



---

---

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

**Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra  
E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana  
del cérvix uterino**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRÍA EN  
MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA:**

**Lic. en Ciencias Farmacéuticas Melissa Gil Delgado**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl**

**Cuernavaca, Morelos, México, a diciembre de 2025**

**Cuernavaca, Morelos, México, a diciembre de 2025**

**Miembros del comité tutorial:**

Tutor Personal: Dra. Gabriela Rosas Salgado

Vocal 1: Dra. Dolores Azucena Salazar Piña

Vocal 2: Dr. Aurelio Cruz Valdés

Vocal 3: Dr. José Luis Montiel Hernández

**Miembros del jurado de examen**

Presidente: Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes

Secretario: Dra. Gabriela Rosas Salgado

1er. Vocal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

2do. Vocal: Dr. Adolfo Pedroza Saavedra

3er. Vocal: Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

## **Agradecimientos**

Agradecimiento es una palabra pequeña que no logra englobar todo lo que necesito expresar hacia las personas que mencionaré. Esta maestría fue retardadora, no solo desde el punto de vista académico, sino también desde lo personal. Estar fuera de mi país y enfrentarme a cómo se hace ciencia lejos de casa me permitió crecer, conocerme más allá de los límites que creía tener y entender muchas cosas de mí misma. Nada de esto habría sido posible sin las personas que me han acompañado, incluso desde antes de que todo comenzara.

Gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí, por darme fuerzas en los momentos en los que quise claudicar y por mi existencia misma. Gracias infinitas a mi esposo, por su aliento constante, por su apoyo y por nunca dejarme caer cuando más lo necesitaba. A mis padres y a mi abuela, no importa qué tan lejos estemos, siempre serán el motor de mi vida. Sin ustedes no estaría hoy aquí, gracias por sus enseñanzas, por su amor y por acompañarme siempre.

A mis tíos y primos, por su apoyo incondicional y a mis amigos. José Miguel, fuiste quien me propuso intentarlo y en gran parte, estoy aquí gracias a ti. A Lea, Clau y Cami, su ayuda fue indispensable en cada una de las etapas de este proceso, incluso en las más difíciles de sobrellevar.

Gracias a mis compañeras de laboratorio por hacer el camino más llevadero y el día a día un poco más ligero y en especial a Lis. Quién nos hubiera dicho que una amistad podría forjarse en la sala de espera de un aeropuerto. Gracias por estar durante estos dos años, por acompañarme siempre y por escucharme, junto a Yoni, en cada momento.

Gracias a todos los profesores que formaron parte de mi vida académica en estos dos años, cada uno dejó una enseñanza que no olvidaré. Por último, gracias a la Dra. Lourdes Gutiérrez, por permitirme formar parte de su laboratorio y por su guía y apoyo durante todo este proceso.

A todos, mis más infinitas gracias.

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiología del Cáncer de Cérvix Uterino (CaCU) .....	7
1.2 Virus de Papiloma Humano (HPV): estructura y clasificación. ....	8
1.3 Historia natural de la infección por HPV. ....	9
1.4 Entorno actual de las pruebas diagnósticas para la detección de HPV, CIN y CaCU. ....	11
1.5 Proteínas biomarcadores celulares.....	13
1.6 La proteína E4 de HPV. Estructura, características y funciones. ....	14
1.7 E4 como biomarcador. Importancia de la proteína.....	16
1.8 Anticuerpos séricos como biomarcadores de infección y lesiones.....	18
<b>2. Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Pregunta de investigación. ....</b>	<b>22</b>
<b>4. Hipótesis. ....</b>	<b>22</b>
<b>5. Objetivo General. ....</b>	<b>22</b>
<b>6. Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>7. Materiales y Métodos .....</b>	<b>23</b>
7.1. Tipo de estudio y consideraciones éticas.....	23
7.1.2 Descripción de la población objeto de estudio.....	23
7.2 Producción y purificación de la proteína E4.....	25
7.3 Cuantificación de proteínas por BCA.....	26
7.4 Detección de los anticuerpos anti-E4 en suero por ELISA indirecto. ....	26
7.5 Tipificación de HPV en muestras biológicas.....	27
7.6 Análisis estadístico .....	27
7.6.1 Conversión de absorbancias a Unidades ELISA (UE/mL) y estimación del punto de corte. ....	27
7.6.2 Análisis sociodemográfico de la población de estudio, validación clínica de anticuerpos anti-E4 y ajuste del modelo por factores de riesgo.....	28
<b>8. Resultados .....</b>	<b>29</b>
8.1 Estandarización del ensayo de ELISA para detección de anticuerpos anti-E4 de HPV16.29	
8.1.1. Estandarización de la dilución del anticuerpo anti-Ig's totales biotinilado.....	29
8.1.2. Estandarización de la dilución de la estreptoavidina-HRP para el ensayo ELISA-E4 .....	30
8.1.3 Parámetros ajustados.....	30
8.2 Descripción de la población de estudio .....	31
8.3 Títulos y prevalencias de anticuerpos anti-E4 Ig's totales por grado de lesión de cérvix uterino.....	33
8.4 Validación clínica de detección de anticuerpos anti-E4 Ig's totales para detección de lesiones premalignas.....	34
8.5 Títulos y prevalencias de isotipos de anticuerpos (IgM, IgA, IgG) contra E4 de HPV en lesiones cervicales. ....	36

8.6 Rendimiento clínico de isotipos (IgM, IgA, IgG) de anticuerpos contra E4 de HPV. ....	37
<b>9. Discusión</b> .....	43
9.1 Anticuerpos contra HPV como biomarcadores. ....	43
9.2. $\alpha$ -E4/IgG como biomarcadores de progresión de lesiones de alto grado. ....	44
9.3. $\alpha$ -E4/IgA como biomarcadores de la regresión de las lesiones. ....	45
9.4 $\alpha$ -E4/IgM presentes en mujeres sin lesión y con lesión en el cérvix uterino.....	45
9.5 Factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos y a las lesiones del cérvix uterino.....	45
9.6 Detección de anticuerpos contra E4 como prueba complementaria a la colposcopia y al Papanicolaou.....	47
<b>10. Conclusiones</b> .....	49
<b>11. Referencias bibliográficas</b> .....	50
<b>12. Anexos</b> .....	58

## Resumen

El cáncer de cérvix uterino continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, pese los avances en prevención. La citología, la colposcopia y la detección de DNA y RNA de HPV son pruebas claves en la detección de este cáncer; pero presentan limitaciones relacionadas con su especificidad y variabilidad en la interpretación del analista. En este sentido, los biomarcadores MCM, Ki-67 y p16 han surgido como una alternativa, sin embargo, su presencia no es exclusiva para el HPV, el CaCU y las lesiones asociadas. La proteína E4 se ha propuesto como biomarcador de las lesiones de bajo grado del cérvix uterino, siendo el transcripto más abundante de las lesiones productivas. Los anticuerpos séricos contra las proteínas del HPV son una alternativa viable, ya que permiten detectar de manera indirecta y amplificada la presencia de antígenos virales, asociándose además con las diferentes etapas de la infección. Teniendo en cuenta esto el objetivo fue: "Evaluar el perfil de inmunoglobulinas séricas IgM, IgA e IgG contra E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana del cérvix uterino". Este es un estudio retrospectivo transversal realizado con un banco de sueros de 169 mujeres de 18 a 65 años con diferentes grados de lesión en cérvix, del Hospital General de Cuautla "Dr. Mauro Belauzarán Tapia". La detección de las inmunoglobulinas se realizó por ELISA con antígeno HPV16 E4 producido in vitro. La prevalencia general de anti-E4 en la población de estudio fue de 28.4%, y de esto el 30% fueron mujeres Sin Lesión (SL), CIN1 22.5%, CIN2 27.5%, CIN3 29.4% y CaCU 40%. Análisis de regresión logística de anti-E4 ajustado por características sociodemográficas, mostró una sensibilidad de 21.6%, una especificidad de 92.1% y un AUC de 0.6867, lo que sugiere ser un buen marcador. Entre los isotipos, IgG fue el que mejor rendimiento mostró, presentando una clara asociación con lesiones de alto grado, sugiriéndose como un biomarcador de progresión. Los anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG representan una alternativa complementaria a la citología y la colposcopia, con un gran potencial para lograr la identificación temprana de mujeres con riesgo de progresión a CaCU, siendo este el hallazgo de mayor relevancia en el estudio. El isotipo IgM fue el más prevalente en todos los grupos, aunque refleja principalmente infecciones recientes o reinfecciones, su presencia en todos los grados del cérvix uterino hace que su papel como biomarcador diagnóstico independiente se vea limitado. Mientras que, la presencia de IgA a nivel sérico podría estar asociado a procesos de regresión de las lesiones dada su presencia en las mujeres Sin Lesión y con CIN2. Factores de riesgo como la edad, el tiempo de actividad sexual, el número de parejas sexuales y la multiparidad mostraron asociaciones consistentes con los distintos isotipos, confirmando que su presencia puede contribuir al desarrollo de la enfermedad hasta llegar a lesiones de alto grado o cáncer.

### **1. Introducción**

#### **1.1 Epidemiología del Cáncer de Cérvix Uterino (CaCU)**

El cáncer de cérvix uterino (CaCU) ocupa el cuarto lugar entre los tipos de cáncer con mayor incidencia en mujeres a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte en la población femenina. En la mayoría de los casos (99.7%), su aparición está estrechamente vinculada a la infección por el Virus de Papiloma Humano (HPV; del inglés, Human Papillomavirus). Entre los diferentes tipos virales, el HPV16 es el más común y está fuertemente asociado con la aparición de lesiones de alto grado (HSIL; por sus siglas en inglés, High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) y con la progresión hacia el CaCU <sup>(1,2,3,4)</sup>.

Durante el año 2022 se estimaron 662,301 nuevos casos de cáncer de cérvix uterino y 348,874 muertes asociadas al mismo, esto según lo reportado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC; del inglés, International Agency for Research on Cancer), ubicándolo en el cuarto lugar entre las causas de muerte por cáncer en mujeres. De estos fallecimientos, cerca del 85% ocurre en países en vías de desarrollo, donde las estrategias de detección y vacunación aún son limitadas <sup>(1, 4)</sup>. Las regiones con mayores tasas de incidencia y mortalidad se concentran principalmente en Asia, África y América Latina, mientras que en América del Norte, Europa y Australia los índices disminuyen hasta diez veces <sup>(4, 5)</sup>. Se proyecta que para el año 2040 el número de nuevos casos a nivel mundial podría aumentar hasta en un 40% alcanzando los 847,306 de los cuales 83,000 corresponderían a América Latina <sup>(5)</sup>. En América Latina, el CaCU ocupa el tercer lugar entre los cánceres más frecuentes en mujeres, con alrededor de 63,171 nuevos casos en 2022. Brasil y México encabezan la lista con 18,715 y 10,348 nuevos casos respectivamente <sup>(5)</sup>. En México, la enfermedad continúa siendo un problema relevante de salud pública sobre todo en mujeres con escasos recursos y con acceso limitado a los servicios médicos <sup>(5)</sup>.

La incidencia del CaCU aumenta a partir de los 20 años y alcanza su punto máximo entre los 35 y 39 años, siendo la edad promedio de diagnóstico alrededor de los 49 años y la de muerte los 58 <sup>(6)</sup>. Entre los principales factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad se encuentran el tabaquismo, el tiempo de actividad sexual, la multiparidad, las múltiples parejas sexuales, el inicio temprano de la actividad sexual y la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV, del inglés, Human Immunodeficiency Virus) y la clamidia.

En consecuencia, resulta necesario seguir profundizando en el estudio del virus y de los mecanismos mediante los cuales logra establecerse, persistir y provocar los cambios celulares que dan origen a las lesiones del cérvix uterino. Comprender su estructura y su ciclo de vida es fundamental para entender el desarrollo de la enfermedad y para avanzar en la búsqueda de estrategias de detección y prevención más efectivas.

### **1.2 Virus de Papiloma Humano (HPV): estructura y clasificación.**

Los Virus de Papiloma Humano (HPV) pertenecen a la familia Papillomaviridae <sup>(7)</sup>. Son virus pequeños, sin envoltura y contienen DNA de doble cadena circular con un tamaño aproximado de 8,000 pares de bases. Su cápside es icosaédrica y está formada por 72 capsómeros pentaméricos que protegen el material genético <sup>(1, 7, 8)</sup>. Hasta la fecha se han identificado 200 genotipos distintos de HPV, los cuales se agrupan en cinco diferentes géneros (*Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Mu*, *Nu*) basados en la secuencia de nucleótidos de la región del marco abierto de lectura (ORF; del inglés, Open Reading Frame) de L1 <sup>(1,2)</sup>. Los tipos *Alfa* son los que infectan principalmente las mucosas, mientras que los géneros *Beta* y *Gamma* están asociados a lesiones cutáneas benignas <sup>(1)</sup>.

El genoma del HPV se divide en tres regiones bien definidas: una región temprana (E) que incluye los genes que codifican para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7; una región tardía (L) que contiene los genes que codifican para las proteínas de la cápside L1 y L2 y una región no codificante (LCR; del inglés, Long Control Region) encargada de regular la replicación y transcripción viral <sup>(3)</sup>.

Para HPV16 se han descrito dos promotores principales p97 que controla la expresión de los genes tempranos, ubicándose antes del gen E6 y p670 responsable de la expresión de los genes tardíos, situado dentro del marco de lectura de E7 <sup>(9)</sup>.

De acuerdo con su potencial oncogénico los HPV se clasifican en bajo y alto riesgo. Los de bajo riesgo se asocian principalmente con verrugas o lesiones benignas, mientras que los de alto riesgo están directamente implicados en el desarrollo de neoplasias intraepiteliales y el cáncer <sup>(1)</sup>. La IARC ha identificado 14 tipos de HPV de alto riesgo, entre los que se destacan el HPV16 y EL HPV18 dado que son los de mayor incidencia, además de HPV31, 33, 35, 45, 52 y 58 como los más relevantes por su capacidad para inducir carcinogénesis <sup>(10)</sup>.

### **1.3 Historia natural de la infección por HPV.**

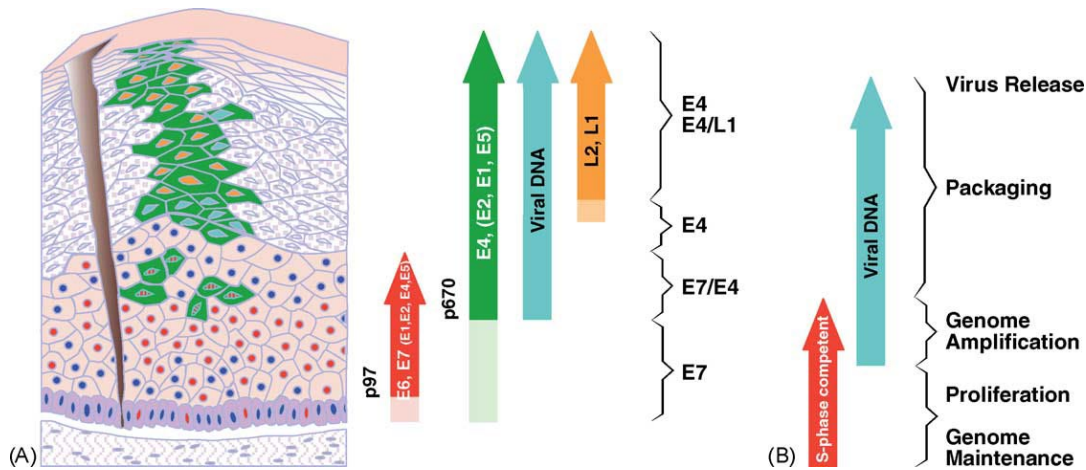
El cérvix uterino constituye la parte inferior del útero y está conectado a la vagina a través del canal endocervical. Dicho canal se encuentra revestido por dos tipos de epitelios uno escamoso estratificado que cubre el ectocérvix y otro columnar, que recubre el endocérvix. La unión entre ambos tipos celulares se conoce como unión escamocolumnar y es precisamente en esta zona donde ocurre con mayor frecuencia la infección por HPV <sup>(11)</sup>.

El virus penetra en el epitelio a través de microabrasiones o microheridas que permiten su acceso hacia las capas basales, donde se encuentran las células con mayor capacidad proliferativa. Este paso inicial es determinante debido a que las células basales son las únicas que permiten el establecimiento de la infección <sup>(12,13)</sup>.

Una vez que el virus ingresa al epitelio, la proteína mayor de la cápside (L1), se une a receptores específicos de la superficie celular, principalmente proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG). Lo que desencadena un cambio estructural en la cápside viral, quedando expuesta la proteína L2, facilitando así la entrada del genoma viral al interior de la célula mediante un proceso endocítico. Posteriormente, el DNA viral se transporta hasta el núcleo donde permanece en forma episomal <sup>(12,13)</sup>.

Durante la fase inicial de la infección, las proteínas E1 y E2 regulan la replicación del genoma viral, mientras que las oncoproteínas E6 y E7 interfieren en los mecanismos de control del ciclo celular mediante la degradación de las proteínas p53 y pRb, respectivamente, evitando así la apoptosis y asegurando la replicación viral <sup>(13)</sup>.

Conforme las células infectadas migran hacia las capas superficiales del epitelio, se activa la expresión tardía del virus donde intervienen los promotores p97 y p670, que regulan la producción de proteínas como E4, L1 y L2. En este punto, la proteína E4 facilita la amplificación del genoma viral y participa en la liberación de los nuevos viriones, mientras que E5 contribuye a la evasión de la respuesta inmune al interferir con la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) <sup>(12, 13)</sup>. Por último, la liberación de los viriones ocurre cuando las células superficiales infectadas completan su proceso de diferenciación y mueren permitiendo la salida y diseminación de los viriones hacia las células vecinas <sup>(13)</sup> (**Fig.1**).



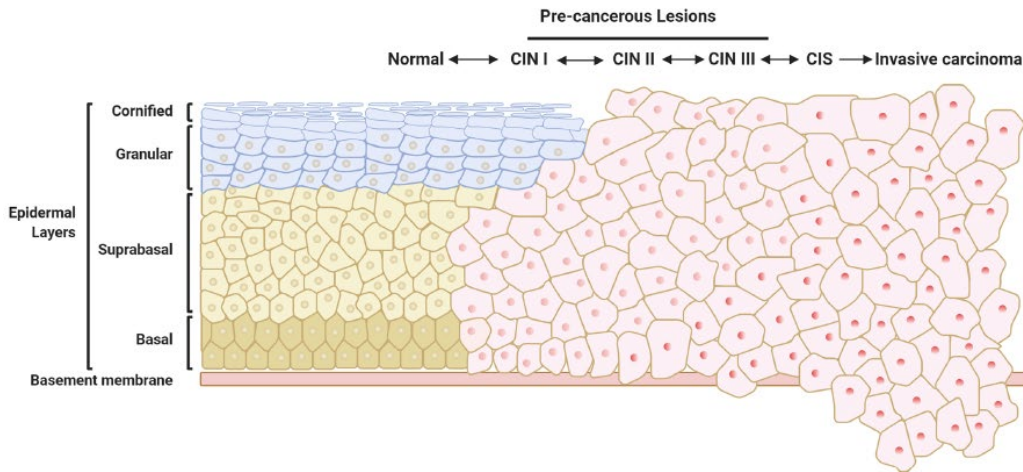
**Figura 1. Ciclo de vida del HPV16 durante la infección productiva.** (A) Representación de la piel para observar el patrón de expresión genética de HPV16, a medida que migra el virus hacia la superficie celular. Tras la infección, el genoma viral se mantiene en forma episomal en un número bajo de copias. Durante la diferenciación epitelial, el promotor p97 dirige la expresión de los genes E6 y E7 necesarios para la entrada en la fase S (rojo). El promotor p670 se regula al alza en las capas epiteliales superiores, las proteínas de replicación viral (E1, E2, E4, E5) aumentan en abundancia (verde), facilitando la amplificación de los genomas virales (azul). E4 persiste en las capas superiores, donde se encuentran las proteínas de la cápside viral (amarillo). (B) Las células de las capas epiteliales inferiores son componentes en fase S. La amplificación del genoma viral comienza en estas células, pero cesa una vez que pierden su capacidad de expresar las proteínas en la fase S (Tomado de Doorbar J, et.al. 2005 <sup>(14)</sup>).

