

Asociación de niveles de folato, vitamina B12 y estado de metilación de los genes L1-L2 del VPH y el gen humano EPB41L3 con infecciones persistentes y lesiones de alto grado del cérvix en mujeres VPH positivo

María Cecilia Agudelo Fernández MD

Trabajo presentado como requisito para optar por el título Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Biología Molecular

Universidad de Antioquia

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Grupo Infección y Cáncer

Medellín-Colombia

2020

Agradecimientos

Llegar a este momento ha sido uno de los retos más grandes de mi vida. El inicio de este camino no fue más que fortuito, pero ha significado la fortuna de encontrar lo que realmente me apasiona y a lo que me quiero dedicar por el resto de mis días. Haber terminado esta tesis significa la culminación de un largo camino donde recibí la colaboración de muchas personas que contribuyeron a mi formación académica, profesional y personal.

Sin lugar a dudas a quien primero quiero agradecer es a la Dra. Gloria, mi tutora. A ella le agradezco infinitamente el haberme recibido en su laboratorio y haberme dado una oportunidad aun sabiendo que era más mi entusiasmo que los conocimientos y la experiencia en este campo. Hizo más de lo que le correspondía como tutora, me brindó todos sus conocimientos, fue mi guía durante todo el desarrollo de la tesis, estuvo siempre atenta y presta a resolver mis inquietudes y fue un soporte incondicional durante toda mi formación doctoral. Su manera de amar la ciencia es para mí una inspiración.

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial, los doctores Alicia Cock, Juan Fernando Alzate, Noel Mueller, María Elena Maldonado e Isabel Garcés por sus aportes críticos a este trabajo. De manera especial quiero resaltar de las doctoras María Elena e Isabel su interés, compromiso, disposición y apoyo constante para finalizar esta tesis.

También quiero agradecer al Dr. Arnold H. Zea del Stanley Scott Cancer Center en Louisiana State University por su interés, por sus consejos, enseñanzas y todo el soporte brindado en el desarrollo de este trabajo y al Dr. Carlos Enrique Restrepo quien impulsó mi carrera al mundo de la ciencia.

Gracias al Dr. Enrique Mejía Ospino del Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander quien de manera generosa me permitió realizar la medición de los micronutrientes con el equipo de HPLC y a la Dra. Chandrika Piyathilake de la Universidad de Birmingham en Estados Unidos por recibirme en su laboratorio para realizar mi pasantía durante cinco meses.

De igual manera quiero agradecer a cada una de las personas que hicieron y hacen parte del Grupo Infección y Cáncer. A las auxiliares de enfermería quienes trabajan incansablemente y son pilares en el que hacer de los proyectos de investigación y a mis compañeros quienes de una u otra manera contribuyeron con mi crecimiento académico y profesional.

A las mujeres que participaron amable y desinteresadamente en el proyecto ASCUS-COL también mi más sincero agradecimiento; ellas son mi motivación y la razón por la cual elegí el camino de la ciencia que aunque parezca contradictorio, apenas comienza. Tengo el total convencimiento de que las contribuciones que se hagan en este campo, por pequeñas que parezcan son significativas e impactan de manera positiva a cada una de estas mujeres.

A Colciencias por la financiación del mi doctorado a través del programa de doctorados nacionales y por los recursos entregados al Grupo Infección y Cáncer para la ejecución del proyecto macro ASCUS-COL. Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia y a la Fundación Pedro Nel Cardona quienes también nos apoyaron económicamente para la realización de este proyecto. A la Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas y a la Universidad de Antioquia por permitirme realizar mi programa doctoral.

Mi familia merece un reconocimiento especial, de ellos recibo apoyo incondicional y motivación para continuar con mi formación personal y académica. Ellos fueron pacientes, generosos, solidarios y me han acompañado en cada uno de mis pequeños triunfos en este largo camino. Al tío Luis, a mis primas Aleja, Ana y Claudia infinitas gracias. A la tía Consu quien partió de este mundo justo en el momento de entregar este manuscrito para su evaluación, no sin antes dejarme la más grande lección de vida. Te extrañaré y recordaré siempre.

Finalmente, esta tesis no está dedicada a mi madre, ella la hizo conmigo y es un triunfo tan mío como suyo. Tengo la fortuna de contar de manera permanentemente con su ayuda y su amor. Me acompañó en las jornadas de estudio, los experimentos, madrugó, traspasó, aprendió sobre el ADN, las proteínas y los micronutrientes. Reconoce los equipos del laboratorio, el protocolo de extracción del ADN, la preparación de las muestras para ponerlas en la máquina de HPLC y conoce mejor que nadie el procedimiento para enviar muestras con hielo seco a otra ciudad. Ella es mi motivación y quien me reta a ser mejor cada día.

Resumen

La infección con genotipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH) es la causa necesaria para neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer de cérvix. Si bien la infección por VPH tiene una alta prevalencia en la población, la gran mayoría de estas infecciones regresan espontáneamente y en la minoría en quienes se mantiene la infección (persistencia viral), existe un alto riesgo de desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC2) o más severo (NIC2+) que si no se tratan progresan a cáncer. Hay evidencia de que ciertos cofactores del hospedero y del ambiente modifican el riesgo de que la infección viral persista o progrese a NIC2+ o cáncer. Entre los co-factores hasta la fecha reconocidos que influyen en el desarrollo del cáncer se encuentran los nutricionales (como los niveles de folatos y la vitamina B12). Los bajos niveles de estas vitaminas, han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollar varios cánceres debido a que son micronutrientes requeridos para los procesos de síntesis, de estabilidad y reparación del ADN. La deficiencia del folato y la inducción de la expresión de las ADN metiltransferasas a través de las oncoproteínas virales conducen a la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de genes supresores de tumores promoviendo la carcinogénesis.

Dado que aún hay vacíos en el conocimiento sobre la relación de los folatos y la vitamina B12 y el riesgo de cáncer cervical, el objetivo de esta investigación fue estimar el riesgo de infecciones por HPV persistentes, lesiones cervicales de alto grado y los niveles de la metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3* asociados con bajos niveles de folato y vitamina B12. El estudio se realizó entre mujeres VPH positivas de una cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín, Colombia. En el capítulo dos, presentamos el análisis correspondiente a la asociación entre los niveles de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12 determinados por HPLC y la infección por VPH persistente. Comparados con los niveles

normales, los niveles posiblemente deficientes y deficientes de 5MTHF y ácido fólico no se asociaron con menor o mayor riesgo de tener una infección persistente, OR 0.93 (IC95% 0.62-1.42) $p=0.749$ y OR 0.80 (IC95% 0.56- 1.14) $p=0.212$ respectivamente. En el capítulo tres presentamos el análisis correspondiente a la asociación entre los niveles de 5MTHF, ácido fólico, folato total y vitamina B12 determinados por HPLC y radioinmunoensayo y el riesgo de NIC2+. Después de ajustar por las variables potencialmente confusoras, los niveles circulantes de estos micronutrientes no se asociaron significativamente con el riesgo de NIC2+. Sin embargo, al realizar un análisis restringido a la comparación de la concentración de folato total entre las participantes sin lesiones ($n=130$) y las participantes diagnosticadas con NIC3+ ($n=44$), encontramos diferencias estadísticamente significativas $p=0.031$. Finalmente, en el cuarto capítulo usando el clasificador S5, evaluamos si los niveles de metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3* estaban asociados con el riesgo de lesiones de alto grado del cérvix y si este riesgo era aún mayor en mujeres que además de metilación alta tenían bajos niveles de folato y vitamina B12. Observamos mayor riesgo de NIC2+ asociado metilación alta en individuos con niveles normales de folato (OR: 2.8, IC95% 1.3 - 6.2) pero la magnitud de esta asociación fue mayor en los individuos con niveles de folato deficiente (OR: 9.0, IC95% 3.9 - 20.7), ($p=0.069$). Estos hallazgos sugieren que el folato podría tener un papel en las etapas tardías de la transformación del epitelio cervical y que los niveles de metilación de manera independiente se relacionan y confieren el riesgo de NIC2+.

Abstract

Infection with oncogenic genotypes of human papillomavirus (HPV) is a needed cause for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer. Although HPV infection has a high prevalence in the population, the majority of these infections resolve spontaneously. In a minority of women in whom the infection persists, there is a high risk of developing high-grade cervical intraepithelial neoplasms (CIN2) or more severe (CIN2+) that, if not treated, can progress to cancer. There is evidence that particular host and environmental co-factors can modify the risk that the viral infection persists or progress to CIN2+ or cancer. To date, among the recognized co-factors influencing cancer development are the nutritional co-factors folate and vitamin B12 are critical in the process. Low levels of these micronutrients have been associated with an increased risk of various cancers since they are required micronutrients for DNA synthesis, stability, and repair. Folate deficiency and induction of DNA methyltransferase expression through viral oncoproteins lead to hypermethylation of the CpG islands of tumor suppressor gene promoters that promote carcinogenesis.

Although, there are still gaps in understanding the relationship between folate vitamin B12 and the risk of cervical cancer, the objective of this research was to estimate the risk of persistent HPV infections, high-grade cervical lesions, and levels of methylation of the L1 and L2 viral genes as well as the human gene EPB41L3 associated with low levels of folate and vitamin B12. This study was performed among HPV positive women from a cohort of women with ASC-US cytology from Medellín, Colombia. Initially, in Chapter Two, we analyzed the association between levels of 5MTHF, folic acid, vitamin B12 and persistent HPV infection by HPLC. Compared to normal levels, possibly deficient and deficient levels of 5MTHF and folic acid were not associated with a lower or higher risk of patients having persistent infection, (OR:0.93, 95%

CI 0.62-1.42) $p=0.749$ and (OR 0.80, 95% CI 0.56-1.14) $p=0.212$ respectively. In Chapter Three, we present the analysis corresponding to the association between the levels of 5MTHF, folic acid, total folate, vitamin B12 and the risk of CIN2+ determined by HPLC and radioimmunoassay. After adjusting for potentially confounding variables, circulating levels of these micronutrients were not significantly associated with CIN2+ risk. However, when performing an analysis restricted to comparing the total folate concentration between the participants without lesions ($n=130$) and the participants diagnosed with CIN3+ ($n=44$), we found statistically significant differences $p=0.031$. Finally, in the Fourth Chapter using the S5 classifier, we evaluated whether the levels of methylation of the viral genes L1, L2 and the human gene EPB41L3 was associated with the risk of high-grade lesions of the cervix and evaluate if this risk was even higher in women than in addition to high methylation levels, have low levels of folate and vitamin B12. We observed a higher risk of CIN2+ associated with with high methylation in individuals with normal folate levels (OR: 2.8, 95% CI 1.3 - 6.2), but the magnitude of this association was higher in individuals with folate deficient levels, (OR: 9.0, 95% CI 3.9 - 20.7), ($p=0.069$). These findings suggest that 1. folate may have a role in the late stages of cervical epithelial transformation 2. that methylation levels are independently related to and confer the risk of CIN2+.

