

Respuesta inmune humoral hacia los papilomavirus oncogénicos tipos 16, 31 y 58 en mujeres colombianas con citología normal

Humoral Immune Response to Oncogenic Papillomavirus Types 16, 31, and 58 among Colombian Women with Normal Cytology

Alba Lucía Cómbita¹, Mónica Molano¹, Nubia Muñoz¹, María Mercedes Bravo¹

¹ Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia.

Resumen

Objetivo: Caracterizar la respuesta IgG e IgA hacia VLP (partículas semejantes a virus) del virus del papiloma humano (VPH) 16, 31 y 58 y determinar su asociación con la eliminación de la infección. **Métodos:** Se incluyeron 186 mujeres con citología normal participantes en un estudio de cohorte sobre la historia natural de la infección por VPH. Se evaluaron tres grupos: control (negativas para ADN VPH, n=146), eliminación (positivas al ingreso y negativas durante el seguimiento, n=25) y persistencia (positivas durante el seguimiento, n=15). Los anticuerpos IgG e IgA hacia VLP VPH 16, 31 y 58 se analizaron mediante ELISA. **Resultados:** En la primera visita, se observó en el grupo de eliminación una mayor seroprevalencia de anticuerpos IgG hacia VLP VPH 16. Esta prevalencia estuvo acompañada de mayores niveles de anticuerpos en este grupo, en comparación con los niveles observados en el grupo de persistencia (media DO405 nm 0,665 vs. 0,290, respectivamente). En contraste, en la quinta visita, se observó una mayor seroprevalencia de anticuerpos IgG hacia VLP VPH 16 y 58 en el grupo de persistencia (p=0,001 y p=0,003, respectivamente). Esta respuesta se correlacionó con mayores niveles de anticuerpos en esta visita (media DO405 nm 0,653 y 0,532, respectivamente), en comparación con los niveles de anticuerpos observados en la primera visita (media DO405 nm 0,290 y 0,362, respectivamente). **Conclusiones:** La presencia de altos niveles de anticuerpos IgG hacia VPH 16 y 58 durante la infección podría estar asociada con la eliminación de la infección.

Palabras clave: neoplasias del cuello uterino, papiloma, anticuerpos, historia natural.

Abstract

Objective: To profile IgG and IgA response to the VLP (virus-like particles) of the human papillomaviruses (HPV) 16, 31 and 58 and to assess the possibility that they may be related to eliminating infection. **Methods:** A group of 186 women with normal cytology, participants in a cohort study on the natural history of HPV infection, were selected. Three groups were evaluated: control (DNA HPV, n=146 negative), elimination (positive at outset and negative during follow-up, n=25), and persistence (positive during follow-up, n=15).

Correspondencia

Alba Lucía Cómbita, Grupo de Investigación en Biología del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología. Av. 1ª N° 9-85, teléfono 334 0959. Correo electrónico: acombita@cancer.gov.co

Fecha de recepción: 29 de diciembre del 2008. Fecha de aprobación: 2 de junio del 2009.

The IgG and IgA antibodies against HPV-VLP 16, 31, and 58 were submitted to ELISA analysis. **Results:** During the initial visit greater IgG antibody seroprevalence against HPV16-VLP was observed among the elimination group. This prevalence was combined with greater antibody levels in this group in comparison with the levels found among members of the persistence (mean DO405 nm 0.665 vs. 0.290, respectively). In contrast, during the fifth visit, there was greater IgG antibody seroprevalence against HPV-PLV 16 and 58 among the persistence group ($p=0.001$ and $p=0.003$, respectively). This response correlated with greater antibody levels on this visit (mean DO 405 nm 0.653 and 0.532, respectively) in comparison with the antibody levels observed on the first visit (mean DO 405 nm 0.290 and 0.362, respectively). **Conclusion:** High levels of IgG antibodies working against HPV 16 and 58 during infection phase may be associated with elimination of infection.

Key words: Uterine cervical neoplasms, papilloma, antibodies, natural history.

Introducción

El cáncer de cuello uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer en la mujer colombiana, con una incidencia de 36,8 casos por 100.000 habitantes, hecho que constituye un problema de salud pública (1,2). La infección por virus del papiloma humano (VPH), particularmente por los tipos virales de alto riesgo de oncogenicidad, es el principal factor en la etiopatogénesis del cáncer de cuello uterino (3,4). Aunque la presencia del virus constituye un factor necesario para el desarrollo de esta neoplasia, otros factores están implicados (5,6).

Dentro de las enfermedades de transmisión sexual, las infecciones por VPH son las más frecuentes en adultos jóvenes y adolescentes sexualmente activos. La mayoría de estas infecciones (del 70% al 90%) son eliminadas en un periodo de 12 a 30 meses (7-9). Los factores que influyen en la eliminación o persistencia del virus son desconocidos. Sin embargo, se ha establecido que las infecciones persistentes con el mismo tipo de VPH oncogénico se asocian a un mayor riesgo de neoplasias cervicales (10-12).

Por otro lado, la alta frecuencia de infección por VPH y de sus lesiones asociadas observadas en mujeres inmunosuprimidas sugiere que el sistema inmune tiene un papel importante en el control de estas infecciones (13-16).

No se conocen marcadores que permitan identificar a aquellas mujeres con infección por VPH que desarrollarán una infección persistente que progresará hasta carcinoma *in situ* o cáncer invasor.

