

# Cultivo de células de cartílago nasal humano

Drs. María Lorena Márquez<sup>1</sup>, Angel Hernández<sup>2</sup>, Dora Scioscia<sup>1</sup>, Elizabeth Merentes<sup>1</sup>.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Policlínica Santiago de León.

e.mail: lormarmar@gmail.com

## RESUMEN

*La producción de cartílago in vitro por bioingeniería de tejidos tiene un enorme potencial terapéutico. Sin embargo, en Venezuela aún no se ha desarrollado esta tecnología, por tanto en nuestro laboratorio se están desarrollando proyectos dirigidos a conocer aspectos involucrados en la biología de los condrocitos, así como también de los tipos de matrices a utilizar como sustrato para su cultivo. En este trabajo se aislaron condrocitos de cartílago nasal humano obtenidos de cirugías estéticas. Las células cultivadas sobre plástico a altas densidades crecen en monocapa, mostrando una morfología poliédrica característica hasta el segundo pasaje; en subcultivos sucesivos estas células muestran cambios morfológicos observándose células fusiformes, indicando un proceso de dediferenciación. Cuando las células son incluidas en una matriz de colágeno tipo I la mayoría mantiene su morfología esférica típica y sintetizan componentes de matriz característicos como proteoglicanos y colágeno tipo II, marcadores de estabilidad fenotípica, factor importante para el desarrollo de neotejidos*

*Palabras clave: Condrocitos. Cartílago nasal. Dediferenciación. Matriz tridimensional.*

## SUMMARY

*The in vitro production of cartilage by tissue bioengineered has an enormous therapeutic potential. However, this technology has not been developed in Venezuela, so, in our laboratory several projects related to biological aspects of chondrocytes and the best matrixial support for their culture are under study. In this work we have isolated chondrocytes from human nasal samples obtained from plastic surgery and culture of cells on plastic dishes at high densities. Initially the cells grew up as a monolayer of polyedric cells, and after the second passage this shape*

*was modified, in successive subcultures these cells show spindle cell morphological changes observed, indicating a dedifferentiation process. When cells are embedded in a matrix of collagen type I most keep their spherical morphology typical characteristic matrix components synthesized as proteoglycans and collagen type II markers, phenotypic stability, an important factor for the development of new tissues.*

*Keywords: Chondrocytes. Nasal cartilage. Dedifferentiation. Three-dimensional matrix.*

## INTRODUCCIÓN

El cartílago hialino es un tejido conectivo especializado constituido por condrocitos los cuales sintetizan componentes de la matriz extracelular compuesta principalmente por proteoglicanos de tipo agregán, y además contiene fibras de colágeno tipo II, y en menor proporción colágeno tipo IX, X y XI. El cartílago es un tejido avascular al igual que la epidermis, por lo cual los nutrientes difunden a partir de los vasos sanguíneos del tejido conectivo que los circundan. En base a esta característica, es posible establecer cultivos de condrocitos y reconstruir tejidos cartilaginosos *in vitro*, pero es importante tener en cuenta que la proliferación, expresión y mantenimiento del fenotipo característico de los condrocitos *in vitro* depende de las condiciones de cultivo tales como suplementos del medio de cultivo (factores de crecimiento entre otras sustancias), densidad de siembra, y tipo de sustrato utilizado

(matrices naturales o sintéticas) (1,2).

La optimización de las técnicas *in vitro* utilizando estas condiciones han permitido que los cultivos de condrocitos puedan ser usados para la restauración de daños en el cartílago articular humano, debido a la limitada capacidad de auto reparación que presenta este tejido (3,4). Sin embargo, recientemente se han podido encontrar poblaciones de células progenitoras en el cartílago humano articular, que pueden amplificarse en cultivo, lo cual abre la posibilidad de producir cartílago para tratar enfermedades como la osteoartritis (5).

En vista de que ningún método usado en las terapias convencionales para reparar daños en cartílago restaura de forma duradera el problema de la osteoartritis, actualmente se utilizan sistemas basados en la implantación de células cultivadas. Se ha planteado una técnica reciente usando membranas de colágeno en la implantación autóloga que representa una alternativa clínica para la reparación del cartílago articular humano (6).

