 2007).

En el caso de las vacunas con las que actualmente se dispone, se ha observado inmunidad humoral tipo específica, siendo la inmunidad mediada por células menos potente, por lo que se busca ampliar la protección y/o conferir actividades terapéuticas adicionales. En ensayos recientes se han encontrado epítomos neutralizantes de alta protección, caracterizados por

presentar varias regiones conservadas de aminoácidos de la proteína L2 de HPV-16, lo que sugiere que este antígeno puede funcionar adicionalmente en la vacuna y potenciar la protección contra diversas infecciones de los HPV de alto riesgo. Sin embargo, las pequeñas cantidades de esta proteína que se pueden integrar en la VLP no son suficientes y es por este motivo que se sigue trabajando en el desarrollo de vacunas de segunda generación (Kim & Kim, 2017).

2.7. Sistemas de detección de anticuerpos neutralizantes en mujeres vacunadas contra HPV.

La vacunación con VLPs genera altos títulos de anticuerpos que son neutralizantes y protegen contra infecciones de los HPV vacunales. Los anticuerpos neutralizantes reconocen epítopes conformacionales de las VLP, esto se debe a que la región C-terminal de las VLP en su forma tridimensional adopta una forma similar a la de la estructura del virus nativo, pero en lugar de volver al capsómero de origen, el brazo se desplaza y se conecta con el capsómero vecino, lo que permite que los residuos en la C-terminal queden accesibles en la superficie de la VLP. Un estudio propuesto por Modis y colaboradores (2002), mostró que varios aminoácidos de la región C-terminal son divergentes entre los tipos de HPV y, por lo tanto, puede ser un dato importante para el reconocimiento por anticuerpos tipo específicos (Modis, 2002; IARC, 2007).

Los epítopes inmunogénicos de las proteínas se han determinado de dos maneras: 1) Generando anticuerpos monoclonales murinos contra las VLPs de L1 y, 2) Mediante el mapeo de epítopes inmunogénicos que surgen como consecuencia de una infección natural (Modis, 2002).

La generación de anticuerpos policlonales contra VLPs ha permitido la identificación de una variedad de tipos de anticuerpos, los que reconocen a los epítopes más expuestos que son los epítopes conformacionales y los que están menos expuestos que en general reconocen epítopes lineales, esto dependerá del grado de conservación del ensamblaje de las VLPs. Sin embargo, hasta la fecha no existe un correlato inmune ni tampoco una titulación umbral de anticuerpos que se correlacione con la protección contra la infección por HPV (Brown, et al., 2014).

En la actualidad, existen dos ensayos serológicos que son utilizados para medir anticuerpos contra el HPV inducidos por infección natural o por la vacunación. Los ensayos de neutralización basado en pseudoviriones (PBNA) y el inmunoensayo competitivo Luminex (cLIA) permiten detectar anticuerpos neutralizantes y dar seguimiento a los esquemas de vacunación. Sin embargo, se han encontrado limitantes en cada uno de estos y, por tanto, se

sigue trabajando en un ensayo que permita medir anticuerpos neutralizantes contra HPV, que sean de bajo costo y que pueda ser utilizado a nivel poblacional (Brown, et al., 2014, Toh, et al., 2020). Entre los ensayos que se han utilizado para evaluar niveles de anticuerpos generados por la vacunación contra HPV se encuentran los siguientes:

2.7.1. Ensayos de neutralización basados en pseudoviriones

El ensayo de neutralización basado en pseudoviriones (PBNA) se trata de un ensayo a base de quimioluminiscentes que utiliza pseudoviriones (PsVs) del HPV, en el entendido de que un pseudovirión es una partícula semejante a un virus que no contiene DNA viral sino un gen reportero que codifica para la expresión de una molécula que permite evidenciar su actividad. Esta técnica permite medir anticuerpos neutralizantes con ayuda de PsVs, los cuales al ponerse en contacto con suero de mujeres vacunadas bloquearán la entrada de los PsVs a las células blanco en condiciones *in vitro*, evidenciando así la acción neutralizante de anticuerpos al evitar la expresión del gen reportero. Si bien, el PBNA se considera el estándar de oro para evaluar la respuesta inmune humoral generada contra los HPV vacunales debido a su alto rendimiento, gran especificidad y sensibilidad, también se ha visto que presenta algunas desventajas como son su complejidad, la falta de discriminación entre isotipos y subclases de anticuerpos anti-HPV, aunado a su alto costo (Sehr, et al., 2013; Barzón, 2014, Toh, et al., 2020).

2.7.2. Inmunoensayo competitivo Luminex

El inmunoensayo competitivo Luminex (cLIA) permite la cuantificación y la detección simultánea de anticuerpos neutralizantes de los tipos 6, 11, 16 y 18. Este tipo de ensayo está basado en la detección de epítomos inmunodominantes específicos de la VLP, para lo que se generaron anticuerpos monoclonales neutralizantes para cada tipo de HPV vacunal. Esto permite medir manera simultánea los títulos de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra L1 que son competidos por los anticuerpos séricos al unirse a las VLPs (Dias, D., et al., 2005). El cLIA se ha caracterizado por su alta sensibilidad, exactitud y precisión, sin embargo, entre sus desventajas se ha observado que solo puede detectar un subconjunto de los anticuerpos neutralizantes totales (nAb), debido a que solo se evalúa la respuesta monoclonal y, por tanto, no permite medir la respuesta neutralizante completa. Lo anterior sugiere que el cLIA subestima los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación contra HPV, además de ser costoso y técnicamente complejo (Brown, et al., 2014, Dias, D., et al., 2005).

2.7.3. Ensayo de inhibición de la Hemaglutinación

Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HIA) han sido empleadas desde los comienzos de la virología moderna. En la técnica de HIA se aprovecha la propiedad de los virus de unirse a la membrana de los eritrocitos, por este motivo los ensayos de HIA han sido utilizados para caracterizar e identificar receptores de la superficie celular para diferentes virus, así como para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de enfermos (Thompson, et al., 2013).

En la actualidad, los ensayos de HIA son útiles en la detección de antígenos reemplazando las técnicas tradicionales y permitiendo una mayor rapidez en la definición del diagnóstico; además, tienen la ventaja de ser fáciles y de rápida implementación. Sin embargo, unas de las limitaciones del ensayo para el análisis cualitativo o semi-cuantitativo se relaciona con la concentración y pureza requerida del antígeno de las VLPs, ya que una mala purificación de estas puede dar lugar a falsos positivos y una concentración baja de antígeno puede arrojar falsos negativos. Por lo que, la prueba de HIA es menos sensible comparada con otros ensayos de detección de anticuerpos contra antígenos virales de tipo neutralizante, por lo que su uso se ha visto limitado para estudios poblacionales (Roden, et al., 1995; Alvarez, et al., 2014).

2.7.4. Ensayo de Inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) es una técnica basada en placas de múltiples pocillos que se utiliza para determinar las concentraciones de anticuerpos, antígenos u otras proteínas en una muestra biológica mediante lecturas cromogénicas, fluorescentes o luminiscentes. Esta técnica se ha convertido en un elemento básico de muchos laboratorios de investigación de diagnóstico y biomédicos, demostrando especificidad, sensibilidad y reproducibilidad en una variedad de aplicaciones. Este ensayo, utiliza enzimas unidas a uno de los reactivos (beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina) lo cual permite la cuantificación de una reacción antígeno-anticuerpo mediante el desarrollo del color después de la adición escalonada de reactivos y mediante la reacción del sustrato o cromógeno (Aydin, 2015; Crowther, J. R., 2021). En función de la manera en que se produzcan las interacciones antígeno-anticuerpo, los ELISA pueden clasificarse en cuatro

categorías: **ELISA directo, indirecto, de captura y de competencia** (Tabla 3) (Andersen, et al.,1997).

El método ELISA se considera como una técnica versátil, simple, sensible y cuantificable. Se ha utilizado ampliamente para medir los anticuerpos inducidos por vacunas, ya que se considera la técnica más eficiente para determinar el grado de protección y la seroconversión inducida por la vacunación, además de que permite evaluar la respuesta humoral a nivel poblacional (estudios sero-epidemiológicos) debido a su poca complejidad, alta sensibilidad, exactitud y bajo costo. Si bien, existen muchas ventajas en el uso del ELISA, este se debe estandarizar y optimizar adecuadamente para garantizar resultados confiables (Aydin, 2015).

TABLA 3. Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) y sus variantes			
TIPO DE ELISA	ANTICUERPO UTILIZADO	ANTIGENO UTILIZADO	FUNDAMENTO Y UTILIDAD
ELISA directo	Ac. Primario	Antígeno de interés	Ensayo que utiliza un anticuerpo para detectar el ac. o ag. De interés. Utilidad: Tamizaje de ag. solubles.
ELISA indirecto	Ac. Primario + ac. secundario	Antígeno de interés	Ensayo que utiliza dos anticuerpos (suero problema y anti-IgG humano) para detectar el ac. o ag. De interés. Utilidad: Tamizaje de ac. y mapeo de epítopes.
ELISA de captura	Ac. De captura + ac. de detección	Antígeno de interés	Ensayo en el que un ag. es inmovilizado entre dos anticuerpos (de captura y detección) que se unirán a dos epítopes distintos de un mismo antígeno. Utilidad: Tamizaje de ac. y mapeo de epítopes.
ELISA de competencia	Ac. Primario + ac. secundario + ac. de competencia	Antígeno de interés	En este ensayo, se utiliza un ag. de referencia que competirá con el ag. de la muestra por unirse al ac. primario. Utilidad: Tamizaje de antígenos solubles.

El método ELISA se considera como una técnica versátil, simple, sensible y cuantificable. Se ha utilizado ampliamente para medir los anticuerpos inducidos por vacunas, ya que se considera la técnica más eficiente para determinar el grado de protección y la seroconversión inducida por la vacunación, además de que permite evaluar la respuesta humoral a nivel poblacional (estudios seroepidemiológicos) debido a su poca complejidad, alta sensibilidad, exactitud y bajo costo. Si bien, existen muchas ventajas en el uso del ELISA, este se debe estandarizar y optimizar adecuadamente para garantizar resultados confiables (Aydin, 2015).

2.8. Determinación de anticuerpos neutralizantes por ELISA indirecto de VLPs de HPV.

Como ya se ha mencionado, los ensayos ELISA tienen diferentes aplicaciones y la elección de la técnica dependerá de lo que se desea analizar.

Durante los ensayos clínicos de la vacuna bivalente Cervarix® contra HPV, se utilizó el ELISA indirecto (ELISA-VLPs) para monitorear el estado inmunológico antes y después de la vacunación. Este tipo de ELISA permite medir los niveles de anticuerpos que se unen a epítomos conformacionales de las VLP fijadas a una superficie sólida, los cuales han sido considerados de tipo neutralizante. Sin embargo, este tipo de ensayos también detectan anticuerpos que reconocen epítomos lineales (anticuerpos no neutralizantes) (Dessy, et al., 2008). Se ha observado que el grado de reactividad atribuible a los anticuerpos no neutralizantes dependerá de la correcta conformación y ensamblaje de las VLPs que se estén utilizando en la técnica.

Como parte de las ventajas que presentan este ensayo es su reproducibilidad, rapidez y alta sensibilidad; sin embargo, presenta algunas deficiencias como la poca especificidad y presencia de reactividad cruzada.