La persistencia de la infección viral junto con la integración del DNA de HPV al genoma de la célula hospedera coinciden con alteraciones genéticas que favorecen la transformación neoplásica del epitelio cervical. Este proceso se manifiesta histológicamente como neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN; del inglés, Cervical Intraepithelial Neoplasia) que pueden ser:

- CIN1: El tercio inferior del epitelio se encuentra afectado.
- CIN2: Se afectan al menos dos tercios del epitelio.
- CIN3: Se afectan más de dos tercios del epitelio y puede progresar a CaCU <sup>(3, 11)</sup>

(Fig.2).

El diagnóstico temprano de estas lesiones es esencial, ya que la progresión hasta CaCU puede tardar entre 10 y 12 años. Durante este tiempo, la infección puede progresar, persistir o avanzar, dependiendo de la respuesta inmunológica del huésped, el tipo viral y los factores de riesgo asociados. Comprender cada una de estas etapas permite explicar la evolución natural de la infección y resalta la importancia de contar con herramientas diagnósticas más sensibles y específicas que faciliten la detección oportuna de las lesiones precursoras del CaCU.



**Figura 2. Epitelio del cérvix uterino.** Diferentes grados de lesión que se producen en consecuencia a la infección por HPV (Tomado de Scarth JA, et.al. 2021)<sup>(9)</sup>.

#### 1.4 Entorno actual de las pruebas diagnósticas para la detección de HPV, CIN y CaCU.

La detección de las neoplasias intraepiteliales cervicales y el cáncer de cérvix uterino comenzó con la prueba de Papanicolau (Pap) en la década de 1950. Esta técnica consiste en recolectar células de la zona de transformación del cuello uterino con una espátula o pequeño cepillo llamado cytobrush. Posteriormente, las muestras se tiñen y se observan al microscopio para identificar alteraciones celulares de tipo canceroso o precanceroso, como el agrandamiento nuclear, irregularidades en la membrana nuclear o la hiper cromasia. Esta prueba permite predecir la presencia de lesiones, aunque no determina si el HPV está presente <sup>(15, 16, 17)</sup>. Cuando el resultado del Pap indica lesión, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda realizar una colposcopia. Esta consiste en la inspección visual del cérvix por parte de un experto mediante la aplicación de ácido acético y Lugol, lo que facilita la identificación de posibles áreas alteradas del cérvix uterino <sup>(18)</sup>. No obstante, tanto el Pap como la colposcopia presentan limitaciones, ya que se basan en la morfología celular y en la interpretación subjetiva de los cambios inducidos por el HPV, lo que puede dar lugar a sesgos. En el caso del Pap, una toma de muestra inadecuada también podría afectar la sensibilidad de la prueba y requerir la repetición de frotis, con el riesgo inevitable de que algunas pacientes se pierdan durante el seguimiento <sup>(15, 16, 17)</sup>.

Con el fin de superar estas limitaciones, se han desarrollado pruebas para la detección del DNA de HPV, basadas en el hecho de que el cáncer de cérvix uterino se asocia en un 99% con la infección por este virus <sup>(16)</sup>. Estas pruebas se realizan a partir de una biopsia de

tejido cervical, la cual se analiza mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; del inglés, Polymerase Chain Reaction). Este método permite amplificar el genoma viral e identificar el tipo de HPV presente en la muestra <sup>(18)</sup>. Aunque su especificidad es variable (47-80%), la sensibilidad para detectar lesiones precancerosas es alta (90-100%), por lo que se consideran adecuadas para la detección temprana, permitiendo la identificación de las mujeres negativas y, por tanto, con un riesgo mínimo de desarrollar la enfermedad <sup>(16, 17)</sup>. Sin embargo, la utilidad de las pruebas de DNA de HPV se ve limitada por la alta prevalencia de la infección en la población general. Muchas mujeres, especialmente las menores a 30 años, presentan infecciones transitorias o asintomáticas que suelen resolverse de manera espontánea. Por esta razón, estas pruebas se emplean con mayor frecuencia en mujeres mayores a 30 años en quienes, la infección tiende a persistir <sup>(16)</sup>. Además, a pesar de su efectividad en la detección de las lesiones de alto grado (HSIL), las pruebas de DNA de HPV aún presentan limitaciones relacionadas en gran medida con la correcta toma de la muestra, lo que puede conducir a un sobrediagnóstico y sobretratamiento, propiciando la sobresaturación de los sistemas de salud <sup>(16, 18)</sup>.

En este contexto las pruebas basadas en la detección de mRNA de HPV se han convertido en una opción prometedora dado que el mRNA refleja la expresión de genes virales y dado que el nivel de expresión de estos genes está directamente relacionado con la progresión de la enfermedad, su detección temprana representa un marcador sólido para el diagnóstico y la clasificación. En particular, las regiones correspondientes a los transcritos de los oncogenes E6 y E7 han adquirido gran relevancia ya que suelen estar presentes en mujeres con infecciones activas ya sea de tipo productivas o transformadoras y ausentes en aquellas con DNA de HPV positivo para una infección reciente <sup>(16)</sup>. No obstante, al igual que las pruebas de DNA, las basadas en mRNA todavía no discriminan con exactitud entre las infecciones de bajo grado que pueden resolverse de manera espontánea y las lesiones precancerosas de alto grado. Además, no permiten identificar el tipo específico de HPV cuando existen múltiples infecciones activas en una misma lesión <sup>(19)</sup>. Estas limitaciones han impulsado a la búsqueda de metodologías complementarias, entre las cuales el uso de biomarcadores con resultados claros y reproducibles representa una alternativa prometedora.

### **1.5 Proteínas biomarcadores celulares.**

Los biomarcadores son moléculas biológicas que pueden medirse en muestras de sangre, orina u otros fluidos corporales y que brindan información sobre procesos biológicos, siendo herramientas útiles en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, como el cáncer <sup>(20)</sup>.

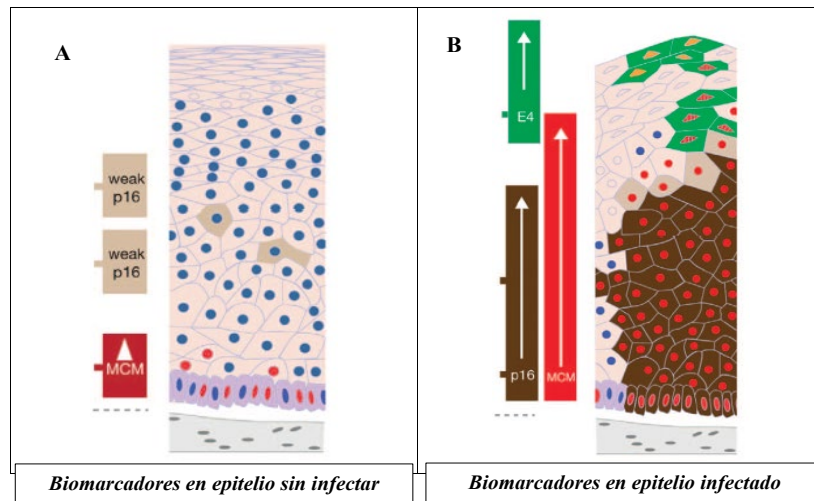
Cuando la infección por HPV persiste en el epitelio del cérvix uterino, tanto el genoma viral como el del huésped sufren alteraciones, mediadas en gran medida por las oncoproteínas E6 y E7, tal y como se mencionó anteriormente. El incremento en la expresión de estas proteínas conduce a la sobreexpresión de ciertos reguladores del ciclo celular entre los que se encuentran p16, Ki-67 y MCM. Estas proteínas han demostrado ser valiosas como biomarcadores subrogados de la actividad de E6 y E7, siendo considerado p16 como el "estándar de oro" entre ellos <sup>(21)</sup>.

Después de p53, p16 es el segundo gen supresor de tumores más frecuente, regula vías clave del ciclo celular, incluyendo pRb-E2F y su sobreexpresión se ha propuesto como un biomarcador subrogado de la oncoproteína E7. En células infectadas por HPV, la degradación de pRb promovida por E7 provoca la activación de E2F y con ello la expresión descontrolada de p16 <sup>(22, 23)</sup>. En el epitelio cervical sano, la expresión de p16 es prácticamente nula mientras que en las lesiones asociadas a HPV de alto riesgo puede estar significativamente aumentada (**Fig.3**). A pesar de ello, su expresión difusa en CIN1 y su presencia en otros cánceres no relacionados con HPV limitan su especificidad diagnóstica <sup>(22, 24, 25)</sup>.

Por su parte, Ki-67 es otra proteína útil en la evaluación de la proliferación celular. Está presente en todas las fases activas del ciclo celular (excepto en G0) y por tanto, ha sido empleada para estimar la fracción de células en división. En el cérvix normal, Ki-67 se limita a las capas basales, mientras que en lesiones CIN su expresión se extiende a todo el espesor epitelial. No obstante, también puede estar aumentada en otras condiciones hiperproliferativas, lo que representa una limitación para su especificidad <sup>(23)</sup>.

MCM-2 es una helicasa asociada a la replicación del DNA cuya expresión también se ve incrementada en presencia de E6 y E7. Mientras que en epitelios normales su expresión se restringe a las capas basales, en las lesiones de alto grado alcanza hasta los dos tercios superiores del epitelio, lo que la posiciona como biomarcador útil para CIN3 y CaCU (**Fig.3**). Sin embargo, su presencia no es exclusiva del cáncer de cérvix uterino <sup>(21, 23)</sup>.

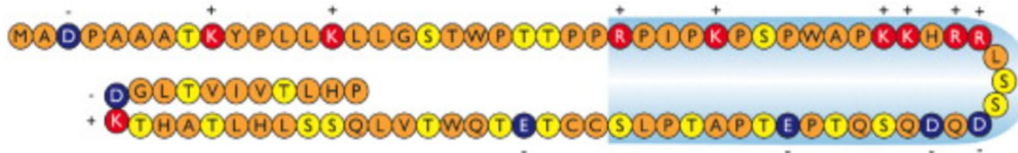
La proteína E4 se ha propuesto también como un posible biomarcador en la identificación de las lesiones tempranas del cérvix.



**Figura 3. Biomarcadores del epitelio estratificado del cérvix uterino durante la infección por HPV.** (A): En el epitelio no infectado, la proteína celular MCM (roja) generalmente es detectable en niveles bajos solo en las capas de células basales y parabasales. La presencia de la proteína p16 es débil en el epitelio no infectado. B. Las proteínas MCM (roja) y p16 (marrón) se encuentran sobre expresadas y en gran parte del epitelio. La proteína E4 (verde) se observa en abundancia en las capas superiores (Modificado de Griffin H, et.al.2015 <sup>(26)</sup>).

### 1.6 La proteína E4 de HPV. Estructura, características y funciones.

La proteína E4 está codificada en un ORF dentro de la Región de Expresión Temprana del HPV. El ORF de E4 está contenido dentro del ORF de E2, mientras que el codón de inicio para su traducción se encuentra dentro del mRNA que codifica para E1. Su expresión ocurre justo antes de las proteínas de la cápside L1 y L2, iniciándose cuando la célula hospedera activa el promotor viral tardío <sup>(27)</sup>. E4 presenta un peso molecular aproximado de 10 a 44 kDa y su longitud varía según el tipo de HPV al que pertenezca, siendo en HPV16 de 92 residuos de aminoácidos <sup>(27)</sup>. Se puede dividir en tres regiones principales: la secuencia N-terminal rica en leucina, la región central rica en prolina y la secuencia C-terminal. Esta última, a su vez está compuesta por tres zonas: una región cargada positivamente, una región cargada negativamente y una región en bucle, donde la secuencia de aminoácidos experimenta un giro. Se ha propuesto que dicha región en bucle contiene los principales epítomos inmunes dominantes dentro de la proteína, siendo por tanto el sitio de unión de los anticuerpos <sup>(27, 28)</sup> (**Fig.4**).



**Figura 4. Estructura de la proteína E4 de HPV16.** La región en bucle se encuentra sombreada en azul. Los aminoácidos azules son los que se encuentran cargados negativamente, los rojos positivamente y los marcados en anaranjado son los ricos en prolina. (Tomado de Doorbar J, et.al.2013 <sup>(27)</sup>)

En HPV16 la proteína se localiza fundamentalmente en el citoplasma, aunque se ha observado también en el núcleo, pero en proporciones muy bajas. A diferencia de otros tipos de HPV, en los que se encuentra en gránulos de inclusión citoplasmáticos, en el epitelio se localiza en las capas superiores donde se ensambla en fibras similares a la amiloide <sup>(27, 29)</sup>.

Se le atribuyen a E4 varias funciones dentro del ciclo de vida viral, pues se ha demostrado su participación en la detención de la progresión del ciclo celular hacia la mitosis, específicamente en la fase G2, favoreciendo así la amplificación del genoma viral. En el caso de HPV16, esto ocurre mediante el secuestro de los complejos CiclinaB/CDK1 y CiclinaA/CDK2, ambos esenciales para la progresión del ciclo celular. Este secuestro está mediado por la región central de la proteína, entre los aminoácidos 17 y 45, e involucra los residuos T22 y T23 (supuesto sitio de unión de la CDK), en lugar del sitio RRL43 (supuesto sitio de unión de la ciclina) <sup>(30)</sup>.

La superposición de los ORF de E4 y E2 y el hecho de que ambas proteínas inhiben la división celular, sugiere un posible sinergismo entre ellas, actuando de manera antagónica frente a la proteína E7, la cual estimula la entrada de las células diferenciadas a la fase S, promoviendo así la proliferación celular <sup>(30, 31)</sup>.

E4 se une directamente a las queratinas, interaccionando fuertemente con la queratina 18, perteneciente a la familia de filamentos intermedios tipo I. Sin embargo, su unión con la queratina 8 (familia tipo II) es débil y no muestra afinidad por la vimentina. Esta interacción con las queratinas está mediada por los 16 aminoácidos presentes en su extremo N-terminal. Además, la fosforilación de E4 de HPV16 en T57 por las p42 MAPK potencia esta unión. En presencia de E4, la red de queratinas se entrecruza y posteriormente se desorganiza, provocando su colapso hacia la periferia nuclear. Se considera que este proceso facilita la liberación de los viriones <sup>(27)</sup>. Tras el colapso de la red, la proteína se asocia a las mitocondrias. El grupo leucina del extremo N-terminal es fundamental para esta interacción. E4 induce el desprendimiento mitocondrial de los

microtúbulos, seguido de la reducción de potencial de membrana mitocondrial y la activación de la apoptosis. La inducción de estas propiedades apoptóticas podría hacer que las células escamosas sean más frágiles, lo que facilita la liberación de los viriones (30, 31).

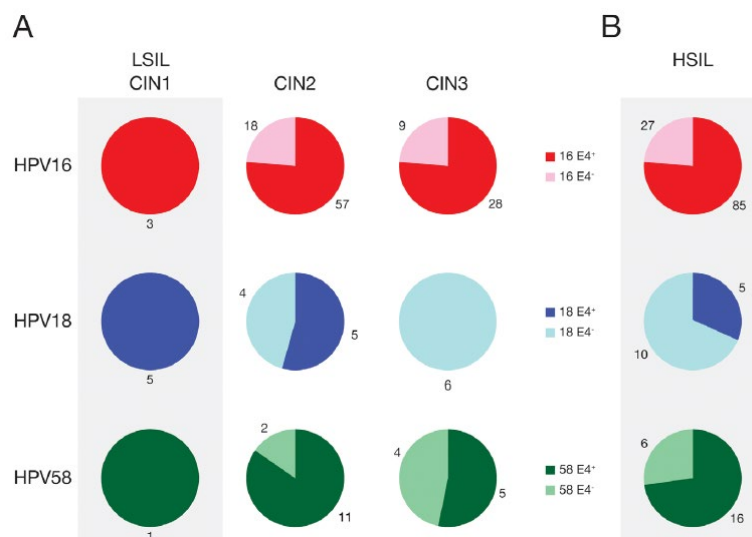
Otra función atribuida a E4 podría estar relacionada con su unión a la helicasa de RNA DEAD-box a través de su extremo C-terminal, alterando su actividad ATPasa. Sin embargo, la relevancia de esta interacción aún no está completamente esclarecida (31).

Tal y como se mencionó anteriormente, la proteína E4 ha sido considerada un blanco importante en la búsqueda de biomarcadores para la identificación temprana de las CIN que con el tiempo pueden progresar a CaCU.

### **1.7 E4 como biomarcador. Importancia de la proteína.**

E4 puede visualizarse fácilmente en biopsias mediante inmunotinción, lo que permite su detección en lesiones causadas por diversos tipos de HPV, incluyendo los que afectan a perros, conejos, ganado y humanos, representando además el transcrito más abundante de las lesiones productivas (20-30%) (19).

En un estudio realizado por Griffin Heater et al. 2012, se observó la posibilidad de utilizar anticuerpos monoclonales generados contra E4 para detectar y asignar el tipo de HPV presente cuando coexisten varios tipos en una misma muestra de tejido. Los autores reportaron que la expresión de E4 es abundante en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), mientras que en las de alto grado (HSIL) su presencia es baja o incluso está ausente. La expresión de E4 disminuye progresivamente a medida que avanza el grado de la lesión, mostrando una relación inversamente proporcional con dicho grado de lesión (**Fig.5**). Este fenómeno podría deberse a que, en el CIN3, ocurre una mayor integración del DNA viral, alterándose el ORF que codifica para la proteína (19). Por tanto, E4 se ha considerado como un biomarcador prometedor para la detección de lesiones de bajo grado. Sin embargo, su aplicación actual requiere de la obtención de una biopsia, lo que representa una limitante ya que depende de la correcta toma de la muestra (19).



**Figura 5. Expresión de proteína E4 de diferentes tipos de HPV por grado de lesión del cérvix uterino.** Estudio realizado por (Griffin-Heater, et al. 2012) <sup>(19)</sup> donde se analizó la presencia de E4 en CIN1, CIN2 y CIN3 asociados a HPV16, HPV18 y HPV58, en un tamaño de muestra 158. Demostrándose una mayor presencia de E4 en las lesiones de bajo grado.