Estructura de la tesis

El manuscrito de tesis doctoral que se presenta a continuación tiene la siguiente estructura: 1) Introducción general, 2) Planteamiento de problema, 3) Hipótesis y objetivos, 4) Metodología y resultados. Este apartado consta de 3 capítulos correspondientes al desarrollo de cada uno de los objetivos específicos; se presentan en formato artículo. En el apartado 4) se presenta la discusión general de los resultados y en el 5) las conclusiones y perspectivas.

Tabla de Contenido

Agradecimientos	2
Resumen	5
Abstract	7
Estructura de la tesis	9
Tabla de Contenido	10
Lista de tablas	12
Lista de figuras	14
Capítulo 1:	19
Introducción e información general	19
Situación epidemiológica del cáncer de cérvix	19
Etiología del cáncer cervical.....	20
Virus del Papiloma Humano.....	21
Ciclo productivo del virus	33
Infección con Virus del Papiloma Humano e historia natural del cáncer cervical	34
Cofactores asociados a la carcinogénesis del VPH	36
Dieta y cáncer	37
Dieta y cáncer cervical	38
Micronutrientes folato y vitamina B12.....	40
Metabolismo de un solo carbono.....	57
Epigenética	58
Resumen de la evidencia de la metilación viral	71
Resumen de la evidencia de la metilación del huésped.....	77
Planteamiento del problema	79
Hipótesis y objetivos	83
Bibliografía	84
Metodología y resultados	99
Capítulo 2:	99
Asociación entre los niveles de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12 con infecciones por VPH persistentes en mujeres de una cohorte con citología ASC-US	99
Introducción	99
Métodos	102
Resultados	124

Discusión	141
Bibliografía	148
Material suplementario	152
Capítulo 3:	164
Asociación entre los niveles de folato y vitamina B12 determinados mediante radioinmunoensayo con lesiones cervicales de alto grado en mujeres VPH positivo con citología ASC-US	164
Introducción	164
Métodos	167
Métodos de laboratorio	169
Resultados	180
Discusión	210
Bibliografía	216
Material suplementario	219
Capítulo 4:	227
Relación de los niveles de folato y vitamina B12 con los niveles de metilación de los genes L1- L2 del Virus del Papiloma Humano y del gen humano EPB41L3	227
Introducción	227
Métodos	231
Resultados	239
Discusión	250
Bibliografía	256
Discusión general	260
Bibliografía	266
Conclusiones y perspectivas	268

Lista de tablas

Tabla de abreviaturas	16
Capítulo 1	
Tabla 1. Concentraciones de folato en suero y eritrocitos para determinar el estado del folato en todos los grupos de edad	47
Tabla 2. Resumen de la evidencia de la metilación en los genes de VPH.....	74
Capítulo 2	
Tabla 1. Preparación de los calibradores 5MTHF y vitamina B12.....	109
Tabla 2. Preparación de los calibradores de ácido fólico.....	110
Tabla 3. Datos para la construcción de la curva de calibración para el 5MTHF y Vitamina B12	110
Tabla 4. Datos para la construcción de la curva de calibración para el ácido fólico	111
Tabla 5: Composición de la fase móvil en el tiempo (gradiente de elución).....	113
Tabla 6. Cálculo del tamaño de muestra (bajos niveles vs. altos niveles de micronutrientes). Probabilidad de exposición entre controles del 2%	117
Tabla 7. Cálculo del tamaño de muestra (bajos niveles vs. altos niveles de micronutrientes). Probabilidad de exposición entre controles del 8%	117
Tabla 8. Cálculo del tamaño de muestra (bajos niveles vs. altos niveles de micronutrientes). Probabilidad de exposición entre controles del 15%	118
Tabla 9. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para la persistencia de la infección por VPH entre casos y controles	128
Tabla 10. Distribución de los niveles séricos de 5 MTHF.....	131
Tabla 11. Distribución de los niveles séricos de Ácido Fólico.....	133
Tabla 12. Distribución de los niveles séricos de vitamina B12	135
Tabla 13. Asociación entre los niveles de 5MTHF y otros factores de riesgo para infecciones persistentes por VPH-AR.....	137
Tabla 14. Asociación entre los niveles de Ácido fólico y otros factores de riesgo para infecciones persistentes por VPH-AR.....	139
Tabla suplementaria 1. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos en el análisis del 5MTHF.....	154
Tabla suplementaria 2. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos en el análisis del Ácido Fólico	156
Tabla suplementaria 3. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos en el análisis de la Vitamina B12.....	158
Tabla suplementaria 4. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos y excluidos para los análisis del 5MTHF	160
Tabla suplementaria 5. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos y excluidos para los análisis de la vitamina B12.....	162

Capítulo 3

Tabla 1. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles	185
Tabla 2. Distribución de los niveles séricos de folato	187
Tabla 3. Concentraciones del folato para diferentes grados de displasia cervical.....	188
Tabla 4. Distribución de los niveles séricos de la vitamina B12	189
Tabla 5. Asociación entre los niveles de folato, vitamina B12 y otros factores de riesgo para lesiones cervicales de alto grado (NIC2+)	192
Tabla 6. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles	195
Tabla 7. Distribución de los niveles séricos de 5MTHF.....	197
Tabla 8. Concentraciones de 5MTHF para los diferentes grados de displasia cervical.....	199
Tabla 9. Distribución de los niveles séricos de Ácido Fólico	200
Tabla 10. Distribución de los niveles séricos de la vitamina B12	202
Tabla 11. Relación entre los niveles de 5MTHF y otros factores de riesgo con el diagnóstico NIC2+	206
Tabla 12. Relación entre los niveles de Ácido fólico y otros factores de riesgo con el diagnóstico NIC2+	208
Tabla suplementaria 1. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles con resultado disponible de 5MTHF	221
Tabla suplementaria 2. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles con resultado disponible de Ácido fólico	223
Tabla suplementaria 3. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles con resultado disponible de vitamina B12.....	225

Capítulo 4

Tabla 1. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles	242
--	-----

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. Estructura del genoma viral de VPH 16.	25
Figura 2. Estructura química del folato.	42
Figura 3. Aspectos fisiológicos de los folatos y del ácido fólico.	45
Figura 4. Estructura química la vitamina B12 (cobalamina).	51
Figura 5. Aspectos fisiológicos de la vitamina B12 asociados a posibles causas de déficit.	53
Figura 6. Ciclo metabólico del folato.	61
Figura 7. Regulación transcripcional normal en eucariotas superiores.	62
Figura 8. Representación esquemática de las interacciones HPV E6 y E7 con modificadores epigenéticos celulares.	66
Figura 9. Regulación de la metilación de genes virales y celulares por las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR.	68
Figura 10. Cambios en la topografía e intensidad de la expresión de DNMT1 y DNMT3B antes y después de la transfección con HPV18.	71

Capítulo 2

Figura 1. Diseño del estudio ASCUS-COL.	103
Figura 2. Curva de calibración para 5MTHF y vitamina B12.	111
Figura 3. Curva de calibración ácido fólico.	112
Se presenta la ecuación del gráfico y el R cuadrado.	112
Figura 4. Cromatograma definición de los picos de manera automática o manual.	113
Figura 5. Cromatograma.	114
Integración de los picos de interés, se indica además el tiempo de retención y el área bajo la curva para cada uno de los tres micronutrientes (5MTHF, ácido fólico y vitamina B12).	114
Figura 6. Análisis de correspondencia que incluye información de 298 casos y 298 controles.	121
Figura 7. Matriz de asociación que incluye información de 298 casos y 298 controles.	122
Figura 8. Flujograma del estudio. ASC-US:	125
Figura 9. Distribución de los niveles séricos de 5MTHF determinados por el método HPLC. .	131
Figura 10. Distribución de los niveles de Ácido fólico determinados por el método HPLC.	133
Figura 11. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método HPLC.	135
Figura suplementaria 1. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el 5MTHF. .	152
Figura suplementaria 2. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el Ácido fólico.	153

Capítulo 3

Figura 1. Análisis de correspondencia que incluye información de 185 casos y 185 controles.	175
--	-----

Figura 2. Matriz de asociación que incluye información de 185 casos y 185 controles.....	176
Figura 3. Análisis de correspondencia que incluye información de 169 casos y 169 controles.	177
Figura 4. Matriz de asociación que incluye información de 169 casos y 169 controles.....	178
Figura 5. Flujograma del estudio ASC-US y selección de muestras para la determinación de las concentraciones de micronutrientes en suero usando la técnica del radioinmunoensayo.	182
Figura 6. Flujograma del estudio ASC-US y selección de muestras para la determinación de las concentraciones de micronutrientes en suero usando la técnica HPLC.....	183
Figura 7. Distribución de los niveles de folato determinados por el método radioinmunoensayo.	187
Figura 8. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método radioinmunoensayo.	190
Figura 9. Distribución de los niveles de 5MTHF determinados por el método HPLC entre casos y controles.	198
Figura 10. Distribución de los niveles de 5MTHF determinados por el método HPLC.	198
Figura 11. Distribución de los niveles de ácido fólico determinados por el método HPLC.....	200
Figura 12. Distribución de los niveles de ácido fólico determinados por el método HPLC.....	201
Figura 13. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método HPLC. ...	203
Figura 14. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método HPLC. ...	203
Figura suplementaria 1. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el 5MTHF..	219
Figura suplementaria 2. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el Ácido fólico	220

Capítulo 4

Figura 1. Flujograma del estudio.	240
Figura 2 y Tabla 2. Comparación de los niveles de metilación de acuerdo a la severidad de lesiones del cérvix.....	244
Figura 3 y tabla 3.Comparación de los niveles de metilación entre lesiones cervicales de bajo y alto grado.	244
Figura 4 y tabla 4. Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de folato.	245
Figura 5 y tabla 5. Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de vitamina B12.....	246
Figura 6 y tabla 6. Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de folato entre individuos VPH16/18 positivos.....	248

Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo
REM	Razones Estandarizadas de Mortalidad
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus
PVs	Papiloma Virus
E	Variante Europea
As	Variantes Asiáticas
AA	Variante Asiático-Americanas
NA	Variante Norteamericana
Af1	Variante Africana 1
Af2	Variante Africana 2
LCR	Siglas en inglés de Long Control Region
E	De Early en inglés
L	De Late en inglés
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
DBD	Del ingles DNA- Binding Domain
DBS	De las siglas en inglés DNA- Binding Site
hTERT	Del inglés human Telomerase Reverse Transcriptase
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIC1	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1
NIC2	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2
NIC2+	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o más severo
NIC3	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 3
NIC3+	Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 3 o más severo
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
LIE-BG	Lesión intraepitelial de bajo grado
ASCUS-COL	Ensayo clínico pragmático ASCUS de Colombia
PDZ	El dominio PDZ es un dominio estructural común de 80-90 aminoácidos que se encuentra en proteínas de señalización
IRF-3	Interferon Regulatory Factor 3
IFN	Interferon-gamma
Tyk2	Tyrosine Kinase 2
CK II	Del inglés Casein Kinase II
pRb	Gen del Retinoblastoma
WCRF	Del Inglés World Cancer Research Fund
IARC	International Agency for Research on Cancer
EPIC	Investigación Prospectiva Europea sobre Cáncer y Nutrición
PABA	De las siglas en inglés ácido para-aminobenzoico
RFT	Proteína transportadora de folato reducido

THF	Tetrahidrofolato
5m-THF	5-metiltetrahidrofolato
SAM	S-Adenosil Metionina
OMS	Organización Mundial de la Salud
AF	Ácido fólico
TCII	Transcobalamina II
FI	Factor Intrínseco
MBD	Del inglés Methyl CpG Binding Domain
DNMT	ADN metiltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa
HMT	Histona metiltransferasa
LINE1	Elemento nuclear largo intercalado 1
SINE	Elemento nuclear corto intercalado
TD rep	Repeticiones en tándem
VEB	virus de Epstein-Barr
VHB	Virus de Hepatitis B
HAT	Histona acetiltransferasa
Sp1	Proteína de especificidad 1
MDM2	Del inglés Murine Doble Minute 2
DAPK1	Del inglés Death-associated protein kinase 1
CDH1	Cadherin 1
CDKN2A	Del inglés cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
JAM3	Del inglés Junctional Adhesion Molecule 3
EPB41L3	Del inglés Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1 like 3
TERT	Del inglés Telomerase reverse transcriptase
GSTP1	Del inglés Glutathione S-transferase Pi 1
CADM1	Del inglés Cell adhesion molecule 1
EPS	Empresas Promotoras de Salud
IPS	Instituciones Prestadoras de servicios de Salud
LEEP	Procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa
LLETZ	Escisión con asa grande de la zona de transformación
CH2	Captura de Híbridos 2
DTT	Dithiothreitol
HPLC	Por sus siglas en inglés High-Pressure Liquid Chromatography
STM	Specimen Transport Medium TM
MS	Metionina Sintasa
Ag-Ac	Antígeno-Anticuerpo
MTFA	5-metiltetrahidrofólico
SIU	Sede de Investigación Universitaria
DS	Desviación estándar
CpG	Islas de citosina
PTPRO	Del inglés Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O
HIC1	Del inglés Hypermethylated In Cancer 1
MAL	Del inglés Myelin and lymphocyte protein

PAX1	Del inglés Paired-Box Gene 1 (PAX1)
SOX1	Del inglés SRY-Box Transcription Factor 1
LMX1	LIM Homeobox Transcription Factor

Capítulo 1:

Introducción e información general

Situación epidemiológica del cáncer de cérvix

El cáncer de cuello uterino es uno de los cinco cánceres más frecuentes entre las mujeres en todo el mundo y las muertes por esta causa representan el 7.5% de todas las muertes por cáncer en la misma población. En 2018 se diagnosticaron alrededor de medio millón de casos y ocurrieron alrededor de 311 mil muertes por este cáncer; la tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad es de 13.1 y 6.9 por cada 100.000 mujeres respectivamente. Cerca del 90% de los casos y muertes se registran en países en desarrollo (Bray et al., 2018).

Los países de América Latina y el Caribe se caracterizan por ser zonas de alto riesgo para el cáncer de cuello uterino y, aunque la incidencia ha disminuido desde los años 60, los cambios demográficos proyectados indican que la carga real de los casos nuevos se incrementará en más del 75% en los próximos 20 años (Parkin et al., 2008). La región de América Latina y el Caribe aporta el 7.7% del total de casos de cáncer de cérvix del mundo y el 8.7% del total de las muertes por esta causa. La tasa estandarizada por edad regional (14.6/ 100.000 mujeres) es similar a la tasa mundial. Las más altas tasas estandarizadas por edad se observan en Bolivia (38.5), Paraguay (31.5), Jamaica (28.4) y Belice (28.0) y las más bajas en Puerto Rico (10.2), Bahamas (10.9), México (11.0) y Costa Rica (11.2). En cuanto al número de casos, Brasil aporta la mayoría de ellos (29%), seguido por México (14%) y Argentina (8%) del total regional (Bray et al., 2018).

El riesgo de morir por cáncer cervical varía también entre y dentro de los países de la región de Latinoamérica y el Caribe. Por ejemplo, se encuentran variaciones en las tasas de mortalidad dentro de Argentina, Colombia, y Chile. Estas variaciones en algunos casos están asociadas a

profundas diferencias socioeconómicas dentro de ellos. En Colombia, el cáncer de cérvix es el cuarto cáncer con mayor incidencia y el quinto en mortalidad entre las mujeres (Bray et al., 2018). En el 2018, las tasas de incidencia y de mortalidad fueron 12.7 y 5.7 por cada 100.000 mujeres respectivamente, presentándose 3.853 nuevos casos y 1.775 muertes anuales (Bray et al., 2018). Dentro del territorio colombiano, el patrón de riesgo de mortalidad por este cáncer muestra muchas áreas del territorio nacional con riesgos altos, particularmente, las zonas cerca de los ríos navegables, las áreas de frontera, el golfo de Urabá y la serranía del Baudó (Baena et al., 2011; Pardo C, 2017). Las regiones del centro de Antioquia, Boyacá y Santander mostraron un menor riesgo de muerte por este cáncer en relación con el promedio nacional mientras que los departamentos de Arauca, Meta y Caquetá tuvieron las razones estandarizadas de mortalidad (REM) más elevadas en el país (REM entre 163 y 201 y una tasa estandarizada por edad entre 12.2 y 15.6 por 100.000 mujeres) (Pardo C, 2017).

Etiología del cáncer cervical

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares realizados desde la década del 90 han comprobado indudablemente que las infecciones persistentes por tipos oncogénicos del Virus del Papiloma Humano (VPH) son la causa necesaria para desarrollar cáncer de cérvix (Bosch & Muñoz, 2002; Walboomers et al., 1999). Esta relación causal ha sido soportada por las siguientes evidencias: (1) la presencia consistente del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) del VPH en células neoplásicas derivadas de biopsias tumorales; (2) la expresión de oncogenes virales (E6 y E7) en biopsias tumorales; (3) la identificación de las propiedades transformantes de los genes E6 y E7; (4) el requerimiento de la expresión de E6 y E7 para el mantenimiento del fenotipo maligno de las líneas celulares de carcinoma cervical; (5) la interacción de las oncoproteínas virales con proteínas celulares reguladoras del crecimiento celular y (6) estudios epidemiológicos

que indican que las infecciones por el VPH constituyen el principal y necesario factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical (Muñoz, Castellsagué, de González, & Gissmann, 2006; Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 2002).

Muñoz y colaboradores, encontraron una asociación entre la presencia del VPH y el desarrollo de cáncer cervical con una razón de disparidad de 158.2 en África (Morocco y Mali), Asia (Tailandia y Filipinas), Brasil, Paraguay y Perú (Muñoz et al., 2003). En los estudios realizados en Colombia y España la razón de disparidad encontrada fue de 63.4 y 19.1 respectivamente (Muñoz et al., 2003). El ADN viral se detectó en el 99,7% de los casos de cáncer cervical y por ello se pudo concluir que el VPH es el agente causal de este cáncer (Bosch & Muñoz, 2002; Walboomers et al., 1999). Hasta la fecha se han identificado más de 150 genotipos de VPH de los cuales 40 infectan el epitelio ano genital; 13 de estos 40 genotipos (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) son considerados de alto riesgo o carcinogénicos (Bouvard et al., 2009; de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004; Muñoz et al., 2003; Muñoz et al., 2006; Schiffman, Clifford, & Buonaguro, 2009).

Virus del Papiloma Humano

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, una familia de virus pequeños con un genoma de ADN circular de doble cadena de 8.000 pares de bases de longitud y una cápside icosaédrica sin envoltura. Su principal característica biológica es la capacidad de infectar células epiteliales con la subsecuente inducción de proliferación celular. Entre las infecciones producidas en humanos se encuentran dos grupos bien definidos: los virus que infectan el epitelio muco-cutáneo de los genitales y el tracto respiratorio superior y aquellos que infectan el epitelio cutáneo. La manifestación más común de la mayoría de las infecciones por VPH son las lesiones proliferativas benignas tales como las verrugas genitales o cutáneas. Sin embargo, en

ciertas circunstancias el VPH induce proliferaciones malignas que conllevan a cáncer (Walboomers et al., 1999). Se estima que el 5% de los cánceres humanos son causados por infecciones por el VPH, y la mayoría de estos cánceres son del cuello uterino (Muñoz et al., 2006).

Taxonomía

Para la clasificación taxonómica y filogénica de la familia *Papillomaviridae* se utiliza la secuencia del gen tardío 1 (L1, del inglés Late 1), el cual codifica una de las proteínas que componen la cápside viral y es una de las regiones más conservadas del genoma de los Papilomavirus (Dueñas-González et al., 2005) De esta manera, el genotipo de Papilomavirus se define si el genoma completo ha sido secuenciado y la secuencia de nucleótidos del gen L1 difiere en más del 10% del tipo conocido más cercano. De igual manera, un subtipo y una variante viral se definen con base en las diferencias entre el 2-10% y de menos de un 2% en la secuencia del gen L1, respectivamente.