En este trabajo determinamos las condiciones de aislamiento de las células a partir de las muestras del cartílago nasal humano para obtener una alta viabilidad, también se establecieron las condiciones de cultivo óptimas que estimulen el crecimiento celular, evaluando la capacidad de proliferación de los condrocitos humanos después de la congelación por 9 meses. Igualmente se caracterizaron morfológicamente las células sembradas en plástico y en una matriz tridimensional de colágeno tipo I.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de células de cartílago y establecimiento del cultivo en monocapas

Bajo consentimiento informado, se utilizaron 6 muestras de cartílago nasal humano cinco de las cuales se obtuvieron de pacientes de edades comprendidas entre 15-36 años, de sexo femenino y una proveniente de un paciente de sexo masculino de 36 años, quienes fueron sometidos a cirugía reconstructiva de la nariz. Una vez obtenidas las muestras fueron incubadas en medio F-12 estéril que contiene doble concentración de antibióticos y antimicóticos a 4°C y transportadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores donde fueron procesadas, según la metodología empleada por Pineda y col. (7)

Las muestras de cartílago se cortaron en trozos y lavaron en una solución tampón fosfato (PBS)

y posteriormente se sometieron a un tratamiento enzimático el cual fue realizado de forma secuencial. Primero se incubaron en una solución de tripsina a una concentración de 0,25 % en medio Ham's F-12 sin suero, con agitación continua a 37 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se extrajo el sobrenadante y los trozos no digeridos se incubaron en una solución de colagenasa tipo II (2 mg/ml) en medio Ham's F-12 suplementado con 10% de suero fetal de bovino inactivado, a 37 °C durante 12 horas. Luego se centrifugó esta suspensión y se eliminó el sobrenadante. El taco celular obtenido se resuspendió en medio nutritivo y se sembró sobre placas de 51 mm previamente gelatinizadas.

Cuando los cultivos primarios de condrocitos humanos alcanzaron la semiconfluencia se procedió a realizar los subcultivos celulares de la manera siguiente: las células se disgregaron con tripsina 0,125 % (Gibco) - EDTA 0,02 % (Sigma), se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, y el taco celular obtenido se resuspendió en el medio nutritivo. Posteriormente se determinó la viabilidad celular usando el método del azul de tripano y se procedió a la siembra celular sobre plástico y/o en un sustrato tridimensional (gel de colágeno tipo I).

### Equivalentes de tejido de cartílago humano

Para preparar estos equivalentes, se emplearon condrocitos del segundo pasaje, los cuales mantienen sus características morfológicas similares al tejido nativo. Estos, fueron mezclados con el colágeno al 1%, a una densidad de  $4 \times 10^5$  cel/ mL de colágeno en placas de 35 mm, luego se dejó gelificar el colágeno en la estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después de 18 horas aproximadamente se añadió el medio nutritivo. Estos cultivos se mantuvieron durante 15-21 días y luego fueron procesados con las técnicas convencionales de histología, así como también mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas para evaluar la producción de componentes de la matriz extracelular, tales como glicosaminoglicanos (GAGs), colágeno tipo II y proteoglicanos, por parte de las células.

Para evaluar la producción de glicosaminoglicanos se utilizó la coloración con azul alcian pH 1, mientras que para evaluar la presencia de colágeno tipo II y de proteoglicanos se empleó una técnica inmunohistoquímica. Para ello, los geles fueron procesados mediante técnicas convencionales de histología, se realizaron los cortes y posteriormente se desparafinaron, e hidrataron, se bloqueó la peroxidasa endógena, y luego se incubó con el anticuerpo

## CULTIVO DE CÉLULAS DE CARTÍLAGO NASAL HUMANO

respectivo (anti-colágeno tipo II o anti proteoglicanos ambos de Chemicon) a una dilución 1/100 durante una hora; para revelar el marcaje con el anticuerpo se utilizó el kit universal Dako LSAB2. HRP, cuyo principio se basa en la interacción estreptavidina-biotina, siguiendo las indicaciones del proveedor.

