

ANÁLISIS NUTRIGENÓMICO ASOCIADO A LA VIA DEL RETINOL Y SU IMPACTO AL TRATAMIENTO DE CÁNCER CERVICOUTERINO

Clave SALUD-2014-01- 233271

Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social
FONDO S0008 SSA/IMSS/ISSSTE-CONACyT

REPORTE FINAL

Responsable técnico del proyecto

Dra. Florinda Jiménez Vega

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Laboratorio de Biotecnología

Cuerpo Académico Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa

Participantes

Dra. Claudia L. Vargas Requena	(UACJ)
Dr. José Alberto López Díaz	(UACJ)
Dr. Antonio De la Mora Covarrubias	(UACJ)
Dra. Cecilia Díaz Hernández	(SSA)
Dr. Ricardo López Romero	(IMSS)
Dra. Ana Lidia Arellano Ortiz	(UACJ)
M en C. Lorena Cassis Nosthas	(ULSA)

Resumen

En la actualidad el cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los cánceres que se puede prevenir si es detectado durante los estadios precancerígenos. Las investigaciones más recientes se han enfocado en descubrir técnicas de diagnóstico, como los marcadores moleculares, para facilitar la identificación de anomalías tempranas en el tejido del cuello uterino. El desarrollo de CaCu es llevado a cabo por una serie de modificaciones epigenéticas y moleculares que alteran la expresión de genes, este reporte se describe el comportamiento de una población de estudio mediante el análisis nutrigenómico de la vía del retinol y su impacto dentro de la enfermedad.

Las pacientes después de ser informadas y firmar su consentimiento de participación, se les realizó una evaluación nutricional por medio de un análisis antropométrico y dietético, así como factores sociodemográficos mediante encuestas. Se colectaron muestras de raspado cervical o biopsias del cérvix, seguido del diagnóstico por citología, asociando 4 grupos de acuerdo a la ausencia o presencia de lesión: 1.-sin lesión intraepitelial (SLIE), 2.- con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), 3.- con lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) y 4.- con CaCu. Molecularmente se diagnosticó la presencia del Virus de Papiloma Humano (VPH). Así mismo se caracterizaron las modificaciones epigenéticas de la región promotora de los genes que codifican para la proteína de unión al retinol celular (CRBP1) y proteínas de unión al ácido retinoico celular (CRABP1, CRABP2), así como los receptores del ácido retinoico RAR- α , RAR- β . Se evaluó la expresión génica de las moléculas antes descritas, así como del receptor de membrana STRA 6, en los grupos de muestras descritas. La metilación de las regiones promotoras fue evaluada por la técnica de PCR específica de metilación y para la expresión génica y el diagnóstico molecular se utilizó PCR.

Los estudios realizados en la población Juarense, muestran una edad promedio de 33.9 años en las pacientes participantes, siendo la mayoría del estado de Chihuahua (70.2%), de oficio amas de casa (61.1%), casadas o en unión libre (68.7%) y con escolaridad en su mayoría de completa educación primaria (60.3%). El 40.5 % realiza actividad física moderada/intensa y tan solo el 6.1 % de la muestra poblacional presenta un consumo extra de vitamina A mediante el uso de suplementos. Los hábitos como el fumar y tomar bebidas alcohólicas, se presentaron en el 22.9 % y el 40.5 % de las pacientes respectivamente.

En cuanto a las características ginecológicas y obstetricias, el 99.1 % de las pacientes con lesiones y CaCu presentan algún genotipo de VPH.

La evaluación del estado nutricional fue determinada mediante el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal (%GC). La media de IMC y %GC en la muestra poblacional fue de 28.0 kg/m² (± 6.6) y 39.9 % (± 4.8) respectivamente. Así mismo, los resultados muestran que la población presenta sobrepeso y la obesidad en el 61.1% del total de la muestra poblacional del estudio.

De los macronutrientes, se observó un consumo promedio general de 215.8 g de carbohidratos (± 67.7), 61.0 g de proteína (± 26.5), 68.0 g de grasa (± 30.7) y 13.0 g de fibra (± 6.9). En base a los resultados de la evaluación dietaria, fue cuantificado el consumo de equivalentes de Retinol Activo (ERA) en las pacientes mostrando una media de en la muestra poblacional de 379.6 µg de ERA/día (± 251.1). El 68 % de la población presenta una subalimentación por debajo del 75% de la Ingesta diaria sugeridas (<427.5 µg ERA /día) y tan solo el 32.0 % presenta un consumo adecuado de retinol. El retinol sérico, se presentó en concentraciones normales (> 28.3 µg/dL).

De la relación entre la expresión y metilación de los genes CRABP1 y CRABP2, se encontró que la metilación de CRABP1 fue significativamente asociada al CaCu y con la presencia de VPH, por su parte la metilación en CRABP2 presente en 17.4% de los pacientes, pero sin asociación significativa, deduciendo que la regulación de la expresión de CRABP1 pudiera depender de procesos post-transcripcionales o trasduccionales participes en el desarrollo del CaCu (Arellano *et al.*, 2013). No se muestra una asociación entre la presencia de metilación y la expresión génica de CRABP1 y CRABP2. Específicamente, la expresión en CRABP1 se mostró disminuida en LIEAG con respecto a los demás grupos ($p=0.047$). Con respecto a CRABP2 no existieron diferencias de la expresión asociadas a la lesión o CaCu ($p=0.628$).

Por su parte CRBP1 presentó un incremento durante los diferentes grados de lesión intraepitelial cervical, viéndose la mayor concentración de transcrito en pacientes diagnosticadas con CaCu, se demostró que la metilación de la región promotora del gen CRBP1 se presenta como un proceso regulatorio durante la transición de LIEBG a LIEAG sin afectar los transcritos de la proteína CRBP1, lo cual nos indica que dicho evento podría ser utilizado como marcador de metilación a identificar en LIEBG.

Para RAR β el porcentaje de pacientes con esta modificación fue significativamente mayor en el grupo de LIEBG, siendo estadísticamente asociado a este grupo ($p=0.026$) estableciendo que existe un riesgo de presentar hemimetilación de 3.5 veces más en LIEBG que en SLIE ($p=0.0103$). Se deduce que la metilación promotora de RAR- β puede ser un marcador de promoción y no de progresión.