De acuerdo al *International Committee on Taxonomy of Virus* (ICTV 2005), la familia *Papillomaviridae* comprende aproximadamente 200 genotipos que se clasifican en 16 géneros. Los géneros Alfa, Gama, Beta, Mu y Nu, infectan a los humanos. El género Alfa, contiene alrededor de 50 de los genotipos que infectan el epitelio muco-cutáneo ano genital y orofaríngeo, algunos de los cuales se encuentran asociados a lesiones benignas como las verrugas genitales (VPH 6) y papilomatosis laríngea (VPH 11) o lesiones malignas como cáncer cervical y orofaríngeo (VPH 16). Los tipos de VPH que se han aislado en el epitelio genital se clasifican de acuerdo al potencial de inducir transformación maligna en genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59) y bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81) (Bouvard et al., 2009; Muñoz et al., 2006).

Entre los genotipos de alto riesgo, el VPH 16 y 18 son los que en el 70 por ciento de las veces se encuentran en el cáncer cervical (de Martel, Plummer, Vignat, & Franceschi, 2017; de Sanjose et al., 2010). Los miembros de los géneros Gama y Beta preferentemente infectan la piel (de Villiers et al., 2004). Los genotipos de VPH 5 y 8 se asocian a la epidermodisplasia verruciforme, son los miembros más representativos del género Beta PVs los cuales usualmente producen infecciones latentes, que en condiciones de inmunosupresión pueden convertirse en cáncer. Los Gama PVs causan lesiones cutáneas histológicamente caracterizadas por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en los queratinocitos.

En cuanto a las variantes moleculares, se han reconocido cerca de 20 para el VPH 16 y un número similar para el VPH 18 (Bernard, 2005; Bernard, Calleja-Macias, & Dunn, 2006; Huertas-Salgado et al., 2011). Las variantes de VPH 16 se distinguen filogenéticamente en varios grupos y han sido denominadas como Europeas (E), Asiáticas (As), Asiático-Americanas (AA), Norteamericana (NA), Africana-1 (Af1) y Africana-2 (Af2) basada en su distribución geográfica que concuerda con la de los grupos étnicos en la población (Yamada et al., 1995). En varias poblaciones se ha demostrado que la infección con variantes no Europeas (Af1, Af2, AA, As, NA) del VPH 16 está asociada a un aumento de 2 a 9 veces en el riesgo de cáncer cervical y lesiones precursoras de alto grado (Berumen et al., 2001; Burk et al., 2003; de Boer et al., 2004; Tornesello et al., 2004; Villa et al., 2000; Xi et al., 2002).

Sin embargo en poblaciones con bajo nivel de mezcla étnica como las de Europa, no se observa esta asociación (Zehbe, Voglino, Delius, Wilander, & Tommasino, 1998). En un estudio llevado a cabo en Colombia donde fueron utilizados métodos muy finos para definir la ancestría genética se observó una relación inversa en la distribución de las proporciones de ancestría y la frecuencia de las variantes. En este estudio se encontró que las mujeres con cáncer cervical que

tenían mayor proporción de ancestría Europea o Nativo Americana tenían una mayor proporción de infecciones con variantes AA o E respectivamente. Esta relación entre la ancestría y la distribución de los linajes filogenéticos sugiere que la co-evolución de la población humana y algunos de los sub-linajes específicos de VPH16 se han traducido en potenciación de propiedades carcinogénicas virales o disminución del huésped de su capacidad de controlar esta infección, lo que explicaría el riesgo de lesiones potencialmente malignas y cáncer de cuello uterino en solo un reducido porcentaje de la población mundial (Lopera et al., 2014).

Estructura del genoma viral

El VPH posee un genoma de ADN circular de doble cadena de 8000 pares de bases de longitud y una cápside icosaédrica sin envoltura. Contienen alrededor de 8-10 marcos abiertos de lectura transcritos de la misma cadena. Su genoma se divide en tres regiones (figura 1): la región larga de control (LCR, siglas en inglés de *Long Control Region*) donde se encuentran las secuencias de ADN que controlan la transcripción de los genes virales (promotores y potenciadores) y el origen de replicación del genoma viral. A ésta le sigue corriente abajo la región temprana (E de *Early* en inglés) conformada en el orden en el que se localizan en el genoma por los genes: E6, E7, E1, E2, E4, E5. Finalmente adyacente y corriente abajo de la región temprana se encuentra la región tardía (L de *Late* en inglés) que contiene los genes L1 y L2 los cuales codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Howley PM, 2007).

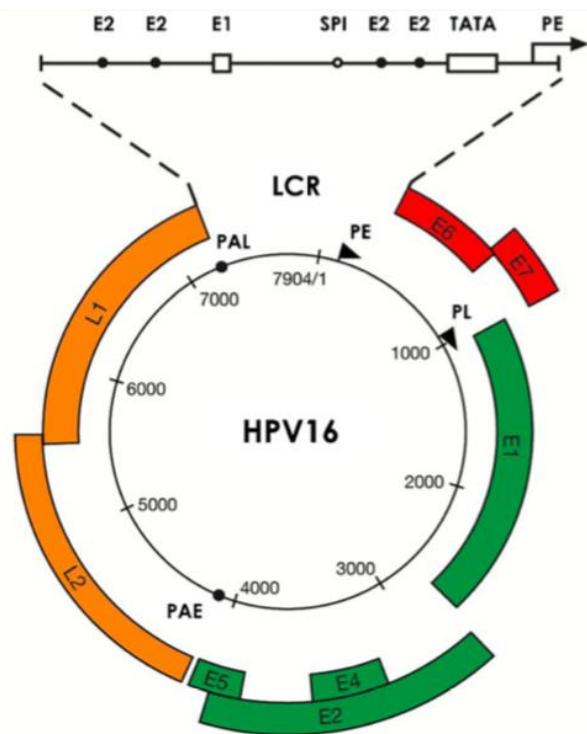


Figura 1. Estructura del genoma viral de VPH 16.

Tomado de (Doorbar et al., 2012). La organización del genoma de HPV16 es típica de los Alfa virus de alto riesgo (incluido HPV18), comprende el LCR y ocho genes que son necesarios para las diferentes etapas del ciclo de vida del virus. El LCR contiene sitios de unión para factores de transcripción celular (por ejemplo, SP1, AP1, Oct1), así como para las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación viral y la expresión génica. HPV16 tiene dos elementos promotores bien caracterizados conocidos como PE (promotor temprano; también denominado p97) y PL (promotor tardío; también denominado p670) que regulan la expresión de ARNm empalmados diferencialmente durante la diferenciación epitelial (posición 97 y 670 en el genoma HPV16 denotan el sitio 5' cap sitio / sitio de iniciación de ARN de transcripciones virales). PAE y PAL indican las posiciones de los sitios de poliadenilación temprana y tardía dentro del genoma.

Estructura y función del LCR

El LCR es un segmento localizado entre la región tardía y la región temprana del genoma viral que oscila entre 800 y 900 pares de bases; contiene los sitios de unión para factores de transcripción celular, así como para las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación viral. Estas secuencias de nucleótidos responden al estímulo ejercido por factores de transcripción que inducen la expresión de genes en eucariotas. En esta región existen 4 sitios de

unión de la proteína E2, y dos de estos se usan como puntos imaginarios de referencia para dividir el LCR en 3 regiones; la primera contiene elementos que regulan la represión de la transcripción de los genes de la región L en las capas profundas del epitelio. En la región central se encuentran por lo menos 20 sitios de unión de varios factores de transcripción celular y finalmente, en el extremo 3' del LCR se encuentran el origen de replicación del ADN viral y elementos que regulan la transcripción de los genes E6 y E7 (Howley PM, 2007).

Función de los genes que conforman la región temprana (E)

Los genes ubicados en esta región tienen como función principal asegurar la replicación completa del virus y regular la transcripción de las proteínas necesarias para este fin. La proteína E1 es la que reconoce el origen de replicación del genoma viral. Esta proteína contiene dos dominios funcionales; en el extremo amino terminal se encuentra una secuencia señal de localización nuclear y la secuencia de aminoácidos que se une al sitio de origen de replicación del ADN viral conocido como DBD (del inglés DNA- *Binding Domain*) o sitio DBS (de las siglas en inglés DNA- *Binding Site*). En el extremo carboxilo se localizan los dominios de la proteína que presentan actividades helicasa y ATPasa. Estos dominios permiten formar y estabilizar un complejo estructural hexamérico que resultan de la unión con la proteína E2 el cual posibilita el reclutamiento de la maquinaria de replicación de la célula hospedera (Howley PM, 2007).

La principal función de la proteína E2, es la regulación de la transcripción especialmente de los genes de la región temprana y participa en la replicación y mantenimiento del número de copias del genoma viral (Howley PM, 2007). La unión de E2 al LCR también tiene la función de activar o suprimir la transcripción de los genes E6 y E7. E2 cumple además con la función de facilitar la segregación de ADN viral a las células hijas durante la replicación. En modelos in

in vitro el gen E2 intacto puede disminuir la eficacia en la inmortalización de células por el virus mediante la represión de E6 y E7, lo que sugiere que a ciertas concentraciones, puede reprimir la expresión de las proteínas oncogénicas del VPH (Howley PM, 2007). En cáncer cervical se observa con cierta frecuencia integración del genoma del virus en el ADN de la célula hospedera con concomitante pérdida del segmento represor del gen E2 e inducción sostenida de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Este se considera un paso fundamental para la carcinogénesis viral (Hamid, Brown, & Gaston, 2009; Jeon & Lambert, 1995).

El gen que codifica para E4 se encuentra en la región E y se superpone con E2 pero se transcribe en un marco de lectura diferente. La proteína E4 es producto de un empalme entre un fragmento del extremo amino terminal del gen E1, dando lugar a una proteína de fusión que es designada como E1^{E4}. A pesar de su localización genómica y estar localizada en la región temprana, la proteína E4 se expresa principalmente en las etapas tardías del ciclo de la replicación viral y es la proteína más abundantemente expresada durante el ciclo del mismo. Su expresión coincide con el inicio de la replicación del ADN viral vegetativo (el que debe entrar a la cápside viral). La proteína E4 se detecta en las células en donde la replicación del ADN viral está en curso y también en queratinocitos altamente diferenciados que expresan los genes que codifican las proteínas de la cápside, E4 no se encuentra en las partículas del virión. Pero se ha sugerido que esta proteína juega un papel importante facilitando la amplificación del genoma viral, la regulación de la expresión de L1 y L2 y el control de la maduración del virus (Humans, 2007). Sin embargo, estas funciones no se han podido comprobar en modelos *in vivo*. Sin embargo se ha confirmado que esta proteína no tiene ningún papel en la transformación de la célula infectada con el virus, y que su expresión se pierde a medida que las lesiones neoplásicas progresan a cáncer (Doorbar et al., 2012; Humans, 2007)

E5 es una proteína pequeña, hasta la fecha se postula que su expresión estimula la activación de la cascada de señalización iniciada por el factor de crecimiento epidérmico; también se une a la ATPasa de H⁺ la cual es responsable de la acidificación de los endosomas y modifica procesos celulares involucrados en la iniciación de la apoptosis y por esta razón las células transfectadas con plásmidos que expresen E5 son menos sensibles a la apoptosis inducida por la proteína de superficie Fas y por el factor de necrosis tumoral alfa. E5 del VPH 16 reduce los enlaces tipo gap que establecen la comunicación intercelular bloqueando el tráfico de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I a la membrana plasmática, lo que dificulta la presentación de antígenos y el reconocimiento de células T de células infectadas con el VPH (Hamid et al., 2009; Tsai & Chen, 2003).