Asimismo, en este trabajo se congelaron células de diferentes pasajes, las cuales posteriormente se descongelaron y se evaluaron las características morfológicas y la potencialidad de proliferación antes y después de la congelación. El comportamiento proliferativo de estas células se calculó determinando el número acumulativo de células.

### RESULTADOS

Los condrocitos humanos cultivados sobre plástico a altas densidades muestran un crecimiento en monocapa, destacándose una apariencia celular de tipo poliédrica con espacios prominentes entre ellas (Figura 1A y 1B). Las células subcultivadas mantienen las mismas características morfológicas, hasta el segundo subcultivo, y se observa una marcada proliferación celular. A partir de tercer

pasaje se observan cambios morfológicos en algunas poblaciones del cultivo donde se pueden evidenciar células con morfología tipo fusiforme (Figura 1C), las cuales se logran mantener en el cultivo hasta el noveno pasaje sin rasgos aparentes de senescencia y además manteniendo su potencial de proliferación.

Cuando los condrocitos humanos del segundo pasaje fueron incluidos en geles tridimensionales, inicialmente se pudo apreciar al microscopio de contraste de fase, las células con una morfología esférica la cual, se mantiene en la mayoría de la población (Figuras 2A y 2B). Al analizar el aspecto morfológico de las células en cortes histológicos de los equivalentes teñidos con hematoxilina, se observó que la mayoría de las células son esféricas (Figura 2C).

En el gel de colágeno donde se incluyeron los condrocitos humanos del segundo pasaje, se puede apreciar una intensa coloración con azul alcian pH 1. Con esta tinción las células con morfología esférica presentan una coloración azul intenso en la matriz, lo cual indica la presencia de GAGs altamente sulfatados (Figura 2D). Luego de hacer la evaluación histológica e histoquímica de los cultivos en geles, se pudo apreciar que bajo estas condiciones *in vitro* los condrocitos producen componentes de matriz

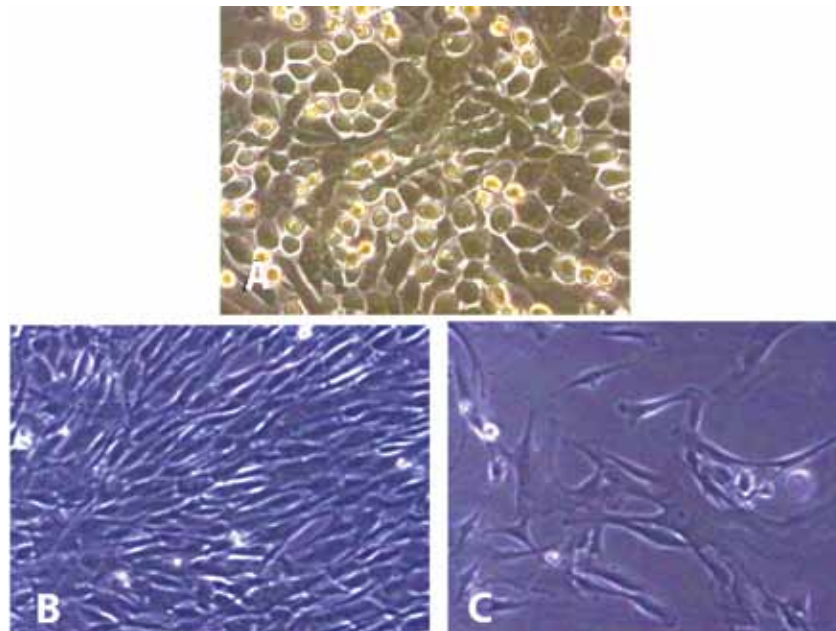


Figura 1. Cultivos en monocapa de células de cartilago nasal humano. A. Cultivo primario: se puede observar células tipo poliédricas con espacios prominente entre ellas y células en división. B. Población de células del primer pasaje que mantiene similar la morfología al cultivo primario. C. Células con un fenotipo fusiforme. Cuarto pasaje. Contraste de fases. 200X.