Por otro lado, la hemimetilación de RAR α no muestra asociación en algún grupo, el proceso de metilación en los genes es diferencial y presenta asociación únicamente con lesiones precancerosas. Presentar hemimetilación en ambos genes incrementa la asociación con el CaCu ($p=0.032$) siendo entonces importante la presencia de ambas modificaciones al mismo tiempo. No se encontró asociación entre la presencia de metilación y la expresión génica de RAR α y RAR β . Sugiriendo que pudiesen estar relacionados otros mecanismos epigenéticos en la expresión génica. Sin embargo, se encontró asociación entre los niveles de expresión de RAR α 2 y el grado de lesión ($p=0.000$) con niveles de expresión significativamente mayores en SLIE que en el resto de los grupos.

La expresión génica de la proteína STRA6 se encontró en todos los grupos (SLIE, LIEBG, LIEAG, CaCu). Con respecto a las unidades de expresión relativas no existieron diferencias asociadas a la lesión o CaCu ($p=0.754$), el análisis de correlación entre el retinol sérico y la expresión del gen STRA6, no se presentó una correlación independiente del grado de lesión, lo cual indica que los procesos cancerígenos no influyen en la regulación de la expresión génica de STRA6.

Dado que la detección temprana de cáncer es una de las estrategias primordiales para la supervivencia, es necesario diseñar pruebas más específicas para identificar las primeras fases de la enfermedad, una determinación en tiempo mediante el propuesto prototipo de diagnóstico rápido a como un un sensor utilizando biomarcadores asociados a la vía del retinol que nos indique la la expresión baja de dichos marcadores, indicaría que la vía del retinol esta disminuida y asociando los tratamiento coadyuvantes, se pronosticaría un bajo éxito. Aunado a ello, el diagnostico de VHP juega una sinergia en la evolución de las lesiones, su detección y la orientación educativa en la población, puede estar asociadas a una mejor respuesta ante el CaCu.

Introducción

En cáncer es una patología causada por una alteración celular que provoca un aumento descontrolado de células anormales, su crecimiento invasivo y propagación a través de los tejidos perturba el funcionamiento normal del organismo. Este daña los genes que regulan el ciclo celular, provocando crecimiento excesivo y mala diferenciación celular. Según la Organización Mundial de la Salud, el CaCu es la segunda mayor causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con alrededor de más de 30,000 muertes al año (INEGI, 2018). Casi todos (99,8%) los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de un virus DNA tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina VPH, la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad. La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo en mujeres va de un 2% a un 44%, más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta (Shastri et al., 2005; Parada et al., 2010), el potencial oncogénico de VPH es debido a la expresión excesiva de las proteínas E6 y E7. En algunos casos antes de desarrollo CaCu se puede identificar lesiones precancerosas, se clasifican en lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) y alto grado (LIEAG). Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG). Después, solo del 20 a 40% de estas LIEBG progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una LIEAG.

Por su parte El estado nutricional de una persona es el resultado de un correcto balance entre lo que necesita y lo que gasta de energía y nutrientes esenciales (Haddad, 1992), cuando existe un desequilibrio nutrimental puede traer la aparición de una enfermedad directa o indirectamente, esta malnutrición de micronutrientes, principalmente en el caso del retinol, ha sido considerada como un factor para el desarrollo del CaCu (Gariglio et al., 2009), por lo que evaluar la ruta metabólica es de vital importancia.

La vía del retinol se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento de cáncer ya que este puede antagonizar la progresión tumoral, de esta forma las alteraciones en esta vía se han asociaron con cáncer (Mauro et al., 2008). Estudios han evaluado la correlación inversa entre el desarrollo de cáncer y el consumo elevado de retinol (Vitamina A) en la dieta (Ruffin y Rock, 2004). Por ello, esta vitamina ha sido utilizada como auxiliar en el tratamiento del cáncer por el efecto de disminuir tumoración a través de procesos metabólicos como

diferenciación, apoptosis y ciclo celular (Doldo *et al.*, 2015). No obstante, estos procesos metabólicos pudieran verse inhibidos o reducidos con un consumo bajo de retinol, la vitamina A es un grupo de compuestos liposolubles, el cual incluye retinol, retinal y ácido retinoico, es un esencial nutriente porque este no puede ser producido por humanos. El retinol es el precursor de 2 esenciales moléculas activas biológicamente, la molécula todo-trans ácido retinoico con el ligando de receptores tal como RARs y la molécula 11-cis-retinal requerido en el ciclo visual.

La mayoría de la vitamina A preformada en la dieta está compuesta de esteroides de cadena larga que deben hidrolizarse en la luz proximal del intestino delgado antes de ser absorbidos por las células epiteliales intestinales (Tanumihardjo *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2012). Debido a que el retinol es químicamente inestable es convertido a ácido retinoico, esta transformación se realiza en el intestino e hígado y posteriormente en células diana, para que los retinoides sean transportados por el organismo es necesaria la presencia de varias proteínas de unión que son las que lo transportan hacia la célula diana, tales como las proteínas de unión a retinol celular (CRBPs), proteínas de unión al retinol (PRB), proteína transtiretina (TTR), proteínas de unión para transporte (STRA6) y proteínas de unión al ácido retinoico (CRABPs).

En el intestino se absorbe por células de la mucosa intestinal, donde se une con la CRBP-II para ser esterificado y posteriormente ser incorporado por quilomicrones, quienes se encargan de transportarlo por el torrente sanguíneo. La proteína STRA6 actúa como transportador y receptor de la membrana plasmática, colocando el retinol en el citoplasma de la célula diana, para que posteriormente este sea transportado hacia el núcleo. El retinol debe de ser oxidado por la enzima alcohol deshidrogenasa a ácido retinoico para poder unirse a CRABP1 quien es la encargada de transportarlo adentro del núcleo, donde se unirá con varios receptores nucleares, incluyendo RAR y RXR para mediar la transcripción de ciertos genes involucrados en el arrestamiento celular, diferenciación y apoptosis (Tenorio y Ruiz, 1987; Arellano *et al.*, 2013). Así, los retinoides y sus análogos sintéticos tienen un papel a nivel molecular en el desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis celular en el CaCu en el cual el efecto es mediado por receptores nucleares como el ligando del receptor del ácido retinoico (RAR).