La proteína E6 tiene un tamaño aproximado de 150 -160 aminoácidos y contiene 4 copias de la secuencia Cys-XX-Cys que forman dos dominios, cada uno con estructura de dedos de Zinc, los cuales están implicados en las interacciones con diversas proteínas de la célula hospedera. En el extremo C-terminal, la proteína E6 tiene el motivo X- (T/S)-X-(V/I/L) que se conserva entre los VPH de alto riesgo y que se une a la familia de las proteínas PDZ (Pim & Banks, 2010). La secuencia de aminoácidos de la proteína E6 es muy conservada entre los Papilomavirus (PVs) y ejerce múltiples funciones en la interacción del virus con la célula hospedera (Hamid et al., 2009). E6 es una proteína esencial para el ciclo reproductivo del virus y mantenimiento del ADN viral en los queratinocitos.

La E6 de VPH 16 induce transformación celular de queratinocitos humanos y aumenta ostensiblemente la actividad oncogénica de E7. La función más conocida de E6 es la habilidad de unir y degradar la proteína supresora de tumores p53, actividad que solo se observa en genotipos oncogénicos del virus (Pim & Banks, 2010). E6 se une a p53 a través de la ligasa E6-

AP (del inglés *E-Associated Protein*), la cual actúa como ligasa de las ubiquitinas. Estas últimas son una familia de proteínas encargadas de transferir las proteínas al proteosoma. Por esta razón, tanto la cantidad como la vida media de la proteína p53 en las células infectadas con VPH 16 es muy corta, ocasionando además que los niveles de esta proteína supresora de tumores en estas mismas células infectadas sean extremadamente bajos y por ende funciones como detención del ciclo celular y apoptosis están completamente abolidos.

E6 también tiene la habilidad de activar la telomerasa celular específicamente induciendo la transcripción de la sub-unidad catalítica de la enzima telomerasa (hTERT, del inglés *Human Telomerase Reverse Transcriptase*), la cual tiene actividad de transcriptasa reversa (Pim & Banks, 2010). Normalmente en tejidos sanos la actividad de esta enzima, que es la encargada de alargar el ADN de los telómeros mediante la adición de nucleótidos en cada ciclo de división celular es prácticamente indetectable, pero en el 85% de los cánceres se encuentra aumentada (Hamid et al., 2009). Adicionalmente, la proteína E6 de los VPH de alto riesgo induce la degradación de la proteína humana PDZ hDlg, la cual es necesaria para la formación de uniones de adhesión, la regulación de la adhesión celular, y la proliferación de tejidos epiteliales. La pérdida de la función de Dlg causa alteraciones morfológicas y crecimiento invasivo de las células epiteliales, dando lugar a letalidad embrionaria y a cáncer (Pim & Banks, 2010).

Finalmente, la proteína E6 tiene una función inmunosupresora debido a que disminuye la expresión de los genes inducidos por interferones. E6 inhibe el transactivador de transcripción de IRF-3, inhibe la habilidad de IL-18 de inducir la señalización de IFN- γ y se une a una tirosina quinasa 2 (Tyk2), una proteína transductora de señales de la vía Jak-STAT que finalmente interfiere en la activación de la vía de señalización del IFN- α (Beglin, Melar-New, & Laimins, 2009).

E7 es una proteína nuclear pequeña de 100 aminoácidos que se une al zinc y es fosforilada por la proteína caseína quinasa II (CK II, del inglés *Casein Kinase II*) En experimentos *in vitro*, E7 es capaz de inducir la síntesis de ADN en células en reposo y en cooperación con el oncogén ras de transformar células primarias de roedores (Moody & Laimins, 2010). E7 posee regiones conservadas que son fundamentales para las actividades de transformación las cuales además unen una serie importantes proteínas reguladoras del ciclo celular, incluido el producto del gen del Retinoblastoma (pRb) y las proteínas relacionadas con pRb, como la p107 y p130 las cuales son genes supresores de tumores (Moody & Laimins, 2010).

Las funciones de estas proteínas son las de regular el crecimiento y proliferación celular y controlar la transición de las células a través de las fases del ciclo celular. En células normales, la proteína pRb es fosforilada en múltiples residuos de serina por quinasas dependientes de ciclinas, en el límite del paso de la fase G1 a la fase S y se mantiene fosforilada hasta finales de la fase M, momento en el que se convierte de nuevo a la forma hipofosforilada a través de la acción de una fosfatasa. Esta última forma, representa la forma activa y tiene la capacidad de retener la progresión del ciclo celular mediante su unión al factor de transcripción E2F y de esta manera bloquear la proliferación celular. E7 del VPH 16 se une a la forma hipofosforilada de pRb produciendo una inactivación de la misma y liberando a E2F; de esta manera se induce la progresión a la fase S del ciclo celular estimulando la proliferación celular constante (Moody & Laimins, 2010).

Sin embargo, estudios genéticos indican que la formación de complejos entre las proteínas E7 y las de la familia de pRb, no es suficiente para dar cuenta de las funciones de immortalización y transformación de esta proteína, lo que sugiere que sean más los blancos celulares de E7 que son relevantes para la transformación celular. De gran interés son los resultados que informan que E7

puede interactuar con inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas lo cual parece ser fundamental para permitir la replicación de ADN viral en las células escamosas diferenciadas (Moody & Laimins, 2010). Una de las consecuencias indirectas de la acción de E7 sobre pRb, es la inducción de la expresión de p16. Esta proteína inhibe la acción de la quinasa dependiente de ciclina que fosforila pRb y por tanto su función es promover la retención del ciclo celular que ocurre en los queratinocitos diferenciados. Cuando las células cesan de replicarse los niveles de p16 son bajos. En células infectadas con PVs, la interacción de la proteína E7 con pRb, induce proliferación celular constante interfiriendo con la retroalimentación negativa que el complejo pRb-E2F ejerce sobre p16, al inducir una expresión descontrolada de genes regulados por E2F. Esto da lugar a la sobreexpresión sustancial de p16 en todas las células que muestran la transformación maligna inducida por VPH (Moody & Laimins, 2010; Wentzensen & von Knebel Doeberitz, 2007).

Genes de la región tardía

Esta región se encuentra en posición adyacente y corriente abajo de la región E, codifica para las proteínas estructurales que forman la cápside viral, las cuales son necesarias en el proceso de empaquetamiento del ADN (Chen, Garcea, Goldberg, Casini, & Harrison, 2000; Horvath, Boulet, Renoux, Delvenne, & Bogers, 2010). Las proteínas L1 y L2 son los únicos componentes de la cápside del VPH y comprenden el 80 y 20% de la masa de la cápside respectivamente (Casini, Graham, Heine, Garcea, & Wu, 2004; Chen et al., 2000; Howley PM, 2007; Modis, Trus, & Harrison, 2002).

L1 es la principal proteína estructural de la cápside debido a su participación en la entrada del virus a la célula hospedera (Culp, Budgeon, Marinkovich, Meneguzzi, & Christensen, 2006; Joyce et al., 1999). En la estructura tridimensional de la proteína L1 se distinguen tres regiones

bien definidas: Una central o el núcleo y los extremos amino y carboxilo que asegura la estabilidad de la cápside viral. El extremo amino está compuesto por aminoácidos altamente conservados entre los diferentes genotipos sugiriendo que cumplen un papel esencial en el ensamblaje; los aminoácidos que conforman la región central confieren estabilidad a la estructura. El extremo carboxilo facilita los reordenamientos espaciales para asegurar la estabilidad e integridad de la cápside viral (Hamid et al., 2009; Modis et al., 2002). El conocimiento acerca de la estructura de L1 es importante porque permite determinar regiones expuestas en la superficie de esta proteína y finalmente en la cápside, lo cual tiene implicaciones en la ubicación de epítopes neutralizantes reconocidos por anticuerpos los cuales son importantes para la protección inmune, información esencial para el desarrollo e implementación de las vacunas profilácticas que están siendo introducidas a nivel mundial (Hamid et al., 2009).

La proteína menor L2 tiene dos funciones importantes en la infectividad del virus; la primera función consiste en la participación en el proceso de encapsidación (Finnen, Erickson, Chen, & Garcea, 2003) mediante el reclutamiento de pentámeros de L1 y del genoma viral (Day, Roden, Lowy, & Schiller, 1998; Florin, Sapp, Streeck, & Sapp, 2002). Específicamente, L2 se une al ADN viral a través de islas de aminoácidos cargados positivamente en los extremos amino y carboxilo (Chen et al., 2000). La segunda función es la de bloquear la infectividad del virus. Se ha demostrado en ensayos *in vitro* que anticuerpos contra epítopes de la proteína L2 son capaces de bloquear su infectividad; aunque estos anticuerpos no necesariamente reconocen aminoácidos implicados en la entrada del virus a la célula hospedera, lo que permite concluir que la proteína L2 participa en el proceso de adhesión celular como un ligando secundario. En este sentido, los residuos de los aminoácidos 13 a 31 y 108 a 126 en L2 juegan un papel importante en la interacción ligando - receptor (R. Yang et al., 2003).