La infección por VPH genera una respuesta serológica dirigida contra epítopes conformacionales presentes en el virión o en partículas semejantes a virus (*virus like particles*, o VLP) producidas sintéticamente (17). Los anticuerpos de tipo IgG contra VLP se asocian comúnmente a persistencia en la detección del ADN viral (17) y son poco detectados en mujeres con infección transitoria por VPH (18).

Esta respuesta inmune persiste durante varios años y es, en su mayor parte, tipo-específica. La respuesta de tipo IgA es también tipo-específica pero no se mantiene en el tiempo como la respuesta de tipo IgG, por lo que la IgA sérica puede ser útil como marcador de infección reciente o activa (19,20).

En el Instituto Nacional de Cancerología se realizó un estudio sobre la historia natural de la infección con VPH en una cohorte de mujeres de Bogotá. Se analizaron 1.859 muestras de citología para la detección del ADN viral y la determinación de factores asociados a la eliminación de la infección viral (21). El objetivo de dicho estudio fue analizar la respuesta inmune tipo IgG e IgA hacia proteínas de la cápside viral del VPH 16, 31 y 58 en 186 mujeres de la cohorte, clasificadas en tres grupos: mujeres con citología normal negativas para VPH, mujeres que eliminaron la infección y mujeres con infección persistente, con el fin de describir el comportamiento de estos anticuerpos según el estado de la infección, su asociación a la carga viral y su papel en la eliminación de la infección.

Métodos

Población de estudio

Entre noviembre de 1993 y noviembre de 1995 se inició en el Instituto Nacional de Cancerología un estudio sobre la historia natural de la infección por VPH, en el que 2.200 mujeres entre los 18 y 85 años fueron invitadas a participar voluntariamente (21). Se recolectaron muestras de citología cada 6 meses por un periodo de 5 años y muestras de sangre en la primera visita (día 1) y la quinta visita (aproximadamente 30 meses) durante el seguimiento. Estas muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Para la realización de este estudio se seleccionó a 186 sujetos del estudio de cohorte descrito previamente, los cuales fueron clasificados en tres grupos:

Grupo A (*control*): se escogió al azar a 146 mujeres que fueron VPH negativas en la primera visita y durante todo el tiempo del estudio.

Grupo B (*eliminación de la infección*): se escogió a 25 mujeres que fueron positivas para ADN de VPH 16, 18, 31, 33 o 58 al inicio del estudio, y que durante el seguimiento se volvieron negativas para la infección. De estas mujeres, 14 presentaron infección simple por VPH 16; 3, infección simple por VPH 31; 2, infección simple por VPH 58, y 6, infecciones múltiples.

Grupo C (*persistencia*): se escogió a 15 mujeres que fueron positivas para ADN de VPH 16, 18, 31, 33 o 58 durante todo el tiempo del seguimiento, que continuaron infectadas con el mismo tipo viral ($n=11$) o un tipo relacionado filogenéticamente ($n=4$). De estas mujeres, 4 presentaron infección simple por VPH 16; 2, infección simple por VPH 58; una, infección simple por VPH 31, y 4, infección con otros tipos de VPH (VPH 39, 52 o 56). Las 4 restantes presentaron infecciones múltiples.

Producción de VLP

VLP de los VPH tipos 16, 31 y 58 fueron expresadas en células de insecto Sf21 infectadas con baculovirus recombinantes que contenían el gen de

L1 de cada tipo viral. Las VLP fueron purificadas por ultra centrifugación siguiendo la metodología reportada previamente (22). Brevemente, las células de insecto Sf21 se infectaron a un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 10 con los sobrenadantes de baculovirus recombinantes para L1 de VPH 16, 31 y 58. Después de cuatro días las células fueron recolectadas y resuspendidas en PBS (tampón fosfato salino) pH 7,2, 0,5% Nodidet P-40.

Las fracciones nuclear y citoplasmática se separaron por centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos. El pellet nuclear fue resuspendido en PBS y sonicado 3 veces durante 15 segundos. El lisado nuclear fue posteriormente cargado sobre un gradiente de CsCl y centrifugado en una ultracentrífuga Beckman, en el rotor SW28 a 28.000 rpm a 4°C por 21 horas. Se recolectaron fracciones de 1 mL; la densidad se determinó por refractometría. Las fracciones con una densidad de alrededor de 1,272 fueron mezcladas y las VLP fueron concentradas por ultracentrifugación a 28.000 rpm a 4°C durante 3 horas. La presencia de VLP en cada preparación se verificó por microscopía electrónica y SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS).

Detección de anticuerpos mediante ELISA

La presencia de anticuerpos IgG e IgA anti VLP de VPH 16, 31 y 58 fue determinada, con algunas modificaciones, mediante la técnica de ELISA descrita anteriormente (23).

Inicialmente, las placas de ELISA fueron acopladas con 200 ng/pozo de VLP o de albúmina bovina sérica diluidos en PBS. Las placas fueron luego incubadas toda la noche a 4°C . Los sitios libres de las placas se bloquearon con 200 μL de suero fetal bovino al 1% en PBS durante 2 horas, a 37°C . Los sueros fueron diluidos 1/20 para IgG y 1/10 para IgA en PBS 5X con suero fetal bovino al 10%. Cada suero fue analizado en duplicado con cada uno de los tipos de VLP y con albúmina bovina sérica en la misma placa. Las placas fueron incubadas con 100 μL /pozo de cada dilución durante 1 hora a 45°C .