Se ha observado que mecanismos como la metilación y como consecuencia el silenciamiento del gen RAR, juega un papel importante en el establecimiento y progresión del cáncer. Se ha sugerido que la metilación de RAR pudiese ser un cambio temprano en las lesiones

intraepiteliales. Así mismo proteínas como el receptor STRA6 han sido reportada por presentar sobreexpresión en cáncer endometrial, ovario, colo-rectal y hepatocarcinoma asociándose en la progresión de los mismos, por lo que fue importante integrar su evaluación con la finalidad de cubrir las moléculas involucradas en la vía del retinol y evaluar su rol dentro de la progresión de la neoplasia. Por tal motivo este proyecto fue enfocado a evaluar el estudio nutrigenómico asociado con la vía del retinol y su evaluación en las etapas de desarrollo de cáncer cervicouterino, en búsqueda de marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad.

A continuación, se presenta un concentrado de los resultados obtenidos en base a los objetivos planteados, la parte metodológica, la representación de los resultados, así como el análisis y su discusión se encuentran contenidos detalladamente en los informes parciales presentados al fondo.

Objetivos

1.-Evaluar el estado nutricional incluyendo el consumo dietario de retinol y concentraciones de retinol sérico de las pacientes.

En este estudio fueron seleccionadas 131 pacientes de la clínica de Colposcopia de la Jurisdicción Sanitaria II (SSA) en Ciudad Juárez, Chihuahua. Fueron clasificadas según su diagnóstico en lesión intraepitelial de bajo (LIEBG) (n=31) o alto grado (LIEAG) (n=59), cáncer cervicouterino (CaCu) (n=23) y para grupo control mujeres sin lesión intraepitelial (SLIE) (n=18). A cada paciente se le dio por escrito y de manera verbal una explicación clara y detallada de su participación en el estudio. Las pacientes que voluntariamente participaron se les solicitaron su firma de consentimiento informado.

En este estudio, fueron seleccionadas algunas características sociodemográficas, hábitos, antecedentes personales, ginecológicos y obstétricos que pudieran relacionarse con un consumo deficiente de retinol y con la presencia de CaCu.

De acuerdo a los resultados, la edad de las pacientes de la muestra poblacional se encuentra en un rango de edad entre los 16 y 65 años, con una media de 33.9 años (± 11.7). Las medias de los grupos fueron 30.2 años (± 10.9) en SLIE, 33.8 años (± 11.4) en LIEBG, 33.1 años

(± 11.7) en LIEAG y 38.9 años (± 11.8) en CaCu, no observándose una diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p=0.091$).

En cuanto a las características de la población, estas fueron similares entre los grupos. La mayor parte de las pacientes que participaron nacieron en el estado de Chihuahua (70.2%), son amas de casa (61.1%), casadas o en unión libre (68.7%) y presentaron una completa educación primaria (60.3%). En cuanto a sus hábitos saludables, el 40.5 % realiza actividad física moderada/intensa y tan solo el 6.1 % de la muestra poblacional presenta un consumo extra de vitamina A mediante el uso de suplementos. Los hábitos como el fumar y tomar bebidas alcohólicas, se presentaron en el 22.9 % y el 40.5 % de las pacientes respectivamente.

En cuanto a las características ginecológicas y obstetricias, se observó una similitud de proporción entre los grupos de estudio. Los resultados del análisis de VPH, el 99.1 % de las pacientes con lesiones y CaCu presentan algún genotipo de VPH. Debido a que el genotipo 16 es el más relacionado con el desarrollo de CaCu, se realizó un análisis para identificar la prevalencia en esta muestra poblacional, manifestándose en el 57.1 % en CaCu, seguida del 44.2 % en LIEAG y el 27.6 % en LIEBG.

La evaluación del estado nutricional se realizó por medio de un análisis antropométrico y dietético. El estado nutricional realizado mediante el análisis antropométrico fue determinado mediante el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal (%GC). La media de IMC y %GC en la muestra poblacional fue de 28.0 kg/m² (± 6.6) y 39.9 % (± 4.8) respectivamente. Así mismo, los resultados muestran que la población presenta sobrepeso y la obesidad en el 61.1% del total de la muestra poblacional del estudio.

Tanto la media del consumo de energía, macronutrientes y porcentajes de adecuación, fueron iguales estadísticamente entre los grupos de estudio, los resultados mostraron que el contenido de energía en promedio para la muestra poblacional fue de 1728.4 kcal (± 547.1). En cuanto a los macronutrientes, se observó un consumo promedio general de 215.8 g de carbohidratos (± 67.7), 61.0 g de proteína (± 26.5), 68.0 g de grasa (± 30.7) y 13.0 g de fibra (± 6.9). Una vez analizado los promedios, se procedió a determinar la adecuación de macronutrientes, es decir, la cantidad de gramos de carbohidratos, proteínas y lípidos por cada 100 kcal ingeridas. Mostrando una adecuación de proteínas del 14.1% (± 4.5), adecuación de carbohidratos del 50.9 % (± 9.6) y adecuación de grasa del 31.2 % (± 1.5).

El 21.4 % de las pacientes tiene un consumo adecuado de energía. El resto de la población presentó un déficit y subalimentación calórica (22.1 y 37.4 % respectivamente). El 83.2%

de la población presentó un exceso en el consumo de carbohidratos (>140 g/día), y el 60.3% tiene un consumo elevado de calorías proveniente de la grasa (>40% al día).

En base a los resultados de la evaluación dietaría, fue cuantificado el consumo de retinol promedio de las pacientes. Los valores de retinol obtenidos muestran una distribución no normal (análisis de Kolmogorov-Smirnov (KS)= 0.119, $p < 0.001$).

El consumo de Equivalentes de Retinol Activo (ERA) en las pacientes mostro una media de en la muestra poblacional de 379.6 µg de ERA/día (± 251.1) y su mediana de 325.3 µg de ERA/día (min 30.1 - max 1451 µg de ERA/día). El 68 % de la población presenta una subalimentación por debajo del 75% de la Ingesta diaria sugeridas (<427.5 µg ERA /día) y tan solo el 32.0 % presenta un consumo adecuado de retinol.