En la actualidad, los ensayos para medir respuesta inmune humoral presentan deficiencias que pueden interferir en la evaluación de la respuesta inmune inducida por las vacunas. Algunos ensayos presentan poca sensibilidad (ensayo de hemaglutinación), son muy complejos o costosos, tal es el caso del cLIA o PBNA o bien, pueden ser poco específicos como el ELISA indirecto de VLPs. Es por este motivo que existe la necesidad de desarrollar un ensayo que permita la detección de anticuerpos neutralizantes en el suero de mujeres vacunadas con una alta sensibilidad, especificidad y que sea de bajo costo para que pueda ser implementado a nivel poblacional.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CC es un problema de salud pública, ya que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México ocupa el segundo lugar en mortalidad y por este motivo se han desarrollado estrategias de prevención y control de la enfermedad. Las vacunas profilácticas basadas en la expresión recombinante de la proteína L1 y su conformación en VLPs de HPV de alto riesgo son una herramienta eficaz en la prevención del CC. Actualmente, las vacunas GARDASIL®4 que protegen contra HPV-16, 18, 6 y 11 y CERVARIX® que brinda protección contra HPV-16 y 18, se encuentran disponibles en más de 100 países. Estas vacunas son producidas de manera recombinante y requieren de tres dosis intramusculares para obtener los títulos de anticuerpos neutralizantes necesarios para lograr la inmunidad del individuo. Sin embargo, las pruebas con las que se evalúan los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación suelen ser costosas, complejas y difíciles de aplicar a nivel poblacional (ensayos de neutralización basado en pseudoviriones o Luminex Multiplex), o bien, pueden ser poco específicas para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV (ELISA indirecto). Es por eso, que en la presente propuesta se pretende comparar el ELISA de captura y el ELISA indirecto con el fin de comprobar si este primer tipo de inmunoensayo presenta las características que se requiere para la determinación de los niveles de anticuerpos neutralizantes a nivel poblacional.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Comparar dos diferentes ELISA (indirecto y de captura) en base a su capacidad para identificar y diferenciar, con mayor sensibilidad, los anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV.

4.2. Objetivos particulares

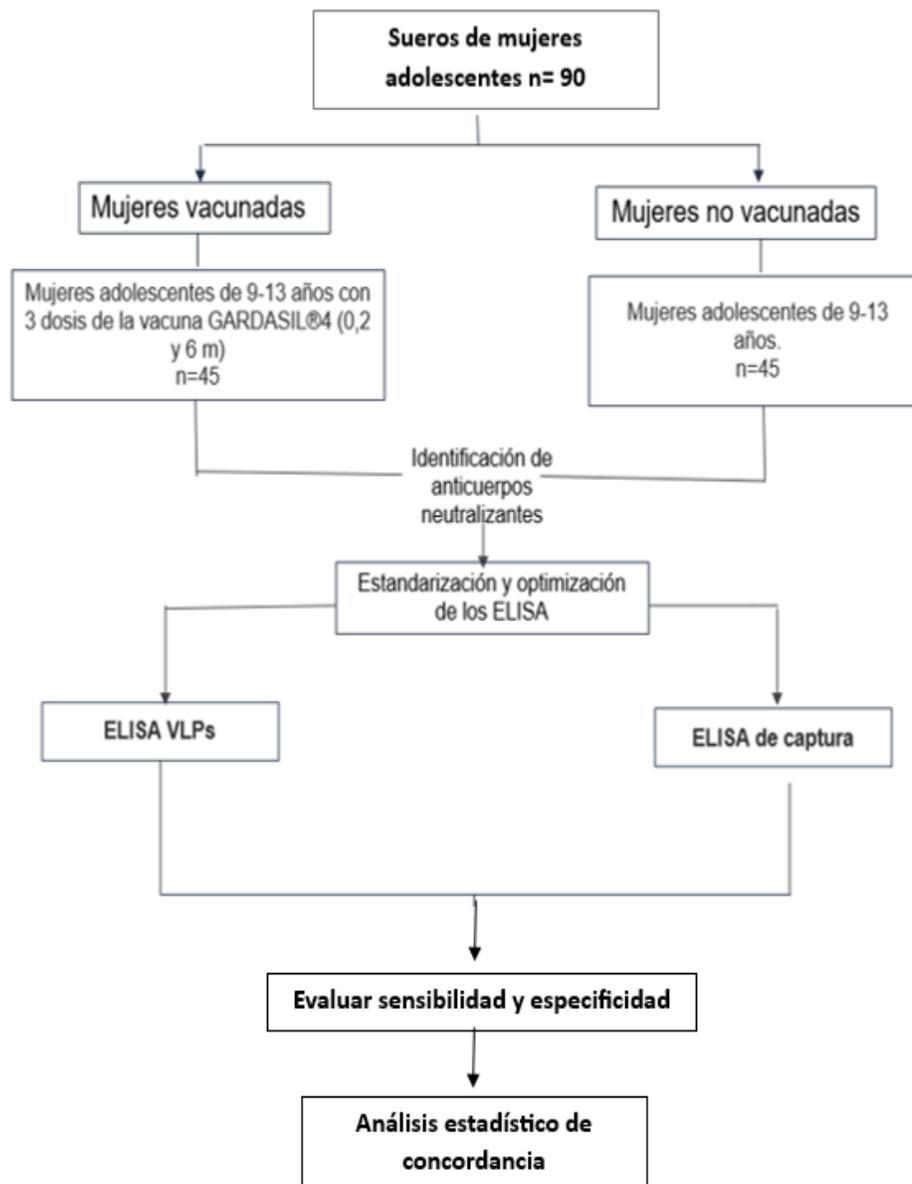
- 4.2.1 Estandarizar y optimizar dos diferentes ELISA (indirecto y de captura) en contra de anticuerpos contra HPV16.
- 4.2.2 Determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra HPV-16 (epítomos conformacionales) por medio de dos diferentes ELISA en mujeres vacunadas contra HPV.
- 4.2.3 Evaluar la sensibilidad y especificidad de los dos tipos de ELISA (indirecto y de captura) para la identificación de anticuerpos neutralizantes en el suero de mujeres vacunadas y no vacunadas contra HPV.
- 4.2.4 Correlacionar los resultados de los diferentes ELISA obtenidos mediante un análisis estadístico de concordancia.

5. HIPÓTESIS

La respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes (epítomos conformacionales) en mujeres vacunadas contra HPV serán identificados con mayor sensibilidad por el ELISA de captura que la técnica convencional de ELISA indirecto, dado que el anticuerpo policlonal anti-VLPs captará los epítomos conformacionales y eliminará el fondo de epítomos lineales de L1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental



6.2. Variables

TABLA 4. VARIABLES DE ESTUDIO					
INDEPENDIENTES					
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	MODO DE OBTENCIÓN
EDAD	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento.	Años cumplidos que refiere tener el paciente y registró en el cuestionario.	Cuantitativa	Años	Cuestionario de un EC previo.
ESQUEMA DE VACUNACIÓN	Guía de inmunización basada en evidencia que indica las vacunas aplicadas, edad, número de dosis de aplicación y cantidad de vacuna por dosis.	Número de dosis aplicadas de la vacuna GARDASIL®4	Cuantitativa	1. No vacunadas 2. Vacunadas	Cuestionario de un EC previo.
DEPENDIENTES					
Anti-VLPs 1	Medición de anticuerpos neutralizantes utilizando un ELISA de captura.	Es una prueba diagnóstica que permite detectar ac. neutralizantes utilizando ac. policlonal de conejo y sueros de inmunizadas.	Cuantitativa	UE/ mL	Sección 7.5.2 de Metodología
Anti-VLPs 2	Medición de anticuerpos neutralizantes utilizando un ELISA de competencia.	Es una prueba diagnóstica que permite detectar ac. neutralizantes utilizando L1/VLPs de HPV-16.	Cuantitativa	UE/ mL	Sección 7.5.3. de Metodología
Anti-VLPs 3	Medición de anticuerpos neutralizantes utilizando un ELISA indirecto.	Es la prueba diagnóstica estándar que utiliza VLPs de HPV para la identificación de anticuerpos neutralizantes (epitopes conformacionales) y no neutralizantes (epitopes lineales).	Cuantitativa	UE/ mL	Sección 7.5.1 de Metodología
SENSIBILIDAD	Probabilidad de que el resultado de	Enfermos positivos/enfermos	Cuantitativa	%	VP/VP+FN

	la prueba sea positivo (h+) en una persona afectada por la enfermedad (e+).				
ESPECIFICIDAD	Probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativo (h-) en una persona sana, que no padece la enfermedad (e-).	Sanos negativos/sanos	Cuantitativa	%	VN/VN+FP
VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP)	Probabilidad condicional de que el paciente tenga la enfermedad, dado que la prueba resultó positiva.	Enfermos positivos/positivos	Cuantitativa	%	a/(a+b)
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN)	Probabilidad condicional de que el paciente no tenga la enfermedad, dado que la prueba diagnóstica resultó negativa.	Sanos negativos/negativos	Cuantitativa	%	d/(c+d)

6.3. Obtención de los sueros de mujeres vacunadas y no vacunadas contra HPV

La población de mujeres evaluadas en este estudio se reclutó durante el 2010-2011 y fueron vacunadas con la vacuna tetravalente de HPV (Gardasil-4®).

Para la obtención de sueros de las adolescentes vacunadas y no vacunadas se recurrió a un banco de sueros de un ensayo clínico previo 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. De este banco de sueros se separaron alícuotas de suero, mismas que se encuentran almacenadas a -80°C en un banco de sueros y son las que actualmente se encuentran en uso.

La población de estudio estuvo integrada por dos grupos: **casos**, el cual estuvo conformado por 45 adolescentes femeninas de entre 9 y 13 años que fueron vacunadas con GARDASIL®4 en un esquema de 3 dosis (0, 2 y 6 meses), sin embargo, para este estudio se

utilizaron los sueros colectados al mes 7 (segunda dosis), mientras que para el grupo control se utilizaron 45 muestras de suero de adolescentes no vacunadas.

6.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN E INCLUSIÓN

Criterios de inclusión:

Mujeres con edades comprendidas entre 9-13 años que fueron vacunadas con la vacuna tetravalente GARDASIL®4 y que aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron carta de consentimiento.

Se eligieron alícuotas de suero con volumen suficiente para poder realizar los dos ensayos de ELISA. Los sueros positivos (casos) y sueros negativos (controles) fueron seleccionados de manera aleatoria provenientes de un banco de sueros de un ensayo clínico previo (Anexo 1).

Criterios de exclusión:

Para la colección de los sueros se excluyeron a mujeres con 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. Mujeres con estas características y aquellas que no cumplieron con los criterios de inclusión.

Para la selección de sueros no se consideraron aquellos que presentaban volumen insuficiente.

Criterios de eliminación:

Mujeres que se embarazaron en el periodo de estudio, mujeres que no llegaron a la toma de muestras, mujeres que retiraron el consentimiento informado.

6.5. ENSAYOS DE ELISA

6.5.1. Ensayo de ELISA indirecto (ELISA-VLPs)

Para poder estandarizar el ELISA indirecto se utilizó como antígeno las VLPs de HPV-16, las cuales fueron previamente preparadas en nuestro laboratorio a partir de baculovirus, purificadas por gradiente de Cesio, renaturalizadas y cuantificadas. En una placa de ELISA de 96 pozos se colocaron 280 ng/pozo de VLPs HPV-16 resuspendidas en PBS a un pH 7.0 (para mantener su conformación) y se dejó incubar a 4°C por 16 h. Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados con buffer de lavado (NaCl 0.9%, Tween 20 al 0.5%) en un lavador automático de placas ELISA (Thermo). Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con leche descremada al 5% (Nestle®) PBS-Tween 20 al 0.5% y AzNa al 0.02% e incubados por 2 h a 37°C. Al término de este tiempo, se agregó por duplicado el suero de mujeres vacunadas y no vacunadas contra HPV en un buffer de dilución (PBS-Tween 0.5%/ leche 2%+AzNa 0.02%) a una dilución 1:200 y se dejó incubar por 1.5 h a 37°C. Así mismo, se utilizó un suero control positivo y un control negativo para el ELISA indirecto. Las placas se lavaron nuevamente con buffer de lavado (NaCl-Tween al 0.5%) como se refiere previamente. Finalmente, se agregó en los pozos el segundo anticuerpo cabra anti-IgG humano conjugado con HRP (horseradish peroxidase, DAKO) diluido en buffer de dilución sin AzNa a una dilución 1:20,000 y se incubó por 1 h a 37°C. El ensayo se reveló utilizando el cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB, Fitzgerald) 1:5 en acetato de sodio (0.1 M pH 6.0) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo agregando una solución 1M H₂SO₄. La actividad enzimática de la peroxidasa sobre el cromógeno se determinó mediante la medición de la densidad óptica (OD) en el lector de ELISA (Thermo Fisher Scientific) a 450 nm y a 630 nm para descartar el fondo del sistema.