Como puede observarse, el uso exclusivo de un único tipo de biomarcador dificulta la determinación precisa de los diferentes estadios de la enfermedad. Por ello, se ha propuesto la utilización combinada de varios biomarcadores <sup>(24)</sup>. Por ejemplo, se ha demostrado que el diagnóstico de CIN puede ser más específico al combinar los patrones de expresión inmunohistoquímica de E4 con la expresión de p16<sup>INK4A</sup> <sup>(24)</sup>. Las lesiones con positividad p16 difusa pero limitada y positividad E4 probablemente representan lesiones productivas y de transformación temprana con una finalización variable del ciclo de vida del HPV y podrían tener una mayor probabilidad de regresión espontánea. Las lesiones ampliamente positivas para p16 y E4 negativas en pacientes y aquellas con una muestra de citología cervical positiva son a menudo lesiones  $\geq$ HSIL/CIN3 y lo más probable es que representen lesiones transformadoras avanzadas. Esto permite dividir a los CIN2 en CIN2 cercanos a CIN 1 (cuando hay positividad a E4 y p16 está en muy bajas proporciones o no está) y CIN2 cercanos a CIN3 (cuando hay positividad para p16 y E4 está en bajas proporciones o no está), lo que permite determinar si la CIN2 avanzará o retrocederá en el tiempo <sup>(24)</sup>. Aunque estas pruebas muestran una alta especificidad, todavía dependen del análisis de muestras de tejidos o de lavados cervicales en los cuales el número de células infectadas por HPV puede ser inferior al 1% lo que hace difícil la detección de pacientes con riesgo de desarrollar CaCU. Por ello se requieren pruebas con alta especificidad, pero menos invasivas. En este sentido la detección de anticuerpos séricos se ha convertido en una alternativa prometedora <sup>(17)</sup>.

### **1.8 Anticuerpos séricos como biomarcadores de infección y lesiones.**

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son proteínas sintetizadas en los vertebrados como respuesta a la exposición a antígenos, estructuras extrañas reconocidas por el sistema inmunológico. Desempeñan un papel crucial como mediadores de la inmunidad humoral, ofreciendo protección contra diversas clases de microorganismos<sup>(32)</sup>. Son conocidas cinco clases de anticuerpos: IgD, IgM, IgG, IgA e IgE<sup>(17, 33)</sup>.

Disímiles son los estudios que relacionan la asociación entre los anticuerpos y el riesgo de padecer cáncer.<sup>(33)</sup> Por ejemplo, se ha sugerido durante mucho tiempo que los anticuerpos (IgG e IgM) contra los antígenos del virus de la hepatitis B (anti-HBc) son factores predictivos del carcinoma hepatocelular (HCC)<sup>(33, 34, 35)</sup>. Otros informaron que existe un mayor riesgo de aparición del cáncer gástrico en pacientes con títulos de IgG anti-*H. pylori* indetectables<sup>(36)</sup>. Lo que sugiere que dada la fuerte asociación entre el riesgo de presentar una enfermedad y la presencia de las inmunoglobulinas es de suponer que las Ig pueden ser biomarcadores eficaces en la detección de patologías y en la determinación del estadio de las mismas.

HPV no es la excepción, pues durante décadas se ha estudiado la respuesta inmune humoral contra las proteínas del HPV para el análisis del ciclo viral, así como marcadores de cánceres asociados al virus en diferentes sitios anatómicos como ano, vulva, vagina, pene y cuello uterino<sup>(33, 37)</sup>. De manera general, los anticuerpos séricos contra proteínas de HPV son una forma indirecta de detectar la presencia de antígenos virales y ser asociados con el estadio de la infección y/o de la enfermedad, lo que les permite tener un alto potencial como biomarcadores de las neoplasias y el cáncer. La expresión de las proteínas del virus se ha correlacionado con datos serológicos, siendo útil en la posible determinación de infecciones previas, presentes y persistentes. De manera general las inmunoglobulinas IgM se han correlacionado como posibles biomarcadores de una infección temprana o actual, las IgA, el isotipo predominante en las superficies mucosas y en las secreciones, en ocasiones se ha relacionado con procesos de eliminación y por último, las IgG, la clase predominante de anticuerpos en el suero humano, se ha relacionado con infecciones persistentes o pasadas<sup>(17, 38)</sup>.

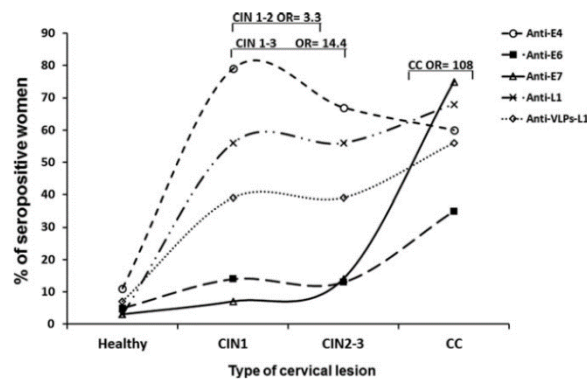
Son varios los estudios que han tratado de relacionar la presencia de anticuerpos contra las proteínas del HPV y los diferentes grados de lesión. A continuación, se muestran algunas de las conclusiones a las que se han arribado en dichos estudios:

- **Anticuerpos anti-L1:** Se ha detectado la generación de anticuerpos neutralizantes contra L1 (entre 8 y 9 meses) siendo la respuesta lenta <sup>(39)</sup>. Recientemente un estudio demostró la posibilidad de emplear anticuerpos IgG como predictores de progresión y anticuerpos IgA como predictores de regresión, esto en los diferentes estadios del cáncer orofaríngeo <sup>(40)</sup>.
- **Anticuerpos anti-VLP-L1:** Se ha observado una asociación entre los IgG contra VLP-L1 y la detección de DNA de HPV16, especialmente alrededor de ocho meses después del diagnóstico. Apareciendo estos anticuerpos con mayor frecuencia en mujeres con alta carga viral, lo que sugiere una infección persistente relacionada con la presencia de HSIL. <sup>(42, 41)</sup>.
- **Anticuerpos anti-E2:** La presencia de anticuerpos IgA contra E2, sugiere que pueden ser empleados como biomarcadores de las lesiones tempranas del cérvix uterino esto debido a su alta prevalencia en dichas lesiones (62%) en contraposición con las de alto grado (entre un 9 y un 31%) <sup>(17,43)</sup>.
- **Anticuerpos anti-E6:** Existe una fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos contra E6 de HPV16 en el cáncer orofaríngeo (OPC, del inglés, Oropharyngeal Cancer) y la aparición de la enfermedad, sugiriendo que dichas inmunoglobulinas pueden ser biomarcadores predictivos de la aparición de la enfermedad, eso debido a que su presencia se encontró hasta diez años antes <sup>(42)</sup>.
- **Anticuerpos contra E5:** Se ha sugerido que la presencia de anticuerpos contra E5 pueden estar asociados a la desaparición de la infección en mujeres sin lesión y con CIN1 <sup>(44)</sup>.

En otros estudios se ha analizado la relación que existe entre la presencia de los anticuerpos contra las oncoproteínas E6 y E7 como posibles biomarcadores para la detección del cáncer de cérvix uterino y las lesiones de alto grado. En el año 2014 en un artículo publicado por Damen Combes J y colaboradores, se identificó que la seroprevalencia de los anticuerpos dirigidos contra las oncoproteínas en CaCU exhibió un aumento significativo del 61% en pacientes con HSIL en comparación con las mujeres sanas <sup>(45)</sup>. Sin embargo, tanto los anti-E6 como los anti-E7 son factores predictivos de estadios tardíos de la enfermedad en los cuales el tratamiento y control de la misma es prácticamente imposible. Por tanto, se ha hecho necesario la búsqueda de biomarcadores de lesiones tempranas del cérvix uterino, lo que permitiría detectar oportunamente la enfermedad y dar tratamiento oportuno. Los anticuerpos contra E4 parecen ser una buena

alternativa, ya que E4 y los anticuerpos se expresan de forma temprana en el desarrollo de la enfermedad.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado la prevalencia de anticuerpos anti-E4 hasta en un 70% en mujeres con lesiones CIN1-2 viéndose disminuida la misma en las mujeres que presentaban CaCU (37, 46, 47). En una revisión llevada a cabo por Gutiérrez Xicotencatl y colaboradores en nuestro laboratorio, se presenta un gráfico (Fig. 6) donde se muestra la prevalencia de anticuerpos contra diferentes antígenos de HPV, esto en distintas poblaciones femeninas con diferente grado de lesión. Tras un análisis se puede observar que la prevalencia de anticuerpos séricos contra E4 es baja en mujeres sanas, experimentando un aumento en aquellas con lesiones CIN 1, y disminuyendo en mujeres con CIN2-3, siendo la mayor respuesta humoral la anti-E4. Lo que coincide con los patrones de expresión de la proteína mencionados con anterioridad (17).



**Figura 6. Prevalencia de anticuerpos anti-HPV en distintas poblaciones femeninas con diferente grado de lesión.** En el eje de las abscisas se muestran los diferentes tipos de lesiones del cérvix uterino (pacientes sanos, CIN1, CIN2-3, CaCU) y en el eje de las ordenadas el porcentaje de las mujeres seropositivas. La respuesta inmunológica frente a las proteínas analizadas manifiesta una amplia variabilidad según el grado de lesión. Las proteínas L1 y VLPs-L1 exhiben respuestas similares, aunque el porcentaje de anticuerpos anti-L1 es mayor, alcanzando un máximo de respuesta inmunológica en las lesiones de alto grado. Los anticuerpos anti-E6 y E7 también alcanzan su punto máximo en HSIL, pero, a diferencia de L1 y VLPs-L1 en las lesiones de bajo grado los anticuerpos anti-E6 y anti-E7 son prácticamente indetectables. Contrariamente, los niveles de anticuerpos dirigidos contra la proteína E4 son bajos en mujeres sanas, experimentando un aumento en aquellas con lesiones CIN 1-2, y disminuyendo en mujeres con HSIL (Tomado de Gutiérrez-Xicotencatl, et.al.2016) (17).

Recientemente, Salazar Piña y colaboradores demostraron la posibilidad de utilizar en combinación los anticuerpos séricos anti-E4 y anti-E7 para discriminar entre CaCU y CIN2-3, con una sensibilidad del 93.3% y una especificidad moderada de 64.1%. Demostrando también que la sensibilidad a los anticuerpos anti-E4 y los anti-E7 es elevada en cualquier momento de la actividad sexual, lo que sugiere que pueden ser biomarcadores para la detección temprana del cáncer de cérvix uterino (48). Contrariamente se conoce poco sobre la presencia de anti-E4 en otros cánceres asociados

a HPV pues se ha identificado una prevalencia menor al 30% en cáncer de ano, vulva y pene, lo que podría suponer que los mismos marcadores serológicos, en este caso los anticuerpos anti-E4, no están presentes en proporciones iguales en todos los cánceres asociados a HPV <sup>(37)</sup>. Por lo anterior, se sugiere que los anticuerpos contra E4 podrían ser marcadores exclusivos para la detección de las lesiones tempranas del cérvix uterino <sup>(37)</sup>.

### **2. Justificación**

El cáncer de cérvix uterino, constituye el cuarto cáncer de mayor incidencia y mortalidad dentro de la población femenina a nivel mundial, y está relacionado en un 99.7% con la infección por el HPV, especialmente los tipos 16 y 18 <sup>(1,2, 3, 4)</sup>. Aunque el HPV es el principal factor etiológico, existen otros factores de riesgo relevantes como el tabaquismo, la multiparidad, las múltiples parejas sexuales y la coinfección con HIV y clamidia <sup>(6,7)</sup>. La infección persistente por HPV puede generar lo que se conoce como neoplasias intraepiteliales cervicales que pueden ir desde lesiones de bajo grado (LSIL): CIN1-CIN2 hasta lesiones de alto grado (HSIL): CIN3 y CaCU <sup>(3)</sup>.

Los métodos actuales para la detección de las lesiones como Papanicolaou, colposcopia, presentan limitaciones, mientras que las pruebas moleculares de detección de DNA y mRNA de HPV no distinguen adecuadamente entre las lesiones de diferente grado <sup>(15,16, 19,18)</sup>. Por ello, se han estudiado biomarcadores como p16, MCM-2 y Ki-67, pero su especificidad es limitada debido a su presencia en otros tipos de cánceres <sup>(21)</sup>. En este contexto, la proteína E4 de HPV, altamente expresada en las lesiones productivas (20-30%), ha sido propuesta como un posible biomarcador para las LSIL. Sin embargo, hasta el momento los métodos de empleo de esta proteína como posible biomarcador dependen de una muestra de tejido o biopsia <sup>(19)</sup>.

Los anticuerpos séricos contra las proteínas del HPV parecen ser una alternativa viable, ya que permiten detectar de manera indirecta y amplificada la presencia de antígenos virales, asociándose además con las diferentes etapas de la infección. En particular, los anticuerpos anti-E4 tienen una prevalencia elevada en lesiones de bajo grado (hasta un 70%) y disminuyen en CaCU. Por otro lado, las inmunoglobulinas séricas (IgM, IgA e IgG) ofrecen información sobre el estado de la infección: desde infecciones tempranas (IgM), hasta persistentes (IgG), mientras que las IgA se han relacionado con procesos de eliminación <sup>(17, 38)</sup>. Por lo tanto, evaluar el perfil de inmunoglobulinas séricas contra E4 de HPV puede ser una estrategia prometedora para mejorar la detección y diferenciación de lesiones de bajo grado, sustentando su análisis como eje central de esta investigación.

**3. Pregunta de investigación.**

¿Qué perfiles de inmunoglobulinas séricas (IgM, IgA, IgG) contra E4 de HPV16 pueden ser utilizados como biomarcadores de lesiones del cérvix uterino?

**4. Hipótesis.**

Si la presencia de anticuerpos séricos contra E4 de HPV16 se relaciona con las lesiones del cérvix uterino, y las IgM se asocian a infecciones recientes, las IgA a la infección en las mucosas, la eliminación del virus, y lesiones de bajo grado, y las IgG a infecciones persistentes y lesiones de alto grado, entonces el perfil IgA-IgM estará relacionado con un proceso regresivo, mientras que el perfil IgA-IgG estará asociado con una infección persistente y un mayor riesgo de progresión a lesiones de alto grado.

**5. Objetivo General.**

Evaluar los perfiles de inmunoglobulinas séricas IgM, IgA, e IgG contra E4 de HPV16 que pueden ser utilizados como biomarcadores de las lesiones del cérvix uterino.

**6. Objetivos específicos.**

1. Determinar la presencia de inmunoglobulinas séricas IgM, IgA, IgG contra E4 de HPV16 en mujeres con diferente grado de lesión en el cérvix uterino.
2. Evaluar la asociación entre los perfiles de anticuerpos IgM, IgA, IgG contra E4 y el grado de lesión del cérvix uterino.
3. Validar los perfiles de anticuerpos contra E4 de HPV16 como posibles biomarcadores del grado de lesión del cérvix uterino.
4. Evaluar la asociación entre otros factores de riesgo y los perfiles de anticuerpos contra E4 en relación con la presencia de lesiones en el cérvix uterino.

## **7. Materiales y Métodos**

### **7.1. Tipo de estudio y consideraciones éticas.**

Corresponde a un estudio retrospectivo transversal anidado en un estudio previo realizado por la Dra. Lourdes Gutiérrez Xicotencatl (2009-2016) denominado **“Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra antígenos de HPV como sistema de diagnóstico temprano para detectar a mujeres en riesgo de desarrollar lesiones en el cérvix uterino”**. El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), ya que cumplió con todos los requisitos de ética y de confidencialidad que supone una investigación con humanos.

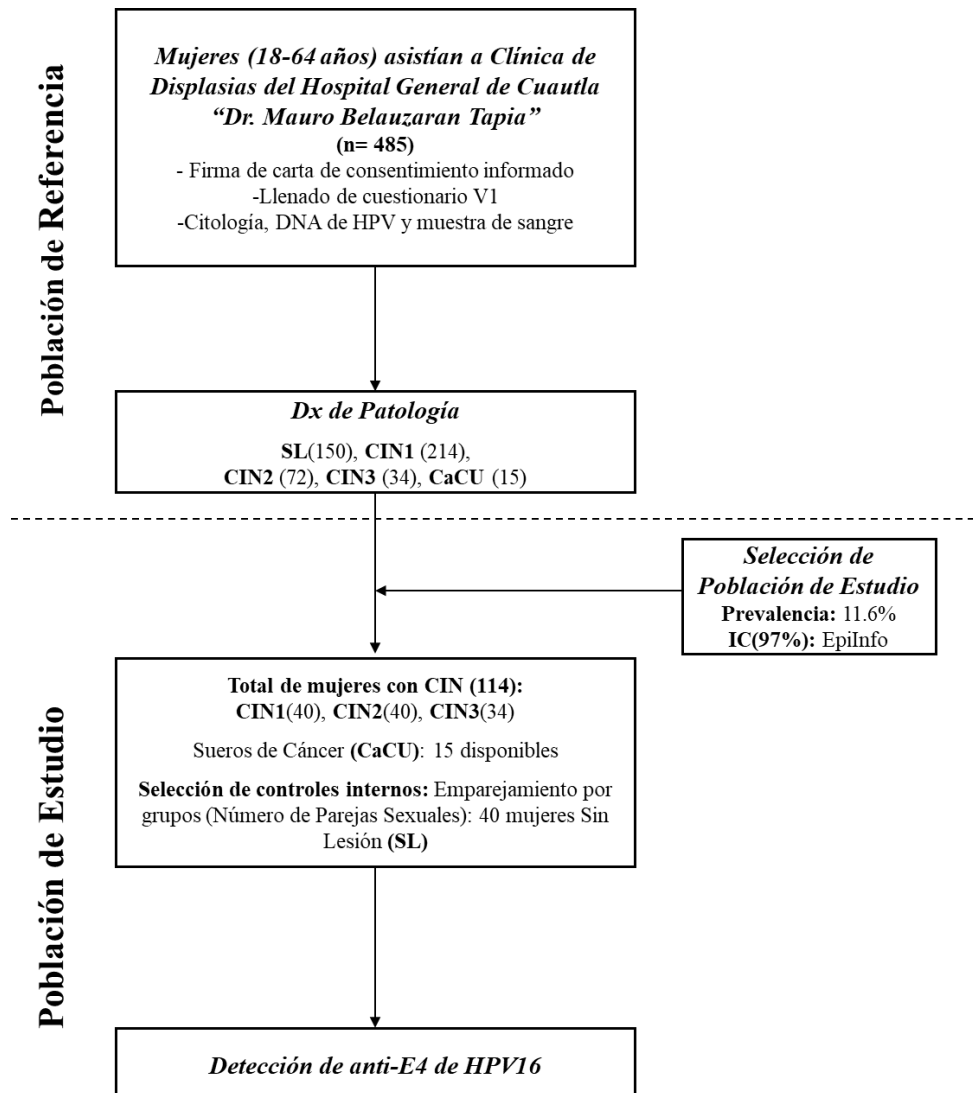
#### **7.1.2 Descripción de la población objeto de estudio.**

❖ **Población de referencia:** La población de referencia estuvo conformada por mujeres entre 18 y 64 años de edad que asistían a la Clínica de Displasias del Hospital General de Cuautla “Dr. Mauro Belauzaran Tapia”, que acudieron tras un estudio de PAP positivo para detección de cáncer de cérvix uterino. Se obtuvo la firma de una Carta de Consentimiento Informado y llenado del cuestionario “V1” (Anexo1), de 485 mujeres de las cuales 320 tenían lesiones del cérvix y 150 no presentaban lesiones (grupo control). Se les realizó muestreo para estudio citológico, detección de DNA de HPV y toma de sangre. Los criterios de inclusión fueron: (a) asistir a la Clínica de Displasias del Hospital General de Cuautla, (b) tener entre 18 y 64 años, (c) tener residencia fija en el estado de Morelos, (d) no tener antecedentes de lesiones en cérvix, ni tratamiento previo, (e) sin histerectomía, (f) aceptar participar en el estudio y (g) firma de consentimiento informado. Mientras que, como criterios de exclusión se consideraron los deseos de abandonar el estudio y la pérdida de seguimiento por causa desconocida (**Fig. 7**).