En cuanto al retinol sérico, la mayoría de las pacientes presentaron concentraciones normales de retinol (> 28.3 µg/dL).

De acuerdo a los resultados dietéticos en este estudio, el consumo calórico y de macronutrientes fue similar en todos los grupos, a pesar de que la mayor parte de las pacientes con CaCu presentó sobrepeso y obesidad. La dieta no se vio asociada con la presencia de algún grado de lesión o CaCu.

De acuerdo al consumo de retinol y al retinol sérico, no se vio reflejada una diferencia significativa entre los grupos de estudio.

2. Realizar un diagnóstico molecular de metilación y cuantificación de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de retinol (CRBP1, CRABP1, CRABP2, RXR y RARbeta) en la población de estudio y su participación en la vía de retinol.

CRBP1

Para identificar los cambios epigenéticos y moleculares que ocurren en la proteína CRBP1 durante los diferentes estadios del CaCu, en este estudio fueron colectadas 136 muestras de tejido cervical, las cuales fueron diagnosticadas histológicamente como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG; n= 26), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG; n= 57), CaCu (n= 25) y sin lesión intraepitelial escamosa (SLIE; n= 28). En cada muestra fue evaluada la metilación de la región promotora y la expresión relativa del gen CRBP1. Éste gen incrementó conforme los grupos histológicos aumentaban el grado de lesión; presentando una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la

expresión relativa del grupo SLIE (0.152) y CaCu (0.279) ($p < 0.05$). La metilación de la región promotora está presente como un proceso regulatorio durante la progresión de LIEBG hasta los diferentes estadios de la carcinogénesis cervical. Durante el análisis se observó que ninguna de las muestras presentaba una completa metilación de la región promotora y se consideraron como positivas todas aquellas muestras que amplificaron la región esperada.

La metilación de acuerdo a los grupos de clasificación histológica, se presentó en más de la mitad de la población en estudio (63.2%; 86/136). El grupo con menor porcentaje de muestras positivas a metilación se encontró en SLIE (53.6%; 15/28). Y aunque se esperaba que el mayor porcentaje de muestras con metilación se encontraría entre los grupos LIEAG (64.9%; 37/57) y CaCu (60%; 15/25). El grupo que presentó un mayor número de muestras positivas a metilación estuvo presente en las LIEBG (73.1%; 19/26).

El funcionamiento de la proteína CRBP1 durante la evolución del cáncer de cuello uterino aún es incierto. Pero estos resultados nos orientan a pensar que la metilación de la región promotora del gen CRBP1 podría ser un evento temprano durante de la carcinogénesis cervical para impulsar el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado.

La correlación entre la expresión relativa y el estado de metilación del gen CRBP1 en los diferentes grupos, no presentó una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, es notorio que la expresión relativa del gen continúa incrementando conforme el grado de lesión evoluciona, aún bajo la presencia de metilación. Se hipotetiza que la metilación y la expresión de gen durante la evolución de las displasias se producen como un mecanismo regulatorio. Y en CaCu, la sobre expresión del gen podría estar dada por la pérdida de este mecanismo, ya que se observa un incremento de casi el doble de la expresión relativa en las muestras desmetiladas en comparación a la del grupo control.

CRBP1

El 69.6% de las pacientes con CaCu presentaron hemi-metilación de CRBP1, siendo estadísticamente significativo el fenómeno en estas mujeres ($p=0.024$) que en pacientes con lesiones de bajo grado (19.4%), alto grado (25.4%) y aquellas sin alguna lesión (16.7%). Además, se realizó un análisis del coeficiente de correlación de Spearman dando una correlación lineal significativa, lo cual indica que la probabilidad de presentar la hemi-metilación será mayor conforme incrementa el grado de lesión ($Rho=0.325$, $p < 0.001$).

Por su parte en cuanto a los resultados de expresión génica. El 67.9% (16/23) de toda la muestra poblacional se detectó la expresión de CRABP1, siendo el grupo de SLIE con la menor proporción de mujeres que expresaban el gen (55.6%, 10/18). El 71.0% (22/31) de LIEBG, 69.5% (41/59) de LIEAG y el 69.6 % (16/23) de CaCu se detectó la presencia de la expresión, no habiendo diferencias de proporciones entre los grupos.

De acuerdo a los resultados, la expresión de CRABP1 aparentemente va disminuyendo conforme va aumentando la presencia de hemi-metilación hasta LIEAG. Sin embargo, el comportamiento se modifica y se observa un incremento de la expresión en CaCu, así como el incremento de la presencia de hemi-metilación, no mostrando un silenciamiento total del gen. Esto puede deberse que al tratarse de un gen hemi-metilado, puede presentarse la transcripción del gen CRABP1 en aquellas células que presentan regiones desmetiladas. Por lo tanto, el gen de CRABP1 puede expresarse y lo que podría modificar su expresión es la presencia de otros factores.

CRABP2

El 7.0% del total de la muestra poblacional presentó hemi-metilación de CRABP2, siendo mayor en las pacientes con CaCu (17.4%), pero no diferente estadísticamente con los grupos SLIE y LIEBG. A pesar que se observó mayor presencia de hemi-metilación en el grupo de CaCu en comparación con los grupos SLIE y LIEBG, no fue significativa, por lo que se considera que la metilación de CRABP2 no representa un proceso importante para el desarrollo de cáncer cervicouterino.

La expresión de CRABP2 se manifestó en el 87.0% de las pacientes con CaCu, seguido del 82.4% en SLIE, 77.4% en LIEBG y un 75.9% de LIEAG, siendo proporcionalmente igual en todos los grupos ($p=0.709$).

De acuerdo a los resultados mostrados, la expresión de CRABP2 no se ve modificada por la presencia de una lesión o con CaCu. Por ello, se analizaron algunos factores que pudieran asociarse con el incremento o la disminución de los genes. Uno de los factores regulatorios principales de la expresión de CRABP2 es la concentración de ácido retinoico. No obstante, se ha visto también que otros factores como los estrógenos y procesos de lipólisis influyen en la expresión de CRABP2.