6.5.2. ELISA de captura

Para la realización de este ensayo, en una placa de 96 pozos se colocó el anticuerpo de captura (anticuerpo policlonal de conejo anti-VLPs-16) obtenido previamente en el laboratorio de Virus y Cáncer del INSP, Cuernavaca Mor. La placa se cubrió con 100 µl de anti-VLPs-HPV-16 a una dilución de **1:2,560** en buffer de carbonatos/azida de sodio (AzNa) 0.02%, dejándose incubar a 4°C por 16 h. Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados con buffer de lavado (NaCl

al 0.9%-Tween al 0.5%) en un lavador automático de placas ELISA (Thermo). Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con leche al 5%, PBS-Tween 20 al 0.5% y AzNa al 0.02% e incubados por 2 h a 37°C. Al término de este tiempo, se colocaron 400 ng/pozo de VLPs-HPV-16 resuspendidas en PBS a un pH 7.0 (para mantener su conformación) y se dejó incubar a 4°C por 16 h.

Al día siguiente, nuevamente se realizaron cuatro lavados con buffer de lavado (NaCl al 0.9%-Tween al 0.5%) en un lavador automático. Posteriormente, se agregó por duplicado el suero de mujeres vacunadas y no vacunadas contra HPV en un buffer de dilución (PBS-Tween 0.5%/ leche descremada al 2%+AzNa 0.02%) a una dilución 1:200 y se dejó incubar por 1.5 h a 37°C. Así mismo, se utilizó un suero control positivo, negativo y un blanco. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo anti-IgG humano conjugado con HRP (DAKO) a una dilución 1:20,000 y se incubó la placa durante 1 h a 37°C. Para revelar el ensayo se utilizó cromógeno TMB (Fitzgerald) a una dilución 1:5 en acetato de sodio (0.1 M pH 6.0) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en completa oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo agregando una solución 1M H₂SO₄. La actividad enzimática de la peroxidasa sobre el cromógeno se determinó mediante la medición de la densidad óptica (OD) en el lector de ELISA (Thermo Fisher Scientific) a 450 nm y a 630 nm para descartar el fondo del sistema.

6.6. Análisis estadístico

Las absorbancias obtenidas de los niveles de anticuerpos α -VLPs-16 de los dos grupos: mujeres vacunadas contra HPV16 (casos) y mujeres no vacunadas (controles) se convirtieron a unidades ELISA (UE) a partir de una curva de cuatro parámetros obtenida de un pool de sueros positivos y negativos para α -VLPs-16. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 del pool de los sueros, y se obtuvieron las absorbancias de cada dilución. Con los valores obtenidos y usando una ecuación logarítmica se generó una curva de cuatro parámetros que nos permitió hacer la conversión a UE/mL. Posteriormente, con los datos de la ecuación y usando la media geométrica (GM), la desviación estándar (SD) y el percentil 95 (p95) se obtuvieron dos puntos de corte (PC) para cada uno de los grupos. A continuación, se realizó un análisis estadístico usando el software STATA13® para determinar el mejor punto de corte para el ELISA indirecto y de captura. Con este mismo programa realizamos un análisis de curvas ROC para determinar el AUC, se obtuvieron los gráficos de dispersión, la sensibilidad, especificidad VPP, VPN. Finalmente, se

realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) para seleccionar la prueba estadística adecuada para realizar el análisis de correlación entre ambos ensayos, lo cual se realizó con la prueba de Spearman.

7. RESULTADOS

7.1. Estandarización y validación del ELISA indirecto de VLPs

Para realizar el análisis de anticuerpos α -VLPs-16 de los sueros de la población en estudio fue necesario la estandarización del ELISA indirecto. Para ello fue necesario utilizar un control positivo que reconoce epítopes conformacionales en las VLPs y un control negativo. Durante la estandarización del ensayo ELISA indirecto se trabajaron distintas diluciones del segundo anticuerpo (cabra α -IgG-humano) para determinar la dilución óptima con la cual se obtuvo el menor fondo con el suero control negativo y que a su vez, nos permitió diferenciar al control positivo. Las diluciones utilizadas del segundo anticuerpo fueron: 1:20,000, 1:30,000, 1:40,000 y 1:50,000 (Fig. 7). Los resultados de la estandarización de este ensayo mostraron que la mayor absorbancia con el menor fondo se obtuvo usando la dilución 1:20,000. Con esta dilución se pudo observar una absorbancia alta con el control positivo y baja para el control negativo, además con esta dilución se obtuvo una absorbancia alta sin saturar el sistema. El resto de las condiciones del ensayo se mantuvieron como se menciona en la metodología.

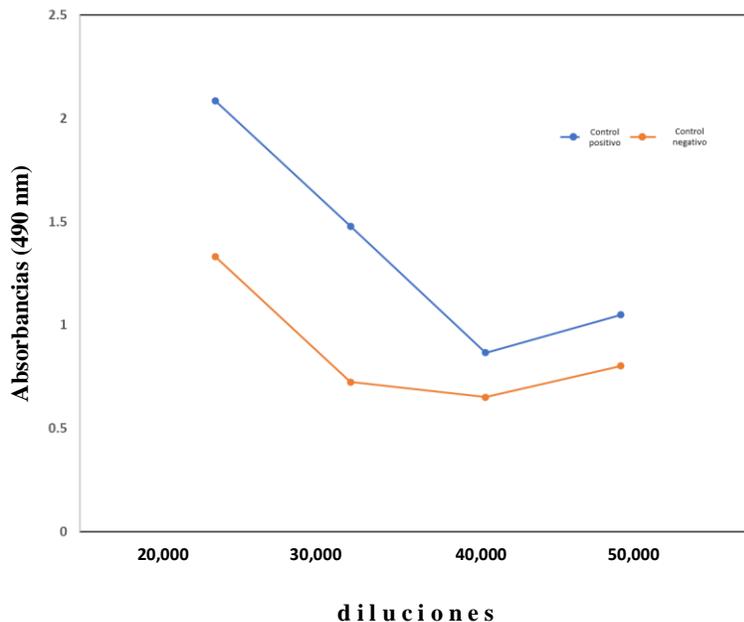


Figura 7. Titulación del segundo anticuerpo α -IgG humano. Diluciones del α -IgG-humano realizadas durante la estandarización del ELISA indirecto colocando 280ng/pp de VLP-16 y efectuando diluciones 1:20,000, 1: 30,000, 1: 40,000 y 1: 50,000 más un control positivo (línea azul) y un control negativo para VLPs (línea naranja).

Para la validación del ensayo de ELISA indirecto fue necesario demostrar la reproducibilidad del ensayo y la variación entre cada uno de ellos. De los cuatro ensayos realizados se obtuvo el coeficiente de variación inter-ensayo (CV%). Para la validación se utilizó un suero positivo y un suero negativo para α -VLPs-16. Dichos sueros se analizaron por duplicado en cada placa y se evaluaron utilizando la siguiente formula:

$$CV\% = \frac{SD}{\text{promedio}} * 100$$

Una vez obtenidas las absorbancias de los controles se promediaron, se calculó la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de los cuatro ensayos realizados (Tabla 5). Los resultados obtenidos indican que los ensayos del ELISA indirecto-VLPs presentaron una baja SD con un CV del 4% para el control positivo y del 14% para el control negativo. Cabe mencionar que según la literatura el CV óptimo debe ser $\leq 20\%$ entre ensayos (Hnasko, 2015). Estos datos muestran que los resultados entre placas son confiables ya que están dentro del rango permitido.

TABLA 5. COEFICIENTE DE VARIACIÓN DEL ELISA INDIRECTO		
ELISA indirecto usando sueros control		
MUESTRA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
ENSAYO 1	1.509	0.132
ENSAYO 2	1.497	0.107
ENSAYO 3	1.517	0.096
ENSAYO 4	1.380	0.124
PROMEDIO	1.476	0.115
DESVIACIÓN ESTÁNDAR (SD)	0.06	0.01
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	4%	14%

*SD (desviación estándar; CV (coeficiente de variación %)).

7.2. Estandarización y validación del ELISA de captura de VLPs

7.2.1. Estandarización de la concentración de anticuerpo policlonal de α -VLPs-16

Para desarrollar el ELISA de captura, primeramente, se necesitó estandarizar la dilución del α VLPs-16 (anticuerpo de captura), el cual permite reconocer los epítopes conformacionales de las VLPs y eliminar el fondo de la proteína L1 (epítopes lineales). Para ello, se probaron diferentes diluciones del α -VLPs-16: 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1,280, 1:2,560 y 1:5,120. Posteriormente, se obtuvieron las absorbancias de cada dilución y con éstas se pudo determinar los títulos de anticuerpos α -VLPs-16 (Fig. 8). Se observó que el título de anticuerpos se encontraba arriba de la dilución 1:1,280 por lo que se tomó un rango más amplio de las diluciones para encontrar el título óptimo para el ensayo que se determinó en la dilución 1:2,560, la cual se consideró como la dilución óptima en donde se obtuvo una absorbancia alta sin saturar el sistema y con la cual se observa la diferencia de reconocimiento de los sueros sobre las VLPs logrando eliminar el fondo de L1.

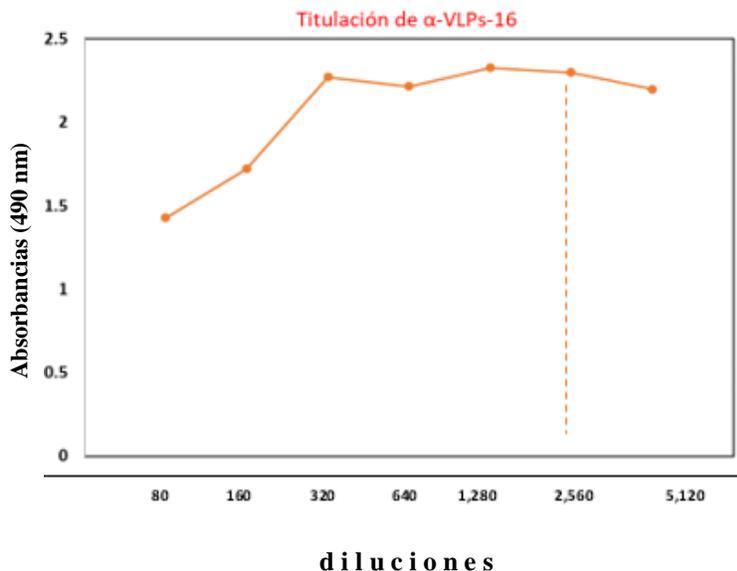


Figura 8. Titulación del anticuerpo de captura (α -VLPs-16 de conejo). Estandarización del anticuerpo de captura colocando 400ng/pp de VLP-16 efectuando diferentes diluciones: 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2,560 y 1:5,120 (La línea punteada representa el título óptimo del anticuerpo).