❖ **Población de estudio:** La población de estudio con lesiones del cérvix uterino fue seleccionada con base en la prevalencia de anticuerpos  $\alpha$ -E4 (11.6%) en la población de referencia, previamente analizada por Salazar Piña et al. (2016)<sup>(48)</sup>, mediante un ensayo de Slot Blot<sup>(44)</sup>. Utilizando esta prevalencia y el programa Epi-Info<sup>®</sup>, se calculó el intervalo de confianza (IC) del 97% para determinar el tamaño de la muestra. Este análisis definió una muestra objetivo de 120 sueros de mujeres con diagnóstico de CIN, distribuidos equitativamente (40 muestras por grupo) entre CIN1,

CIN2 y CIN3. Sin embargo, dado que la población de referencia solo disponía de 34 casos de CIN3, el número total de mujeres con CIN incluidas en el estudio fue de 114. Adicionalmente, se incluyeron los 15 sueros disponibles de mujeres con CaCU de la población de referencia. Por otra parte, la selección de los controles internos se realizó mediante pareo por edad y número de parejas sexuales. De manera general, la población de estudio quedó conformada por un total de 169 mujeres, distribuidas en los grupos CIN1, CIN2, CIN3, CaCU y sin lesión (SL) (**Fig. 7**).

- ❖ **Población control:** Para la validación del ensayo, se empleó una población control externa a la población de estudio, compuesta por 40 mujeres adolescentes de 9 a 13 años que no habían iniciado relaciones sexuales, ni tenían exposición previa con HPV. Estas adolescentes fueron seleccionadas del banco de sueros del proyecto: **“Evaluación de niveles de inmunogenicidad en mujeres vacunadas contra HPV en México”** (CI:883) del Dr. Eduardo Lazcano Ponce, quien cumplió con la aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). La selección de las muestras se realizó mediante un muestreo aleatorio simple utilizando el programa Win-Epi<sup>®</sup>, lo que permitió mantener la homogeneidad necesaria en los datos de control.



**Figura 7. Flujo de la población de referencia y población de estudio.** Población de referencia: Mujeres que asistían a la Clínica de Displasias del Hospital General Cuautla: Dr.Mario Belauzarán Tapia (18-64 años). Población de estudio seleccionada según la prevalencia de anticuerpos anti-E4 (11.6%) reportada por Salazar-Piña. et al “2016”<sup>(48)</sup>, el cálculo del tamaño de la muestra se realizó con el programa Epi Info.

## 7.2 Producción y purificación de la proteína E4

La proteína E4 se produjo y purificó previamente en nuestro laboratorio. Su producción se llevó a cabo de forma *in vitro* en el Rapid Translation System a altas concentraciones y con una baja cantidad de proteínas contaminantes de extractos bacterianos. Por medio de una reacción con ribosomas bacterianos, la producción de E4 se llevó a cabo a 22 °C durante 16 h con agitación continua, a partir del plásmido pIVEX- E4 para expresión de la proteína correspondiente en el sistema. Posteriormente, la proteína E4 se purificó por cromatografía de afinidad por medio de una columna de Ni-NTA de acuerdo con lo

descrito previamente (Salazar-Piña, et al, 2016) <sup>(48)</sup>. Una vez purificado, el antígeno viral HPV16-E4 se analizó mediante inmunoblot para verificar la presencia e identidad de la proteína. Para ello, se empleó un anticuerpo anti-His generado en el laboratorio para identificar el motivo 6-His presente en las proteínas recombinantes producidas *in vitro*. La concentración de la proteína E4 producida en estas condiciones se calculó mediante el ensayo BCA para proteínas.

### **7.3 Cuantificación de proteínas por BCA**

La concentración de la proteína E4 se determinó utilizando el Kit de ensayo para cuantificación de proteínas Micro BCA (Thermo Scientific ®). Para ello, se colocaron 100 µL/pozo de la proteína y se adicionó la misma cantidad del kit preparado con los reactivos A, B y C en una proporción 25:24:1, respectivamente. Se construyó una curva estándar de proteína a partir de la albúmina sérica bovina (BSA, 2mg/mL) realizando diluciones seriadas que fueron desde 200 hasta 0 µg/mL (200, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 µg/mL). Como control se incluyó el buffer de elución de la proteína E4 bajo las mismas condiciones experimentales. Posteriormente, la placa se incubó durante 2 horas a 37°C y la absorbancia se midió a 562 nm en el lector de ELISA (Thermo Fisher Scientific ®). Obteniéndose una concentración de 7.1 µg/mL de la proteína.

### **7.4 Detección de los anticuerpos anti-E4 en suero por ELISA indirecto.**

La detección de anticuerpos anti-E4 en suero se llevó a cabo mediante un ensayo de ELISA indirecto. El antígeno E4 fue inmovilizado en placas para ELISA de 96 pozos a una concentración de 100 ng/pozo, utilizando buffer de carbonatos (pH 8.9). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C para favorecer la adsorción del antígeno. Posteriormente, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con solución de bloqueo: PBS, Tween-20 0.05%, leche 5% y azida de sodio 0.02%, durante 2 h. Se continuó con la adición de los sueros problema en una dilución 1:100 incubándose durante 90 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-Ig's de humano, seguido de estreptoavidina-HRP, ambos fueron incubados durante 1 h, el anticuerpo biotinilado se incubó a 37°C, mientras que la estreptoavidina se incubó a temperatura ambiente. Después de cada incubación, se realizaron lavados con buffer de lavado (PBS, Tween 20 0.05% y azida de sodio 0.02%), esta última fue excluida del buffer de lavado luego de la incubación del segundo anticuerpo biotinilado. La presencia de anticuerpos anti-E4 se reveló mediante la adición del sustrato TMB (3,3',5,5-

tetrametilbencidina) preparado en buffer de acetato de sodio (1:5), el cual fue incubado durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo con 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 1M ( $H_2SO_4$ ) y la absorbancia se midió a 450 nm y 620 nm en el lector de ELISA (Thermo<sup>®</sup>).

Concluida la detección de anticuerpos  $\alpha$ -E4 se procedió a la detección de isotipos específicos (IgM, IgA, IgG) siguiendo el mismo protocolo, pero se utilizaron anticuerpos específicos contra cada isotipo acoplados a biotina. En esta parte solo se incluyeron los sueros que resultaron positivos en el ensayo inicial.

Es importante resaltar que los ELISA se realizaron de forma ciega en cuanto al diagnóstico de la lesión, para evitar el sesgo de interpretación por parte de los analistas.

### **7.5 Tipificación de HPV en muestras biológicas.**

La genotipificación del HPV en las muestras del cérvix uterino fue llevada a cabo por el laboratorio farmacéutico LSG Clínicos, ubicado en Mexicali, Baja California, México. Para este procedimiento se empleó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) seguida de pirosecuenciación, lo que permitió la identificación de 17 genotipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59 y 68.

### **7.6 Análisis estadístico**

#### **7.6.1 Conversión de absorbancias a Unidades ELISA (UE/mL) y estimación del punto de corte.**

La determinación de los títulos de anticuerpos  $\alpha$ -E4 se realizó mediante la transformación de las absorbancias en Unidades ELISA (UE/mL) por medio de una curva de cuatro parámetros (4PL) realizada mediante el programa AssayFitPro<sup>®</sup> para la cual se utilizaron diluciones seriadas de un pool de 7 sueros que presentaron las mayores absorbancias para anticuerpos anti-E4 en el ensayo de ELISA. Por su parte, el valor del punto de corte (PC) se estimó utilizando el banco de sueros de la población de adolescentes y se definió como la media geométrica más dos desviaciones estándar ( $PC= 366.21UE/mL$ ). Este mismo procedimiento se siguió para los resultados obtenidos de la detección de los isotipos, solo que en este caso no fue posible utilizar para el punto de corte a las adolescentes, en esta parte se tomaron a las mujeres sin lesión, para estos casos se definió como la media geométrica más una desviación estándar quedando establecidos en:  $\alpha$ E4-IgM ( $PC=599.269 UE/mL$ ),  $\alpha$ E4-IgA ( $PC=181.743 UE/mL$ ) y  $\alpha$ E4-IgG ( $PC=2661.03 UE/mL$ )

**7.6.2 Análisis sociodemográfico de la población de estudio, validación clínica de anticuerpos anti-E4 y ajuste del modelo por factores de riesgo.**

Se realizó la descripción de las características sociodemográficas y de comportamiento sexual del grupo sin lesión (SL) versus los grupos CIN1, CIN2, CIN3 y CaCU, identificando la diferencia de proporciones con una prueba exacta de Fisher.

Para la validación del modelo diagnóstico basado en la detección de anticuerpos  $\alpha$ -E4 de HPV16, se calcularon: la sensibilidad (proporción de verdaderos positivos entre los individuos con la enfermedad), especificidad (tasas de falsos positivos sobre el total de sujetos sanos), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y AUC (área bajo la curva, del inglés, *Area Under the Curve*). Inicialmente dichos parámetros se estimaron para los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-E4 de HPV16. Posteriormente, se realizó el mismo análisis para cada isotipo de anticuerpo por separado:  $\alpha$ E4-IgM,  $\alpha$ E4-IgA y  $\alpha$ E4-IgG.

Adicionalmente, fue utilizado un modelo de regresión logística multinomial para estimar la asociación entre los niveles de anticuerpos  $\alpha$ -E4 versus el grado de lesión del cérvix uterino y diversos factores de riesgo. Para cada variable fueron calculadas las razones de momios (OR), los intervalos de confianza del 95% (IC95%) y los *p-valor*, este último mediante el análisis de *p* de tendencias. Este análisis se realizó tanto para los anticuerpos totales  $\alpha$ -E4 como para cada uno de los isotipos. Aquellas variables sociodemográficas y de comportamiento sexual que mostraron una asociación estadísticamente significativa o relevante fueron consideradas para el ajuste del modelo. Con base en el ajuste mencionado, se realizó nuevamente el cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y AUC.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software STATA versión 14.0, considerando el nivel de significancia del 10% ( $\alpha=0.10$ ).

## 8. Resultados

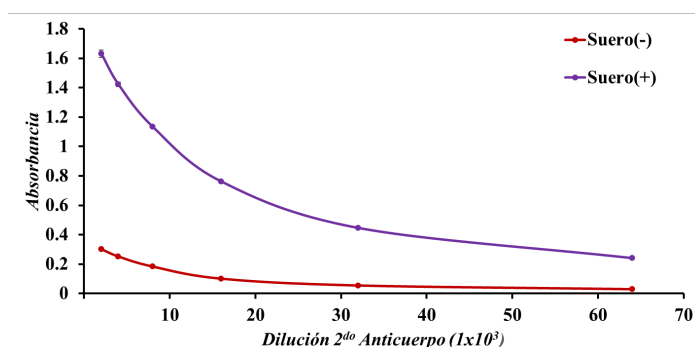
### 8.1 Estandarización del ensayo de ELISA para detección de anticuerpos anti-E4 de HPV16.

#### 8.1.1. Estandarización de la dilución del anticuerpo anti-Ig's totales biotinilado.

La aplicabilidad y reproducibilidad de los ensayos ELISA dependen en gran medida de la correcta integración de todos los parámetros que conforman el ensayo. Pequeñas modificaciones en alguna de las etapas del proceso pueden generar variaciones de gran impacto en los resultados a obtener <sup>(49)</sup>. Teniendo en cuenta esto, con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos totales  $\alpha$ -E4 y de inmunoglobulinas séricas ( $\alpha$ -E4/IgM,  $\alpha$ -E4/IgA,  $\alpha$ -E4/IgG) específicas en mujeres con diferentes grados de lesión, se comenzó con la estandarización del protocolo para determinar la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -E4 en suero por ELISA.

Uno de los puntos clave para la optimización de nuestro ensayo fue definir la dilución adecuada del anticuerpo secundario a través de la cual se obtienen mejores valores de absorbancia. Para ello, se evaluó una serie de siete diluciones seriadas en proporción 1:2 que fueron desde 1:2,000 hasta 1:128,000 <sup>(49, 50)</sup>.

Nuestros resultados mostraron que la dilución 1:4,000 ofrecía una mejor discriminación entre los sueros controles, positivo y negativo, manteniendo una buena intensidad de señal para el control positivo y un fondo bajo para el negativo. En el resto de las diluciones se observó una disminución de más del 7% para el control positivo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (**Fig. 8**), se seleccionó la dilución 1:4,000 como la adecuada para el anticuerpo secundario biotinilado, la cual fue empleada en los ensayos posteriores ya que ésta permite diferenciar muy bien los controles, siendo el fondo del sistema bajo.



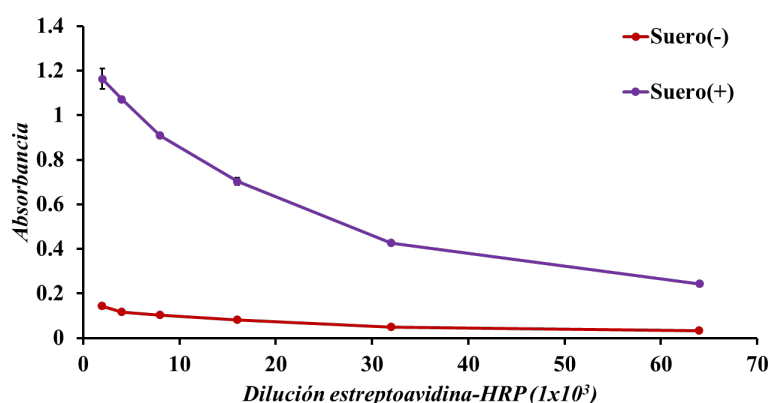
**Figura 8. Estandarización de la dilución del 2<sup>do</sup> anticuerpo  $\alpha$ -Ig's totales biotinilado.** El ensayo de ELISA-E4 se llevó a cabo con 100 ng de E4, los sueros de control en dil. 1:100 y el 2<sup>do</sup> anticuerpo

anti-Ig's biotinilado se usó en diluciones 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000, 1:64,000, 1:128,000. Mientras que la estreptoavidina-HRP se mantuvo en dil. 1:2,000. Las barras muestran la desviación estándar de los datos.

### 8.1.2. Estandarización de la dilución de la estreptoavidina-HRP para el ensayo ELISA-E4.

La estreptoavidina-HRP se une a la biotina del segundo anticuerpo proporcionando un aumento en la sensibilidad del ensayo, con lo cual se asegura la detección de sueros con títulos de anticuerpos bajos, evitándose la presencia de falsos negativos <sup>(49)</sup>.

La dilución de la estreptoavidina-HRP fue muy similar a lo que se realizó con el 2<sup>do</sup> anticuerpo. En este caso se probaron igualmente un total de siete diluciones para analizar el mejor ajuste para este reactivo, las cuales fueron de 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000, 1:64,000 y 1:128,000, manteniendo constantes todos los demás parámetros del ensayo. Al analizar los resultados, observamos que la dilución 1:2,000 fue la que mejor ajustó con los controles, siendo esta dilución en donde se observa la mayor diferencia entre el suero positivo y el negativo con un bajo fondo del sistema (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Estandarización de la dilución de la estreptoavidina-HRP en el ELISA-E4. El ensayo de ELISA-E4 se llevó a cabo con 100 ng de E4, los sueros de control en dil. 1:100 y el 2do anticuerpo anti-Ig's biotinilado se usó en dilución 1:4,000. De la estreptoavidina-HRP se utilizaron diferentes diluciones que fueron de 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000, 1:64,000 y 1:128,000. Las barras muestran la desviación estándar de los datos.

### 8.1.3 Parámetros ajustados.

Además de la optimización de la dilución del anticuerpo secundario y de la estreptoavidina-HRP, se ajustaron otros parámetros del ensayo con el objetivo de establecer las condiciones finales y óptimas para el mismo. La **Tabla I** muestra un resumen de todos los parámetros estandarizados.

Tabla I. Parámetros estandarizados para ELISA-E4.

<i>Parámetro ajustado</i>	<i>Ajuste Realizado</i>
<i>Concentración del Antígeno (Proteína E4)</i>	100 ng/pozo
<i>Dilución de los sueros</i>	1:100
<i>Buffer de Carbonatos</i>	2X
<i>Dilución del 2do anticuerpo</i>	1: 4,000
<i>Dilución de estreptoavidina-HRP</i>	1:2,000
<i>Tiempo de incubación del cromógeno</i>	60min

Por último, se decidió analizar la reproducibilidad interensayo, con el objetivo de evaluar la variabilidad intrínseca del método. Para ello, se realizó una serie de ensayos manteniendo constantes todos los parámetros previamente definidos como óptimos, sin cambios en el analista, los equipos, reactivos o el tiempo de ejecución <sup>(50)</sup>. Los resultados obtenidos muestran un coeficiente de variación (CV) para el control positivo de 5.85% y para el control negativo de 7.86%, lo que permitió considerar que el ensayo posee una variabilidad intrínseca aceptable, es decir, el método posee una buena precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

## 8.2 Descripción de la población de estudio

En la **Tabla II** se muestran las características sociodemográficas y de comportamiento sexual de las 169 mujeres incluidas en el presente estudio, las cuales fueron divididas en cinco grupos de acuerdo con el grado de lesión del cérvix uterino que presentaban: SL (n=40), CIN1 (n=40), CIN2 (n=40), CIN3 (n=34) y CaCU (n=15). La selección de la población se realizó tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

La población estudiada presentó una edad promedio de 40.2 años (rango de 18-69 años), siendo el grupo de edad de 30 a 49 años el de mayor prevalencia en los diferentes grados de lesiones cervicales, a excepción del CIN3. En cuanto al estado civil, el 74.5% de las mujeres (126/169) reportaron tener pareja estable, y más del 55% tienen un nivel de educación primaria. El hábito de fumar fue minoritario, ya que, el 91.7% de las participantes declaró no fumar.

En relación con el comportamiento sexual, un poco más del 50% de la población declaró haber tenido más de dos parejas sexuales a lo largo de su vida, mientras que el tiempo de actividad sexual (TAS) se concentró en el intervalo de 11 a 30 años de actividad. Por

su parte, en el número de embarazos el rango más frecuente fue el de 3 a 5 (48%) y solo el 27.8% de las mujeres fueron positivas para la detección de DNA de HPV (47/169). Mediante la prueba exacta de Fisher se realizaron las comparaciones entre el grupo SL frente a los grupos de mujeres con diferentes lesiones, tanto en las características sociodemográficas como en las de comportamiento sexual (**Tabla II**). Los factores de riesgo como edad, nivel de educación, fumar, tiempo de actividad sexual, número de embarazos e infección por HPV presentaron diferencias significativas o marginalmente significativas al realizar la comparación entre el grupo sin lesión y los distintos grados de lesión del cérvix uterino. Dado que se ha demostrado que estas características constituyen factores de riesgo de relevancia para la aparición de las lesiones, fueron consideradas para el posterior ajuste de los modelos de regresión (44, 51, 52).