Dados los resultados encontrados hasta el momento, y en el continuo seguimiento de muestras para el estudio de RAR y RXR se utilizó una población n=120 pacientes, distribuidas en 4 de acuerdo a la lesión con 30 pacientes cada uno.

RAR α metilación

De acuerdo a la fase experimental realizada pudimos observar que el 64.2% de las muestras evaluadas (n=120) presentaron un patrón de hemi-metilación, es decir que de esas muestras algunas células presentaban metilación de su región promotora y algunas no; el 35.8% únicamente tenían un patrón de no metilación y 0% presentaron metilación. Se encontró que el 70% de las pacientes con CaCu presentaban hemi-metilación de la región promotora, sin embargo.

Al realizar un análisis de asociación entre la hemi-metilación y el grado de lesión, no hubo relación estadísticamente significativa.

RAR β metilación

La metilación del gen RAR β ha sido utilizado como un marcador biológico para la detección temprano de procesos malignos o para monitorear la respuesta quimiopreventiva. Los productos de amplificación correspondientes al gen RAR β , muestran un patrón de hemi-metilación en (n=120) 55% de las muestras y el 45% restante no presento metilación en su región promotora. Al igual que en RAR α las células de cada muestra que presentaban metilación fue variable.

Para este caso se realizó un estudio de asociación por χ^2 y entre la hemi-metilación y las lesiones obteniéndose un valor significativo de $p=0.026$.

Se realizó un análisis de asociación con aquellas muestras que presentaron hemi-metilación en ambas regiones promotoras. En líneas celulares de CaCu se ha observado que RAR α es un factor de transcripción para RAR β (Geisen *et al.*, 1997), es por esto que su regulación epigenética pudiese estar relacionada.

Se encontró hemi-metilación en ambos genes en un 39.2 % de las muestras (n=120); de los cuales el 23.4% correspondían a SLIE, el 36.2% a LIEBG, el 12.8% a LIEAG y el 27.7% a CaCu. Se realizó un análisis por χ^2 y no existe asociación entre la hemi-metilación de RAR α

y RAR β ($p=0.075$). De igual manera se realizó un análisis de asociación entre la doble hemimetilación y el grado de lesión encontrándose significancia estadística ($p=0.032$).

RAR α expresión

La expresión del gen RAR $\alpha 2$ se determinó por RT-qPCR, fue detectada en el 64.2% de las muestras ($n=120$), en CaCu únicamente el 63.3% mostraron expresión, en LIEAG el 56.6%, en LIEBG el 56.6% y en SLIE el 80%; no se encontró diferencia entre los grupos ($p=0.051$). Los datos no poseen una distribución normal ($KS=0.408$, $p= <0.001$). Siendo así se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparación de medianas, dando como resultado que existe diferencia significativa en los valores de expresión entre los distintos grupos de estudio ($p=<0.001$) tomando en cuenta la población total, lo cual se representa en la figura 4. Se realizó la misma prueba estadística ($KS=0.384$, $p= <0.001$), pero considerando únicamente aquellas pacientes que mostraron expresión, para descartar que esta asociación pudiese deber a la variación de expresión entre las que no expresaron transcrito; y se obtuvo una diferencia significativa entre los grupos ($p=<0.001$), es decir que existe al menos un grupo está presentando una expresión diferente al resto.

RAR β expresión

Todas las muestras analizadas presentaron algún grado de expresión para la isoforma $\beta 2$. Siendo del 43.3% para SLIE, 73.3% para LIEBG, 40% para LIAG, 63.3% para CaCu. Los datos mostraron no poseer una distribución normal ($KS=0.337$, $p=<0.001$). Siendo así se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, dando como resultado que no existe diferencia significativa en los valores de expresión entre los distintos grupos de estudio ($p=<0.551$).

Así mismos para el caso de la isoforma $\beta 5$, los porcentajes de expresión génica, se presentaron sin mostrar una distribución normal ($KS=0.386$ $p= <0.001$); siendo así, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, dando como resultado que no existe diferencia significativa, en los valores de expresión entre los distintos grupos de estudio ($p=0.270$).

El análisis de expresión de las isoformas se realizó comparando la expresión en las muestras que presentaban hemimetilación contra aquellas que presentaban no metilación,

y este análisis se estratificó por grupos de diagnóstico dando como resultado que no existe diferencia significativa entre la metilación y el nivel de expresión de ninguna de las isoformas. Se ha propuesto que las modificaciones sobre las histonas pueden ser un mecanismo que regule la expresión génica de RAR β 2; ya que se ha observado que la mayoría de las veces se encuentra una expresión reducida y una región hipermetilada, por otro lado, se ha reportado una disminución de la expresión con secuencias promotoras no metiladas (Zhang *et al.*, 2007). Por lo que las características propias del individuo pueden estar jugando un papel en la expresión. Para el caso de RAR α 2 se ha observado que existen niveles de acetilación y metilación de histonas variables en esta población (Glasow *et al.*, 2008). Por lo anterior es necesario aun dilucidar otros mecanismos epigenéticos como modificaciones de histonas o efecto de micro RNAs que estén regulando la expresión génica en CaCu.

3. Evaluar la presencia del virus de papiloma humano (VPH) y su relación con el diagnóstico molecular.

Se analizó la presencia de VPH, así como el genotipo 16 utilizando la técnica de amplificación por PCR con diferentes cebadores (MITOC FW/RV, GP +5/+6 y 16U FW/RV), los cuales amplifican la región D-Loop del ADN mitocondrial, la región L1 del VPH y la región E1 del genotipo viral 16 respectivamente.

El porcentaje de detección de la infección viral fue de 86.43% destacando que el 56% de estos reportes de VPH positivos se presentaron en mujeres con citología normal (n=28), es importante enfatizar la elevada frecuencia que presentaron las LIEAG (n=70), así como la de CaCu (n=25) los cuales mostraron una prevalencia del 98.6% y 96.2% respectivamente. En base a las muestras encontradas positivas a la presencia de VPH se realizó la determinación del genotipo 16 mostrados. Este estudio electroforético muestra un 38% de prevalencia a VPH 16, en donde, el 28.8, 42.5, 57.6 y 14.0% hacen referencia para LIEBG, LIEAG, CaCu y Sin Lesión respectivamente.