Ciclo productivo del virus

El VPH tiene un tropismo específico por células de epitelio escamoso donde causa lesiones proliferativas benignas como las verrugas o lesiones malignas como el cáncer. El ciclo replicativo está estrechamente relacionado con el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales del hospedero. Modelos experimentales sugieren que el VPH infecta las células basales del epitelio a través de lesiones, micro-heridas y abrasiones del tejido por medio de la interacción con los receptores proteoglicanos de heparán sulfato (Combita et al., 2001; Giroglou, Florin, Schäfer, Streeck, & Sapp, 2001; K. M. Johnson et al., 2009) y probablemente de la laminina (Culp et al., 2006). Una vez invadido el queratinocito basal se produce la internalización del virus y la transferencia del genoma viral al núcleo (Bienkowska-Haba, Patel, & Sapp, 2009; Kines, Thompson, Lowy, Schiller, & Day, 2009; R. M. Richards, Lowy, Schiller, & Day, 2006; Schiller, Day, & Kines, 2010).

El ADN del virus permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos al mismo tiempo que ocurre la división celular de la célula basal del epitelio. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral aumenta, produciendo la acumulación de copias del ADN genómico dentro del núcleo de la célula. Análisis moleculares demuestran que la expresión de los genes tempranos ocurre en los dos tercios inferiores y la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos más superficiales del epitelio, donde también ocurre el ensamblaje de las cápsides virales dando lugar a la formación de viriones en las células que se descaman naturalmente de este epitelio (Doorbar, Egawa, Griffin, Kranjec, & Murakami, 2015).

Infección con Virus del Papiloma Humano e historia natural del cáncer cervical

La infección por VPH es la infección de transmisión sexual más común en el mundo. La adquieren tanto hombres como mujeres y generalmente sucede corto tiempo después del inicio de las relaciones sexuales (Bosch et al., 2008). Se estima que cerca del 80% de la población mundial sexualmente activa ha estado alguna vez en contacto con este virus (Bosch et al., 2008; Burchell, Winer, de Sanjosé, & Franco, 2006; Clifford et al., 2005).

La prevalencia del VPH entre la población adolescente y adultos jóvenes es de alrededor del 20 al 30%; a partir de esta edad la prevalencia disminuye paulatinamente hasta llegar a los niveles más bajos en la cuarta o quinta década de la vida. En estudios realizados en varios países latinoamericanos, se ha observado un segundo pico en la prevalencia de la infección de VPH después de la quinta década, dando lugar a una curva bimodal (Herrero et al., 2000; Lazcano-Ponce et al., 2001; Molano et al., 2002). El primer pico representa la rápida adquisición de la infección después del inicio de la actividad sexual y el segundo pico observado en mujeres posmenopáusicas puede ser explicado por las siguientes hipótesis: la primera, la reactivación de infecciones latentes (sin embargo para el caso del VPH un estado de latencia no se ha comprobado hasta la fecha) y la segunda, la representación de nuevas infecciones (de Sanjose et al., 2010).

Las infecciones por VPH tanto con genotipos de bajo y alto riesgo pueden pasar desapercibidas, causar alteraciones clínicamente evidentes en la citología, o lesiones exofíticas proliferativas (verrugas genitales), pero tanto la infección como estas lesiones son auto-controladas por la respuesta inmune y desaparecen espontáneamente sin dejar secuelas (Franco et al., 1999; Winer et al., 2011); la mayoría de las infecciones por VPH (entre el 90 y 95%) aclaran en un término de 6 a 18 meses (Rodríguez et al., 2008). Regresión de la infección o aclaramiento

se define de acuerdo al tiempo promedio ocurrido entre la primera detección del ADN viral y el momento en el que este desaparece o no es detectable (Moscicki, Schiffman, Kjaer, & Villa, 2006). La mayoría de los estudios han demostrado que las infecciones con genotipos de alto riesgo tienden a durar más (persistir) que las infecciones con genotipos de bajo riesgo (Moscicki et al., 2006).

Como se mencionó previamente, un reducido porcentaje de mujeres (entre el 5 y 10%) no aclaran la infección y desarrollan infecciones persistentes (Rodríguez et al., 2008). La diferenciación entre infección persistente y transitoria es difícil debido a que el intervalo de las visitas de seguimiento es variable entre los diferentes estudios y hay muchos detalles de la historia natural que aún son desconocidos como tiempo exacto de la infección por VPH, existencia o no de infecciones latentes y la posible reactivación (Hamid et al., 2009; Moscicki et al., 2006). Hasta la fecha, se ha demostrado que la infección por VPH 16 persiste más tiempo que las infecciones por otros genotipos de alto riesgo (Moscicki et al., 2006).

Las infecciones por VPH persistentes son el requisito para el desarrollo de lesiones cervicales de alto grado (NIC2+, de las siglas Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o más severas) y cáncer. Sin embargo, no hay un consenso claro sobre la definición de persistencia; la mayoría de los investigadores catalogan como infecciones persistentes a aquellas en las que se detecta el mismo genotipo viral durante dos visitas consecutivas que pueden tener entre 4 a más de 12 meses de diferencia (Moscicki et al., 2006; Muñoz et al., 2009; Rodríguez et al., 2008). Se ha demostrado que en las mujeres mayores de 30 años el riesgo de tener infecciones persistentes y desarrollar lesiones de alto grado y cáncer es mayor (Rodríguez et al., 2010; Schiffman et al., 2011). La mayoría de los estudios en este campo han demostrado que el genotipo de VPH y la persistencia de la infección son los principales determinantes en el desarrollo de lesiones NIC2+.

En particular, la detección repetida de ADN de VPH 16 se asocia con un riesgo acumulado de NIC3 superior al 30% en algunas cohortes (Castle et al., 2009). Se ha estimado que el tiempo que transcurre entre la infección con VPH y el desarrollo de NIC3 es entre 7 y 15 años (Rodríguez et al., 2010) y el tiempo que transcurre hasta el desarrollo de un cáncer invasor es de alrededor de 30 años (McCredie et al., 2008).

Cofactores asociados a la carcinogénesis del VPH

Una gran cantidad de información y conocimientos, soportan que los genotipos de alto riesgo tienen la capacidad de transformar células a fenotipos malignos, sin embargo solo una pequeña minoría de las mujeres infectadas con un virus de alto riesgo inevitablemente progresarán a cáncer cervical (Dueñas-González et al., 2005). Esto es explicado debido a que la gran mayoría de estas infecciones regresan (aclaramiento viral) y en la minoría que se mantiene la infección (persistencia viral) existe un alto riesgo de desarrollo de lesiones NIC 2+ o cáncer invasor. Por lo tanto, hoy, la infección por VPH es conocida como el factor etiológico necesario pero no suficiente en el desarrollo del carcinoma de cérvix (Bosch & Muñoz, 2002; Ho et al., 1995).

Este conocimiento, ha llevado a pensar que otra serie de factores del hospedero, el virus y del ambiente modifican el riesgo de que la infección viral persista o progrese a lesiones NIC2+. Los factores hasta la fecha reconocidos en el huésped que influyen el desarrollo del cáncer son el tabaquismo, el consumo prolongado de anticonceptivos hormonales, la multiparidad, la co-infección con otras infecciones transmitidas sexualmente y la dieta (Castellsagué & Muñoz, 2003), así como los factores relacionados con el virus como la carga viral, la capacidad de integración del genoma viral, el genotipo y las variantes moleculares. Varios de estos factores implicados en la carcinogénesis se encuentran actualmente en investigación (Boccardo, Lepique, & Villa, 2010; Gonzalez & Riboli, 2010; Kjellberg et al., 2000; Muñoz et al., 2006).

Dieta y cáncer

La dieta y la nutrición ocupan un lugar destacado entre los determinantes más importantes en la etiología del cáncer (Mayne, Playdon, & Rock, 2016). Su importancia en la prevención del cáncer es ampliamente reconocida, debido a una impresionante cantidad de evidencia de investigaciones epidemiológicas, clínicas y de laboratorio (Wiseman, 2008). Desde la década de los 80's en su muy citada revisión de las causas del cáncer, Doll & Peto concluyeron que 35% de todos los cánceres en USA y otros países industrializados eran causados por la dieta (Doll & Peto, 1981). Este problema ha sido reexaminado por un sinnúmero de autores y por diferentes comités durante las últimas dos décadas. Sin embargo, el consenso general que la dieta se relaciona en aproximadamente el 30% de todos los cánceres permanece intacto (Baena Ruiz & Salinas Hernández, 2014; Wiseman, 2008).

Quizás la revisión sistemática más grande de la literatura sobre asociaciones entre la dieta, la nutrición y el riesgo de cáncer ha sido realizada por el *World Cancer Research Fund* (WCRF) y la *American Institute for Cancer Research* (AICR) (Lohse, Faeh, Bopp, Rohrmann, & Group, 2016). Este grupo revisó una gran cantidad de literatura sobre los efectos de los alimentos, la nutrición y la actividad física sobre el riesgo de 16 cánceres diferentes. En la actualidad se conoce que el cáncer con el mayor número de factores de riesgo relacionados con la dieta, los suplementos dietéticos y la actividad física es el colorrectal (Lohse et al., 2016). Como una integración indirecta de todos los componentes de la dieta y el nivel de actividad física de un individuo, el tema asociado con el mayor número de cánceres es la "grasa corporal", que aumenta el riesgo de cáncer de esófago, páncreas, vesícula biliar, colon y recto, seno en mujeres posmenopáusicas, endometrio y riñón (Lohse et al., 2016; Sapienza & Issa, 2016).

El consumo alto de frutas y verduras también se ha asociado con la prevención del cáncer (Sapienza & Issa, 2016). Los efectos positivos que proporcionan las frutas y verduras provienen de la gran cantidad de sustancias potencialmente protectoras que contienen, que afectan a diferentes vías bioquímicas y metabólicas (Aggarwal & Shishodia, 2006). Varios estudios han investigado particularmente el papel de los compuestos polifenólicos, flavonoides, isoflavonas, isotiocianatos, selenio, carotenoides, vitaminas E, D, C, A, B12, B6 y ácido fólico. Las vitaminas E, C y D y el selenio comparten propiedades antioxidantes fundamentales contra el estrés oxidativo y sus efectos nocivos en nuestro organismo, lo que lleva a la carcinogénesis. Sin embargo, el estrés oxidativo es un proceso natural con acciones positivas, como la mejora de respuesta inmune (Trapp, Knez, & Sinclair, 2010). Aunque algunos estudios epidemiológicos han encontrado un beneficio del alto consumo de frutas y verduras en la prevención de cáncer como el de cuello uterino (Zhang, Dai, Zhang, & Wang, 2012) o el cáncer de cabeza y cuello (Chuang et al., 2012), la evidencia disponible no es completamente consistente. Hay resultados no concluyentes para las vitaminas E, C y selenio en el carcinoma hepatocelular (Glauert, Calfee-Mason, Stemm, Tharappel, & Spear, 2010) y el cáncer de próstata (G. Trottier, Boström, Lawrentschuk, & Fleshner, 2010), para la vitamina D y el ácido fólico en el cáncer de páncreas (J. Johnson & de Mejia, 2011) o para las vitaminas del grupo B en el cáncer de próstata (Bassett et al., 2012).