7.2.2. Estandarización de segundo anticuerpo cabra α -IgG humano

Durante la estandarización del ensayo ELISA de captura se trabajaron distintas diluciones del segundo anticuerpo (cabra- α -IgG-humano) para determinar la dilución óptima con la cual se observó el menor fondo con el suero control negativo y que, a su vez, nos permitiera diferenciar el control positivo. Las diluciones utilizadas fueron 1:10,00 y 1:20,000. Los resultados de la estandarización de este ensayo mostraron que la mayor absorbancia con el menor fondo se obtuvo usando la dilución 1:20,000; con esta dilución ambos controles pudieron diferenciarse claramente sin saturación del sistema (datos no mostrados).

Al igual que con el ELISA indirecto se tuvo que validar nuestro ELISA de captura y para ello fue necesario demostrar la reproducibilidad y variación entre cada ensayo utilizando una placa de los sueros controles (por duplicado). De los tres ensayos efectuados se promediaron las absorbancias, se obtuvo el CV% y la SD para poder determinar si nuestros resultados son confiables. Los CV obtenidos fueron de 13% para el control positivo y 14% para el control negativo, lo que nos indica una buena reproducibilidad de nuestro ensayo con un valor dentro del rango permitido (Tabla 6).

TABLA 6. COEFICIENTE DE VARIACIÓN DEL ELISA DE CAPTURA		
ELISA de captura usando sueros control		
MUESTRA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
ENSAYO 1	1.313	0.744
ENSAYO 2	1.684	0.987
ENSAYO 3	1.643	0.931
PROMEDIO	1.547	0.887
DESVIACIÓN ESTÁNDAR (SD)	0.2	0.1
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	13%	14%

*SD (desviación estándar; CV% (coeficiente de variación %)).

7.3. Cálculo y evaluación de los puntos de corte del ELISA indirecto y de captura para VLPs.

Una vez que las condiciones se estandarizaron para ambos ensayos, lo siguiente fue evaluar a la población de estudio (casos y controles) a través de un ELISA indirecto y de captura para poder realizar toda la caracterización de ambos ensayos.

Con las absorbancias obtenidas de ambos ELISA, lo primero que se hizo fue normalizar los títulos de anticuerpos en la población de estudio para lo cual se realizó la transformación logarítmica de las absorbancias a unidades ELISA (UE/mL) para finalmente obtener el punto de corte (PC). Para ello se realizó un pool de 10 sueros de mujeres que contaban con la vacuna GARDASIL®4. Estos sueros fueron seleccionados por ser aquellos que presentaron títulos anti-VLP más altos. Posteriormente, se obtuvieron las absorbancias y se promediaron para su posterior análisis. Por otro lado, también se utilizó un pool de 10 sueros de mujeres que no habían estado expuestas al HPV las cuales presentaron bajas absorbancias. A continuación, se obtuvo la estadística descriptiva de los valores obtenidos y a partir de la $GM+2SD$ se calculó el primer punto de corte, mientras que para calcular el segundo punto de corte se utilizó el percentil 95 (p95). Para la obtención de la curva de cuatro parámetros se utilizó la aplicación "Assay Fit" con la cual pudimos generar una ecuación logarítmica utilizando el logaritmo de las diluciones y las absorbancias del pool de sueros (Figura 9 y 10). Los valores de la ecuación se sustituyeron hasta darnos una función logarítmica que permitió hacer la transformación a UE/mL.

a)

logaritmo (X)	Promedio de las abs. (Y)
16.64	3.80
15.64	3.69
14.64	3.61
13.64	3.48
12.64	2.93
11.64	2.24
10.64	1.44
9.64	1.01
8.64	0.53
7.64	0.34
6.64	0.13
5.64	0.06
4.64	0.10

b)

A	3.986673018
B	-8.470620785
C	11.30356861
D	0.119296528

$$((((A - D) / (y - D)) - 1) ^ (1 / B)) * C$$

c)

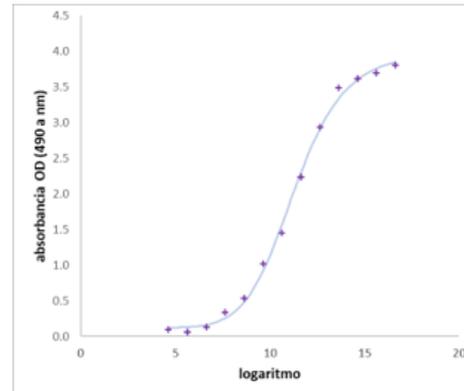


Figura 9. Parámetros para obtener títulos de anticuerpos anti-VLP-16 en UE/mL del ELISA indirecto. a) Absorbancias de las diluciones que fueron utilizadas para la obtención de la curva de cuatro parámetros del ELISA de captura para VLPs. b) Ecuación utilizada para realizar la conversión de las absorbancias a UE* c) Curva de cuatro parámetros del pool de sueros adolescentes negativos y positivos para HPV-16.

a)

logaritmo (X)	Promedio de las abs. (Y)
17.644	2.992
16.644	2.9775
15.644	2.830
14.644	2.406
13.644	2.379
12.644	2.215
11.644	1.814
10.644	1.340
9.644	1.161
8.644	0.896
7.644	0.613
6.644	0.399
5.644	0.263
4.644	0.145

b)

A	3.619598511
B	-4.079242175
C	11.84239413
D	0.090387521

$$((((A - D) / (y - D)) - 1) ^ (1 / B)) * C$$

c)

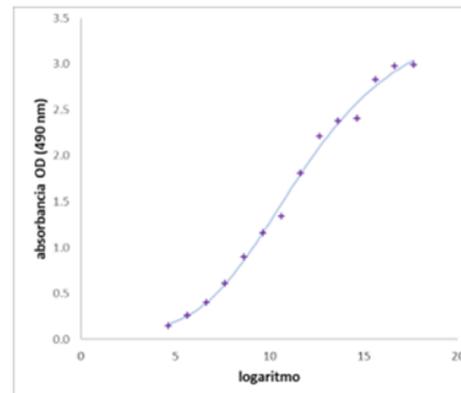


Figura 10. Parámetros para obtener títulos de anticuerpos anti-VLP-16 en UE/mL del ELISA de captura. a) Absorbancias de las diluciones que fueron utilizadas para la obtención de la curva de cuatro parámetros del ELISA de captura para VLPs. b) Ecuación utilizada para realizar la conversión de las absorbancias a UE*. c) Curva de cuatro parámetros del pool de sueros adolescentes negativos y positivos para HPV-16.

7.4. Determinación de los títulos de anticuerpos anti-VLPs-16 de la población de adolescentes controles y vacunadas contra HPV

Como ya se describió anteriormente, los valores de las absorbancias obtenidas en los ensayos se convirtieron a UE/mL a través de la ecuación de la curva de cuatro parámetros. De esta forma, se normalizaron los títulos de anticuerpos de la población de estudio, ya que solamente se utilizó una dilución para los ensayos. El primer punto de corte del ELISA indirecto se obtuvo con la GM+2SD del grupo control, el cual fue de 1.11 en absorbancias y de 10, 008.09 en UE/ml, mientras que usando el p95 el PC fue de 1.09 en absorbancias y de 9,787.88 en UE/mL (Tabla 7). Este mismo cálculo se realizó para el ELISA de captura, el cual tuvo un PC de 0.79 en absorbancias y de 3,421.70 en UE/mL usando la GM+2SD mientras que el PC usando el p95 fue de 0.77 en absorbancias y de 3,267.79 en UE/mL (Tabla 7).

TABLA 7. PUNTOS DE CORTE OBTENIDOS PARA UN ELISA INDIRECTO Y DE CAPTURA PARA VLPs		
PC usando GM+2SD	ELISA INDIRECTO PARA VLPs	ELISA DE CAPTURA PARA VLPs
En absorbancias	1.11	0.79
En UE/mL	10,008.09	3,421.70
PC usando p95		
En absorbancias	1.09	0.77
En UE/mL	9,787.88	3,267.79

*UE- unidades ELISA

Con los datos de los controles del ELISA indirecto se evaluó el mejor punto de corte, identificando que el de GM+2SD permitió clasificar mejor a la población de estudio, ya que, de los 45 controles solo uno fue positivo, quedando por encima del PC y dando una seropositividad del 2.2%. Mientras que, con el p95, 3/45 estuvieron por encima del PC presentando una seropositividad del 6.6%. Sin embargo, cuando se analizaron los 45 sueros de las mujeres vacunadas contra HPV-16 con ambos PC el 100% de los sueros mostraron altos títulos de α -VLPs-16 por encima del punto de corte (Fig. 11).

Posteriormente, utilizamos los dos PC del ELISA de captura para poder graficar nuestros valores y así analizar el comportamiento de cada uno. Para este ensayo no hubo diferencia

significativa entre el PC con GM+2SD y usando p95, ya que ambos valores permitieron clasificar al grupo control, el cual presentó bajos títulos de α -VLPs-16 (debajo del punto de corte) y permitió diferenciar el grupo de mujeres vacunadas, el cual presentó altos títulos de α -VLPs-16 con una seropositividad del 100% (Fig. 12). En ambos ELISAs se logró clasificar el 100% de los casos como positivos y entre el 93-98% de los controles como seronegativos. En este sentido, se puede sugerir que ambos ensayos presentan un nivel de especificidad alrededor del 95%.

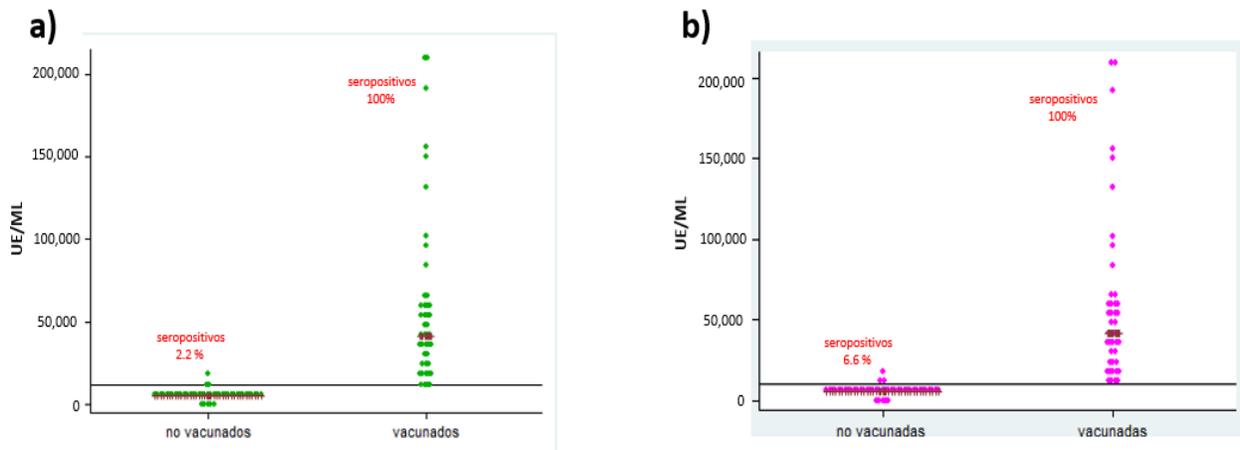


Figura 11. Títulos de anticuerpos α -VLP-16 evaluados por ELISA indirecto en la población de adolescentes. A) Títulos de α -VLPs16 de la población (casos y controles) usando la GM+ 2SD para un ELISA Indirecto de VLPs. (La línea azul indica el PC en UE/mL) B) Títulos de α -VLPs16 de la población (casos y controles) usando el p95 para un ELISA de captura de VLPs. (La línea azul indica el PC en UE/mL) (Unidades ELISA) *GM (media geométrica), *SD (desviación estándar).