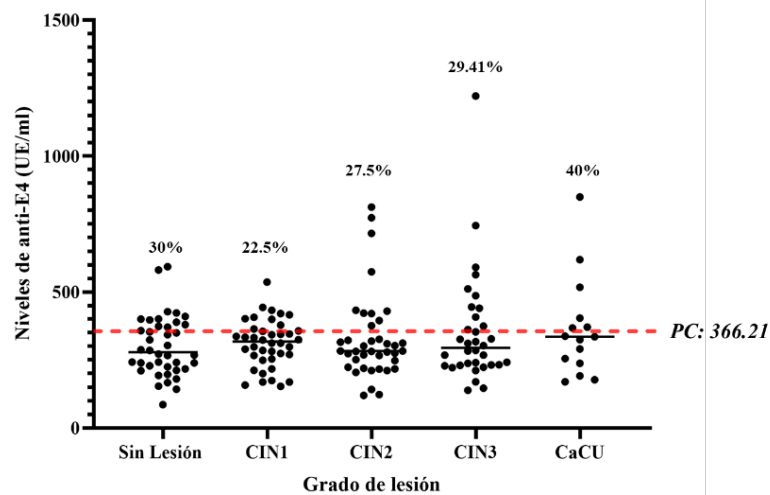
**Tabla II. Características sociodemográficas y comportamiento sexual de la población de estudio.**

Características Sociodemográficas	Total	SL (n=40)		CIN1 (n=40)			CIN2 (n=40)			CIN3 (n=34)			CaCU (n=15)		
	n=169	n	(%)	n	(%)	p	n	(%)	p	n	(%)	p	n	(%)	p
<b>Edad (Años)</b>	<b>n=143</b>														
≤ 29	18	0	(0)	5	(13)		6	(15)		6	(18)		1	(7)	
30-39	52	14	(35)	12	(30)		11	(28)		11	(32)		4	(27)	
40-49	43	10	(25)	14	(35)	0.107	11	(28)	0.281	3	(9)	0.053	5	(33)	0.750
≥ 50	30	8	(20)	3	(8)		8	(20)		8	(24)		3	(20)	
<b>Estado Civil</b>	<b>n=169</b>														
Con pareja estable <sup>1</sup>	126	30	(75)	31	(78)	1.000	33	(83)	0.556	21	(62)	0.314	11	(73)	1.000
Sin pareja estable <sup>2</sup>	43	10	(25)	9	(23)		7	(18)		13	(38)		4	(27)	
<b>Nivel de Educación</b>	<b>n=136</b>														
Primaria	75	25	(63)	9	(23)		17	(43)		15	(44)		9	(60)	
Secundaria	53	9	(23)	24	(60)	0.000	9	(23)	0.373	9	(26)	0.704	2	(13)	0.467
Medio-Alto	8	1	(3)	2	(5)		3	(8)		1	(3)		1	(7)	
<b>Fuma</b>	<b>n=169</b>														
No	155	39	(98)	37	(93)	0.615	38	(95)	1.000	28	(82)	0.043	13	(87)	0.177
Si	14	1	(3)	3	(8)		2	(5)		6	(18)		2	(13)	
<b>Actividad Sexual</b>															
<b>No. Parejas Sexuales</b>	<b>n=169</b>														
0-1	80	19	(48)	25	(63)	0.261	19	(48)	1.000	12	(35)	0.348	5	(33)	0.380
≥ 2	89	21	(53)	15	(38)		21	(53)		22	(65)		10	(67)	
<b>Tiempo Actividad Sexual (Años)</b>	<b>n=143</b>														
≤ 10	19	1	(3)	6	(15)		6	(15)		5	(15)		1	(7)	
11-20	43	8	(20)	13	(33)		9	(23)		9	(26)		4	(27)	
21-30	44	14	(35)	11	(28)	0.076	11	(28)	0.304	5	(15)	0.085	3	(20)	0.485
≥ 31	37	9	(23)	4	(10)		10	(25)		9	(26)		5	(33)	
<b>Número Embarazos</b>	<b>n=169</b>														
0-2	33	6	(15)	12	(30)		8	(20)		6	(18)		1	(7)	
3-5	81	17	(43)	22	(55)	0.020	18	(45)	0.700	16	(47)	0.818	8	(53)	0.768
≥ 6	55	17	(43)	6	(15)		14	(35)		12	(35)		6	(40)	
<b>Infección por HPV</b>	<b>n=169</b>														
Negativos	122	31	(78)	34	(85)		24	(60)		27	(79)		6	(40)	
Bajo Riesgo <sup>3</sup>	7	3	(8)	2	(5)	0.748	2	(5)	0.206	0	(0)	0.214	0	(0)	0.004
HPV16	24	3	(8)	3	(8)		5	(13)		6	(18)		7	(47)	
Alto Riesgo <sup>4</sup>	16	3	(8)	1	(3)		9	(23)		1	(3)		2	(13)	

**8.3 Títulos y prevalencias de anticuerpos anti-E4 Ig's totales por grado de lesión de cérvix uterino.**

Los títulos de anticuerpos se obtuvieron a partir de los ELISA indirectos realizados en el suero de mujeres sin lesión y en aquellas con distintos grados de lesión del cérvix uterino (CIN1, CIN2, CIN3), incluyendo los casos de cáncer (CaCU). En el grupo Sin Lesión, los valores oscilaron entre 85.7 y 593.1 UE/mL, y en CIN1 se observaron rangos similares (153.3 a 536.2 UE/mL). En contraste con los grupos CIN2 y CIN3 en los cuales se registró un aumento marcado, alcanzando valores superiores a las 1220.4 UE/mL, lo que sugiere una mayor respuesta inmunológica conforme la lesión progresa. En los casos de CaCU, los valores llegaron hasta 849.4 UE/mL que, aunque son menores a los observados en el CIN3, permanecen por encima del grupo: SL y CIN1.

El punto de corte para los anticuerpos anti-E4 Ig's totales se calculó tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos, quedando en 366.21 UE/mL. La prevalencia general fue de 28.4% (48/169). El análisis por grupos reveló que las mujeres con CaCU mostraron la prevalencia más alta (40.0%), seguidas del grupo Sin Lesión (30.0%). En los grupos CIN1 (22.5%), CIN2 (27.5%) y CIN3 (29.4%) se observó una tendencia ascendente en la prevalencia (**Fig.10**).



**Figura 10. Prevalencias de anticuerpos anti-E4 Ig's totales en el grupo sin lesión, en los distintos grados de lesión (CIN1, CIN2, CIN3) y en el cáncer cervicouterino (CaCU). La línea discontinua roja representa el punto de corte (PC: 366.21 UE/mL) que corresponde a la media geométrica más dos desviaciones estándar.**

**8.4 Validación clínica de detección de anticuerpos anti-E4 Ig's totales para detección de lesiones premalignas.**

La validación clínica de los anticuerpos  $\alpha$ -E4-Ig's totales se evaluó considerando la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) y el área bajo la curva (AUC) para cada grado de lesión del cérvix uterino (**Tabla III**). La especificidad mantuvo valores por arriba del 75% al ser evaluada con los diferentes grados de lesiones en el cérvix. El VPP fue mayor en el grupo sin lesión (70.6%) con una tendencia a disminuir conforme avanza la lesión, hasta llegar a 54.6% en cáncer. En contraste, el VPN fue del 64% en CaCU (**Tabla III**).

**Tabla III. Análisis de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y AUC de anticuerpos anti-E4-Ig's totales.**

<i>Parámetro</i>	<i>Diagnóstico*</i>				
	<i>SL</i>	<i>CIN1</i>	<i>CIN2</i>	<i>CIN3</i>	<i>CaCU</i>
<i>Sensibilidad</i>	30.0	22.5	27.5	29.4	40.0
<i>Especificidad</i>	<b>76.2</b>	<b>76.2</b>	<b>76.2</b>	<b>76.2</b>	<b>76.2</b>
<i>VPP</i>	<b>70.6</b>	<b>64.3</b>	<b>68.8</b>	<b>66.7</b>	54.6
<i>VPN</i>	36.4	34.0	35.6	40.0	64.0
<i>AUC</i>	0.5310	0.5065	0.5185	0.5280	0.5810

\* Comparación de adolescentes vs. tipo de lesión

Por otra parte, se analizó la asociación entre la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -E4 con los diversos factores de riesgo y con el diagnóstico histopatológico, a fin de identificar factores que pudieran contribuir a la detección de las lesiones del cérvix uterino (**Tabla IV**). Un análisis de p de tendencias se incorporó para fortalecer nuestro análisis estadístico.

En el modelo de regresión logística realizado, la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -E4 mostró asociaciones positivas con los distintos grados de lesión, siendo los valores de OR de 1.28 (*IC95%: 0.37-4.51*) para CIN2, 1.14 (*IC95%: 0.30-4.26*) para CIN3 y 3.54 (*IC95%: 0.62-20.34*) para CaCU, siendo esto marginalmente significativo ( $p=0.0745$ ).

El número de parejas sexuales presentó una asociación positiva ( $OR = 1.04$ ), mientras que el resto de los factores de riesgo analizados no mostró asociaciones positivas o significativas. No obstante, todos los factores de riesgo que se muestran en la tabla fueron incluidos en el ajuste del modelo con el propósito de optimizar el rendimiento clínico de la prueba.

Tabla IV. Asociación entre la presencia de  $\alpha$ -E4 y factores de riesgo.

Características sociodemográficas y de comportamiento sexual	$\alpha$ -E4				OR	IC (95%)	p
	Negativos n=121		Positivos n=48				
	n	%	n	%			
<b>Lesiones</b>	<b>n=169</b>						
SL	40	28	23.1	12	25.0	Ref.	-
CIN1	40	31	25.6	9	18.7	0.43	(0.11-1.68)
CIN2	40	29	24.0	11	23.0	<b>1.28</b>	(0.37-4.51)
CIN3	34	24	19.8	10	20.9	<b>1.14</b>	(0.30-4.26)
CaCU	15	9	7.4	6	12.5	<b>3.54</b>	(0.62-20.34)
<b>Nivel de Educación</b>	<b>n=136</b>						
Primaria	75	53	55.8	22	53.6	0.39	-
Secundaria	53	37	39.0	16	39.0	0.57	(0.06-2.52)
Medio-Alto	8	5	5.3	3	7.3	Ref.	(0.09-3.55)
<b>Tiempo de Actividad Sexual (Años)</b>	<b>n=143</b>						
≤ 10	19	11	11.1	8	18.2	Ref.	-
11-20	43	33	33.3	10	22.7	0.35	(0.09-1.31)
21-30	44	30	30.3	14	31.8	0.55	(0.15-1.96)
≥ 31	37	25	25.2	12	27.3	0.70	(0.16-2.97)
<b>Infección por HPV</b>	<b>n=169</b>						
Negativos	122	85	70.2	37	77.1	Ref.	-
Bajo Riesgo	7	6	5.0	1	2.1	0.27	(0.03-2.61)
HPV16	24	12	14.9	4	12.5	0.39	(0.094-1.60)
Alto riesgo	16	18	9.9	6	8.3	0.42	(0.081-2.18)
<b>Número de Parejas Sexuales</b>	<b>n=169</b>						
0-1	80	59	48.8	21	43.7	Ref.	-
>2	89	62	51.2	27	56.25	<b>1.04</b>	(0.41-2.59)

El ajuste del modelo se realizó tal y como se mencionó anteriormente de acuerdo con los factores de riesgo mencionados. Como resultado, la sensibilidad alcanzó un 21.6%, la especificidad alcanzó un valor de 92.1%, el VPP de 57.1%, el VPN del 70.7% y el AUC de 0.6867 también experimentaron un aumento, lo que valida un buen ajuste del modelo de manera general (Fig. 11).

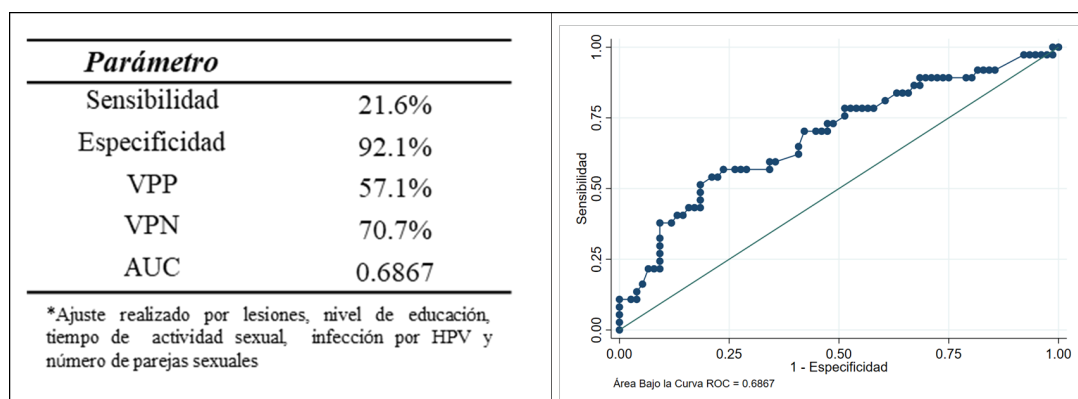
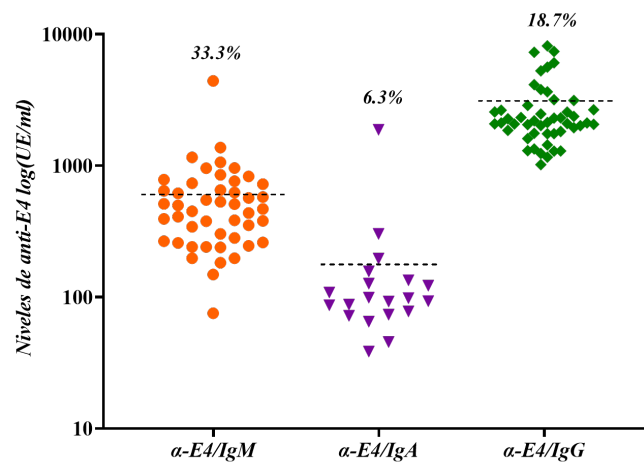


Figura 11. Ajuste del modelo por características sociodemográficas. La figura muestra los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y AUC obtenidos. A la derecha se observa la curva ROC obtenida, la cual presentó un AUC de 0.6867.

### 8.5 Títulos y prevalencias de isotipos de anticuerpos (IgM, IgA, IgG) contra E4 de HPV en lesiones cervicales.

Los sueros de mujeres previamente identificados como positivos para anticuerpos totales  $\alpha$ -E4 fueron analizados para determinar la presencia de los distintos isotipos específicos IgM, IgA e IgG. Los títulos de anticuerpos para cada una de las inmunoglobulinas mostraron comportamientos distintos. En el caso de IgM, los valores oscilaron entre 75.2 y 4404.5 UE/mL, mientras que los títulos de IgA se encontraron entre 38.5 y 1876.5 UE/mL. Por otro lado, IgG fue la inmunoglobulina que presentó valores más elevados, superando las 8000 UE/mL. Lo que refleja una mayor magnitud de respuesta humoral mediada por IgG frente a E4, mientras que IgA e IgM muestran respuestas variables.

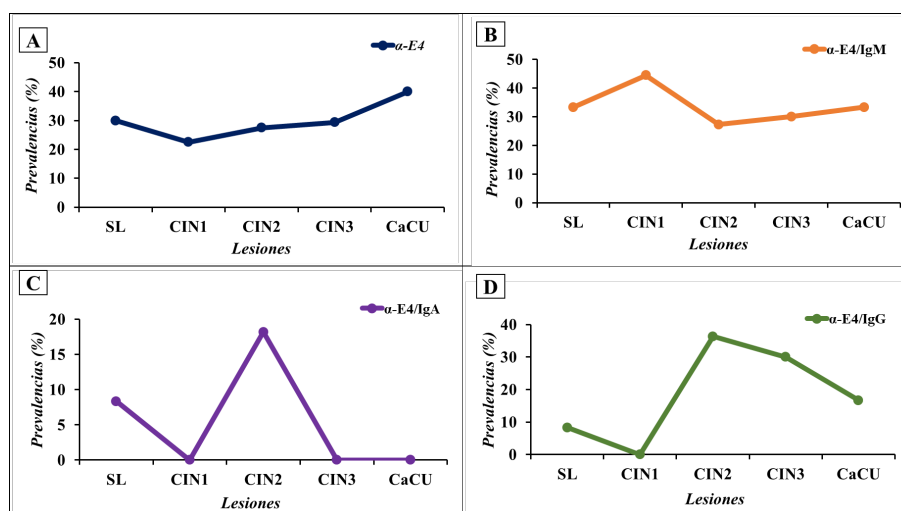
Como se muestra en la **Figura 12**, se observó que la prevalencia de anticuerpos específicos varió entre los distintos isotipos. La mayor proporción correspondió a  $\alpha$ -E4-IgM con un 33.3% (16/48), seguida de  $\alpha$ -E4-IgG con un 18.7% (9/48) y en menor medida  $\alpha$ -E4-IgA con un 6.3% (3/48).



**Figura 12.** Títulos de isotipos para anticuerpos anti-E4 (IgM, IgA, IgG) en la población de estudio. Las líneas discontinuas representan el PC para cada isotipo que corresponde a la media geométrica más una desviación estándar. Los resultados se analizaron en UE/mL, se empleó escala logarítmica para el mejor ajuste de  $\mu$ os datos.

Las prevalencias de  $\alpha$ -E4 e isotipos se analizaron en los distintos grados de lesión del cérvix uterino. Los anticuerpos  $\alpha$ -E4 Ig's totales mostraron una prevalencia que osciló entre 22.5% (CIN1) y 40% (CaCU), representando un aumento de 1.78 veces mayor de  $\alpha$ -E4 en las mujeres con cáncer con respecto a las que tenían CIN1 (**Fig. 13A**). Para el resto de las lesiones, las prevalencias se mantuvieron en un rango constante.

La mayor prevalencia de  $\alpha$ -E4/IgM (44.4%) se observó en CIN1, y se mantiene por debajo del 30% en el resto de las lesiones y CaCU (**Fig. 13B**). Los  $\alpha$ -E4/IgA se observan en CIN2 (18.2%) y están ausentes en las lesiones CIN1, CIN3 y CaCU (**Fig. 13C**). Los anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG muestran una prevalencia alta en CIN2 (36.4%), con una tendencia a la baja en CIN3 (30%) y CaCU (16.7%). Interesante fue observar que la prevalencia en CIN2 fue 4.36 veces mayor que en el grupo sin lesión, y de 3.6 y 2 veces mayor en CIN3 y CaCU, respectivamente (**Fig. 13D**).



**Figura 13. Prevalencia de anticuerpos totales  $\alpha$ -E4 e isotipos según el grado de lesión del cérvix uterino. A. Anticuerpos  $\alpha$ -E4 Ig's totales. B.  $\alpha$ -E4/IgM, C.  $\alpha$ -E4/IgA, D.  $\alpha$ -E4/IgG. La prevalencia se obtuvo para las mujeres Sin lesión (SL), con distintos grados de lesión (CIN1, CIN2, CIN3) y cáncer (CaCU).**

### 8.6 Rendimiento clínico de isotipos (IgM, IgA, IgG) de anticuerpos contra E4 de HPV.

Una vez que se identificó la prevalencia y distribución de los perfiles de isotipos de  $\alpha$ -E4 presentes en los diferentes grados de lesiones del cérvix, se procedió a analizar el rendimiento clínico de estos perfiles de anticuerpos contra E4. Para ello, se realizó un análisis de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y AUC, para cada isotipo específico de inmunoglobulina ( $\alpha$ -E4/IgM,  $\alpha$ -E4/IgA,  $\alpha$ -E4/IgG), mediante la comparación del grupo sin lesión (SL) frente a los distintos grados de lesión del cérvix uterino (CIN1, CIN2, CIN3 y CaCU) (**Tabla V**). El análisis mostró una alta especificidad (>65%) para la mayoría de las lesiones y cáncer, la cual fue especialmente alta (91.7%) en la comparación SL vs. CIN2 para  $\alpha$ -E4/IgA y  $\alpha$ -E4/IgG, lo que indica una buena capacidad del modelo para identificar mujeres positivas para CIN2+. Mientras que el VPP fue alto

en  $\alpha$ -E4/IgG para CIN2 (80.0%) y CIN3 (75.0%). Por otro lado, el VPN fue moderadamente elevado para  $\alpha$ -E4/IgG en CaCU (68.8%). En el resto de los casos, tanto el VPP como el VPN no mostraron valores representativos.