Con respecto a lo mencionado anteriormente, en este análisis se observó diferencia en el factor de edad, en donde pacientes con LIEBG fue diferente con respecto a sin lesión, LIEAG y cáncer

En este estudio, se asumió que la cantidad de la carga viral en el paciente está directamente relacionada con la intensidad de la banda presentada en la electroforesis. En pacientes con

intensidad de banda baja, los porcentajes se comportaron de manera descendente, conforme al grado de lesión, la intensidad aumentaba. Para las muestras sin lesión, LIEBG, LIEAG y CaCu “+” (57.1%, 33.3%, 26.7% y 20%) “++” (28.6%, 53.3%, 33.3% 33.3%) y “+++” (14.3%,13.3%, 40%, 46.7), se determinó que el aumento de riesgo asociado con el VPH 16 no ocurre sólo en función de una mayor carga viral encontrada en estas pacientes, sino que implica una mayor patogenicidad.

Se detecta una alta presencia del virus lo cual se ve asociado con un aumento en los porcentajes presentes en el desarrollo de la lesión, se observó por triple ciego una mayor intensidad en la respuesta viral durante el diagnóstico molecular.

STRA6

Adicionalmente, se llevó a cabo la evaluación de la expresión génica y proteica de la proteína STRA6, así como la evaluación con el contenido de retinol, los resultados del análisis de correlación entre el retinol sérico y la expresión del gen STRA6, no presentó una correlación independiente del grado de lesión, lo cual indica que los procesos cancerígenos no influyen en la regulación de la expresión génica de STRA6.

En el análisis de los resultados por IHQ se encontró que el 89.6% del total de las muestras presentaron expresión proteica de STRA6. Con base en la localización celular era de esperarse encontrar a la proteína en la membrana celular, no obstante, en todos los grupos hubo presencia de la proteína en núcleo y citoplasma, siendo más predominante en glándulas y estroma. Con esto se puede inferir que la función y localización proteica de STRA6 en tejido de cérvix difiere a la conocida en otros tejidos, independientemente del grado de lesión o CaCu. Por último, no existe asociación entre la intensidad de expresión génica y proteica, lo que indica que existen procesos particulares en el control traduccional y post-traduccional que modifican la regulación de la síntesis proteica, pudiendo explicar el porqué de la diferencia entre la expresión génica y la proteica.

4. Diseñar y Divulgar un prototipo de examen diagnóstico preventivo o terapéutico ante una neoplasia basado en el estudio del consumo de retinoides, expresión y metilación de genes involucrados en la vía de retinol en mujeres con riesgo a cáncer cervicouterino.

Con base a los resultados obtenidos, se ve que no hay un patrón de comportamiento generalizado, las muestras presentan heterogeneidad debida a los múltiples factores asociados a la enfermedad, la metilación no presento una respuesta clara de asociación con los resultados de expresión génica.

Sin embargo, se propone el diagnóstico mediante un panel de evaluación para la identificación de los genes que mostraron el mejor comportamiento dentro del desarrollo del proyecto con un arreglo molecular que incluya los siguientes marcadores: CRBP1, CRABP1, RAR β 2y RAR α , así mismo se empleara el uso del constitutivo para validar la reacción 18S. Al prototipo desarrollado se asocia una prueba y VPH del alto grado estudiando su asociación o diagnóstico de un cérvix no sano, así como un recordatorio de 24horas consumo de retinol en la dieta y un listado de la incorporación de la misma. La prueba consta de oligos de secuencia corta específicos para los genes de interés que hibridan con cDNA marcado de la muestra del paciente llámese raspado vaginal o biopsia de cérvix. Dicha muestra será la misma que se utilizará para la detección de VPH por DNA. El poder detectar una baja expresión de los marcadores moleculares de la vía del retinol, permitirá que se administren suplementos, los cuales puedan revertir una lesión LIEBG o bien puedan aumentar la eficiencia de tratamientos como las quimioterapias.

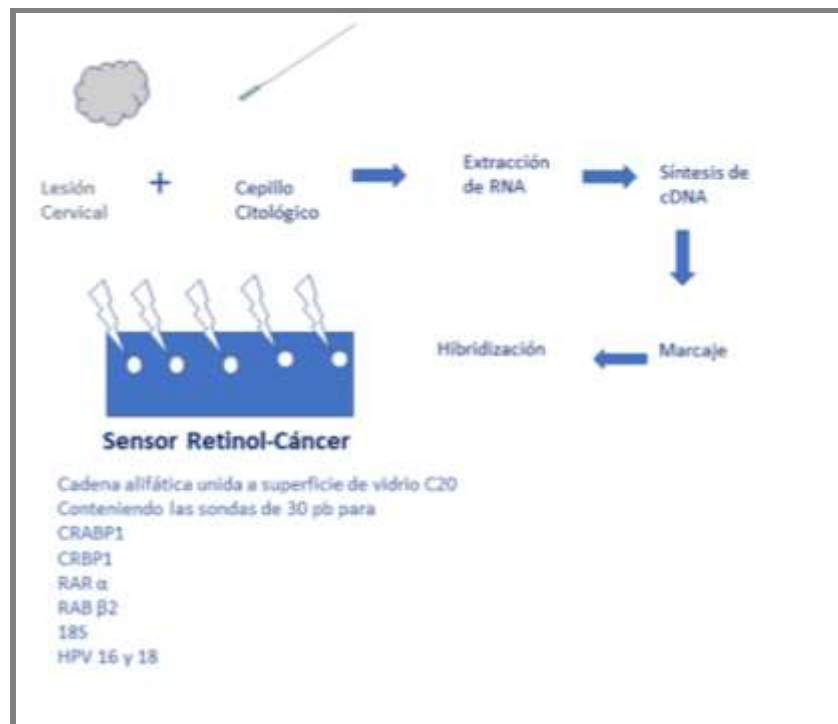


Fig. 1 Prototipo propuesto

Así mismo en cuanto a este objetivo se realizó una campaña de concientización en la población, específicamente en la Clínica de Colposcopia de la Jurisdicción Sanitaria II, Se realizaron platicas informativas con los ejes temáticos atendidos de prevención de cáncer cervicouterino y alimentación, de agosto 2017 a la fecha, las pláticas En estas pláticas se entregó como material de difusión una bolsa ecológica como incentivo a la población de bajos recursos, así mismo se trabajó con materiales impresos de difusión, bajo el apoyo de la Dra. Cecilia Díaz, de las estudiantes participantes en el proyecto bajo la dirección de la Dra. Ana Lidia Arellano Ortiz.