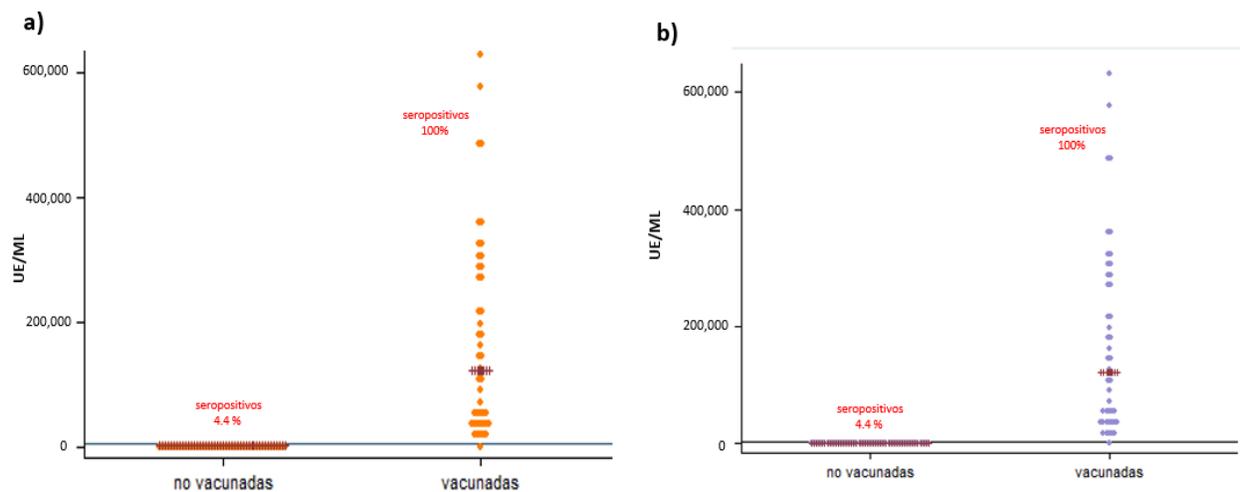


Figura 12. Títulos de anticuerpos α -VLP-16 evaluados por ELISA de captura en la población de adolescentes. A) Títulos de α -VLPs16 de la población de adolescentes controles y vacunadas contra HPV-16 en un ELISA de captura para VLPs. La línea azul indica el PC en UE-mL usando GM+2SD. B) Títulos de α -VLPs-16 de la población de adolescentes controles y vacunadas

contra HPV-16 en un ELISA de captura para VLPs. La línea azul indica el PC en UE-mL usando p95.*UE (Unidades ELISA)
*GM (media geométrica), *SD (desviación estándar).

7.5. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los ELISA indirecto y de captura para la detección de anticuerpos neutralizantes (anti-VLPs).

Una vez que se obtuvo el PC en UE/mL a través del modelo de regresión logística para los 90 sueros analizados, se compararon los parámetros de ambos ELISA: la sensibilidad, especificidad y curva ROC (para la validación del ensayo). Para esto, se obtuvieron usando tanto el PC con GM+2SD, como con el p95. El ensayo de ELISA indirecto de HPV16 usando el primer PC (GM+2SD) presentó una sensibilidad del 100% y especificidad del 97.7%. Al evaluar y validar el ELISA de captura se observó una sensibilidad del 100% y una especificidad de 95.5%. Los resultados mostraron que ambos ensayos son altamente eficientes para discriminar a las mujeres vacunadas (seropositivas) de las mujeres no vacunadas (seronegativas) (Tabla 9 y 10). Estos resultados indican que con el PC de GM+2SD podemos clasificar con mayor precisión a los grupos de adolescentes de estudio ya que identifica el 100% de los casos.

La clasificación predictiva de la población de estudio se calculó en base a lo descrito en la literatura (Diana, N., 2018). Con la información obtenida se generaron tablas de contingencia (tablas 2x2). Con las tablas 2x2 pudimos clasificar los casos y controles que fueron verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP), verdaderos negativos (VN) y falsos negativos (FN) de acuerdo con las fórmulas descritas en la Tabla 8.

Tabla 8. Fórmulas para la clasificación de casos positivos y negativos

Verdaderos positivos	(Mujeres vacunadas con Gardasil® y con presencia de anti-VLP con el ELISA indirecto).
Falsos positivos	(Mujeres no vacunadas con Gardasil®, sin embargo, presentan anti-VLP con el ELISA indirecto).
Falsos negativos	(Mujeres vacunadas con Gardasil®, sin embargo, no tienen presencia de anti-VLP con el ELISA indirecto).
Verdaderos negativos	(Mujeres no vacunadas con Gardasil® sin presencia de anti-VLP con el ELISA indirecto).

Sensibilidad= $VP/VP+FN$
Especificidad= $VN/VN+FP$
Valor predictivo positivo= $VP/VP+FP$
Valor predictivo negativo= $VN/FN+VN$

Los resultados del ELISA indirecto mostraron que de un total de 90 sueros: 45/45 casos fueron VP con los dos PC, 1/45 fue FP solo con GM+2SD y 3/45 fueron FP con p95, 44/45 y 42/45 fueron VN con GM+2SD y p95, respectivamente (Figura 13 A y B); lo que finalmente nos da una sensibilidad del 100% para los 2 puntos de corte, pero una mejor especificidad (97.7%) para el punto de corte de la GM+2S (Tabla 9).

	No vacunados	vacunados
-	44	0
+	1	45

	No vacunados	vacunados
-	42	0
+	3	45

Figura 13. Tablas 2x2 de la población total (casos y controles) para el ELISA indirecto de VLPs. A) Clasificación de las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV considerando el PC de la GM+2SD. B) Clasificación de las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV considerando el PC del p95.

CLASIFICACIÓN	MG+2SD	P95
Verdaderos positivos	45	45
Falsos positivos	1	3
Verdaderos negativos	44	42
Falsos negativos	0	0
Sensibilidad (VP/VP+FN)	100%	100%
Especificidad (VN/VN+FP)	97.7%	93.3%

Tabla 9. Clasificación y rendimiento del ELISA indirecto de VLPs en las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV utilizando el PC de la GM+2SD y p95.

En cambio, el ELISA de captura mostró un comportamiento diferente al ELISA indirecto pero muy similar entre puntos de corte. La clasificación consistió en 45/45 VP, 2/45 fueron FP, 43/45 fueron VN y ningún suero fue FN (Fig. 14 A y B). Al final el ensayo de captura tuvo una sensibilidad del 100% con ambos PC y una especificidad del 95.5% con los 2 puntos de corte (Tabla 10).

	No vacunados	vacunados
-	43	0
+	2	45

	No vacunados	vacunados
-	43	0
+	2	45

Figura 14. Tablas 2x2 de la población total (casos y controles) para el ELISA de captura de VLPs. A) Clasificación de las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV considerando el PC de la GM+2SD. B) Clasificación de las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV considerando el PC del p95.

CLASIFICACIÓN	MG+2SD	P95
Verdaderos positivos	45	45
Falsos positivos	2	2
Verdaderos negativos	43	43
Falsos negativos	0	0
Sensibilidad (VP/VP+FN)	100%	100%
Especificidad (VN/VN+FP)	95.5%	95.5%

Tabla 10. Clasificación y rendimiento del ELISA de captura de VLPs en las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV utilizando el PC de la GM+2SD y p95.

Una vez que se analizó nuestra población total se determinó la sensibilidad y especificidad, el valor predictivo positivo (*VPP*), valor predictivo negativo (*VPN*) y un análisis de curva ROC para cada uno de nuestros ensayos (Tabla 11). En el ELISA indirecto se pudo determinar una sensibilidad del 100%, especificidad del 97.7%, *VPP* del 97.8%, *VPN* del 100% y AUC de 0.98 que permite clasificar a este ensayo como una prueba diagnóstica excelente.

Esta misma validación se realizó con el ELISA de captura el cual presentó una sensibilidad del 100%, especificidad del 95.5%, *VPP* del 95.7%, *VPN* del 100%, AUC de 0.97 clasificando la detección de este ensayo como una excelente prueba diagnóstica y que además permite discriminar de manera correcta a las adolescentes vacunadas y no vacunadas contra HPV.

Estos resultados nos llevan a quedarnos con el primer punto de corte (GM+2SD) para evaluar nuestro ELISA indirecto y de captura, ya que es el que nos permite diferenciar mejor entre las adolescentes vacunadas que presentan anticuerpos α -VLPs-16 y aquellas que a pesar de estar vacunadas no presentan seroconversión. Además, nos permitió estimar la probabilidad de que nuestra población presente o no anticuerpos α -VLPs-16.

Tabla 11. Validación de los ELISA (indirecto y captura) para la detección de anticuerpos α-VLPS-16		
	ELISA INDIRECTO	ELISA DE CAPTURA
SENSIBILIDAD (VP/VP+FN)	100%	100%
ESPECIFICIDAD (VN/VN+FP)	97.7%	95.5%
VPP (VP/VP+FP)	97.8%	95.7%
VPN (VN/FN+VN)	100%	100%
AUC ROC	0.98	0.97
CLASIFICACIÓN VALOR ROC	Excelente	Excelente

* El ensayo predice el 100% de los casos

Posteriormente, para poder elegir la prueba estadística idónea para hacer un análisis de correlación, se realizaron pruebas de normalidad; en este caso se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para analizar los resultados. Dado que nuestros datos se comportaron como “no normales” se utilizó la prueba de correlación de Spearman (Rho de Spearman) para determinar si existe relación entre los dos ELISA utilizados. Nuestros resultados indican que la correlación entre el ELISA indirecto y ELISA de captura es positiva alta con un valor de 0.81 y es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Fig. 15). Este valor sugiere que la correlación entre nuestros dos ensayos es alta y que las pruebas diagnósticas evaluadas pueden predecir a nuestra población de mujeres adolescentes vacunadas de las no vacunadas contra HPV, esto en mujeres con altos títulos de anticuerpos, ya que las muestras de los controles positivos fueron tomadas al mes 7. También pudimos observar que a pesar de que los dos ensayos presentaron una alta sensibilidad y especificidad con un valor ROC lo suficientemente bueno, lo que nos indica exactitud, buena capacidad de discriminación y con el mínimo error permisible de discriminación, el ELISA de captura puede identificar con mejor precisión los α -VLPs-16 y esto se puede observar en la figura 14 que muestra altos títulos de anticuerpos α -VLPs-16 (600,000 UE/mL) vs el ELISA indirecto donde la lectura más alta fue de 200,000 UE/mL.

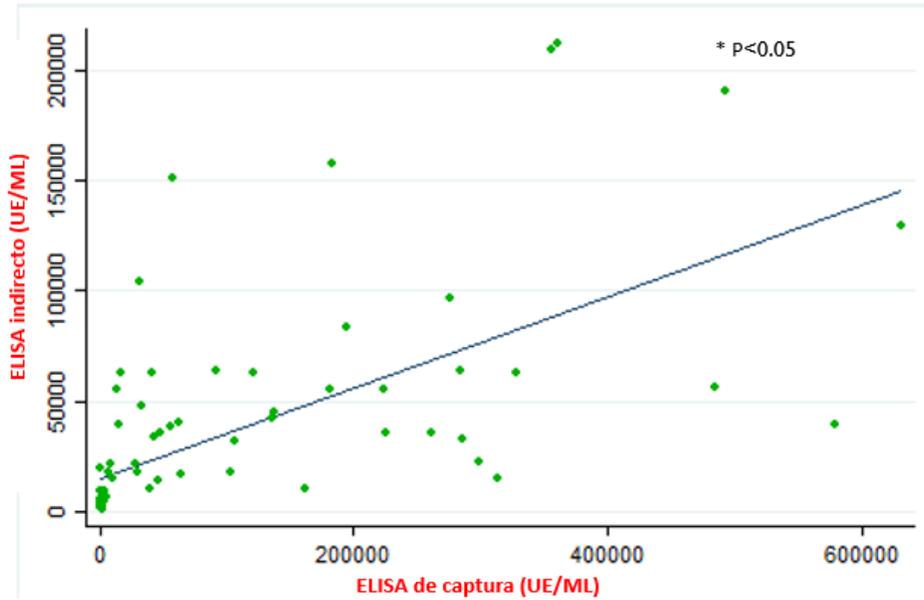


Figura 15. Análisis de correlación de Spearman entre anticuerpos anti-VLP-16 obtenidos por ELISA indirecto y ELISA de captura.