La sensibilidad se mantuvo baja en todos los isotipos y con todas las lesiones (< 45%). El área bajo la curva (AUC) expuso sus mayores valores en  $\alpha$ -E4/IgG para CIN2 (0.64) y CIN3 (0.60) (**Tabla V**).

**Tabla V. Análisis de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de anticuerpos anti-E4 de acuerdo con los distintos isotipos.**

Diagnóstico	$\alpha$ -E4		
	$\alpha$ -IgM	$\alpha$ -IgA	$\alpha$ -IgG
<b>SL vs CIN1</b>			
Sensibilidad	44.4	-	-
Especificidad	<b>66.7</b>	-	-
VPP	50.0	-	-
VPN	61.5	-	-
AUC	0.5556	-	-
<b>SL vs CIN2</b>			
Sensibilidad	27.3	18.2	36.4
Especificidad	<b>66.7</b>	<b>91.7</b>	<b>91.7</b>
VPP	42.9	66.7	<b>80.0</b>
VPN	50.0	55.0	61.1
AUC	0.5303	0.5492	0.6402
<b>SL vs CIN3</b>			
Sensibilidad	30.0	-	30.0
Especificidad	<b>66.67</b>	-	<b>91.7</b>
VPP	42.9	-	<b>75.0</b>
VPN	53.3	-	61.1
AUC	0.5167	-	0.6083
<b>SL vs CaCU</b>			
Sensibilidad	30.0	-	16.7
Especificidad	<b>66.7</b>	-	<b>91.7</b>
VPP	42.9	-	50.0
VPN	53.3	-	<b>68.8</b>
AUC	0.5167	-	0.5417

\* Comparación del grupo SL vs. tipo de lesión  
 - No se tienen observaciones en estos grupos

Las asociaciones entre la positividad de anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgM y las características sociodemográficas, de comportamiento sexual y el grado de lesión del cérvix uterino se evaluaron mediante una regresión logística, incorporando la p de tendencia para la mejora del análisis.

En relación con el grado de la lesión del cérvix uterino, las mujeres con CIN1 representaron un 25% del total de positivos para  $\alpha$ -E4/IgM, lo que derivó en un OR=2.40 respecto al grupo sin lesión, mientras que el grupo de mujeres con CIN3 representó el 18.8% con un OR= 1.04. El tiempo de actividad sexual mostró un incremento de la frecuencia de positivos conforme aumentaban los años de actividad sexual. El grupo de

21-30 años tuvo un OR= 6.24, mientras que las mujeres con un tiempo de actividad sexual mayor a 21 años la OR=2.51 representa una asociación positiva. El número de parejas sexuales presentó también una asociación positiva OR=1.12 pero sin significancia estadística en este caso.

**Tabla VI. Asociación entre la presencia de anticuerpos anti-E4 isotipo IgM y factores de riesgo.**

<i>Características sociodemográficas y de comportamiento sexual</i>	<i>α-E4/IgM</i>				<i>OR</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p</i>
	<i>Negativos n=32</i>		<i>Positivos n=16</i>				
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>			
<b><i>Lesiones</i></b>	<b><i>n= 48</i></b>						
SL	12	8	25.0	4	25.0	<b>Ref.</b>	
CIN1	9	5	15.63	4	25.0	<b>2.40</b>	(0.24-24.03)
CIN2	11	8	25.0	3	18.8	0.72	(0.08-6.10)
CIN3	10	7	21.9	3	18.8	<b>1.04</b>	(0.12-8.74)
CaCU	6	4	12.5	2	12.5	0.42	(0.03-6.79)
<b><i>Estado Civil</i></b>	<b><i>n= 48</i></b>						
Con pareja estable	38	25	78.1	14	87.5	<b>Ref.</b>	
Sin pareja estable	8	7	21.9	2	12.5	0.69	(0.08-5.62)
<b><i>Tiempo de Actividad Sexual (Años)</i></b>	<b><i>n= 44</i></b>						
≤ 10	8	7	23.3	1	7.1	<b>Ref.</b>	
11-20	10	8	26.7	2	14.3	<b>1.04</b>	(0.05-21.82)
21-30	14	7	23.3	7	50.0	<b>6.24</b>	(0.52-74.48)
≥ 31	12	8	26.7	4	28.6	<b>2.51</b>	(0.17-36.49)
<b><i>Número de Parejas Sexuales</i></b>	<b><i>n=48</i></b>						
0-1	21	14	43.7	7	43.7	<b>Ref.</b>	
>2	27	18	56.2	9	56.2	<b>1.12</b>	(0.21-5.75)

No fue posible establecer una asociación entre la presencia de α-E4/IgA y las características sociodemográficas y de comportamiento sexual. Esto debido al bajo número de casos que resultaron positivos en este grupo ( $n=3$ ). Aunque se realizó un análisis estadístico mediante una prueba p de tendencias no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas debido al bajo número de muestras. (Tabla VII).

**Tabla VII. Prevalencias de  $\alpha$ -E4/IgA en los grupos por lesión, tiempo de actividad sexual y número de parejas sexuales.**

<i>Características sociodemográficas y de comportamiento sexual</i>		<i><math>\alpha</math>-E4/IgA</i>				<i>p</i>
		<i>Negativos n=45</i>		<i>Positivos n=3</i>		
		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
<i>Lesiones</i>		<i>n= 48</i>				
	SL	12	11	24.4	1	33.3
	CIN1	9	9	20.0	0	0.0
	CIN2	11	9	20.0	2	66.7
	CIN3	10	10	22.2	0	0.0
	CaCU	6	6	13.3	0	0.0
<i>Tiempo de Actividad Sexual (Años)</i>		<i>n= 44</i>				
	≤ 10	8	7	17.1	1	33.3
	11-20	10	10	24.4	0	0.0
	21-30	14	13	31.7	1	33.3
	≥ 31	12	11	26.8	1	33.3
<i>Número de Parejas Sexuales</i>		<i>n=48</i>				
	0-1	21	20	44.4	1	33.3
	>2	27	25	55.6	2	66.7

Las asociaciones entre la positividad de anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG y los factores de riesgo se evaluaron al igual que en las otras inmunoglobulinas mediante una regresión logística, incorporando además la p de tendencias para reforzar el análisis.

En cuanto al grado de lesión, el grupo CIN2 fue el que mostró mayor prevalencia (44.4%), obteniéndose un OR de 13.01, lo que indica una asociación marcada entre la presencia de  $\alpha$ -E4/IgG y este nivel de lesión. Para CIN3 y CaCU también se identificaron asociaciones elevadas, con OR de 9.55 y 4.10 respectivamente. Además, las mujeres mayores de 50 años presentaron un OR de 13.27, evidenciando una asociación importante entre la positividad de IgG y este grupo etario. Por su parte, las mujeres con tres a cinco embarazos mostraron la mayor prevalencia de IgG (6%), lo que reflejó un OR de 2.15 (**Tabla VIII**).

Tabla VIII. Asociación entre la presencia de anticuerpos anti-E4 isotipo IgG y factores de riesgo.

Características sociodemográficas y de comportamiento sexual	$\alpha$ -E4/IgG				OR	IC (95%)	p
	Negativos n=39		Positivos n=9				
	n	%	n	%			
<b>Lesiones</b>	<b>n= 48</b>						
SL	12	11	28.2	1	11.1	Ref.	
CIN1	9	9	23.1	0	0.0	-	-
CIN2	11	7	17.9	4	44.4	<b>13.01</b>	(0.39-429.76)
CIN3	10	7	17.9	3	33.0	<b>9.55</b>	(0.40-224.93)
CaCU	6	5	12.8	1	11.1	<b>4.10</b>	(0.07-224.39)
<b>Edad (Años)</b>	<b>n= 44</b>						
≤ 29	6	4	11.4	2	22.2	Ref.	
30-39	16	14	40.0	2	22.2	0.59	(0.02-14.00)
40-49	10	9	25.7	1	11.1	0.54	(0.01-8.22)
≥ 50	12	8	22.9	4	44.4	<b>13.27</b>	(0.19-922.45)
<b>Número Embarazos</b>	<b>n= 48</b>						
0-2	9	8	20.5	1	11.1	Ref.	
3-5	27	21	53.8	6	66.7	<b>2.15</b>	(0.11-43.4)
≥ 6	12	10	25.6	2	22.2	0.23	(0.00-23.27)
<b>Infección por HPV</b>	<b>n= 48</b>						
Negativos	37	30	76.9	7	77.8	Ref.	
Bajo Riesgo	1	1	2.7	0	0.0	-	-
HPV16	6	5	12.8	1	11.1	0.44	(0.01-14.23)
Alto riesgo	4	3	7.7	1	25.0	1.14	(0.06-19.18)
<b>Número de Parejas Sexuales</b>	<b>n=48</b>						
0-1	21	17	43.6	4	44.4	Ref.	
>2	27	22	56.4	5	55.6	0.12	(0.00-1.52)

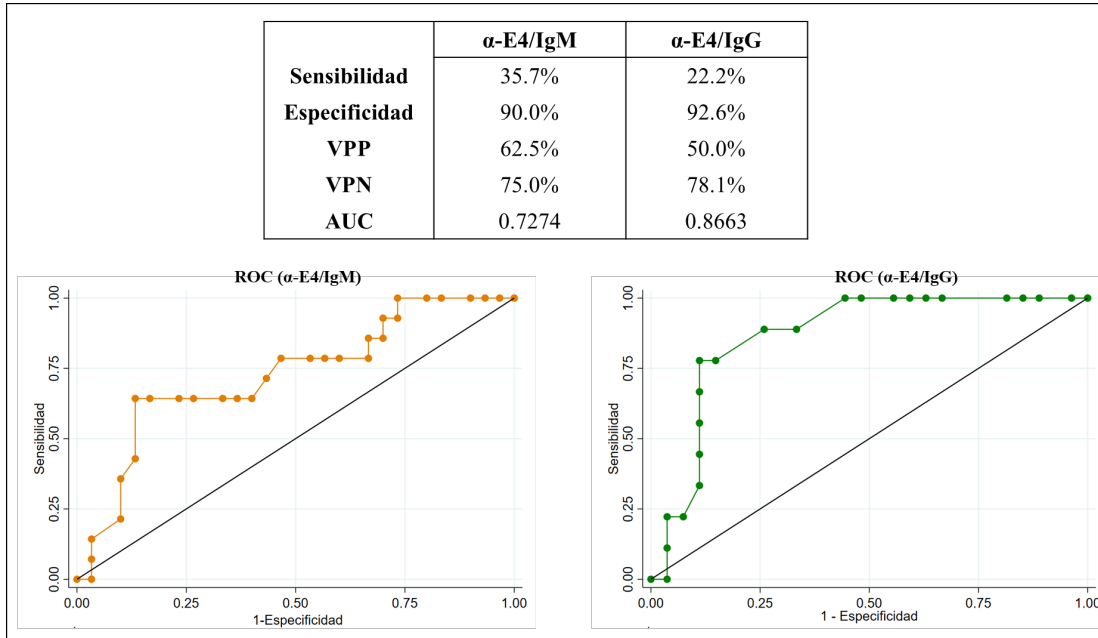
Una vez identificadas las características sociodemográficas y de comportamiento sexual con mayor influencia sobre la asociación de los distintos tipos de anticuerpos, se procedió al ajuste de los modelos de regresión logística.

En el caso de  $\alpha$ -E4/IgM el ajuste se realizó teniendo en cuenta: tipo de lesión del cérvix uterino, estado civil, tiempo de actividad sexual y número de parejas sexuales. Los resultados mostraron una baja sensibilidad (35.7%), pero una alta especificidad (90.0%), lo que indica que la prueba es capaz de identificar correctamente a las mujeres negativas, lo cual está en concordancia con el alto VPN obtenido (75.0%). En este caso se obtuvo un AUC de 0.7274, lo cual es bueno teniendo en cuenta el pequeño tamaño de nuestra muestra (**Fig. 14**).

Por su parte, el ajuste del modelo para  $\alpha$ -E4/IgG se realizó teniendo en cuenta: tipo de lesión del cérvix uterino, edad, número de embarazos e infección por HPV, mientras que el número de parejas sexuales se incluyó en nuestra tabla, pero no en el ajuste de nuestro modelo. En este caso también obtuvimos una alta especificidad y VPN correspondientes a 92.6% y 78.1% respectivamente, mientras que el AUC obtenido fue de 0.866, siendo el valor más alto entre todos los análisis realizados, lo que sugiere que nuestra prueba tiene una alta capacidad discriminatoria (**Fig. 14**).

## Resultados

Para el caso de  $\alpha$ -E4/IgA, no fue posible realizar el ajuste del modelo debido a que solo obtuvimos tres casos positivos para esta inmunoglobulina lo que limitó nuestro análisis estadístico.



**Figura 14.** Curvas ROC de los modelos ajustados para  $\alpha$ -E4/IgM y  $\alpha$ -E4/IgG. En la tabla se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y AUC obtenidos para cada modelo. La curva de la izquierda corresponde al modelo ajustado para  $\alpha$ -E4/IgM (AUC=0.7274) y la de la derecha al modelo ajustado  $\alpha$ -E4/IgG (AUC=0.8663).

## **9. Discusión**

El cáncer de cérvix uterino es la cuarta causa de muerte en mujeres a nivel mundial <sup>(5)</sup> y pese a las campañas de prevención y a los programas de vacunación, sigue siendo un problema de salud importante. La detección temprana de este cáncer y de las lesiones precursoras es esencial para reducir la mortalidad asociada al mismo <sup>(53)</sup>. Los protocolos actuales se basan en citología líquida (Papanicolau), colposcopia y pruebas complementarias como la detección de DNA y RNA de HPV <sup>(54)</sup>, ya que el 99% de los casos están vinculados al virus <sup>(3)</sup>. Sin embargo, estas pruebas presentan limitaciones de sensibilidad y sobre todo de especificidad, al depender de la interpretación del personal y de la calidad de la toma de la muestra <sup>(15, 16, 17)</sup>. Esto ha contribuido a falsos positivos y a la saturación de los servicios de salud <sup>(16, 18)</sup>. Biomarcadores como p-16, MCM y Ki-67 se han propuesto como alternativas, pero su expresión en otros tipos de cáncer y su asociación principalmente con lesiones de alto grado limitan su utilidad para la detección temprana <sup>(25)</sup>

### **9.1 Anticuerpos contra HPV como biomarcadores.**

La detección de anticuerpos séricos contra las proteínas del HPV se ha mostrado como una alternativa confiable ya que es una forma indirecta y amplificada de medir la respuesta en contra del virus. Los pacientes con carcinoma orofaríngeo (OPC), HPV16+ presentan anticuerpos detectables para las proteínas E1, E2 y E7 proponiéndose como biomarcadores potenciales para la detección del OPC asociado a la presencia del virus <sup>(55)</sup>. Otros han asociado la presencia de anticuerpos contra E6 como un predictor de recurrencia del OPC <sup>(56, 57)</sup>. En el caso del CaCU se han realizado investigaciones basadas fundamentalmente en los anticuerpos contra las oncoproteínas del virus E6 y E7 detectándose altas prevalencias de estos en CIN3 y CaCU, lo que los hace excelentes predictores de los estadios avanzados de la enfermedad <sup>(45)</sup>. Recientemente, un estudio sugiere que los anticuerpos contra la proteína E5 podrían estar asociados con la desaparición de la infección en mujeres sin lesión y con lesiones CIN1 <sup>(44)</sup>.

En particular, los anticuerpos dirigidos contra la proteína E4 representan una opción prometedora, dado que tanto la proteína como los anticuerpos se detectan en etapas tempranas de la infección <sup>(37)</sup>. Estudios previos como el de Pedroza-Saavedra et al., 2000 y el de Salazar Piña et al., 2016 han reportado una alta prevalencia de  $\alpha$ -E4 en mujeres con CaCU siendo del 60% y del 75% respectivamente <sup>(48, 46)</sup>. En nuestro estudio

obtuvimos resultados consistentes con los reportados por estos autores, ya que las mujeres con CaCU representaron el grupo con la mayor prevalencia de  $\alpha$ -E4 (40%).

Cabe destacar que, hasta donde se tiene conocimiento, **no existen estudios previos que evalúen la presencia de inmunoglobulinas específicas contra la proteína E4 del HPV como posibles biomarcadores de las lesiones cervicales**, lo que posiciona a este trabajo como una aportación innovadora en el área.

### 9.2. $\alpha$ -E4/IgG como biomarcadores de progresión de lesiones de alto grado.

Sin duda alguna, el hallazgo de mayor relevancia en nuestro estudio corresponde a la posible utilización de los anticuerpos  **$\alpha$ -E4/IgG como biomarcadores de lesiones CIN2+, con una tendencia a desaparecer a medida que la lesión avanza hacia CIN3 y cáncer de cérvix uterino, lo cual se sugiere por la asociación positiva observada (OR > 13). La prevalencia de  $\alpha$ -E4/IgG (18.8%) fue similar a lo reportado en una población sexualmente activa (13-18%)<sup>(58, 59)</sup>. En nuestro análisis, la presencia de IgG se asoció principalmente con lesiones de alto grado (CIN2-3) y, en menor medida, con CaCU, lo que sugiere que este isotipo podría estar asociado a la memoria inmunológica derivada de la persistencia de episomas virales y a un estado replicativo del HPV, en el que la proteína E4 está implicada. En un estudio realizado en 2024 por Weiland et al., se observó que los anticuerpos  $\alpha$ -L1/IgG se asociaron con estadios avanzados del cáncer orofaríngeo<sup>(40)</sup>. Este hallazgo es de relevancia, dado que los anticuerpos anti-E4 podrían indicar que las mujeres con lesiones de alto grado (CIN2-3) y positividad a IgG estarían en mayor riesgo de progresar a lesiones de alto grado (Fig. 15). Sin embargo, esta hipótesis deberá corroborarse mediante el seguimiento de estas pacientes, lo cual tendría gran importancia clínica.**

Los anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG mostraron una especificidad superior al 90% y un AUC de 0.8663, lo que refleja su excelente capacidad para detectar a los verdaderos negativos y, a su vez, un notable potencial para detectar a mujeres con lesiones de alto grado (CIN2-3). Además, los títulos de IgG superaron ampliamente a los de IgA e IgM, lo que consolidó a IgG como la inmunoglobulina de mayor relevancia en nuestro estudio.

Esta alta capacidad predictiva y la alta especificidad del ensayo hacen que la detección de anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG pueda considerarse para incorporarse como prueba complementaria al algoritmo de diagnóstico actual, situándose estratégicamente después de la prueba de Pap y antes de la colposcopia. Este enfoque permitiría optimizar los sistemas de salud, reduciendo la carga de falsos negativos enviados a colposcopia y

asegurando un seguimiento más preciso y seguro para las mujeres con riesgo de progresión al cáncer de cérvix uterino.

### **9.3. $\alpha$ -E4/IgA como biomarcadores de la regresión de las lesiones.**

Recientemente, un estudio publicado en 2024 por Weiland et al., asoció la presencia de anticuerpos IgA contra la proteína L1 de HPV con procesos de regresión a estadios tempranos del cáncer orofaríngeo <sup>(40)</sup>. Nuestros resultados coinciden con estas observaciones, aunque en nuestro estudio únicamente tres mujeres resultaron positivas para  $\alpha$ -E4/IgA: una sin lesión y dos con CIN2, lo cual podría estar relacionado con la baja frecuencia de este isotipo en la sangre <sup>(60)</sup>. No obstante, su detección a nivel sérico constituye un hallazgo relevante, pues podría indicar una fuerte respuesta inmunológica en el sitio de la infección, lo que reforzaría la hipótesis de su participación en procesos de regresión. Es importante mencionar que son necesarios estudios con un tamaño de muestra mayor que permitan confirmar esta hipótesis y establecer su valor real como biomarcador de regresión (**Fig.15**).