Después de 5 lavados con PBS-Tween, se adicionaron 100 µL/pozo de conjugado anti-IgG 1/5.000 (Vector Laboratories, Inc.) o anti-IgA 1/3000 (DakoCytomation, Denmark A/S, Denmark) humana marcada con peroxidasa y se incubaron 1 hora a 45° C y 37° C, respectivamente. La reacción se reveló por adición de 100 µL de una solución de TMB (Tetramethyl benzidine) y peróxido de hidrógeno. Después de 30 min. la reacción se frenó mediante adición de 100 µL de H₂SO₄ 4N. Los valores de densidad óptica (DO) se midieron a 450 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan® MCC/340). La reactividad IgG o IgA fue expresada como el valor medio de la DO de los duplicados.

Para calcular la absorbancia neta de cada suero, el promedio de la DO de los pozos con albúmina (ruido de fondo) fue restado del promedio de la DO de los pozos con VLP. Para determinar la variabilidad interensayo se determinaron los coeficientes de variación (CV); las muestras con CV mayor al 20% fueron analizadas nuevamente.

El punto de corte para cada antígeno fue determinado como la media más tres desviaciones estándar de las absorbancias obtenidas para un grupo de 70 mujeres con citología normal, las cuales habían sido negativas para ADN de VPH y anticuerpos hacia VLP en un estudio previo (23). Para los ensayos de ELISA de tipo IgG, los puntos de corte fueron 0,419, 0,495 y 0,354 para VLP de VPH 16, 31 y 58, respectivamente, y para ELISA de IgA estos valores fueron 0,470, 0,371 y 0,418, respectivamente.

Análisis de carga viral

Los valores de carga viral de las mujeres positivas para VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 56 y 58 fueron obtenidos de un estudio previo, mediante PCR-ELISA (24). Este método permite evaluar semicuantitativamente la cantidad de ADN de VPH en los cepillados cervicales, con base en la relación lineal que existe entre la cantidad de ADN y la densidad óptica observada en el rango de 10 a 10⁶ copias. En este estudio los valores de la carga viral se agruparon en dos categorías: baja carga viral, cuando la densidad óptica de las muestras fue menor de 1,0, y alta, cuando la densidad óptica fue mayor o igual a 1,0.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado, se calcularon los promedios y la desviación estándar para cada grupo. Mediante la prueba de Shapiro Wilks se verificó el supuesto de distribución normal en cada uno de los grupos. Se empleó un modelo lineal generalizado que consideró tanto efectos principales como términos de interacción, para comparar los promedios de las densidades ópticas de la primera y quinta visitas (factor intrasujetos) y de los grupos (factor intersujetos); se empleó como prueba post hoc para el componente intersujetos la diferencia mínima significativa (DMS).

Se hizo el mismo análisis categorizando las DO como positivas y negativas; se empleó la prueba de McNemar para la comparación de porcentajes de positividad entre la primera y la quinta visitas. La asociación entre los porcentajes de positividad y el grupo de estudio, tanto en la primera como en la quinta visitas, se realizó mediante la prueba de χ^2 .

Resultados

Prevalencia de anticuerpos IgG anti-VLP VPH 16, 31 y 58 en la primera y quinta visitas de seguimiento

La prevalencia de los anticuerpos tipo IgG anti-VLP VPH 16, 31 y 58 en los tres grupos de mujeres analizados es mostrada en la Tabla 1. Aunque en la primera visita no se encontró una diferencia significativa en la prevalencia de anticuerpos IgG anti-VLP VPH16, 31 y 58 entre los grupos analizados, se observó una mayor prevalencia de anticuerpos IgG anti-VLP VPH16 en el grupo de eliminación (40%).

En contraste, durante la quinta visita, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de anticuerpos IgG anti-VLP VPH 16 y 58 ($P=0,001$ y $P=0,003$, respectivamente) entre los grupos analizados. La mayor prevalencia de anticuerpos anti-VLP VPH 16 y 58 fue observada en el grupo de persistencia (53,3% y 46,7%, respectivamente).

Cuando se comparó la prevalencia de anticuerpos de la primera visita con la quinta, la prevalencia de anticuerpos anti-VLP VPH 16, 31 y 58 fue

Tabla 1. Seroprevalencia de anticuerpos tipo IgG hacia VLP de VPH 16, 31 y 58 en 186 casos de mujeres con citología normal. Primera visita y quinta visita.

Prevalencia Anticuerpo tipo IgG anti-VLP VPH	Visita	Total (n=186)	Control (n=146)	Eliminación (n=25)	Persistencia (n=15)	P ^a
16	Primera visita (%)	29,0	28,1	40,0	20,0	0,347
	Quinta visita (%)	19,9	15,1	28,0	53,3	0,001
	p ^b		0,003	0,25	0,063	
31	Primera visita (%)	23,1	23,5	24,0	20,0	0,953
	Quinta visita (%)	14,0	11,0	24,0	26,7	0,074
	p ^b		0,003	1	1	
58	Primera visita (%)	25,3	24,7	24,0	33,3	0,753
	Quinta visita (%)	17,2	13,0	24,0	46,7	0,003
	p ^b		0,012	1	0,5	

P^a: Prueba de χ^2 para determinar asociación entre los tres grupos: control, eliminación y persistencia.