Lo anterior indica que el ELISA de captura de VLPs puede medir con mejor precisión la presencia de anticuerpos α -VLPs-16 a los que denominamos anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopos conformacionales. Esto nos lleva a argumentar que el ensayo ELISA indirecto de VLPs es suficientemente bueno para detectar los anticuerpos neutralizantes, pero no puede discriminar la presencia de anticuerpos α -L1, mientras que el ensayo de captura elimina el fondo de los anticuerpos α -L1 lo que permite obtener resultados más precisos en cuanto a la presencia de anticuerpos neutralizantes y el nivel de protección contra la infección por HPV16.

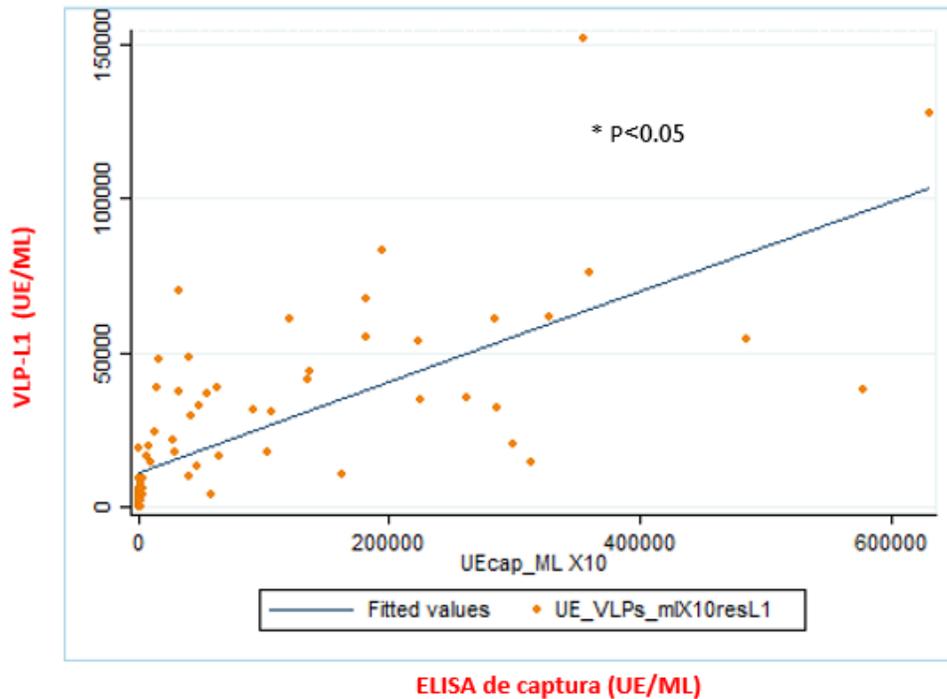


Figura 16. Análisis de correlación de Spearman entre anticuerpos α -VLPs restando los α -L1 obtenidos por ELISA indirecto y un ELISA de captura.

Por otro lado, también se evaluó la correlación existente entre el ELISA de captura vs la resta de UE-VLPs menos UE-L1, dicho resultado se considera un valor similar al ELISA competitivo ya que permite quitar el fondo de los anticuerpos no neutralizantes (anti-L1) que se unieron a epítopes lineales para quedarnos únicamente con los valores de anticuerpos neutralizantes. Nuestros resultados indican que la correlación entre el ELISA de captura vs ELISA VLPs-L1 presenta una rho de 0.70, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Fig. 16) mostrando un comportamiento y una distribución de los datos similar a la correlación del ELISA-indirecto vs ELISA de captura. Con estos resultados confirmamos que el ELISA de captura es una prueba sensible y específica que mide títulos de α -VLPs logrando eliminar el fondo no deseado de los α -L1.

8. DISCUSIÓN:

En la actualidad el CC sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, la incidencia de esta enfermedad ha ido en decremento debido al uso de vacunas profilácticas contra HPV las cuales brindan protección contra los tipos de papilomavirus oncogénicos más prevalentes (tipos 16 y 18) que están involucrados en el desarrollo de CC así como de otros tipos de cánceres asociados a HPV. Las vacunas profilácticas autorizadas a nivel mundial en México se incorporaron al esquema básico de vacunación hasta el año 2010. De las tres vacunas que se encuentran autorizadas a nivel mundial, en México solo se disponen de la vacuna bivalente CERVARIX® y GARDASIL®4, las cuales tienen una eficacia del ~95% en la prevención la infección por HPV de los tipos 16, 18 6 y 11 (Yue, et al., 2013). Se ha demostrado que la vacunación contra HPV induce una fuerte respuesta de tipo celular y humoral, pero particularmente la respuesta inmune humoral generada por ambas vacunas es de 10 a 100 veces más elevados los títulos de anticuerpos que los que se generan en una infección natural (Kim & Kim, 2017; Cho, et al., 2011). La protección inducida por la vacunación con VLPs es generada por altos títulos de anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes conformacionales pero también se ha observado que una parte del total de los anticuerpos generados son del tipo “no neutralizantes” y tienden a reconocer epítopes lineales (Pedroza-Saavedra et al., 2021). La presencia de este tipo de anticuerpos no neutralizantes se debe a que las VLPs presentan en su estructura cierta cantidad de epítopes lineales y también depende de la estabilidad de las VLPs o de VLPs mal ensambladas que podrían estar exponiendo epítopes lineales que se encuentran en el interior de las VLPs (Modis, 2002; Ferguson et al., 2006; IARC, 2007). Es por eso que la identificación selectiva de anticuerpos neutralizantes y de los no neutralizantes es de importancia para poder evaluar el nivel de protección que presentan las personas vacunadas contra HPV.

A la fecha no existe un correlato de la respuesta inmune con relación al umbral de títulos de anticuerpos y su correlación con la protección contra la infección por HPV (Brown, et al., 2014). Para poder evaluar la protección por anticuerpos neutralizantes se han desarrollado diferentes ensayos que permiten evaluar la inmunogenicidad generada por las vacunas contra HPV, entre los que se encuentran: el ensayo PBNA (que debido a su alta sensibilidad y especificidad se considera como el “estándar de oro”, el inmunoensayo competitivo cLIA y el ELISA que mide anticuerpos totales (neutralizantes y no neutralizantes). Sin embargo, se han encontrado limitaciones en cada uno de estos ensayos como son: la complejidad técnica, el alto

costo y la baja sensibilidad o especificidad (Aydin, 2015; Brown, et al., 2014., Toh, et al., 2020). Para las vacunas contra HPV autorizadas y disponibles en nuestro país, la farmacéutica Merck evaluó la inmunogenicidad de su vacuna utilizando el ensayo cLIA, mientras que GSK lo hizo utilizando un ELISA-VLPs. Sin embargo, a pesar de que ambas técnicas permitieron medir los anticuerpos neutralizantes inducidos por el inmunógeno, en ambos casos no se determina los niveles reales de anticuerpos neutralizantes. Por lo que se hace necesario la estandarización de un ensayo que permita homogenizar y comparar la eficacia e inmunogenicidad de cada vacuna (Scherpenisse et al., 2013). Por ello, se han buscado alternativas y mejoras en los diferentes ensayos para que sean altamente sensibles, específicos y reproducibles, además de que sean técnicamente sencillos, de bajo costo y se puedan aplicar a nivel poblacional.

Desde la generación de las VLPs y su implementación como vacunas profilácticas, se comenzaron a probar ensayos serológicos utilizando a estas proteínas como antígeno de interés. Kirnbauer, evaluó un ELISA específico para detectar anticuerpos contra HVP-16 en el suero de mujeres que habían dado positivo a papilomavirus por el método de PCR. El trabajo desarrollado por Kirnbauer y colaboradores identificaron que, en una población de mujeres, el 56% de las mujeres que fueron positivas a HPV por el método de PCR, también dieron positivo al ensayo de ELISA, contrario a esto, del total de mujeres que fueron negativas a PCR, solo el 6% fueron negativas a ELISA, mientras que el 75% de las mujeres con ADN positivo para HPV-16 con displasias graves dieron resultados ELISA positivos.

En 2013, Scherpenisse comparó un cLIA y un MIA-VLP modificado para poder evaluar los anticuerpos neutralizantes específicos de HPV-16 y 18 posterior a la vacunación y después de una infección natural, los resultados mostraron que el cLIA puede detectar anticuerpos específicos del HPV mientras que el VLP-MIA detecta la cantidad total de anticuerpos del HPV que van dirigidos contra epítopes neutralizantes y no neutralizantes lo que da como resultado un mayor porcentaje de seropositividad que el cLIA. Además, el MIA-VLP demostró ser reproducible y con baja reactividad contra anticuerpos monoclonales (mAb) específicos de tipo 16 y 18, mientras que el cLIA permitió detectar anticuerpos neutralizantes de alta afinidad y específicos de HPV mediante el uso de mAb pero se observó que aunque los anticuerpos detectados por este ensayo tienen capacidad neutralizante, podría subestimar la capacidad total de los anticuerpos neutralizantes generados tanto por infecciones naturales como posterior a la

vacunación. La concordancia entre estos dos ensayos no fue tan alta ya que presentó una correlación kappa de $k=0.55$ y 0.65 para HPV-16 y 18, respectivamente (Scherpenisse et al., 2013). Por el contrario, nuestros resultados demostraron que entre el ELISA indirecto y el ELISA de captura hay una alta correlación (ρ de 0.81), esto nos permite inferir que nuestro ELISA de captura puede detectar anticuerpos neutralizantes eliminando el fondo de L1. Con estos resultados podemos reforzar la hipótesis planteada, de tal manera que al usar un anticuerpo de conejo α -VLP-16 podría permitir que la sensibilidad de nuestro ELISA de captura sea mayor ya que el α -VLP de HPV-16 captará los epítopes conformacionales y eliminará el fondo de epítopes lineales de L1.

Como se ha mencionado, actualmente se sigue trabajando en la evaluación y comparación de los ensayos serológicos que determinan anticuerpos neutralizantes contra HPV y que permitan medir con mayor precisión y sensibilidad los niveles de estos tanto en mujeres con infecciones naturales, pero principalmente en mujeres vacunadas. Además, se ha tratado de que estos ensayos sean altamente comparables con el ensayo de PBNA considerado como el “Gold standar” pero por su alto costo y complejidad se están buscando otras alternativas de ensayos. En un estudio hecho por Zhao y colaboradores evaluaron y compararon un ELISA-VLP vs. un ensayo PBNA para medir los anticuerpos α -VLP-16 y 18 inducidos por la vacuna de HPV. Este estudio mostró que ambos ensayos eran altamente concordantes, sobre todo, la concordancia fue mayor ($r = 0.96-0.97$) al detectar anticuerpos inducidos por vacunación que al evaluar los anticuerpos inducidos por infección natural ($r = 0.59-0.68$, respectivamente) (Zhao et al., 2014).