Adicionalmente podemos mencionar que: Es preocupante los índices de infección por VPH en la población y, lo cual se puede reducir con campañas informativas que lleguen a la población. Sin embargo, de acuerdo a los estudios realizados y a los reportes de la literatura es de importancia medir los marcadores de la vía de retinol, así como un monitoreo de las lesiones a través de tiempo y la reversión de ellas.

Incluir en la dieta de las pacientes retinol para elevar los niveles y tener una mayor respuesta en la reversión de las lesiones, lo cual consideramos que sería una siguiente fase del proyecto.

Referencias

- Arellano A., Jiménez F., y M. Salcedo. 2013. Suplementos dietéticos como tratamiento en el cáncer cervicouterino; revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6):1770-1780.
- Doldo, E., Costanza, G., Agostinelli, S., Tarquini, C., Ferlosio, A., Arcuri, G., Orlandi, A. (2015). Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. *BioMed Research International*, 2015, 1–14.
- Gariglio, P., Gutiérrez, J., Cortés, E., y Vázquez, J. (2009). The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Archives of Medical Research*, 40(6), 449–65.
- Geisen C1, Denk C, Gremm B, Baust C, Karger A, Bollag W, Schwarz E. High-level expression of the retinoic acid receptor beta gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor alpha and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Research*. 1997 Apr 15;57(8):1460-7.
- Glasow A.; Barrett A.; Petrie K.; Gupta R.; Boix-Chornet M.; Zhou D.; Grimwade D.; Gallagher R.; Lindern M.; Waxman S.; Enver T.; Hildebrandt G. Zelent A. 2008. "DNAmethylation-independent loss of *RARA* gene expression in acute myeloid leukemia". *Blood*. 111 (4). 2374-2377.
- Haddad, L. (1992). The Impact of Women's Employment Status on Household Food Security at Different Income Levels in Ghana. *Food and Nutrition*, 14(4), 341–344.
- INEGI. 2018. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, datos nacionales. Comunicado de prensa número, 61/18, 1-13.
- Mauro V., Dalurzo M., Smith D., Lastiri., Vasallo B., Bal E., Pallotta M., y L. Puricelli. 2012. Retinoides (RAR y CRBP1) en carcinoma de pulmón a células no pequeñas. *Medicina*, 68; 205-212.
- Parada R., Morales R., Giuliao A., Cruz A., castellsague X., and P. Lazcano. 2010. Prevalence, concordance and determinates of human *papillomavirus* infection among heterosexual partners in a rural region in central Mexico. *BMC Infectious diseases*, 10(223):2-10.

- Ruffin, M., y Rock, C. (2004). Human Papillomavirus Infection in Men and Women: The Impact of Nutrition on Cervical Cancer. En M. J. Legato (Ed.), *Principles of Gender-Specific Medicine* (pp. 796–812
- Shastri S., Dinshaw K., Amin G., Goswami., Patil S., Chinoy R., Kelkar R., Muwonge R., Mahe C., Ajit D., and R. Sankaranarayanan. 2005. Concurrent evaluation of visual, cytological and HPV testing as screening methods for the early detection of cervical neoplasia in Mumbai, India. *Bulletin of the world health organization*, 83(3): 186-194.
- Tanumihardjo S., Russell R., Stephensen C., Gannon B., Craft N., Haskell M., Lietz G., and D. Raiten. 2016. Biomarkers of nutrition for development (BOND) vitamin A review. *The Journal of Nutrition*, 7: 1817s-1848s.
- Tenorio B., y J. Ruiz. 1987. Desarrollo de los retinoides en investigaciones básica y clínica en oncología. *Revista del INC*. 33 (2):335-344.
- Zhang, Z.; Joh, K.; Yatsuki, H.; Zhao, W.; Soejima, H.; Higashimoto, K.; Noguchi, M.; Yokoyama, M.; Iwasaka, T.; Mukai, T. 2007. "Retinoic acid receptor b2 is epigenetically silenced either by DNA methylation or repressive histone modifications at the promoter in cervical cancer cells". *Cancer Letters*. 247. 318-327.
- Zhong, M., Kawaguchi, R., Kassi M and H. Sun. 2012. Retina, retinol, retinal and the natural history of vitamin A as a light sensor. *Nutrients*, 4: 2069-2096.

Estancias Académicas

Estancia de investigación en el Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI-Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México. Estudiante de Maestría Brenda Susana Luna Flores, acuda a realizar Trabajo sobre las metodologías de inmunohistoquímica y microscopía óptica en la expresión del gen STRA6 en tejidos del cérvix. del 10 abril al 10 de mayo del 2017.

Estancia Académica en el Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI-Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México. Dra. Cecilia Díaz (Integrante del Proyecto) 11 al 13 noviembre del 2017.

Estancia Académica del Dr. Ricardo López Romero para participar como sínodo en el examen de grado de Maestría del estudiante Luis Carlos Alderete Torres Instituto de Ciencias Biomédicas Universidad Autónoma de Ciudad Juárez 22 de marzo del 2018.

Estancia Académica Dres. Claudia Lucia Vargas Requena, Florinda Jiménez Vega y José Alberto López Díaz. II International Workshop: Integrating Genomics in Cancer Management. Clínica Hospital de Navara. Madrid España del 23 al 25 de mayo del 2018.

Formación de Recursos humanos

Nivel Doctorado

Evaluación del retinol y su participación en la expresión y metilación de los genes CRABP1 y CRABP2 en mujeres con cáncer cervicouterino. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias Químico Biológicas PNPC. Alumno Ana Lidia Ortiz Arellano. Director Dra. Florinda Jiménez Vega.