P^b: Prueba de McNemar para determinar proporciones repetidas: primera visita vs. quinta visita.

significativamente mayor en la primera visita en el grupo control ($P=0,003$, $P=0,003$ y $P=0,012$, respectivamente) (Tabla 1). Aunque en el grupo de persistencia la prevalencia de anticuerpos fue mayor en la quinta visita, esta diferencia no fue significativa. En el grupo de eliminación, las seroprevalencias permanecieron constantes para VPH 31 y 58 y disminuyeron para VPH 16; esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Comparación de los niveles de anticuerpos IgG anti-VLP VPH 16, 31 y 58 en la primera y quinta visitas de seguimiento.

Los niveles de anticuerpos IgG hacia VLP de VPH 16, 31 y 58 se calcularon como el valor medio de las densidades ópticas (DO_{405nm}) en los diferentes grupos. En los grupos de eliminación y persistencia se tomó en cuenta a las mujeres que fueron ADN VPH 16, 31 y 58 positivas (Fig. 1).

Se realizó un análisis intrasujetos, el cual considera simultáneamente la medida repetida (primera visita vs. quinta visita) y un análisis intersujeto que compara el comportamiento según grupo. Este análisis mostró diferencias significativas en los niveles de anticuerpos hacia VLP 16 y 58 ($P=0,001$ y $P=0,006$, respectivamente).

Cuando se analizó la reactividad IgG específica hacia VLP 16 en el grupo control, el promedio de los niveles de anticuerpos hacia VLP VPH 16 fue inferior al punto de corte tanto en la primera visita como en la quinta (media DO_{405nm} 0,361 y 0,208 respectivamente), mientras que en el grupo de eliminación se observaron promedios superiores al del punto de corte en ambas visitas (media DO_{405nm} 0,665 y 0,545) (Fig. 1a).

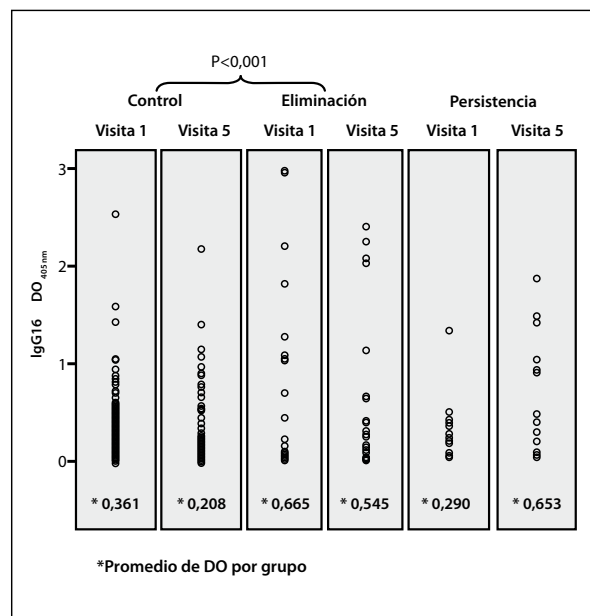
En el grupo de persistencia la media fue menor al punto de corte en la primera visita y mayor al punto de corte en la quinta visita (media DO_{405nm} 0,290 y 0,653, respectivamente). Cuando se realizó el análisis intersujeto para analizar las diferencias de los niveles de anticuerpos por grupo, se observó solo una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó el grupo control vs. eliminación ($P<0,001$). No se observó ninguna diferencia estadística cuando se compararon los grupos de persistencia vs. normal y los grupos de persistencia vs. eliminación.

El promedio de los niveles de anticuerpos hacia VLP de VPH 31 fue inferior al punto de corte para los tres grupos en ambas visitas. El análisis intersujeto no mostró diferencias estadísticamente significativas (Fig. 1b).

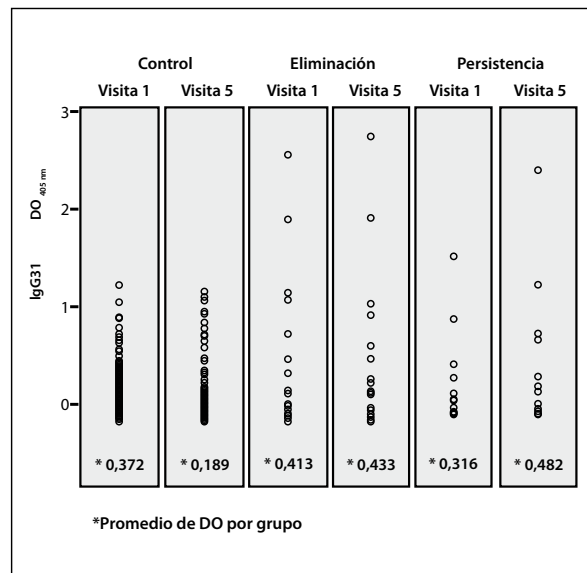
Los niveles de anticuerpos hacia VLP de VPH 58 estuvieron por debajo del punto de corte tanto en el grupo normal como en el grupo de eliminación, en ambas visitas. En el grupo de persistencia se observó una mayor reactividad, principalmente, en la quinta visita (media DO_{405nm} 0,362 vs. 0,532) (Fig. 1c). En el análisis intersujeto se observó una diferencia significativa entre los grupos de eliminación vs. persistencia ($P<0,001$) y control vs. persistente ($P<0,001$). No se observó ninguna diferencia entre el grupo normal vs. eliminación ($P=0,182$).