Como parte de este trabajo se trató de buscar una alternativa que nos permitiera medir y evaluar los anticuerpos neutralizantes en una población de mujeres adolescentes vacunadas contra HPV. Basándonos en la fortalezas y debilidades de cada técnica que se ha mencionado, se optó por trabajar con el ELISA-VLPs que mostró una alta correlación con el ensayo PBNA en el caso de personas vacunadas contra HPV, utilizando este ELISA-VLPs como nuestro ensayo de referencia para la detección de anticuerpos específicos contra HPV16. En la búsqueda de un ensayo que fuera capaz de diferenciar entre los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes en la población de estudio, además de que permitiera clasificar correctamente a las adolescentes seropositivas de aquellas que son seronegativas. Para ello, estandarizamos un ELISA de captura, clasificado así en función a la interacción antígeno-anticuerpo. Este ensayo ELISA de captura

VLPs-16 utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo (α -VLP-16) con lo cual pudimos eliminar el fondo de L1 y únicamente quedarnos con los α -VLP-16. Con este ensayo pudimos identificar anticuerpos α -VLP-16 específicos, con una alta sensibilidad (100%) especificidad ($\geq 95\%$) y con un valor ROC lo suficientemente bueno que nos permitió discriminar a la población vacunada de la no vacunada en un 98%. pero a diferencia del ELISA indirecto de VLPs-16, este ensayo tuvo la gran ventaja de identificar anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes conformacionales y excluir a los anticuerpos no neutralizantes que reconocen epítopes lineales, es por ello por lo que la correlación fue menor ($\rho = 0.7$) cuando se quitó el fondo de L1 mediante la resta de anticuerpos anti-VLPs- anti-L1.

Como se ha mencionado, actualmente se sigue trabajando en la evaluación y comparación de los ensayos serológicos que determinan anticuerpos neutralizantes contra HPV y que permitan medir con mayor precisión y sensibilidad los niveles de estos tanto en mujeres con infecciones naturales, pero principalmente en mujeres vacunadas. Además, se ha tratado de que estos ensayos sean altamente comparables con el ensayo de PBNA considerado como el “Gold standar” pero por su alto costo y complejidad se están buscando otras alternativas de ensayos. En un estudio hecho por Zhao y colaboradores evaluaron y compararon un ELISA-VLP vs. un ensayo PBNA para medir los anticuerpos α -VLP-16 y 18 inducidos por la vacuna de HPV. Este estudio mostró que ambos ensayos eran altamente concordantes, sobre todo, la concordancia fue mayor ($r = 0.96-0.97$) al detectar anticuerpos inducidos por vacunación que al evaluar los anticuerpos inducidos por infección natural ($r = 0.59-0.68$, respectivamente) (Zhao et al., 2014).

Como parte de este trabajo se trató de buscar una alternativa que nos permitiera medir y evaluar los anticuerpos neutralizantes en una población de mujeres adolescentes vacunadas contra HPV. Basándonos en la fortalezas y debilidades de cada técnica que se ha mencionado, se optó por trabajar con el ELISA-VLPs que mostró una alta correlación con el ensayo PBNA en el caso de personas vacunadas contra HPV, utilizando este ELISA-VLPs como nuestro ensayo de referencia para la detección de anticuerpos específicos contra HPV16. En la búsqueda de un ensayo que fuera capaz de diferenciar entre los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes en la población de estudio, además de que permitiera clasificar correctamente a las adolescentes seropositivas de aquellas que son seronegativas. Para ello, estandarizamos un ELISA de captura, clasificado así en función a la interacción antígeno-anticuerpo. Este ensayo ELISA de captura

VLPs-16 utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo (α -VLP-16) con lo cual pudimos eliminar el fondo de L1 y únicamente quedarnos con los α -VLP-16. Con este ensayo pudimos identificar anticuerpos α -VLP-16 específicos, con una alta sensibilidad (100%) especificidad (\geq 95%) y con un valor ROC lo suficientemente bueno que nos permitió discriminar a la población vacunada de la no vacunada en un 98%. pero a diferencia del ELISA indirecto de VLPs-16, este ensayo tuvo la gran ventaja de identificar anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes conformacionales y excluir a los anticuerpos no neutralizantes que reconocen epítopes lineales, es por ello por lo que la correlación fue menor ($\rho = 0.7$) cuando se quitó el fondo de L1 mediante la resta de anticuerpos anti-VLPs- anti-L1.

9. CONCLUSIONES

- El ELISA de captura de VLPs de HPV16 permitió la identificación de anticuerpos neutralizantes (α -VLPs-16) en una población de mujeres adolescentes vacunadas con una alta sensibilidad (100%) y especificidad (95.5%).
- El ELISA de captura de VLPs que detectando únicamente α -VLPs-16 (reconocen epítopes conformacionales) tiene la capacidad de diferenciar a la población seropositiva vacunada de la población seronegativa (no vacunada) con un alto valor predictivo (AUC= 0.97).
- El ELISA de captura es una excelente prueba diagnóstica para detectar anticuerpos neutralizantes eliminando el fondo de L1, como lo indica su alta correlación con el ensayo de ELISA indirecto (ρ = 0.81).

10. BIBLIOGRAFIA

1. Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G. I., Jerónimo, J., Salmerón, J., Ferreccio, C., Lazcano-Ponce, E., Herrero, R. (2010). Nuevas paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. *Rev Salud pública de México* (52), p. 544-557
2. Alviarez, Y., Lares, M., Vietri, M., Aguilar, C. M., Herrera, L., & Ferrer, E. (2014). Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*, 34(2), 309-313. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2078>
3. Andersen, J., Berthelsen, L., & Lind, I. (1997). Measurement of antibodies against meningococcal capsular polysaccharides B and C in enzyme-linked immunosorbent assays: towards an improved surveillance of meningococcal disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 4(3), 345-351. <https://doi.org/10.1128/cdli.4.3.345-351.1997>
4. Ault, K. A. (2007). Long-term efficacy of human papillomavirus vaccination. *Gynecologic Oncology*, 107(2), S27-S30. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.07.078>
5. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
6. Barzon, L., Squarzon, L., Masiero, S., Pacenti, M., Marcati, G., Mantelli, B., Gabrielli, L., Pascucci, M. G., Lazzarotto, T., Caputo, A., & Palù, G. (2014). Neutralizing and cross-neutralizing antibody titres induced by bivalent and quadrivalent human papillomavirus vaccines in the target population of organized vaccination programmes. *Vaccine*, 32(41), 5357-5362. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.014>
7. Bayas, J.-M., Costas, L., & Muñoz, A. (2008). Cervical cancer vaccination indications, efficacy, and side effects. *Gynecologic Oncology*, 110(3), S11-S14. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.05.011>
8. Beltrán Lissabet, Jorge Félix (2014). Generalidades sobre las partículas similares al Virus del Papiloma Humano. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 45(2),99-107.[fecha de Consulta 11 de Noviembre de 2020]. ISSN: 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1812/181231236004>
9. Brown, D., Müller, M., Sehr, P., Pawlita, M., Seitz, H., Rubio, I., Antonello, J., Radley, D., Roberts, C., & Saah, A. (2014). Concordance assessment between a multiplexed competitive Luminex immunoassay, a multiplexed IgG Luminex immunoassay, and a pseudovirion-based neutralization assay for detection of human papillomaviruse types 16 and 18. *Vaccine*, 32(44), 5880-5887. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.004>
10. Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1-2), 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>
11. 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>
12. Burd, E. M., & Dean, C. L. (2016). Human Papillomavirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4), 1-13. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.dmih2-0001-2015>
13. Campo, M., Graham, S., Cortese, M., Ashrafi, G., Araibi, E., Dornan, E., Miners, K., Nunes, C., & Man, S. (2010). HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, 407(1), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.044>
14. Chaturvedi, A. K. (2010). Beyond Cervical Cancer: Burden of Other HPV-Related Cancers Among Men and Women. *Journal of Adolescent Health*, 46(4), S20-S26. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2010.01.016>
15. Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., & Harrison, S. C. (2000). Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell*, 5(3), 557-567. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80449-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80449-9)

16. Cho, H.-J., Oh, Y.-K., & Kim, Y. B. (2011). Advances in human papilloma virus vaccines: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(3), 295-309. <https://doi.org/10.1517/13543776.2011.551114>
17. Crowther, J. R. (2021). *The ELISA Guidebook (Methods in Molecular Biology) by Jhon R. Crowther (200-08-17)*. Humana Press.
18. Dadar, M., Chakraborty, S., Dhama, K., Prasad, M., Khandia, R., Hassan, S., Munjal, A., Tiwari, R., Karthik, K., Kumar, D., Iqbal, H. M. N., & Chaicumpa, W. (2018). Advances in Designing and Developing Vaccines, Drugs and Therapeutic Approaches to Counter Human Papilloma Virus. *Frontiers in Immunology*, 9, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02478>
19. de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
20. Dessy, F. J., Giannini, S. L., Bougelet, C. A., Kemp, T. J., David, M. P. M., Poncet, S. M., Pinto, L. A., & Wettendorff, M. A. (2008). Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and Pseudovirion-based neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine. *Human Vaccines*, 4(6), 425–434. <https://doi.org/10.4161/hv.4.6.6912>
21. Diana, N. (2018). *Guia para las pruebas diagnosticas (7.ª ed.)*. Editorial McGraw-Hill.
22. Dias, D., van Doren, J., Schlottmann, S., Kelly, S., Puchalski, D., Ruiz, W., Boerckel, P., Kessler, J., Antonello, J. M., Green, T., Brown, M., Smith, J., Chirmule, N., Barr, E., Jansen, K. U., & Esser, M. T. (2005). Optimization and Validation of a Multiplexed Luminex Assay To Quantify Antibodies to Neutralizing Epitopes on Human Papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(8), 959–969. <https://doi.org/10.1128/cdli.12.8.959-969.2005>
23. Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110 (5), 525-541. <https://doi.org/10.1042/cs20050369>
24. 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, F55-F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
25. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
26. Florin, L., Sapp, M., & Spoden, G. A. (2012). Host-cell factors involved in papillomavirus entry. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(4), 437-448. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0270-1>
27. Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Plummer, M., & Franceschi, S. (2012). Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*, 30, F12-F23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.055>
28. Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 75(3), 1565–1570. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.3.1565-1570.2001>
29. Gutiérrez-Xicoténcatl, L., Plett-Torres, T., Madrid-González, C. L., & Madrid-Marina, V. (2009). Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Pública de México*, 51, s479-s488. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342009000900014>
30. 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>
31. Hausen, H. (2000). Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion from Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 690-698. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.9.690>
32. Hernández-Hernandez DM. et., al (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (53), S154-S159

33. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Meeting, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Meeting, World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (2007). *Human Papillomaviruses*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
34. INEGI. Estadísticas nacionales a propósito del Día Mundial contra el Cáncer 2018. Disponible en www.inegi.org.mx
35. Karim, R., Meyers, C., Backendorf, C., Ludigs, K., Offringa, R., van Ommen, G. J. B., Melief, C. J. M., van der Burg, S. H., & Boer, J. M. (2011). Human Papillomavirus Dereglates the Response of a Cellular Network Comprising of Chemotactic and Proinflammatory Genes. *PLoS ONE*, 6(3), e17848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.001784>
36. Krajden, M., Cook, D., Yu, A., Chow, R., Su, Q., Mei, W., McNeil, S., Money, D., Dionne, M., Palefsky, J., Karunakaran, K., Kollmann, T., Ogilvie, G., Petric, M., & Dobson, S. (2014). Assessment of HPV 16 and HPV 18 antibody responses by pseudovirus neutralization, Merck cLIA and Merck total IgG LIA immunoassays in a reduced dosage quadrivalent HPV vaccine trial. *Vaccine*, 32(5), 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.007>
37. 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>
38. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., & Mandelboim, O. (2013). Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology*, 34(4), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.003>
39. Kreimer, A. R., Struyf, F., Del Rosario-Raymundo, M. R., Hildesheim, A., Skinner, S. R., Wacholder, S., Garland, S. M., Herrero, R., David, M.-P., & Wheeler, C. M. (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)
40. Lopez, M. S., Baker, E. S., Maza, M., Fontes-Cintra, G., Lopez, A., Carvajal, J. M., Nozar, F., Fiol, V., & Schmeler, K. M. (2017). Cervical cancer prevention and treatment in Latin America. *Journal of Surgical Oncology*, 115(5), 615-618. <https://doi.org/10.1002/jso.24544>
41. 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), 3-8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-105>
42. Morrison, B. J., Labo, N., Miley, W. J., & Whitby, D. (2015). Serodiagnosis for Tumor Viruses. *Seminars in Oncology*, 42(2), 191–206. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.024>
43. Müller, M., Zhou, J., Reed, T. D., Rittmüller, C., Burger, A., Gabelsberger, J., Braspenning, J., & Gissmann, L. (1997). Chimeric Papillomavirus-like Particles. *Virology*, 234(1), 93-111. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8591>
44. Narisawa-Saito, M., Cgr, T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Science*, 98(10), 1505–1511. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>
45. Peh, W. L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., Brandsma, J., Percival, A., Lewis, J., Liu, W. J., & Doorbar, J. (2002). Life Cycle Heterogeneity in Animal Models of Human Papillomavirus-Associated Disease. *Journal of Virology*, 76(20), 10401–10416. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.20.10401-10416.2002>
46. Rauch, S., Jasny, E., Schmidt, K. E., & Petsch, B. (2018). New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01963>
47. Reimers, L. L., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., Henson, D. E., & Castle, P. E. (2009). Etiologic Heterogeneity for Cervical Carcinoma by Histopathologic Type, Using Comparative Age-Period-Cohort Models. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(3), 792-800. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0965>