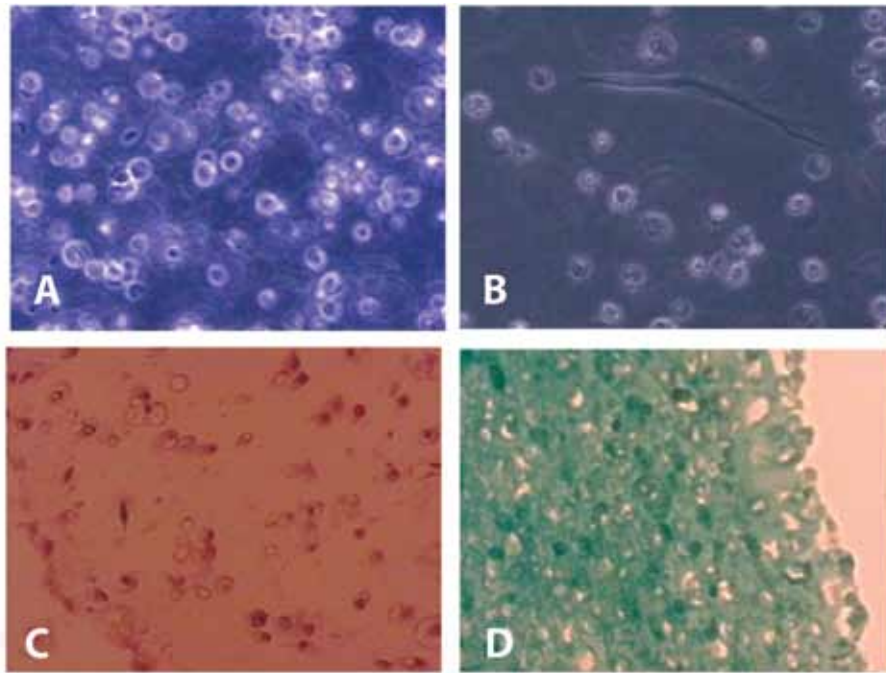


Figura 2. Células de cartilago nasal humano incluidas en el gel de colágeno. A. Población de células con morfología esférica. 1hora de siembra. Contraste de fases.100X. B. La mayoría de las células inmersas en el gel son esféricas y algunas tipo fusiforme 7 días de cultivo. 200X. C. Corte histológico donde se aprecian las células esféricas en el equivalente de tejido. Coloración de Hematoxilina-Eosina.200X. D. Se puede apreciar la intensa coloración azul de la matriz con azul alcian a pH 1, lo que indica la presencia de GAG sulfatados.200X.

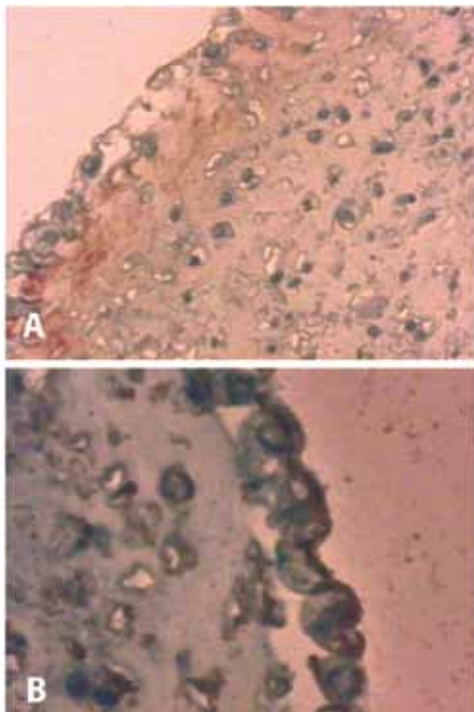


Figura 3. Equivalentes de cartilago nasal humano. A. Puede observarse mediante inmunohistoquímica en contra de colágeno tipo II, el marcaje positivo principalmente en la zona periférica del equivalente ( . ) 200X. B. Se puede apreciar el marcaje positivo alrededor de las células con el anticuerpo en contra de proteoglicanos de condroitín sulfato.400X.

característicos como son los GAGs componentes principales de los proteoglicanos.