Es importante resaltar que en la primera visita la mayor prevalencia de anticuerpos tipo IgG hacia VLP de VPH 16 (40%) fue observada en el grupo de eliminación. Esta mayor prevalencia se correlaciona con mayores niveles de anticuerpos en este grupo, en comparación con los niveles observados en el grupo de persistencia (media DO_{405nm} 0,665 vs. 0,290, respectivamente). Por el contrario, en la quinta visita una mayor seroprevalencia hacia VLP de VPH 16 y 58 fue observada en el grupo de persistencia. Tal prevalencia se correlacionó con mayores niveles de anticuerpos en comparación con la primera visita (Fig. 1).

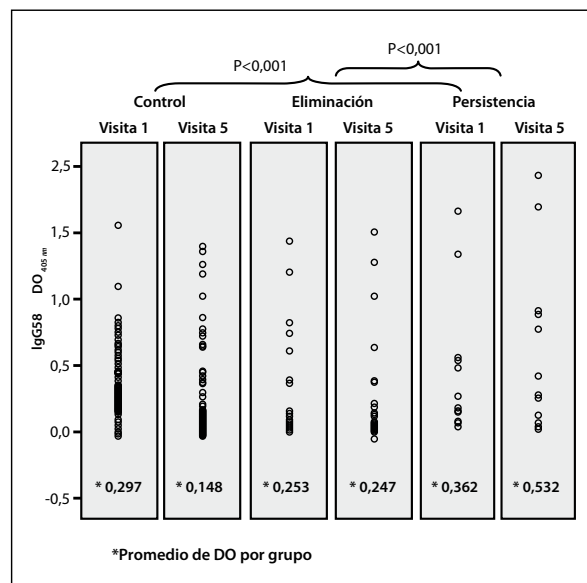
Figura 1. Análisis de los niveles de anticuerpo en mujeres con infección no persistente (eliminación) y persistente. Dispersión de las DO de anticuerpos IgG hacia (a) VLP de VPH 16, (b) VLP de VPH 31 y (c) VLP de VPH 58.



a. VLP VPH 16



b. VLP VPH 31



c. VLP VPH 58

Prevalencia y niveles de anticuerpos IgA anti-VLP VPH 16, 31 y 58 en la primera y quinta visitas de seguimiento

Durante la primera visita las prevalencias de los anticuerpos tipo IgA anti-VLP VPH 16, 31 y 58 en los tres grupos de mujeres estuvieron en un rango del 6,2% al 36%; se observó una mayor prevalencia en el grupo de eliminación. El análisis mostró una diferencia significativa en la prevalencia de anticuerpos solo hacia VLP VPH 16 y VPH 58 ($P=0,014$ y $P=0,003$, respectivamente) (Tabla 2).

Tabla 2. Seroprevalencia de anticuerpos tipo IgA hacia VLP de VPH 16, 31 y 58 en 186 casos de mujeres con citología normal. Primera visita y quinta visita.

Prevalencia Anticuerpo tipo IgA anti-VLP VPH	Visita	Totales (n=186)	Control (n=146)	Eliminación (n=25)	Persistencia (n=15)	P ^a
16	Primera visita (%)	13,4	10,3	32,0	13,3	0,014
	Quinta visita (%)	8,6	7,5	16,0	6,7	0,364
	p ^b		0,503	0,219	1	
31	Primera visita (%)	8,1	6,2	16,0	13,3	0,188
	Quinta visita (%)	11,3	8,2	24,0	20,0	0,038
	p ^b		0,804	0,687	1	
58	Primera visita (%)	14,6	10,3	36,0	20,0	0,003
	Quinta visita (%)	17,2	17,8	16,0	13,3	0,896
	p ^b		0,061	0,227	1	

P^a: Prueba de χ^2 para determinar asociación entre los tres grupos: control, eliminación y persistencia.

P^b: Prueba de McNemar para determinar proporciones repetidas: primera visita vs. quinta visita.

En la quinta visita las prevalencias hacia VLP VPH 16, 31 y 58 variaron entre el 6,7 % y el 24 %. Las diferencias observadas en los porcentajes de prevalencia de anticuerpos entre los grupos fue solamente significativa para VLP VPH 31 ($P=0,038$) (Tabla 2). Cuando se compararon las prevalencias hacia VLP VPH 16, 31 y 58 de la primera y la quinta visita no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres grupos.

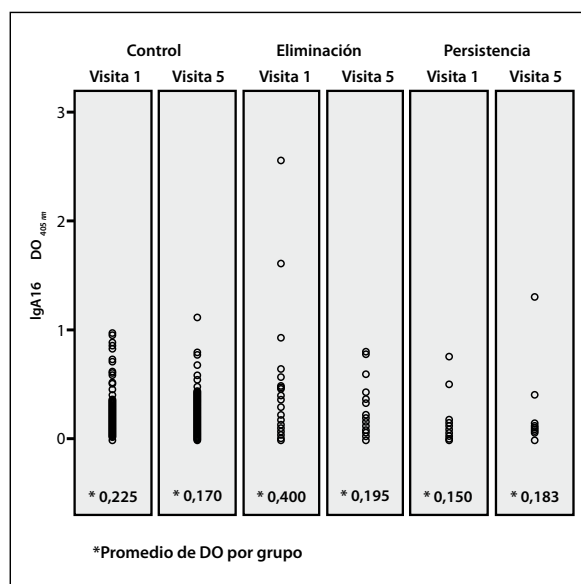
Los niveles de anticuerpos IgA, en general, fueron mucho más bajos que los observados para IgG (Fig. 2). Al hacer la comparación entre la primera y quinta visitas, el análisis intrasujeto no mostró ninguna diferencia estadística cuando se compararon los promedios de las DO de los diferentes grupos.