### **9.4 $\alpha$ -E4/IgM presentes en mujeres sin lesión y con lesión en el cérvix uterino.**

Los anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgM estuvieron presentes desde las mujeres sin lesión y en todos los estadios de la enfermedad y mujeres con cáncer, representando la inmunoglobulina con mayor prevalencia (33.0%) presentando un pico de prevalencia en CIN1 y una asociación positiva con este grado de lesión ( $OR=2.40$ ) lo que se podría indicar una infección reciente en este estadio, mientras que su presencia en lesiones de alto grado y CaCU podría deberse a reinfecciones (**Fig.15**). No obstante, debido a que este isotipo se detectó en todos los grados de lesión del cérvix uterino, su utilidad diagnóstica como marcador independiente resulta limitada.

### **9.5 Factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos y a las lesiones del cérvix uterino.**

Se sabe que factores de riesgo como el tiempo de actividad sexual, la edad, el número de embarazos, el tabaquismo y el número de parejas sexuales se han asociado con el riesgo

de desarrollar cáncer de cérvix uterino, por lo que resultó necesario analizarlos en conjunto con los isotipos de anticuerpos anti-E4<sup>(6,7)</sup>.

El tiempo de actividad sexual se ha identificado como un factor de riesgo clave para la aparición de lesiones cervicales, ya que, a mayor número de años de exposición, se incrementa la probabilidad de contacto con el HPV<sup>(61)</sup>. En nuestro estudio observamos una asociación positiva entre este factor de riesgo y la presencia de IgM, especialmente en el rango de 21 a 30 años ( $OR=6.24$ ), lo que refuerza la idea de que este isotipo refleja una infección reciente o episodios de reinfección. Teniendo en cuenta que la proteína E4 es altamente expresada durante la fase productiva del virus y es por tanto un marcador de replicación activa del mismo, la respuesta de IgM puede entenderse como un indicador de exposición continua al HPV.

La edad también es un factor de riesgo que se ha relacionado con la progresión de la enfermedad con el tiempo, pues es conocido que las mujeres mayores de 50 años tienen un riesgo incrementado de padecer CaCU, lo cual está asociado tanto a la persistencia viral como a fenómenos de inmunosenescencia<sup>(62)</sup>. Un estudio realizado en Inglaterra confirmó que las mujeres de esta edad presentan un mayor riesgo de desarrollar CaCU en especial aquellas que no han presentado un seguimiento anterior<sup>(63)</sup>. En nuestro caso, este grupo etario mostró una fuerte asociación con IgG ( $OR=13.27$ ), lo cual es coherente con lo que hemos planteado con anterioridad: que este isotipo está asociado a la memoria inmunológica y con la posibilidad de que refleje infecciones persistentes o de larga duración.

Por otra parte, el número de parejas sexuales se mantiene como uno de los factores de riesgo de mayor consistencia. A mayor número de parejas, mayor probabilidad de exposición al HPV y, por tanto, de desarrollar una respuesta inmunológica detectable. En nuestra población de estudio, este factor mostró una asociación positiva con el isotipo IgM, lo cual concuerda con estudios previos que documentan este comportamiento como uno de los determinantes más importantes de la adquisición y de las reinfecciones con HPV<sup>(63)</sup>.

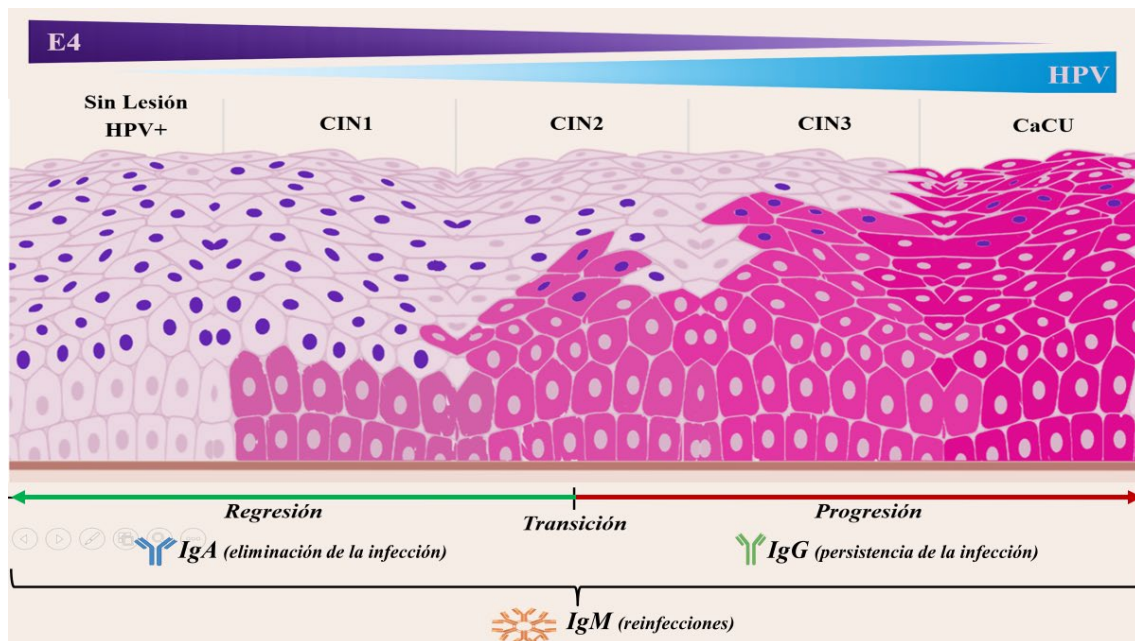
Diversos autores han señalado que el embarazo puede favorecer la persistencia del virus debido a los cambios hormonales y a la inmunomodulación propia de este estado. Un metaanálisis realizado en el año 2022 demostró que las mujeres con alta paridad tenían 2.65 veces más posibilidades de desarrollar CaCU<sup>(64)</sup>. A ello se suma el trauma obstétrico repetido en el cuello uterino, que favorece procesos de metaplasia y facilita la entrada del virus<sup>(65, 66)</sup>. En nuestro análisis se observó una tendencia positiva entre el número de

embarazos y la presencia de anti-E4/IgG, lo cual podría explicarse por la mayor vulnerabilidad inmunológica de las mujeres con múltiples gestaciones, tal como se ha descrito en la literatura.

En conjunto, nuestros resultados refuerzan la evidencia de que factores tradicionales como la edad, el tiempo de actividad sexual, el número de parejas sexuales y la multiparidad no solo aumentan el riesgo de desarrollar lesiones en el cérvix uterino, sino que también influyen en la dinámica de la respuesta humoral frente al HPV.

### **9.6 Detección de anticuerpos contra E4 como prueba complementaria a la colposcopia y al Papanicolaou.**

Nuestro análisis incluyó no solo a mujeres con CaCU, sino también a adolescentes, lo que permitió establecer un punto de corte más preciso y, al mismo tiempo, lograr una diferenciación adecuada entre mujeres sanas y enfermas. Esto derivó en una especificidad del 76.6% al comparar el grupo adolescente con las mujeres sin lesión y con los distintos grados de lesión hasta llegar al CaCU. Sumado a ello, se obtuvo un VPN superior al 80%, lo que sugiere que nuestra prueba es eficiente para la identificación correcta de las mujeres negativas. Nuestros resultados se ubicaron por debajo de los reportados por Salazar-Piña et al., 2016, estudio a partir del cual se seleccionó nuestra población, obteniéndose una especificidad entre 82.7% y 89.6% mientras que el VPN osciló entre 39.7% y 95.7% <sup>(48)</sup>. No obstante, considerando que nuestra población representa solo una muestra, los hallazgos constituyen un avance relevante, ya que sugieren que, al ampliar el tamaño de la muestra, podría incrementarse la capacidad discriminatoria de la prueba. En conclusión, los resultados de este estudio respaldan la posibilidad de **incorporar la detección de anticuerpos  $\alpha$ -E4 especialmente los  $\alpha$ -E4/IgG como una prueba complementaria** al Papanicolaou y la colposcopia, lo que podría mejorar la eficiencia diagnóstica y optimizar la identificación temprana de mujeres con riesgo de progresión hacia cáncer cervicouterino. En este trabajo no se plantea sustituir las pruebas existentes, sino complementarlas para favorecer la detección temprana de mujeres con riesgo de desarrollar CaCU.



**Figura 15. Representación del epitelio del cérvix uterino sin lesión y con los distintos grados de lesión (CIN1, CIN2, CIN3) hasta llegar al cáncer.** Los puntos morados corresponden a la proteína E4, abundante en las mujeres sin lesión positivas a HPV y en lesiones de bajo grado (CIN1, CIN2), mientras que su presencia disminuye en CIN3 y CaCU. Los anticuerpos IgA se observan principalmente en las lesiones CIN2 hacia abajo, lo que podría relacionarse con procesos de regresión; por el contrario, los IgG aparecen en CIN2 en adelante, sugiriendo un papel asociado a la progresión. El CIN2 destaca como punto de transición entre la regresión y la progresión. Finalmente, los anticuerpos IgM están presentes en todas las lesiones incluyendo el cáncer y en las mujeres Sin Lesión.

## **10. Conclusiones**

### **10.1 Anticuerpos $\alpha$ -E4/IgG como biomarcadores de progresión a lesiones de alto grado.**

Los anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG fueron los que mostraron mayor utilidad diagnóstica, con una especificidad superior al 90% y un AUC de 0.8663 y su presencia se observó principalmente en lesiones CIN2-3, lo que respalda la posibilidad de que este isotipo refleje infecciones persistentes o de larga duración y en consecuencia, un mayor riesgo de progresión hacia CaCU. Los resultados respaldan la posible **incorporación de los anticuerpos  $\alpha$ -E4/IgG como prueba complementaria al Papanicolau y a la colposcopia, con el objetivo de mejorar la identificación temprana de mujeres con riesgo de progresión a CaCU.**

### **10.2 Anticuerpos $\alpha$ -E4/IgM sin utilidad diagnóstica como marcadores independientes.**

Los  $\alpha$ -E4/IgM fue el isotipo más frecuente en la población estudiada estando presente en todos los grados de lesión del cérvix uterino, con un incremento notable en los CIN1. Este comportamiento sugiere infecciones recientes o episodios de reinfección, sin embargo, dada su presencia en todos los grados de lesión del cérvix uterino **su valor como marcador independiente es limitado.**

### **10.3 Anticuerpos $\alpha$ -E4/IgA como posibles biomarcadores de regresión de las lesiones.**

Los  $\alpha$ -E4/IgA se detectaron en muy pocos casos de la población estudiada, sin embargo, su presencia a nivel sérico en mujeres sin lesión y con CIN2 abre la posibilidad de que estén **vinculados a procesos de regresión, pudiéndose considerar como un marcador de regresión de las lesiones en el tiempo.** Se necesitan estudios con mayor número de muestras para validar esta hipótesis.

### **10.4 Factores de riesgo a tener en cuenta dada su influencia sobre la aparición de las lesiones.**

**Factores de riesgo** como la edad, el tiempo de actividad sexual, el número de parejas sexuales y la multiparidad mostraron asociaciones consistentes con los distintos isotipos, confirmando que su presencia puede **contribuir al desarrollo de la enfermedad hasta llegar a lesiones de alto grado o cáncer.**

**11. Referencias bibliográficas**

1. Buskwofie A, David-West G, Clare CA. A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. *Journal of the National Medical Association*. 2020 Abr 1;112(2):229–32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32278478/>
2. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80–98.
3. Muñoz-Bello JO, Carrillo-García A, Lizano M. Epidemiology and Molecular Biology of HPV Variants in Cervical Cancer: The State of the Art in Mexico. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Ene 1;23(15):8566. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8566/htm>
4. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, Risk Factors and Screening. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2020 Dic 31;32(6):720–8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7797226/>
5. Global Cancer Observatory. Global Cancer Observatory. *Iarc.fr*. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
6. Memon A, Bannister P. Epidemiology of Cervical Cancer. En: *Uterine Cervical Cancer*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 1–16.
7. Choi S, Ismail A, Pappas-Gogos G, Boussios S. HPV and Cervical Cancer: A Review of Epidemiology and Screening Uptake in the UK. *Pathogens*. 2023 Feb 1;12(2):298. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/2/298>
8. Toro-Montoya AI, Tapia-Vela LJTV. Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer. *Medicina y Laboratorio*. 2021 Abr 5;25(2):467–83.
9. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *Journal of General Virology*. 2021 Mar 1;102(3).
10. Skelin J, Sabol I, Tomaić V. Do or Die: HPV E5, E6 and E7 in Cell Death Evasion. *Pathogens*. 2022 Sep 1;11(9):1027. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/9/1027>
11. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina*. 2019 Jul 17;55(7):384. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681523/pdf/medicina-55-00384.pdf>

## *Referencias bibliográficas*

12. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov;30(5): F55–70.
13. Graham Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*. 2017 Ago 10;131(17):2201–21. Disponible en: <http://www.clinsci.org/content/131/17/2201>
14. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005 Mar; 32:7–15.
15. Zaldívar Lelo de Larrea G, Martín Molina F, Sosa Ferreyra CF, Ávila Morales J, Lloret Rivas M, Román Lara M, et al. Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *REV CHIL OBSTET GINECOL*.2012;77(2):31-21.
16. Shiraz A, Crawford R, Egawa N, Griffin H, Doorbar J. The early detection of cervical cancer. The current and changing landscape of cervical disease detection. *Cytopathology*. 2020 Jul;31(4):258–70.
17. Gutierrez-Xicotencatl L, Salazar-Piña A, Pedroza-Saavedra A, Chihu-Amparan L, Angelica Nallelhy Rodriguez-Ocampo, Maldonado-Gama M, et al. Humoral Immune Response Against Human Papillomavirus as Source of Biomarkers for the Prediction and Detection of Cervical Cancer. 2016 Mar 1;29(2):83–94.
18. Toro R, Reigosa A, Castro J, Contreras A, Del Villar M, González P, et al. Factores histológicos relacionados con resultados discordantes entre Salus la biopsia y la prueba de ADN, en el diagnóstico del virus papiloma humano (VPH). *Rev SalusUC*. 2016;20(2):30–6.
19. Griffin H, Wu Z, Marnane R, Dewar V, Molijn A, Quint W, et al. E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PloS One*. 2012; 7(12):99-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226504>
20. IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. [www.iarc.who.int](http://www.iarc.who.int). Disponible en: <https://www.iarc.who.int/>
21. Leeman A, Jenkins D, Pino M, Ordi J, Torné A, Doorbar J, et al. Expression of p16 and HPV E4 on biopsy samples and methylation of FAM19A4 and miR124-2 on cervical cytology samples in the classification of cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer Medicine*. 2020 Abr;9(7):2454–61.
22. Serra S, Chetty R. p16. *Journal of Clinical Pathology*. 2018 Aug 3;71(10):853–8. Disponible en: <https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/71/10/853.full.pdf>

23. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina*. 2019 Jul 17;55(7):384. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681523/pdf/medicina-55-00384.pdf>
24. Leeman A, Jenkins D, Pino M, Ordi J, Torné A, Doorbar J, et al. Expression of p16 and HPV E4 on biopsy samples and methylation of FAM19A4 and miR124-2 on cervical cytology samples in the classification of cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer Medicine*. 2020 Abr;9(7):2454–61.
25. Griffin H, Soneji Y, Van Baars R, Arora R, Jenkins D, van de Sandt M, et al. Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM. *Modern Pathology*. 2015 May 8;28(7):977–93.
26. Griffin H, Soneji Y, Van Baars R, Arora R, Jenkins D, van de Sandt M, et al. Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM. *Modern Pathology*. 2015 May 8;28(7):977–93.
27. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):80–98.
28. Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert PF. Human Papillomavirus Type 16 E1/E4 Contributes to Multiple Facets of the Papillomavirus Life Cycle. *Journal of Virology*. 2005 Oct 1;79(20):13150–65. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1235822/>
29. E. Davy C, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, et al. Identification of a G2 Arrest Domain in the E1/E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2002 Abr 5;9806–18.
30. Davy C, Jackson DJ, Raj K, Woei Ling Peh, Southern SA, Das P, et al. Human Papillomavirus Type 16 E1/E4-Induced G2 Arrest Is Associated with Cytoplasmic Retention of Active Cdk1/Cyclin B1 Complexes. *Journal of Virology*. 2005 Apr 1;79(7):3998–4011.
31. Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1/E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Associates with Mitochondria. *Journal of Virology*. 2004 Jun 11;78(13):7199–207.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai. *Inmunología celular y molecular*. 10th ed. Barcelona: Elsevier; 2022.