En el desarrollo de este trabajo analizamos si las células subcultivadas de diferentes pasajes incluidas en una matriz de colágeno tipo I, pueden restablecer sus propiedades de expresar proteoglicanos y colágeno tipo II característico de este tipo de célula. Se pudo determinar por inmunohistoquímica que las células expresan sus características típicas del tejido nativo cuando se mantienen hasta el segundo pasaje, mientras que aquellas células con un mayor número de pasajes no sintetizan estos componentes de matriz e inclusive en algunos casos degeneran con el tiempo de cultivo. Es importante destacar que el mantenimiento de este fenotipo similar al cartílago humano, va a depender entonces, del número de pasajes y de las condiciones de cultivo que se le suministre a dichas células.

Cuando el anticuerpo contra colágeno tipo II fue ensayado sobre los cortes de cartílago humano proveniente del segundo cultivo del paciente masculino de 36 años, se observó el marcaje positivo en las regiones periféricas de la matriz (Figura 3A), de igual manera se apreció el marcaje positivo con el anticuerpo contra proteoglicanos de condroitín sulfato alrededor de las células (Figura 3B).

## DISCUSIÓN

Se ha planteado que la producción de cartílago *in vitro* por bioingeniería de tejidos, tiene un enorme potencial terapéutico. Sin embargo, otra alternativa es la utilización de condrocitos cultivados obtenidos del mismo paciente, los cuales pueden ser implantados para la reparación del cartílago articular de la rodilla de personas que han sufrido traumatismo (4). A pesar de todas las expectativas que se han generado a nivel mundial, hasta el momento en el país no se tiene esta tecnología totalmente desarrollada. Cuando se va a utilizar el sistema basado en la implantación de células cultivadas, es importante conocer cuáles son los requerimientos *in vitro* para la producción de un número importante de condrocitos y que estos mantengan el fenotipo diferenciado. Además también se debe caracterizar la criopreservación celular y los tipos de matrices a utilizar como sustrato que permitan el desarrollo de equivalentes del cartílago.

En este sentido, en este trabajo se aislaron condrocitos humanos a partir de muestras de cartílago nasal humano. Los condrocitos aislados y sembrados a alta densidad sobre plástico, crecen en monocapa

y muestran una morfología esférica o poliédrica con espacios prominentes entre las células. Esta morfología se mantiene durante las primeras semanas de cultivo e inclusive hasta el segundo pasaje, pero luego de subsecuentes subcultivos estas tienden a mostrar una morfología tipo fibroblasto.

Se ha señalado que este proceso de dediferenciación en los condrocitos *in vitro* ocurre cuando las células son subcultivadas o sembradas a bajas densidades (8), además hay pérdida de acumulación de matriz metacromática, debido a que están sintetizando colágeno tipo I (9). Sin embargo, a pesar de esta propiedad el cultivo en monocapa es utilizado actualmente con la finalidad de estimular la proliferación de los condrocitos; esta característica es importante tomando en cuenta que el número de células es un factor limitante ya que el cartílago es un tejido con una baja tasa de recambio celular.

Lahiji y col. (10) cultivaron condrocitos humanos sobre películas de quitosán y observaron que las células mantienen su morfología esférica, proliferan y expresan componentes de matriz específicos de la matriz extracelular, como son el colágeno tipo II y agregan después de siete días de cultivo, en contraste con la células sembradas sobre plástico donde un 90 % adquiere una morfología alargada tipo fibroblasto. El quitosán es un polímero biodegradable, no tóxico de glucosamina y N-acetil glucosamina, el cual forma parte del esqueleto de insectos e invertebrados marinos. La biocompatibilidad de este sustrato con los condrocitos en cultivo ha sido atribuida a que su estructura se asemeja a la de los GAGs que componen la matriz del cartílago, como son el keratán sulfato y el ácido hialurónico, los cuales están formados por residuos de N-acetil glucosamina.

Otro factor crítico es el tipo de matriz utilizada donde se insertan los condrocitos. En este trabajo se utilizó una matriz de colágeno tipo I observándose que la mayoría de las células mantienen su morfología esférica y sintetizan componentes de matriz característicos como GAGs y colágeno tipo II, los cuales son marcadores de la estabilidad fenotípica, y uno de los factores importantes para el desarrollo de neotejidos *in vitro* (7,11). Nuestros resultados coinciden con lo observado en algunos estudios en los que trabajando con células de cartílago articular de caninos, se pudo determinar que los condrocitos que han sido mantenidos en cultivos de monocapas hasta el segundo pasaje, mantiene la capacidad de biosíntesis de colágeno tipo II cuando se usa una matriz combinada de colágeno tipo I-GAG (12).