Dieta y cáncer cervical

Diferentes estudios han revelado que varios micronutrientes podrían prevenir la progresión de lesiones precursoras a cáncer de cérvix. Los resultados del estudio de Investigación Prospectiva Europea sobre Cáncer y Nutrición (EPIC) mostraron una asociación inversa significativa entre la ingesta diaria de fruta y este cáncer (Gonzalez & Riboli, 2010). En particular, el consumo de

micronutrientes como las vitaminas A, C y E, B12, folatos, carotenoides y minerales, se ha asociado con un menor riesgo de infección por VPH, lesiones preneoplásicas y cáncer cervical (Cao, Shen, Li, Xu, & Wu, 2016; Guo et al., 2015; Hwang, Lee, Kim, & Kim, 2010; J. Kim et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Siegel et al., 2010; Tomita et al., 2010; Zhang et al., 2012; Zhou & Meng, 2016). Estos hallazgos apoyan el papel protector de los micronutrientes y algunos fitoquímicos a través de la inhibición de la proliferación de células cancerosas (García-Closas, Castellsagué, Bosch, & González, 2005), la estabilización de p53 (Reddy, Odhav, & Bhoola, 2003), la prevención del daño en el ADN, la metilación ADN y la reducción de la supresión inmune (Barchitta et al., 2017; Field, Johnson, & Schley, 2002; García-Closas et al., 2005).

Desde finales de los años 90, se han llevado a cabo varios estudios para explorar la asociación entre los niveles de folato y vitamina B12 séricos y el cáncer cervical. Los resultados han sido contradictorios y hasta la fecha no se ha llegado a conclusiones definitivas. Sin embargo, en varios estudios se ha sugerido el alto consumo de ácido fólico como un factor importante para la prevención del cáncer cervical. Las mujeres con deficiencia de folato parecieran ser más susceptibles a los cambios preneoplásicos del cérvix y a tener un mayor riesgo de cáncer (Y. I. Kim, 1999; Tomita et al., 2013). Otros estudios han reportado que no hay una conexión obvia y directa entre el nivel de ácido fólico en suero y la aparición y progresión del cáncer cervical (Ragasudha et al., 2012; Weinstein et al., 2001).

También se ha explorado la asociación entre los niveles de estas vitaminas y el riesgo de adquirir una infección por VPH de alto riesgo o el riesgo de desarrollar lesiones NIC2+ (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake, Macaluso, Brill, Heimbürger, & Partridge, 2007). En una cohorte de mujeres con citología anormal (ASC-US y LIEBG) de Birmingham, Alabama, Piyathilake y colaboradores observaron

que las concentraciones circulantes más altas de folato se asociaron con una menor probabilidad de adquirir una infección por VPH de alto riesgo y una menor probabilidad de tener una infección persistente, y cuando se está infectado, una mayor probabilidad de eliminar la infección (Piyathilake et al., 2004).

En un trabajo posterior en la misma población, los investigadores evaluaron si las concentraciones circulantes de folato modificaban el riesgo de NIC2+ asociado a diferentes genotipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR); ellos observaron que las mujeres con niveles de folato más bajo y VPH positivo para cualquiera de los 13 tipos de alto riesgo, tenían el doble de probabilidades de tener NIC2+ (Piyathilake et al., 2007). Más importante aún, también demostraron que las mujeres con bajos niveles de folato y positivas para el VPH-16 tienen nueve veces más probabilidades de ser diagnosticadas con NIC2+ que las mujeres VPH 16 negativo (positivas para los otros genotipos de VPH-AR) con niveles de folato normales, lo que sugiere un efecto específico de los niveles de folato en la infección por en el VPH 16, el genotipo más comúnmente encontrado en las lesiones preneoplásicas y cáncer (Piyathilake et al., 2007).

Micronutrientes folato y vitamina B12

Los micronutrientes son elementos esenciales que los seres vivos, incluido el ser humano, requieren en pequeñas cantidades a lo largo de la vida para realizar diferentes funciones metabólicas (como cofactores enzimáticos, al formar parte de la estructura de numerosas enzimas o al acompañarlas –coenzimas-) y fisiológicas. Se consideran como micronutrientes a las vitaminas y a los minerales. Reciben ese nombre ya que se requieren en pequeñas cantidades, generalmente menores a 100 miligramos, mientras que los macronutrientes se requieren en gramos (Hambidge, 2010). Sin embargo, por pequeñas que sean las cantidades, las consecuencias de su ausencia son graves. Los micronutrientes no siempre necesitan ser aportados

diariamente. Algunos como la vitamina A, la D o la B12, pueden almacenarse en el hígado para cubrir las necesidades de períodos prolongados (Hambidge, 2010).

Folato

Generalidades, bioquímica y farmacocinética

Conocido también como vitamina B9, es un micronutriente que pertenece a las vitaminas hidrosolubles del complejo B (Pieroth, Paver, Day, & Lammersfeld, 2018); se compone de tres estructuras primarias, un anillo de pteridina heterobocíclico, ácido para-aminobenzoico (PABA por sus siglas en inglés) y ácido glutámico (uno o varios residuos) (Herrera M, 2016). La unión entre el anillo de pteridina y PABA, por medio de un puente metileno, forma el ácido pteróico y la unión de éste con el glutamato, mediante un enlace peptídico, forman el ácido fólico (McNulty, Pentieva, Hoey, Strain, & Ward, 2012) como se muestra en la figura 2.

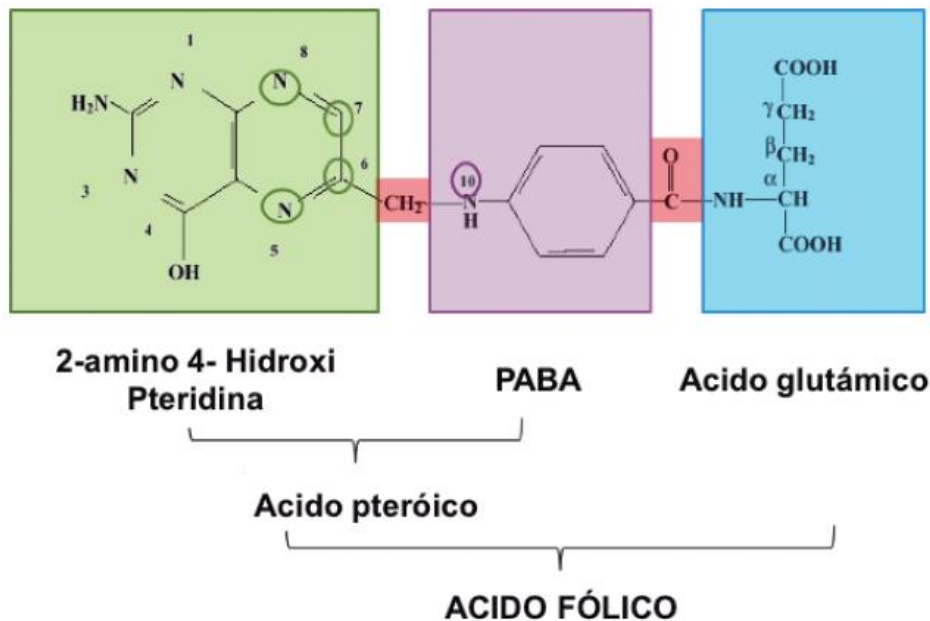


Figura 2. Estructura química del folato.

Tomado de (Herrera M, 2016). Ácidó fólico, conformado por el anillo de pteridina o 2-amino,4-hidroxi pteridina (recuadro verde), el ácido para-amino benzóico- PABA- (recuadro lila) y el ácido glutámico o aminoácido glutamato (recuadro azul). La unión entre los dos primeros componentes por medio de un puente metileno forman el ácido pteróico y la unión del ácido pteróico con un residuo de glutamato por un enlace peptídico, forman el ácido fólico. Los nitrógenos en las posiciones 5 y 10 son los aceptores y donadores de los compuestos monocarbonados. Los nitrógenos en las posiciones 5 y 8 y los carbonos en las posiciones 6 y 7, sirven para la incorporación de átomos de hidrógeno y la reducción a las formas dihidrofolato y tetrahidrofolato.

Ya que los humanos no pueden sintetizar este compuesto, es un requerimiento dietético (Herrera M, 2016; Screen G, 2010). El estado de oxidación, el número de residuos de glutamato constitutivos de la estructura y su procedencia, son elementos clave para identificar las diferencias específicas entre el folato dietario y el ácido fólico. El folato dietario se refiere a una mezcla compleja y variable de compuestos de folato; a la forma reducida de la vitamina con presencia de dos a cuatro átomos de hidrógeno en los nitrógenos de las posiciones 5 y 8 y en los carbonos de las posiciones 6 y 7 del anillo pteridina, formando dihidrofolato o tetrahidrofolato,

respectivamente. Además, una larga cadena de residuos del aminoácido glutamato (poliglutamatos), siendo la forma como se encuentra en los alimentos naturales (Screen G, 2010).

Aunque el ácido fólico es la forma principal del folato utilizado en suplementos dietarios o alimentos fortificados, comprende solo el 10% o menos de folatos en la dieta. Es la forma más oxidada de la vitamina, carece de la presencia de átomos de hidrógeno y posee únicamente un glutamato terminal (monoglutamato) (Screen G, 2010); estas características le confieren a la vitamina mayor estabilidad químico-estructural por lo que posee una biodisponibilidad dos veces mayor, en comparación con el folato dietario (Meshkin & Blum, 2007; Pieroth et al., 2018).

A pesar de que los folatos son abundantes en la dieta, la cocción y el procesamiento destruyen sus compuestos. Las mejores fuentes de folato en los alimentos son las verduras de hoja verde, frutas como la naranja y papaya, la levadura de cerveza, vísceras como el hígado y el riñón también contienen altas cantidades de folatos.