48. Rincon-Orozco, B., Halec, G., Rosenberger, S., Muschik, D., Nindl, I., Bachmann, A., Ritter, T. M., Dondog, B., Ly, R., Bosch, F. X., Zawatzky, R., & Rosl, F. (2009). Epigenetic Silencing of Interferon- in Human Papillomavirus Type 16-Positive Cells. *Cancer Research*, *69*(22), 8718–8725. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-0550>
49. Roden, R. B., Hubbert, N. L., Kirnbauer, R., Breitburd, F., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1995). Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *Journal of virology*, *69*(8), 5147-5151. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.8.5147-5151.1995>
50. Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 138–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>
51. Sasagawa, T., Takagi, H., & Makinoda, S. (2012). Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *18*(6), 807–815. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0485-5>
52. 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>
53. Scherpenisse, M., Schepp, R. M., Mollers, M., Mooij, S. H., Meijer, C. J. L. M., Berbers, G. A. M., & van der Klis, F. R. M. (2013). Comparison of Different Assays To Assess Human Papillomavirus (HPV) Type 16- and 18-Specific Antibodies after HPV Infection and Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, *20*(8), 1329–1332. <https://doi.org/10.1128/cvi.00153-13>
54. Sehr, P., Rubio, I., Seitz, H., Putzker, K., Ribeiro-Müller, L., Pawlita, M., & Müller, M. (2013b). High-Throughput Pseudovirion-Based Neutralization Assay for Analysis of Natural and Vaccine-Induced Antibodies against Human Papillomaviruses. *PLoS ONE*, *8*(10), e75677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075677>
55. Stanley, M. (2008). Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology*, *109*(2), S15-S21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.02.003>
56. Stanley, M. A., & Sterling, J. C. (2014). Host Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Human Papillomavirus*, 58–74. <https://doi.org/10.1159/000355964>
57. Stanley, M., Gissmann, L., & Nardelli-Haeftliger, D. (2008). Immunobiology of Human Papillomavirus Infection and Vaccination - Implications for Second Generation Vaccines. *Vaccine*, *26*, K62-K67. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.066>
58. Thomison, J., Thomas, L. K., & Shroyer, K. R. (2008). Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology*, *39*(2), 154-166. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.11.002>
59. Thompson, C. M., Petiot, E., Lennaertz, A., Henry, O., & Kamen, A. A. (2013). Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology Journal*, *10*(1), 141. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-141>
60. Toh, Z. Q., He, L., Chen, C., Huang, A., Russell, F. M., Garland, S. M., Reyburn, R., Ratu, T., Tuivaga, E., Frazer, I. H., Mulholland, E. K., & Licciardi, P. V. (2020). Measurement of Human Papillomavirus-Specific Antibodies Using a Pseudovirion-Based ELISA Method. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585768>.
61. Vidyasagar, P., Sridevi, V. N., Rajan, S., Praveen, A., Srikanth, A., Abhinay, G., Siva Kumar, V., Verma, R. R., & Rajendra, L. (2014). Generation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against baculo-expressed HPV 16 VLPs. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *4*(1), 56-64. <https://doi.org/10.1556/eujmi.4.2014.1.5>
62. Wang, X., Meyers, C., Wang, H.-K., Chow, L. T., & Zheng, Z.-M. (2011). Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. *Journal of Virology*, *85*(16), 8080-8092. <https://doi.org/10.1128/jvi.00670-11>
63. Woo, Y. L., van den Hende, M., Sterling, J. C., Coleman, N., Crawford, R. A., Kwappenberg, K. M., Stanley, M. A., & van der Burg, S. H. (2010). A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *International Journal of Cancer*, *126*(1), 133–141. <https://doi.org/10.1002/ijc.24804>

64. Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
65. World Health Organization. [Accessed August 15, 2020]. Available at: <http://www.who.int/en/>.
66. Zhao, H., Lin, Z. J., Huang, S. J., Li, J., Liu, X. H., Guo, M., Zhang, J., Xia, N. S., Pan, H. R., Wu, T., & Li, C. G. (2014). Correlation between ELISA and pseudovirion-based neutralisation assay for detecting antibodies against human papillomavirus acquired by natural infection or by vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(3), 740–746. <https://doi.org/10.4161/hv.27619>
67. Xu, Y.-F., Zhang, Y.-Q., Xu, X.-M., & Song, G.-X. (2006). Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Archives of Virology*, 151(11), 2133–2148. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0798-8>
68. Xue, Y. (2012). Loss of HPV16 E2 Protein Expression Without Disruption of the E2 ORF Correlates with Carcinogenic Progression. *The Open Virology Journal*, 6(1), 163–172. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010163>
69. Yue, Y., Yang H, Wu K, Yang L, Chen J, et al. (2013) Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *PLoS ONE* 8(1): e55204. doi:10.1371/journal.pone.0055204
70. Yugawa, T., & Kiyono, T. (2009). Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology*, 19(2), 97–113. <https://doi.org/10.1002/rmv.605>

Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de ensayos serológicos para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenya Lorenza Sánchez Flores. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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

María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl



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

MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL | Fecha:2023-05-25 13:51:21 | Firmante

JiR5bVH2sp3lj6Nckf+mcmoTpG/0MyqUF4Q2Fn2Fr2/8PUFORX4CDjOrxJgogSapTdQbbP5ESg8LxrvL9UTDazLKWdjq1Hhk5Ndv+BVPCJsaitMXbje7XWdumAX0udvTVDN+wa7qlRAo8+gJBlpacSE2tBBo+KF0uvBShjZNYwhyn2d2Xs3BipUv4XF+Yc/s08rSato3jEioNxJsZ/PCcJxJHjeMw9/crJMm0Sn2zVn2X2uqQudEsgMOB8D6B6tXZqhMFdCBabNkZ6Ym7Vc4bglf/W90bK1DC+hvrzqrhFpGfdbbWHz4JBh8fBRyaZcEQOifw5Ny7uPgvSaXR9CYQ==

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



[FVnzHohja](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/b855fird0XIZYqLHIFcVABqLJQE9W4OA>



Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de ensayos serológicos para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenya Lorenza Sánchez Flores. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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. Iván Martínez Duncker Ramírez



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

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-05-25 17:01:39 | Firmante

UL+fmAg9ayxwXfEf0EenFw+YvwXOHyo1Lp0oL4V+bfdHX94/W6V3iHGNxS+odxsXCGFSbis/+NvRE9B7GepMp2p5qCdHRnGiq85SUFQryPRz9QST4pk4PxPgeP+AIG/6A+ez+5t4/gxAi5MGMzzzxmAjNCTYvCzlti9+wLzbyW/EPLnNQohiLCgEgRWqOoSJPjZTKWpQsXWrmQCgOglGJ6CsD2FNOYwWELiqtwQ8zfvyee/f4GpHUQ3npuhuOGnMfJonK8PIfSEeGAqfsKWmC0KAzgf4kQk0QfwXPTI2iwawSRTYjaiMI/iRLg9Z3xxfxv3GhN8SoYHnPAoxA==

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



[bjD6iftPM](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mzHWrsn6jswfLhAPCTJ5TjPDfMDFGtif>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de ensayos serológicos para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenya Lorenza Sánchez Flores. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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





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:2023-05-25 15:21:03 | Firmante

muFkqY0/HlqaXEqEQAcoeaSgOnTeoB95LSXqNMvr6muRk/BSeFADTmLIPN4fVqeOXtZy+QJg10KP3pKVfU85yUPdwSZ3Heqnu6HArHbUYOyLX/c8byXwYVcq5mDS2MI3/BSd/CUGyfwidIt+o+23BG6zT3F9x6PrOY9Ppx5CPXDvVDVIsJkO9og9JjXca3dzijDAY8bHKwBjyFdUAo1sM7Czk/rG8pGK+miPmGyDEa8AkRBX/alXcwHZZailmW2q99H+Kob1QFV GKPc04VDJtQWucWb9bBgAg30qH2bYErI0Z5RTLl6lJaHBFRksPv8oh+d+iXS9BFsziV30CtNFJcA==

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



46JvhLNoP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/50CIAGS8kb4E5nnmybpZbSH7DNDerDCe>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de ensayos serológicos para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenya Lorenza Sánchez Flores. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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





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:2023-05-25 18:20:49 | Firmante

PnCnjDNJ28DuW9zYn6OMxBQOMLzgm+Oj8GCgPsCkGtwlkTyV5tOE5DfXow6DUb4zapeLmPHotmWRIAk7/Py+QuyXGkS+OIJNvjVvB+tE59kyb74PzXOfTfqH+SvmSABkSSQF
XKleT+8SYZcQoW+htm3MsA6Ld1mAOabmJLzBtDrCKrPM6R5WDutlujl1tdd14R1cuADii2mZ01mQMIINUD8KMCNwRSCY2YCT1BMz6ul45y56bNcZcdJSvyvE33C8IWHKzOsH
WpZaOfaz1GwFfJAK2feEzZCFwWoAIUOjce17UgwARmkH8IApN4I0HbR/Uu6FaHX2HvIWpRXREqkiWg==

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



[yp5BAjgVN](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/frwe54xcQNysfqRnBCf3D4ezH40LS1a6>



Cuernavaca, Mor., 24 de abril de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de ensayos serológicos para la identificación de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 en mujeres vacunadas contra HPV**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Kenya Lorenza Sánchez Flores. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 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. Vera Lucia Petricevich



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

VERA LUCIA PETRICEVICH | Fecha:2023-05-25 15:30:02 | Firmante

gVsDg5QJVamseEKJvjkWItBzUE1EXSLj7ydwbEDdNSj/+kGO4Dh9VUncw5sUr5/Qt59pR/YzWsJd5951EMO4GiptNrtTqCtOmeb4BLqsofx28ZqsimlRmETfB+uy/OT5r5jchAAu1Yg9arjkoimab1jHonvhLj7mpCLFCJhbxXYCzTSH/B5E764Cw0BKSEVgzLuHtLFt10GnqQwffOvZQYSHv6yXX86sVj0kgpnk+y5FR+l/egSah6Sv9dK9HcjYNCPWQSPN6JV3LKJC/m4pjpCpS2TRSaL3IOAp2m8YodY+Li9qdFtUq5zdU1QiVGXg490+S+tBSiGV1BNH6rOw==

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



[CemxAfEhK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/buAvgscARFWty2OTaiFLqpp3nWnexNIG>