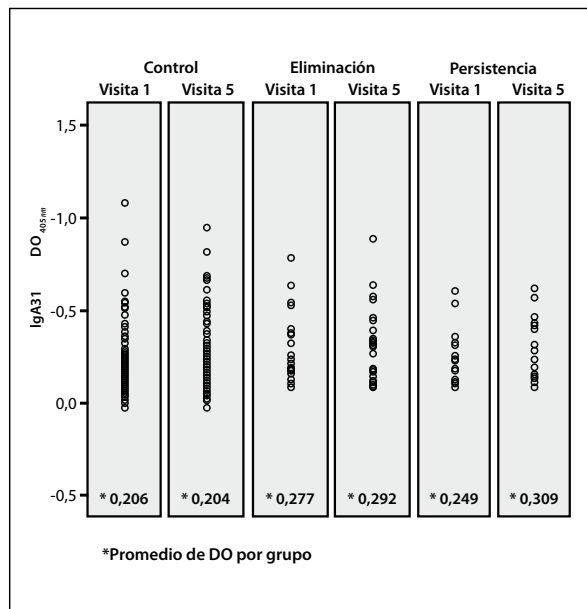
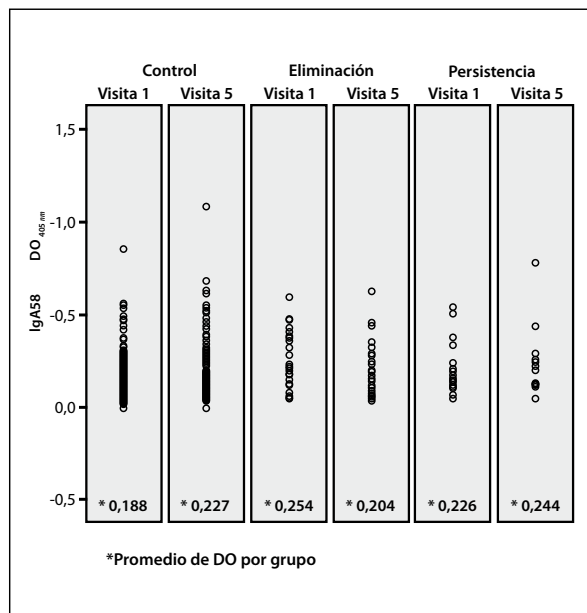
El promedio de la reactividad hacia VLP de VPH 16, VPH 31 y VPH 58 fue inferior al punto de corte en los tres grupos, tanto de la primera como de la quinta visita. En general, se observó una baja correlación entre las seropositividades tipo IgG y tipo IgA en los tres grupos ($Kappa = 0,25$).

Asociación entre la carga viral y la presencia de anticuerpos anti VLP

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la prevalencia de anticuerpos IgG e IgA en los grupos de

eliminación y persistencia, según la carga viral. En general, predominó la carga viral alta en el grupo de persistencia (del 80% en la primera visita y del 90% en la quinta visita) respecto al grupo de eliminación (56% en primera visita).

Figura 2. Análisis de los niveles de anticuerpo en mujeres con infección no persistente (eliminación) y persistente. Dispersión de las DO de anticuerpos IgA hacia (a) VLP de VPH 16, (b) VLP de VPH 31 y (c) VLP de VPH 58.**a. VLP VPH 16**


b. VLP VPH 31

c. VLP VPH 58

En el grupo de eliminación con carga viral alta se observó una prevalencia del 71,4% para IgG o IgA; por el contrario, en el grupo de persistencia con carga viral alta (primera visita) solo el 50% presentó anticuerpos IgG o IgA. Cuando se comparó la respuesta tipo IgA entre los grupos de eliminación y persistencia en la primera visita, en el grupo de eliminación se observó una prevalencia del 50%, mientras que para el grupo de persistencia esta fue solo del 12,5%.

Tabla 3. Prevalencia de anticuerpos IgG e IgA según la carga viral en los grupos de eliminación y persistencia.

Grupo	Eliminación 1ª visita (n=25)	Persistencia 1ª visita (n=10)	Persistencia 5ª visita (n=10)
Carga viral alta	14 (56%)	8 (80%)	9 (90%)
IgG/IgA	5/14 (35,7%)	0	2/9 (22,5%)
IgG solo	3/14 (21,4%)	3/8 (37,5%)	5/9 (55,6%)
IgA solo	2/14 (14,3%)	1/8 (12,5%)	1/9 (11,1%)
Negativo	4/14 (28,6%)	4/8 (50,0%)	1/9 (11,1%)
Carga viral baja	11 (44%)	2 (20%)	1 (10%)
IgG/IgA	2/11 (18,1%)	0	0
IgG solo	3/11 (27,3%)	0	0
IgA solo	3/11 (27,3%)	2/2 (100,0%)	0
Negativo	3/11 (27,3%)	0	1/1 (100,0%)

Para las mujeres con carga viral baja, en el grupo de eliminación se observó una prevalencia del 72,7% para IgG o IgA; por el contrario, en el grupo de persistencia solo se observó una respuesta tipo IgA en la primera visita y no se observó ninguna respuesta en la quinta visita.