Nivel Maestría

CRBP1 como marcador molecular en el desarrollo de cáncer cérvicouterino. Tesis de maestría. Maestría en Ciencias Orientación Genómica PNPC Alumno Juan Carlos Silva Espinoza. Director Dra. Florinda Jiménez Vega.

Expresión génica del receptor STRA6 en pacientes con lesiones intraepiteliales y cáncer cervicouterino. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Orientación Genómica PNPC. Alumna: Brenda Susana Luna Flores. Director Dra. Florinda Jiménez Vega.

Metilación y expresión del gen del ácido retinoico RAR en el desarrollo de cáncer cervicouterino. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Orientación Genómica PNPC. Alumno Luis Carlos Alderete Torres. Director Dra. Florinda Jiménez Vega.

Nivel Licenciatura

Diseño y evaluación de pláticas sobre salud y alimentación para la prevención de cáncer cervicouterino en adolescentes de bachillerato. Tesis de Licenciatura- Nutrición Estudiante: Selene Guadalupe Medina Tovar. Dirección Dra. Ana Lidia Arrellano Ortiz

Genotipificación del virus del papiloma 16U en una población de Cd. Juárez. Tesis de Licenciatura en Química. Estudiante: Aracely Vargas Rodríguez. Dirección Dra. Florinda Jiménez Vega.

Participaciones en Congreso

Silva Espinoza, J. Jiménez Vega, F. Vargas Salcedo, M. CRBP1 como marcador molecular en el desarrollo del cáncer cervicouterino. Marco de la séptima feria mesoamericana de posgrados Mexicanos de Calidad, celebrada en las ciudades de San José, Costa Rica y Bogotá Colombia, del 09 al 14 de octubre 2015.

Arrellano ortiz, a., Jimenez Vega, f., Salcedo Vargas, M., Diaz Hernández, C. López Diaz, J.A., Silva Espinoza, J.C. y Vargas Requena, C.L. Methylation status of cellular retinoic acid binding protein1 can be a tumor biomarker in patients with squamous intraepithelial lesion and cervical cancer has been accepted for eposter presentation at the 19 th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO 2015) to be held in Nice, France on October 24-27, 2015.

Arellano Ortiz A. L., Jiménez-Vega, F. Díaz-Hernández C. Silva-Espinoza J. C. Salcedo-Vargas, M. Vargas-Requena, C.L. López Díaz, J.A. Cassis-Nosthas, RosalesGuevara, J. Relation of CRABPs expression with retinol serum cervical cancer. 2nd BBRC Health Disparities Symposium: From Molecules to Disease. Estados Unidos, 2015.

Arellano Ortiz A. L., Cassis-Nosthas, L., De la Mora Covarrubias, A., López – Díaz, J.A., Vargas-Requena, C.L., Jiménez-Vega, F. Consumo y concentraciones séricas de retinol en pacientes que asistieron a una clínica de colposcopia en Ciudad Juárez, Chihuahua. Simposium de Química Médica y Diagnóstica- CONACyT. Taxco Gro. Noviembre 30 a diciembre 02 de 2015.

Arellano-Ortiz A. Díaz-Hernández, C. Vargas-Requena, C. López-Díaz, J. SalcedoVargas, M. Jiménez-Vega, F. Evaluación del Retinol y su Participación en la Expresión y Metilación de los Genes CRABP1 y CRABP2 en Mujeres con Cáncer Cervicouterino. Congreso Nacional de la Sociedad de Genética, México, 2016.

Luna-Flores, B S, Arellano-Ortiz A L, Alderete-Torres, L C, Romero, A, VargasRequena, C L, López-Díaz, J A, y Jiménez-Vega, F. Expresión Génica del Receptor STRA6 en Pacientes con Lesiones Intraepiteliales y Cáncer Cervicouterino. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética, México, 2016.

Vargas R, M.A y Jiménez-Vega, F. Genotipificación del Virus de Papiloma 16U en una población de Ciudad Juárez. Universidad autónoma de Ciudad Juárez Semana de Química del 22 al 24 de abril de 2017.

Medina Tovar, S.G. y Arellano Ortiz, A.L. Diseño y evaluación de pláticas sobre salud y alimentación para la prevención de cáncer cervicouterino en adolescentes del bachillerato. Congreso Internacional Asociación Mexicana de Miembros de Facultades y Escuelas de Nutrición A.C. Bogotá Colombia del 16 al 18 de noviembre del 2017.

Publicaciones

Arellano Ortiz, A.L; Jiménez Vega, F; Díaz Hernández, C; Salcedo Vargas, M; De la Mora Covarrubias, A; López Díaz, J.A; Vargas Requena, C.L., Cassís Nosthas ML. Micronutrient deficiency in the diet of the patient with precancerous cervix lesions on a colposcopy clinic at Ciudad Juárez, México. Nutr Hosp. 2016 Jul 19;33(4):396. doi: 10.20960/nh.396.

Arellano-Ortiz AL; Salcedo-Vargas M; Vargas-Requena CL; López-Díaz JA; de la Mora-Covarrubias A; Silva-Espinosa JC; Jiménez-Vega F. DNA Methylation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins in Cervical Cancer. *Genetics and Epigenetics*, 2016, 10:8, 53-57.

Arellano Ortiz, A.L., Jiménez Vega, F., Salcedo Vargas, M., Díaz Hernández, C., Silva J.C., De la Mora Covarrubias, A., Tobias Alonso, S., Muñoz Hernández, S., Hernández, D y Escarcega Ávila, M.A. Cellular retinoic acid binding protein-1 in the prognosis of cervical cancer regression. *Journal Pathology Oncology Research* Enviado a revista.

Difusión

Platicas en la Unidad de Colposcopia de la Jurisdicción Sanitaria II de Ciudad Juárez Chihuahua. Se realizan platicas informativas con los ejes temáticos atendidos de prevención de cáncer cervicouterino y alimentación. De agosto 2017 a la fecha, las pláticas se realizan cada 15 días, y asiste la población en general. En estas pláticas se entrega el material de difusión bolsa ecológica como incentivo a la población de bajos recursos.