Esto es importante ya que, se ha establecido que el sustrato tridimensional mantienen el fenotipo de los condrocitos, porque provee de un soporte mecánico a las células para la formación de un nuevo tejido, con la ventaja de que definen y mantienen un espacio tridimensional para la formación de un nuevo tejido con una estructura apropiada y guían su desarrollo funcional (7).

Como se ha planteado anteriormente para la producción de tejidos *in vitro* se requiere un considerable conocimiento de las células que garantice su crecimiento y la producción de proteínas específicas del tejido nativo. Para lograr esto es importante obtener modelos *in vitro* que permitan estudiar los factores que mantenga el fenotipo diferenciado, creando un medio ambiente apropiado para el desarrollo tisular y que se mantenga la función celular (8).

Recientemente se ha podido mostrar que el plasma rico en plaquetas puede ser una fuente de factores de crecimiento que estimulan la proliferación de condrocitos articulares y la biosíntesis de la matriz (13).

Otro aspecto importante es caracterizar las técnicas de criopreservación para este tipo de células, en este sentido, en este trabajo se congelaron condrocitos cultivados de diferentes pasajes por largo plazo, hasta por 9 meses y luego se descongelaron. Se pudo determinar que no hay una pérdida del potencial de proliferación independiente del número de pasajes realizados. Sin embargo, no se mantiene el fenotipo, esto va a depender de las condiciones *in vitro* donde las células se mantienen y algunos autores han planteado que el número de pasajes es un factor importante que puede afectar la calidad del tejido producido *in vitro* (14).

Es importante señalar que utilizando el sistema de cultivo de micromasas a altas densidades, no ocurre la transformación del fenotipo y las características del neotejido formado es similar al tejido nativo (15). Estos resultados también se han observado en células mesenquimales del tejido adiposo, las cuales mantienen su potencial de proliferación y diferenciación aun cuando han sido mantenidas por 6 meses de congelación (16). La capacidad de proliferación de estas células progenitoras mesenquimales, su potencialidad para diferenciarse en diferentes linajes de tejido conectivo y su baja inmunogenicidad, ha permitido también su reciente uso en la bioingeniería de tejidos (17), para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o provean tejidos funcionales.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Proyecto Grupo CDCH PG 03.00.6519.2006

## REFERENCIAS

1. Lemare F, Steimberg N, Griel C, Demignot S, Adolphe M. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1b. *J Cell Physiol.* 1998;176:303-313.
2. Perka C, Spitzer R, Lindenhayn K, Sittinger M, Schultz O. Matrix-mixed culture: New methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *Biomed Mater Res.* 2000;49:305-311.
3. Freed L, Martin I, Vunjak-Novakovic G. Frontiers in tissue engineering. *Clin Orthop.* 1999;367S:46-58.
4. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund E, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002;30(1):2-12.
5. Archer CW. The isolation and partial characterization of stem cell-like from aged human articular cartilage. *Osteoarthritis & Cartilage.* 2007;15:Suppl. C. p. C4. Doi: 10.1016/51063-4554(07)616-10-0.
6. Steinwachs M. New technique for cell-seeded collagen matrix-supported autologous chondrocyte transplantation. *Arthroscopy.* 2009;25:208-211.
7. Pineda K, Merentes E, Starosta R. Caracterización morfológica y bioquímica de condrocitos *in vitro*. *Rev Inst Nac de Hig "Rafael Rangé"*. 2004;35(1):6-11.
8. Melero-Martin JM, AlRubei M. *In vitro* expansion of chondrocytes. *Topics Tissue Eng.* 2007;3:1-37.
9. Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M, Kurioka H, Katsube K. Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen. *J Biomed Mater Res.* 2000;50:138-143.
10. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D, Frondoza C. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:586-595.
11. Merentes E. Bioingeniería de cartílago. *MIBE.* 2005;4:19-22.
12. Waldman S, Spiteri G, Grynepas M, Pillaiar R, Kandel A. Long-term intermittent stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* 2004;10:1323-1331.