Discusión

En este estudio se evaluó la respuesta humoral tipo IgG e IgA hacia VLP VPH 16, 31 y 58 en mujeres colombianas con citología normal. La seroprevalencia de anticuerpos tipo IgG en mujeres con citología normal fue ligeramente más alta que las observadas en otras poblaciones latinas (VPH 16: 22,5%; VPH 31: 21,8%) (25,26), lo cual denota el alto nivel de exposición a estos tipos virales de nuestra población y la naturaleza transitoria de la mayoría de las infecciones. En concordancia con estudios previos de frecuencia de detección ADN de VPH en la población colombiana, se observó una mayor seroprevalencia hacia-VLP de VPH 16, seguido por VPH 58, lo que confirma la alta frecuencia de estos dos tipos virales en dicha población (21,23).

Una alta prevalencia de anticuerpos tipo IgG hacia VLP fue observada en el grupo de mujeres control (negativas para ADN VPH) durante la primera visita (rango del 23,5% al 28,1 %). Esta prevalencia disminuyó en la quinta visita (rango del 11,0% al 15,1%), lo cual indica que los anticuerpos anti-VLP pueden ser marcadores de infecciones pasadas y reflejan la exposición a VPH durante algún tiempo después de la infección (27-29).

En la quinta visita se observó una mayor seroprevalencia tipo IgG hacia VLP de VPH 16 y 58 en el grupo de persistencia, la cual se asoció a mayores niveles de anticuerpos en la quinta visita, en comparación con la primera visita (media DO_{405nm} 0,653 y 0,532, respectivamente), lo cual señala que las infecciones persistentes podrían mantener un efecto de estimulación lento y gradual, que conlleva una mayor seroconversión y niveles más altos de anticuerpos (6,18,30).

A pesar de que existen varios estudios encaminados a determinar el papel protector de los anticuerpos generados después de la infección natural, aún no hay una claridad total al respecto (26,31). La respuesta inmune específica hacia VPH durante la primera fase de la infección puede ser importante en la prevención de la reinfección y de la persistencia viral (31). En este estudio se observó una mayor seroprevalencia de anticuerpos tipo IgG hacia VLP de VPH 16 (40%) en el grupo de eliminación en la primera visita. Esta seroprevalencia se asoció a mayores niveles de anticuerpos, en comparación con los observados en el grupo de persistencia (media DO_{405nm} 0,665 *vs.* 0,290, respectivamente). El estudio de seguimiento del ADN viral de este grupo de mujeres (datos no mostrados) no mostró reinfecciones durante el seguimiento. Estos resultados podrían sugerir que la inducción de altos niveles de anticuerpos hacia las cápsides virales desde el inicio de la infección podrían estar asociados a una mayor tasa de eliminación y a menores tasas de persistencia de la infección (31).

Ho y cols. reportan que la presencia de altos niveles de anticuerpos tipo IgG anti VLP VPH 16, que se mantienen en el tiempo, se asocia a un menor riesgo de presentar nuevas infecciones con VPH 16 y otros tipos virales relacionados a VPH 16 (31).

Adicionalmente, en estudios de vacunación con VLP de VPH, en los que se comparan las respuestas de anticuerpos entre mujeres vacunadas y mujeres no vacunadas expuestas a VPH, se ha observado que los niveles de anticuerpos inducidos por la vacunación son entre 50 y 60 veces mayores que los niveles observados luego de la infección natural, lo cual señala que altos niveles de anticuerpos desde el inicio de la infección podrían estar asociados a una mayor protección (32-34).

En contraste con Bontkes y cols. (35), quienes reportaron que los niveles de IgA sistémica contra VPH 16 se correlacionan con la eliminación de la infección viral y la resolución de lesiones asociadas a VPH, en este estudio, aunque en el grupo de eliminación se observó una mayor prevalencia de anticuerpos tipo IgA hacia VLP VPH 16 y 58 (32% y 36%) en la primera visita, el promedio de los niveles de anticuerpos hacia las tres cápsides analizadas fue bajo.

A diferencia de Ho y cols. (31), quienes reportaron que la seropositividad tipo IgA hacia VLP VPH 16 se correlaciona con la habilidad de inducir una fuerte respuesta IgG, en este estudio no se observó asociación entre la respuesta tipo IgG e IgA. Sin embargo, en el grupo de eliminación, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa, se observó que una proporción de las pacientes que presentaron respuesta tipo IgG hacia cualquiera de los tres tipos de VLP presentó, a la vez, una respuesta tipo IgA. Estos resultados, al igual que lo propuesto por Ho y cols., sugieren que la presencia tanto de IgA como de IgG está asociada a una disminución en el riesgo de reinfecciones.

En contraste con Studentsov y cols. (36), quienes observaron asociación entre alta carga viral y mayores niveles de anticuerpos, en este estudio no se observó una asociación significativa entre alta carga viral y respuesta a anticuerpos. En el grupo de eliminación el 71,4% de las mujeres con carga viral alta presentó algún tipo de respuesta a anticuerpos, frente a un 28,6% que no presentó respuesta; dicha respuesta fue principalmente de tipo IgA (50%).