33. Monroy-Iglesias MJ, Crescioli S, Beckmann K, Le N, Karagiannis SN, Van Hemelrijck M, et al. Antibodies as biomarkers for cancer risk: a systematic review. *Clinical and Experimental Immunology*. 2022 Abr 4;209(1):46–63. Disponible en: <https://academic.oup.com/cei/article/209/1/46/6563255>
34. Seo SI, Choi HS, Choi BY, Kim HS, Kim HY, Jang MK. Coexistence of hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface may increase the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection: a retrospective cohort study. *J Med Virol* 2014, 86, 124–30. doi:10.1002/jmv.23779.
35. Amougou MA, Noah DN, Moundipa PF, Pineau P, Njouom R. A prominent role of hepatitis D virus in liver cancers documented in Central Africa. *BMC Infect Dis* 2016, 16-647.
36. Inoue M, Sawada N, Goto A, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, et al. High-negative anti-helicobacter pylori IgG antibody titers and longterm risk of gastric cancer: results from a large-scale populationbased cohort study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2020, 29, 420–6. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0993.
37. Gutierrez-Xicotencatl L, Salazar-Piña A, Chihu-Ampan L, Pedroza-Saavedra A. Serological biomarkers for the prediction and detection of human Papillomavirus associated cancers. Disponible en: *Immunoregulatory Aspects of Immunotherapy*. InTech; 2018.
38. Orth G Y Favre M. Virus del papiloma humano. Propiedades bioquímicas y biológicas. *Clin Dermatol*. 1985; 3:27–42.
39. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000; 181:1911–1919.
40. Weiland T, Zgubic J, Brcic L, Thurnher D. Detection of antibody subclasses IgA, IgM and IgG against HPV L1 in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma patients: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2024;281(5):2637–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-024-08537-9>
41. Pedroza-Saavedra A, Angélica Nallelhy Rodríguez-Ocampo, Dolores Azucena Salazar-Piña, Aislinn Citlali Perez-Morales, Chihu-Ampan L, Maldonado-Gama M, et al. Differential Antibody Response against Conformational and Linear Epitopes of the L1 Proteins from Human Papillomavirus Types 16/18 Is

- Observed in Vaccinated Women or with Uterine Cervical Lesions. *Vaccines*. 2021 May 2;9(5):442–2.
42. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, et al. Respuestas inmunes contra partículas similares al virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 en un estudio de cohorte de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical. II. Las respuestas sistémicas, pero no locales de IgA se correlacionan con la eliminación del VPH-16. *J Gen Virol* 1999; 80 (parte 2): 409–417.
  43. Rocha-Zavaleta L, Jordan D, Pepper S, et al. Differences in serological IgA responses to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *Br J Cancer* 1997; 75:1144–1150.
  44. Salazar-Piña A, Maldonado-Gama M, Gonzalez-Jaimes AM, Cruz-Valdez A, Ortiz-Panozo E, Esquivel-Guadarrama F, et al. Serum antibodies against the E5 oncoprotein from human Papillomavirus type 16 are inversely associated with the infection and the degree of cervical lesions. *Biomedicines*. 2024;12(12). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12122699>
  45. Combes JD, Pawlita M, Waterboer T, Hammouda D, Rajkumar T, Vanhems P, et al. Antibodies against high-risk human papillomavirus proteins as markers for invasive cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 2014 Abr 26;135(10):2453–61.
  46. Pedroza-Saavedra A, Cruz A, Esquivel F, De La Torre F, Berumen J, Gariglio P, et al. High prevalence of serum antibodies to Ras and type 16 E4 proteins of human papillomavirus in patients with precancerous lesions of the uterine cervix. *Arch Virol*. 2000;145(3):603–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s007050050050>
  47. Vázquez-Corzo S, Trejo-Becerril C, Cruz-Valdez A, Hernández-Nevarez P, Esquivel-Guadarrama FR, Gutiérrez-Xicotencatl M de L. Asociación entre la presencia de anticuerpos anti-Ras y anti-VPH16 E4/E7 y lesiones intraepiteliales del cérvix. *Salud Publica Mex*. 2003;45(5):335–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-36342003000500002>
  48. Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Cruz-Valdez A, Ortiz-Panozo E, Maldonado-Gama M, Chihu-Ampan L, et al. Validation of Serological Antibody Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine*. 2016 Feb 12;95(6): e2769. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4753926/>

## *Referencias bibliográficas*

49. Crowther JR. The ELISA guidebook: Second edition. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: Humana Press; 2010.
50. Mózsik G, editor. Norovirus. Londres, Inglaterra: IntechOpen; 2021.
51. Ribeiro AA, Costa MC, Alves RRF, Villa LL, Saddi VA, Carneiro MADS, et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer*. 2015;10(1):16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-015-0011-3>
52. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical cancer: An overview of pathophysiology and management. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(2):166–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003>.
53. World Health Organization. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva: World Health Organization; 2020.
54. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention: use of dual-stain cytology to triage women after a positive test for human papillomavirus (HPV). Geneva: World Health Organization; 2024 (WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition).
55. Busch C-J, Hoffmann AS, Viarisio D, Becker BT, Rieckmann T, Betz C, et al. Detection of stage I HPV-driven oropharyngeal cancer in asymptomatic individuals in the Hamburg City Health Study using HPV16 E6 serology - A proof-of-concept study. *EClinicalMedicine*. 2022;53(101659):101659. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101659>
56. Spector ME, Sacco AG, Bellile E, Taylor JMG, Jones T, Sun K, et al. E6 and E7 antibody levels are potential biomarkers of recurrence in patients with advanced-stage human Papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(11):2723–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1617>
57. Lang Kuhs KA, Kreimer AR, Trivedi S, Holzinger D, Pawlita M, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence. *Cancer*. 2017;123(22):4382–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.30966>

## *Referencias bibliográficas*

58. Lang Kuhs KA, Pawlita M, Gibson SP, Schmitt NC, Trivedi S, Argiris A, et al. Characterization of human papillomavirus antibodies in individuals with head and neck cancer. *Cancer Epidemiol.* 2016;42:46–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2016.03.003>
59. Ewaisha R, Ruffin MT, Williams S, Chung Y, DeGraffinreid CR, Paskett ED, et al. Serum profiling of the antibody response to HPV in women with or without abnormal cervical cytology undergoing cervical cancer screening. *Front Immunol.* 2025;16(1612761):1612761. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2025.1612761>
60. Male DK, Brostoff J, Roth DB, Roitt IM, Masson PL (2007) *Immunologie*, 7th edn. Elsevier, Masson, pp 41-42
61. Plummer M, Peto J, Franceschi S, International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. *Int J Cancer.* 2012;130(11):2638–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26250>
62. He J, Zhuang Y, Hu C. Clinicopathological characteristics and prognostic risk factors of cervical cancer patients aged  $\leq 35$  years old. *Medicine (Baltimore).* 2022;101(50):e32004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000032004>
63. Castañón A, Landy R, Cuzick J, Sasieni P. Cervical screening at age 50-64 years and the risk of cervical cancer at age 65 years and older: population-based case control study. *PLoS Med.* 2014;11(1):e1001585. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001585>
64. Tekalegn Y, Sahiledengle B, Woldeyohannes D, Atlaw D, Degno S, Desta F, et al. High parity is associated with increased risk of cervical cancer: Systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Womens Health (Lond Engl).* 2022;18(17455065221075904):17455065221075904. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/17455065221075904>
65. Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ, et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer.* 2009; 100(7):1191–7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6604974>
66. Sun L, Herkanaidu PK, Mohur P, Ramudoo J. Effect of pregnancy on HPV infection and on its mode of management. *Med J Obstet Gynecol.* 2017];

## *Referencias bibliográficas*

Disponible en: <https://www.jscimedcentral.com/journal-article-info/Medical-Journal-of-Obstetrics-and-Gynecology/Effect-of-Pregnancy-on-HPV--Infection-and-on-its-Mode-of--Management-6373>

**12. Anexos**

**Anexo1: Cuestionario V1**

Cuestionario de la Entrevista Inicial

**Proyecto**

**“Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra antígenos de HPV como sistema de diagnóstico temprano para detectar a mujeres en riesgo de desarrollar lesiones en el cérvix uterino”**

Versión Final del 10 Febrero 2008

*Investigadores/ Entrevistadores:*

*Ésta es una entrevista que nos ayudará a saber si los factores específicos de demografía y de conducta son importantes y se asocian a la infección por virus del papiloma humano (HPV) y la presencia de anticuerpos contra proteínas virales que nos permitan hacer un pronóstico del desarrollo de una lesión en el cérvix uterino de la mujer. La entrevista tiene una duración aproximada de 20 minutos.*

*Por favor observe que los textos entre comillas (“”) deben ser leídos al sujeto exactamente como están escritos.*

Nombre del País: México

Centro	Número de sujeto	Visita	Fecha de visita
_____	_____	VISITA 1	____ ____ 20____ día      mes      año
Número de entrevistador			Tiempo al inicio y fin de la entrevista
_____			____:____ inicio   ____:____ fin

*"Me gustaría pasar cerca de 20 minutos haciéndole preguntas relacionadas con su estado civil, educación, hábitos en el fumar, historial sexual y reproductivo. Tal vez sienta que algunas de las preguntas son delicadas, sin embargo, sus respuestas a las preguntas son muy importantes para el estudio. Por favor tome su tiempo para recordar esta información de la manera más exacta posible. Sus respuestas serán registradas utilizando un número de identificación del estudio para proteger su identidad."*

#### INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA

*"Me gustaría empezar haciéndole algunas preguntas sobre sus antecedentes."*

1 "¿Cuál es su estado civil actual?" (lea las opciones y marque la que aplique)

- Soltera  
 Casada  
 Viuda  
 Divorciada o separada  
 Vive con un compañero

2 "¿Cuál es el nivel de educación que ha completado?" (lea las opciones y marque la que aplique)

- Primaria  
 Secundaria  
 Posterior a la secundaria/universidad

#### HÁBITOS DE FUMAR PASADOS Y ACTUALES

*"Ahora voy a preguntarle sobre sus hábitos de fumar." (El término cigarro también puede significar puro o pipa)*

3 "¿Ha probado o experimentado fumar cigarros, aunque sea sólo una o dos fumadas?"

- Sí  
 No (nota, entrevistador pase a la pregunta 6)

4 "Si usted es una fumadora irregular, ha fumado por lo menos 100 cigarros en su vida?"  
(\*regular se considera fumar por lo menos 1 cigarro por día)

- Sí  
 No

5 “¿Usted ha fumado regularmente?” (\*regular se considera fumar por lo menos 1 cigarro por día)

- No (nota, entrevistador pase a la pregunta 6)
- Sí, si responde sí

a) “¿Cuántos años tenía cuando empezó a fumar regularmente?”

|\_|\_| Años (aproximadamente)

b) “¿Actualmente fuma regularmente?”

- Sí; si responde sí

↳ “¿Cuántos cigarros fuma en promedio?”

- ≤ 10 diariamente
- 11-20 diariamente
- 21-40 diariamente
- >40 diariamente

- No; si responde no

↳ “¿Cuántos años tenía cuando dejó de fumar regularmente?”

|\_|\_| Años (aproximadamente)

↳ “¿Cuántos cigarros fumaba en promedio antes de que dejara de fumar regularmente?”

- ≤ 10 diariamente
- 11-20 diariamente
- 21-40 diariamente
- >40 diariamente

↳ “¿Cuándo fue la última vez que fumó por lo menos un cigarro por día?”

- menos de 6 meses atrás
- 6 meses - 1 año atrás
- más de 1 año

### HISTORIAL SEXUAL ACTUAL Y USO DE ANTICONCEPTIVOS NO HORMONALES

*“Las siguientes preguntas se refieren a su historial sexual y al uso de anticonceptivos no hormonales. Por favor tome tiempo para recordar esta información de la manera más exacta posible. Para el propósito de esta entrevista, las relaciones sexuales se refieren al contacto sexual con penetración, contacto sexual genital con genital o contacto sexual oral - genital.”*

6 “¿Ha tenido relaciones sexuales?”

- No; (nota, entrevistador pase a la pregunta 11)  
 Sí

7 “¿Cuántos años tenía cuando tuvo su primera relación sexual?”

\_\_ \_\_ Años (aproximadamente)

8 “¿Cuántos días, semanas, meses o años han pasado desde que tuvo su última relación sexual?”

\_\_ \_\_

- Días  
 Semanas  
 Meses  
 Años

9 “Durante toda su vida con cuántos compañeros ha tenido relaciones sexuales aproximadamente?”

- 1  
 2-5  
 6-10  
 11-15  
 16-20  
 >20

10 “Durante el último año, ¿con cuántos compañeros ha tenido relaciones sexuales?”

\_\_ \_\_ \_\_ número de compañeros (aproximadamente)

Ninguno

a) “¿Con cuántos de estos compañeros tuvo relaciones sexuales por primera vez?” (con los que nunca había tenido relaciones sexuales anteriormente)

\_\_ \_\_ \_\_ número de compañeros (aproximadamente)

b) “Durante el último año, ¿su(s) compañero(s) utilizó (utilizaron) un condón masculino...?”

- Cada vez que usted y él tuvieron relaciones sexuales  
 La mayoría de las veces que usted y él tuvieron relaciones sexuales  
 Algunas veces  
 Nunca

c) "Durante el último año, ¿utilizó regularmente un anticonceptivo femenino que cubriera el cérvix (como una barrera)? Esto incluye métodos como el condón femenino, caperuza cervical y/o diafragma."

- Sí
- No
- Nunca
- No Aplica

d) "Durante el último año, ¿utilizó otros métodos anticonceptivos que no contengan hormonas? (por ejemplo esterilización femenina, coito interrumpido, método del ritmo, medición de temperatura corporal, revisión de moco cervical, espermicidas vaginales, dispositivo intrauterino no hormonal?"

- Sí
- No
- No Aplica

### HISTORIAL REPRODUCTIVO Y CONDICIÓN DE MENOPAUSIA

"La siguiente pregunta es acerca de cualquier embarazo previo y condición de menopausia."

11 "¿Alguna vez ha estado embarazada?"

- No
- Sí; si responde sí

↳ "¿Cuántas veces?"

|\_|\_|

↳ "¿Cuántos de sus embarazos resultaron en partos de bebés vivos?"

|\_|\_| Por vía vaginal

|\_|\_| Por cesárea

↳ "¿Cuántos de sus embarazos resultaron en partos de fetos muertos?"

|\_|\_| Por vía vaginal

|\_|\_| Por cesárea

↳ "¿Cuántos de sus embarazos resultaron en malparto o aborto?"

|\_|\_|

"Éste es el final de la entrevista. Gracias."



**FACULTAD DE MEDICINA**  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 28 de noviembre de 2025.

**Dr. Lorenzo Díaz Carrillo**  
**Director de la Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana del cérvix uterino**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Gil Delgado. 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. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes**



Calle Iztaccíhuatl esq. Leñeros s/n, Col. Los Volcanes Cuernavaca, Mor., Cuernavaca Morelos, México, CP 62350.  
Tel. (777) 329 7048, / medicina@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LUIS ENRIQUE ALBERTO CAÑEDO Y DORANTES | Fecha:2025-12-12 11:07:01 | FIRMANTE

YuNaEIQ5Xsc03Za0oRYmBnsirRMP1ykrgozxlNA3vdwfpfp/NLFZcWUvGczN+Pofcx36vHpiUjFmGmrXMHChktDGvzMsNqnmkrAqDyKHvFSrj6dTaidO7JM29EhrR+3AM3zY9SgqcOKq4m0HdG/1PIExq/XzroraW+mfoalqerXkCdWpbVfohXKrNqxdDXQtJyGlggQQ7ZQzAN81en00BV+3sCepeuh9ZIML8jOryM0YuwgNdrgr6vRHFv/XaofP0SIdbCsHgaom7aWgd1QbCwJ6GyQygyZ+3FPyqqWzrPgh8/P/w05ScxCKUJgCB7yHr8ngS3Dc5dFLICiyB0xQg==

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



VgK3kNylW

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/rUFvyyVcEDTt4faHVF5Mk3WXlI0S>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



**FACULTAD DE MEDICINA**  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 28 de noviembre de 2025.

**Dr. Lorenzo Díaz Carrillo**  
**Director de la Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana del cérvix uterino**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Gil Delgado. 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. Gabriela Rosas Salgado**



Calle Iztaccihuatl esq. Leñeros s/n, Col. Los Volcanes Cuernavaca, Mor., Cuernavaca Morelos, México, CP 62350.  
Tel. (777) 329 7048, / medicina@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

**Sello electrónico**

**GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2025-12-12 13:43:34 | FIRMANTE**

K8P1Ad3Vcgj6XC3CovQ8Wz2pnP4sKBe7Xu7xLYFbi6cr1R5wzCShQca+og63IzjCQU55cd1+8g6ohLstGA+n5ykc02Btu9emTRc6EKxAAx9qqWvsqgRpN+cl7v0ldu2AKEO82Gg  
f6q9qEa8DKkjuVvs+9Z38Ln0h5+SPnhFLZ5WIs9xTRLiWrvzYw92bQGSQ6PO+ggoOtdGlnB0OYCdwpylh2c11AYFYrVDKbsx0NChspilRxxwdyEMxEXRr4dFMeVAT0wvYTBa  
OtaKk7RJCu86ZEiyywGsl1fc10BIge8dY0MyjKbvyYa1vk+xsc2ajAgNGwrgObA/Cq2Sizw==

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



[OGCSWwXKu](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6Xl3kDHvIH2gHcFe69jouTWA0JXoxc>



**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



**FACULTAD DE MEDICINA**  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 28 de noviembre de 2025.

**Dr. Lorenzo Díaz Carrillo**  
**Director de la Facultad de Medicina**

**Presente**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana del cérvix uterino**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Gil Delgado. 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. Juan José Acevedo Fernández**



Calle Iztaccíhuatl esq. Leñeros s/n, Col. Los Volcanes Cuernavaca, Mor., Cuernavaca Morelos, México, CP 62350.  
Tel. (777) 329 7048, / medicina@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2025-12-01 22:11:57 | FIRMANTE

NxMORvaAsBSTDZCgMlprHwVARq6xIAI/J8nltwTYTxNoE8KgNxXTctYJXLVAgaXi8qDNJ4QC6jL2PXNPF2rLjT67NGv4C+GdbWQo4qHapV47T4vip9deTsxzVVR5L9DYDw+wbXBOoK0RGiq0IvmCXVL2y5bHO5oXJMNSViJBSzQ+sYo1NgfOSjJTZQVFQEcu7qwEK8aQ/cgA8UJmfC4a0/qVoz29OwWZAj+KtwBsOQww1SE6WgJRQ5jz9cJyyCvoMYK67DbEBEMJoqtnsTOXACFCqZ0ZcnsoGG9/dTfuxDUvxjBSC/bNYMpa5x/sBjhlBhu3ShfwEpD0Wzb7FpA==

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



rHyuNJWIU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WoACTIj4RbUXjjaarhcXTDT1vT8YQOO>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



**FACULTAD DE MEDICINA**  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 28 de noviembre de 2025.

**Dr. Lorenzo Díaz Carrillo**  
**Director de la Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana del cérvix uterino**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Gil Delgado. 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. Adolfo Pedroza Saavedra**



Calle Iztaccíhuatl esq. Leñeros s/n, Col. Los Volcanes Cuernavaca, Mor., Cuernavaca Morelos, México, CP 62350.  
Tel. (777) 329 7048, / [medicina@uaem.mx](mailto:medicina@uaem.mx)

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ADOLFO PEDROZA SAAVEDRA | Fecha:2025-12-13 23:44:57 | FIRMANTE

4P5h8i6wQUslKaLUYBDGKArX9cCZxJAqHf9OtyaAi7d7iUty4FvKg/hCSlwMkTh3PCBYVpMSRFO/PYLY/mNxyyuCc9Pd3JRyx2IW8LwTHUYhmWE6OLEIKF0USeNS8DcSt1EHI  
DLdFOTDmCC0vx/PoWklS9Q8S7kjnsn6/iKMVyxGfXBqT9roaZLCDmwSqNh1g8szCyTeEuAkNc.ch2S4FqnAlnvcEuc:W5tD1QCP8vgvHCIE3vbPOzxaYHSsZelrkdCGumTpiAwKv  
jJM7R4/mF0hD63ZHpyod+2S+58bIRUqlzqwmSILFVKUZ+BMWBILN8fkfYpoWpJcCEqE4Gw8NQ==

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



pMBtcRAKU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/so548xyJeCfuZoTe66zPRLIT1BqdJ7Xu>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



**FACULTAD DE MEDICINA**  
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 28 de noviembre de 2025.

**Dr. Lorenzo Díaz Carrillo**  
**Director de la Facultad de Medicina**

**P r e s e n t e**

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **Evaluación del perfil de inmunoglobulinas séricas contra E4 de HPV16 como biomarcadores de lesión temprana del cérvix uterino**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Melissa Gil Delgado. 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. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl**



Calle Iztacñhuatl esq. Leñeros s/n, Col. Los Volcanes Cuernavaca, Mor., Cuernavaca Morelos, México, CP 62350.  
Tel. (777) 329 7048, / medicina@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

**Sello electrónico**

**MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL | Fecha:2025-12-03 14:49:04 | FIRMANTE**

eVxO4XBLlrOw+TFaHDIVAgG83I72lhqdlZeHjQR/GKrG2V7aoueOdQ5c7C0I9nJEvLELhQBEnTdUP0VZ26qEf1Ua+FgKzJnl/Mmrm6P1ONL90B10TVh0kL1xN6DxGdYU4XzFE  
amlelRDAgwnntaRO8e2YRsQ6VjflaY2B/jzxaSG+rHnu8LrKkvWKh833zYLvRejVoh8N729WpOHD76iCIVvVl49dv3qZiIn/fQwjUCr/reR4v3KJ2LhTFTsVTsUC6QI0ehfdDWp5v5uf  
F6y0rjTWGv1VqwlwgPkm67aSQdI39D92bMNuOaVTBxVWIGYNsIs5Gcs+k8NchiC4g==

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



6joaMWQ12

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/u0ypmbxUFVNjtWwX4IFLA4aXRQxt8lml>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029