13. Akeda K, An HS, Okum M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ-MA, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:1272-1280.
14. Kang S, Yoo SP, Kim BS. Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage. *Biomed Mater Eng*. 2007;17:269-276.
15. Zhang Z, McCaffery M, Spencer R, Francomano C. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat*. 2004;205:229-237.
16. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *REVISTA*. 2008; 121(2):401-410.
17. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: The current status. *Cell Tissue Res* (2011) pp. 1-15. doi:10.1007/s00441-011-1243-1.

## Recomendaciones para el uso de la vacuna del virus del papiloma humano en hombres. Comité Asesor en Prácticas de Inmunización 2011

El 25 de octubre de 2011, el Comité asesor en prácticas de inmunización (CAPI) recomendó el uso rutinario de la vacuna contra los tipos 6, 11, 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH4; Gardasil, Merck & Co. Inc.), en hombres de 11 o 12 años. También recomendó la vacunación entre 13 y 21 años a hombres no vacunados previamente o quienes no hubieran completado la serie de 3 dosis; los hombres entre 22 y 26 años pueden también ser vacunados (1). Estas recomendaciones reemplazan las de octubre de 2009, cuando el CAPI recomendó la vacunación en hombres entre 9 y 26 años, de acuerdo con la información obtenida en la prevención de la neoplasia intraepitelial anal grado 2 o 3 (NIA2/3), seguridad de la vacuna, estimaciones de enfermedad y cáncer producidos por VPH, estudios de coste-efectividad y otras consideraciones programáticas.

En 2009 la vacuna se recomendó en hombres para la prevención de las verrugas genitales y en 2010 se agregó la prevención del cáncer anal, tanto en hombres como mujeres. De acuerdo con los datos disponibles la cobertura con la vacuna VPH es baja. Para 2010, con 1 dosis la cobertura alcanzó 48,7 % y con 3 dosis 32,0 %, en mujeres de 13 a 17 años. Para hombres del mismo grupo de edad la cobertura con 1 dosis fue menor al 2 %.

Se estima que anualmente se registran en EE.UU, alrededor de 22 000 cánceres asociados a los tipos 16 y 18 del VPH, de los cuales unos 7 000 ocurren en hombres (orofaríngeos, anales o penales). Entre 1973 y 2007, la incidencia de cáncer orofaríngeo fue del 1 % anual y la de cáncer anal del 3 %. Aproximadamente 250 000 casos de verrugas genitales (condilomatosis) se registran en hombres sexualmente activos.

La eficacia de la vacuna ha sido demostrada en varios estudios de fase III. En algunos protocolos se ha alcanzado casi un 90 % de prevención de verrugas genitales relacionadas con los tipos 6, 11, 16 y 18 del VPH (LC 95 % 65,3-97,9). La prevención de la NIA2/3 varió entre 75 % y 78 %.

Los datos de inmunogenicidad muestran una alta seroconversión en hombres de 9 a 15 años en comparación con los de edades entre 16 y 26 años, para los cuatro tipos del virus VPH, lo cual concuerda con la ausencia de infecciones asociadas al VPH en los vacunados. Hasta la fecha no se ha determinado un título mínimo de anticuerpos protectores, tanto en hombres como en mujeres.

Los ensayos clínicos en aproximadamente 5 300 hombres han demostrado que el evento adverso más común es la reacción en el sitio de la inyección. Cefalea y fiebre fueron los eventos sistémicos más comúnmente reportados, tanto en los vacunados como en los controles. Desde que la vacuna fue licenciada, alrededor de 40 millones de dosis de VPH4 han sido distribuidas hasta septiembre de 2011. El número de eventos adversos no ha variado significativamente en relación con los ensayos antes de la aprobación de la vacuna para su uso. El CAPI recomienda la observación por al menos 15 minutos de todo sujeto vacunado.

- (1) CDC. Recommendations on the use of quadrivalent human papillomavirus vaccine in males. Advisory Committee on immunization practices (ACIP), 2011. (doi)MMWR 23 diciembre 2011; 60(50): 1705-1708 (Accedido el 23 de diciembre de 2011).