En el grupo de persistencia, aunque se observó una alta carga viral en la primera visita, solo el 50,0% presentó algún tipo de respuesta de anticuerpos,

con una baja respuesta de anticuerpos tipo IgA (12,5%). En la quinta visita se observó un aumento de la respuesta (87,5%); sin embargo, esta no fue protectora. Tales resultados indican, nuevamente, que la exposición acumulada, inferida de la alta carga viral y acompañada de bajos niveles de anticuerpos, puede favorecer la persistencia de la infección.

En conclusión, en Colombia, al igual que en otras regiones geográficas, la detección de anticuerpos anti-VLP está asociada a una exposición acumulada a VPH. La medición de estos anticuerpos puede tener utilidad como biomarcador de prevalencia de infecciones en la población. Adicionalmente, el desarrollo de una respuesta tipo IgG fuerte desde el inicio de la infección podría estar asociado a la eliminación de la infección y, posiblemente, a la protección a reinfecciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todas las instituciones e individuos que participaron en este estudio. Igualmente, agradecemos al grupo de VPH del Instituto Nacional de Cancerología de Bogotá, Colombia; especialmente, a: M. González, J. Luna, G. Martínez, E. Mora, G. Pérez, J. M. Fuentes, C. Gómez, E. Klaus, C. Camargo, C. Tobón, T. Palacio, C. Suárez, C. Molina.

Adicionalmente, agradecemos al doctor Coursaget, del Laboratoire "Virus, vectorisation et Imagerie de ciblage", INSERM, U618, Université François Rabelais, Tours, France, por la transferencia de la tecnología para la producción de VLPs.

Finalmente, a Ricardo Cendales, por su colaboración en el análisis estadístico. El presente trabajo fue financiado por la carrera Terry Fox, Colciencias grant 2101-04-16359 y el INC, por recursos de inversión/DNP 41030310-11.

Referencias

- Muñoz N, Bosch FX, de San José, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. 1992;52(5):743-9.
- Piñeros M, Murillo RH. Incidencia de cancer en Colombia: importancia de las fuentes de información en la obtención de cifras estimativas. *Rev Colomb Cancerol*. 2004;8(1):5-14.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-65.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000;19(1-2):1-5.
- Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA, et al. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(1):113-20.
- Wang SS, Schiffman M, Shields TS, Herrero R, Hildesheim A, Bratti MC, et al. Seroprevalence of human papillomavirus-16, -18, -31, and -45 in a population-based cohort of 10000 women in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2003;89(7):1248-54.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338(7):423-8.
- Ho GY, Studentsov YY, Bierman R, Burk RD. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(1):110-6.
- Moscicki AB. HPV infections in adolescents. *Dis Markers*. 2007;23(4):229-34.
- Fukuchi E, Sawaya GF, Chirenje M, Magure T, Tuveson J, Ma Y, et al. Cervical human papillomavirus incidence and persistence in a cohort of HIV-negative women in Zimbabwe. *Sex Transm Dis*. 2009;36(5):305-11.
- Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998;132(2):277-84.
- Muñoz N, Hernández-Suarez G, Méndez F, Molano M, Posso H, Moreno V, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*. 2009;100(7):1184-90.
- Palefsky J. Human papillomavirus infection among HIV-infected individuals. Implications for development of malignant tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991;5(2):357-70.
- Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):41-6.
- Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer*. 1994;57(6):836-40.

16. Silverberg MJ, Schneider MF, Silver B, Anastos KM, Burk RD, Minkoff H, et al. Serological detection of human papillomavirus type 16 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(4):511-9.
17. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Coursaget P, Stukart MJ, Dupuy C, et al. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 2):399-408.
18. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.* 2000;181(6):1911-9.
19. Onda T, Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, et al. Characterization of IgA response among women with incident HPV 16 infection. *Virology.* 2003;312(1):213-21.
20. Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Eklund C, Knekt P, et al. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J Infect Dis.* 2000;181(2):456-62.
21. Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer.* 2002;87(3):324-33.
22. Cómbita AL, Touze A, Bousarghin L, Sizaret PY, Muñoz N, Coursaget P. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;204(1):183-8.
23. Cómbita AL, Bravo MM, Touze A, Orozco O, Coursaget P. Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer.* 2002;97(6):796-803.
24. Molano M, Van den BA, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158(5):486-94.
25. Marais DJ, Constant D, Allan B, Carrara H, Hoffman M, Shapiro S, et al. Cervical human papillomavirus (HPV) infection and HPV type 16 antibodies in South African women. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):732-9.
26. Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Bratti MC, et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(2):324-7.
27. Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(7):494-9.
28. Nakagawa M, Viscidi R, Deshmukh I, Costa MD, Palefsky JM, Farhat S, et al. Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(4):877-82.
29. Wideroff L, Schiffman MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, et al. Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women. *J Infect Dis.* 1996;174(5):937-43.
30. Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kirnbauer R, Greer CE, et al. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis.* 1995;172(6):1425-30.
31. Ho GY, Studentsov Y, Hall CB, Bierman R, Beardsley L, Lempa M, et al. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis.* 2002;186(6):737-42.
32. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):284-92.
33. Joura EA, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, et al. HPV antibody levels and clinical efficacy following administration of a prophylactic quadrivalent HPV vaccine. *Vaccine.* 2008;26(52):6844-51.
34. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 2002;347(21):1645-51.
35. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, et al. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 2):409-17.
36. Studentsov YY, Ho GY, Marks MA, Bierman R, Burk RD. Polymer-based enzyme-linked immunosorbent assay using human papillomavirus type 16 (HPV16) virus-like particles detects HPV16 clade-specific serologic responses. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):2827-34.