Como se mencionó anteriormente, los estudios farmacocinéticos en humanos indican que el ácido fólico tiene una biodisponibilidad entre el 10 y el 98% y está influenciada por el pH intestinal, la actividad enzimática, la presencia de alcohol y otros inhibidores, los trastornos de malabsorción y el patrón alimentario (Pieroth et al., 2018). Con grandes dosis orales de ácido fólico aumentan sustancialmente los niveles plasmáticos en sujetos sanos de una manera dependiente del tiempo y dosis. Después de la administración oral de dosis altas de ácido fólico (en un rango de 25-1.000 mg/día), los niveles de folato en los glóbulos rojos (RBC) permanecen elevados por períodos superiores a 40 días después de la interrupción del suplemento (Meshkin & Blum, 2007).

Metabolismo del folato: digestión, absorción, transporte y almacenamiento.

Después de la ingestión, el proceso de conversión del ácido fólico a las formas metabólicamente activas es relativamente complejo; se requieren varias enzimas, adecuado funcionamiento hepático e intestinal y suministros adecuados de riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6), zinc, vitamina C y serina. Después de la formación de las formas coenzimáticas de la vitamina en el hígado, estos compuestos metabólicamente activos se secretan en el intestino delgado con la bilis (ciclo enterohepático de folato), donde son reabsorbidos y distribuidos a los tejidos a lo largo del cuerpo (Screen G, 2010).

Para que los poliglutamatos provenientes de las fuentes naturales (folatos dietarios), puedan ser absorbidos deben ser hidrolizados en el lumen intestinal hasta convertirse en monoglutamatos mediante las enzimas folilpoli- glutamilcarboxipeptidasas, provenientes de los jugos pancreáticos sales biliares y las conjugasas dependientes de zinc de los enterocitos yeyunales (Screen G, 2010). Tras la hidrólisis, los monoglutamatos son captados por el enterocito mediante diversos mecanismos: el saturable dependiente de sodio y energía, el que requiere la proteína transportadora de folato reducido (RFT) o por el sistema de absorción por difusión tras la ingesta de dosis farmacológicas (Herrera M, 2016). Al interior del enterocito las formas oxidadas de folato son reducidas mediante la incorporación de átomos de hidrógeno en el anillo pteridina para obtener el tetrahidrofolato (THF), se transfieren grupos de un carbono en las posiciones 5 y 10 del ácido pteróico, formando diferentes coenzimas necesarias para procesos metabólicos específicos (Screen G, 2010). El transporte de folatos desde el enterocito hacia el torrente sanguíneo, requiere de proteínas transportadoras ubicadas en la membrana basolateral, que permiten la salida de diferentes coenzimas siendo la 5-metiltetrahidrofolato (5m-THF) la más abundante. El transporte sanguíneo se lleva a cabo mediante proteínas de unión al folato y en

menor medida por la prealbúmina, albúmina y β -2 macroglobulina (Screen G, 2010), las cuales dirigen las coenzimas hacia los tejidos hepáticos y extrahepáticos para su almacenamiento figura 3 (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

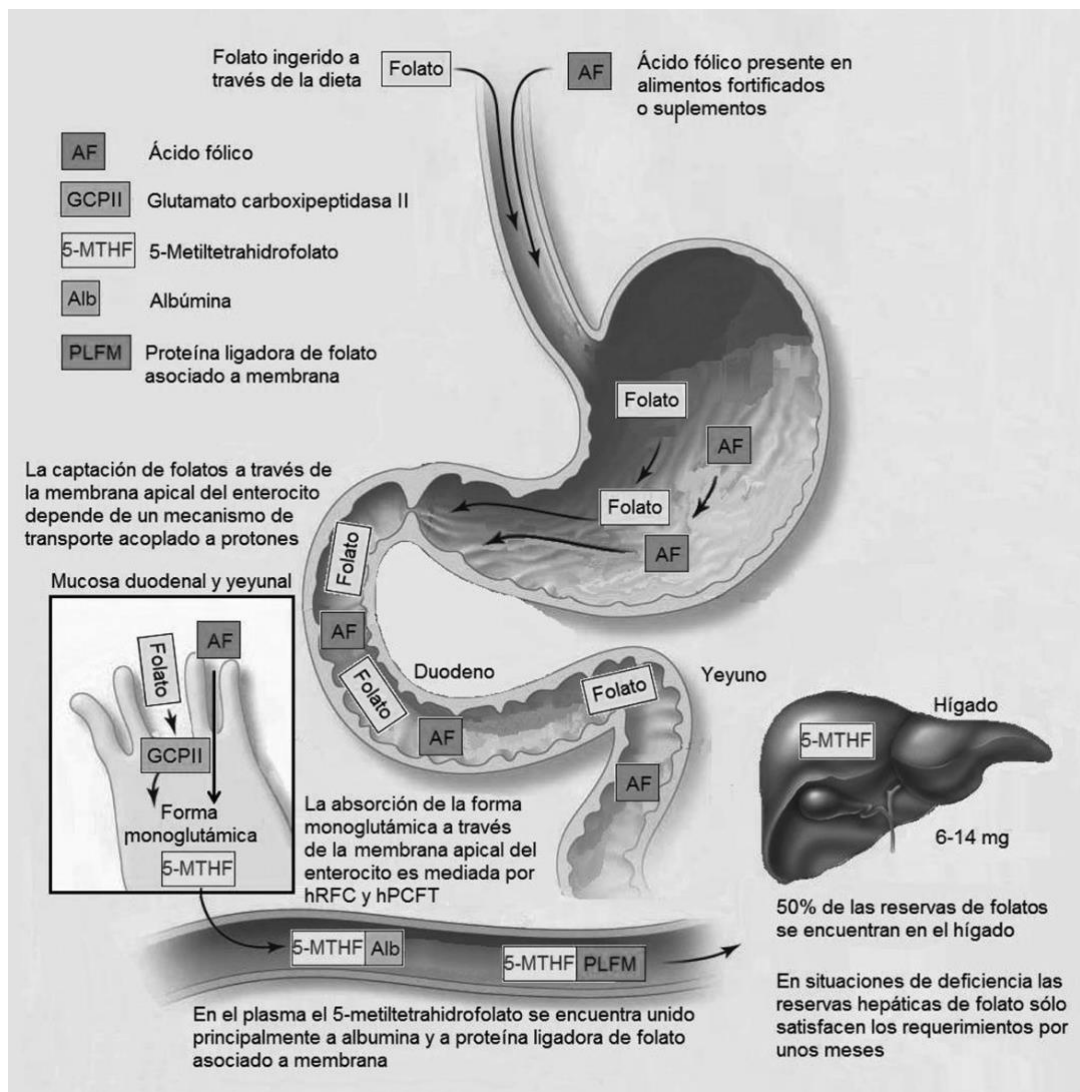


Figura 3. Aspectos fisiológicos de los folatos y del ácido fólico. Modificado de: (Andrès et al., 2004; Herrera M, 2016).

Dentro de las células, los dihidrofolatos son hidrogenados para formar tetrahidrofolatos y estos a su vez son conjugados con residuos de glutamato (Herrera M, 2016). La formación de poliglutamatos es necesaria para el almacenamiento intracelular y aumentar la afinidad por las enzimas que participan en el ciclo del folato y la metionina. En el espacio intracelular, el folato se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria donando o recibiendo unidades monocarbonadas. La disponibilidad del folato es particularmente indispensable en tejidos que experimentan recambio celular continuo, dado que a partir de él se obtienen bases nitrogenadas, aminoácidos y S-Adenosín Metionina (SAM), identificado como el principal compuesto que dona grupos metilo para el ADN (Herrera M, 2016).

Deficiencia y Síntomas

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la deficiencia de folato incrementa el riesgo de diferentes enfermedades y se asocia con efectos negativos para la salud humana en todos los grupos de edad. Además, es una de las principales causas de anemia macrocítica en el mundo (Kaferle & Strzoda, 2009). Pueden contribuir a la deficiencia de este micronutriente los siguientes aspectos: el suministro deficiente de alimentos; defectos en el metabolismo del mismo, como en individuos alcohólicos o con enfermedad hepática; malabsorción; mayores necesidades en las mujeres embarazadas, madres lactantes; interferencia metabólica por medicamentos como los anticonceptivos orales, el metrotexato, trimetoprim, algunos anticonvulsivantes y las sulfazalazinas; pérdidas de folato en hemodiálisis; y deficiencias en enzimas o cofactores necesarios para la generación de ácido fólico activo y el consumo de tabaco (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012; Herrera M, 2016).

Los signos y síntomas de la deficiencia de folato incluyen anemia macrocítica, fatiga, irritabilidad, neuropatía periférica, hiperreflexividad de los tendones, síndrome de piernas inquietas, diarrea, pérdida de peso, insomnio, depresión, demencia, trastornos cognitivos y psiquiátricos. La Homocisteína plasmática elevada también puede indicar una deficiencia dietética o funcional de ácido fólico (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

Valores de referencia y prevalencia de la deficiencia del folato

Los puntos de corte y valores de referencia de las concentraciones séricas, plasmáticas o eritrocitarias de los folatos establecidos por la OMS se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de folato en suero y eritrocitos para determinar el estado del folato en todos los grupos de edad

Concentraciones de folato en suero o plasma ng/ml (nmol/l) ^{a, b}	Concentraciones eritrocitarias de folato ng/ml (nmol/l) ^{a, b}	Interpretación
> 20 (> 45,3)		Elevaradas
6-20 (13,5-45,3)		Intervalo normal
3-5,9 (6,8-13,4)		Posible carencia
< 3 (< 6,8)	< 100 (< 226,5)	Carencia

^a Factor de conversión del ácido fólico: 1 ng/ml = 2,265 nmol/l.

^b Ensayo con *Lactobacillus casei*.

Una revisión de la OMS (Allen, 2008) mostró que la mayoría de los datos sobre la prevalencia de deficiencias de folato y vitamina B12 se derivan de encuestas locales relativamente pequeñas, pero estos datos y las pocas encuestas nacionales de algunos países sugieren que las deficiencias de ambas vitaminas pueden ser problema de salud pública que podría afectar a millones de personas en todo el mundo (de Benoist, 2008). Las bajas concentraciones de micronutrientes ocurren en todos los grupos de edad y en países con diversos índices de desarrollo (de Benoist,

2008). Datos de las Américas, indican que la deficiencia de folato es menos frecuente que la deficiencia de vitamina B12 aun antes de la fortificación con Ácido Fólico (AF) (Allen, 2004). En Chile, después de esta intervención la deficiencia de folatos es menor al 1% en distintos grupos de edad (Hertrampf et al., 2003).

Datos derivados de una encuesta probabilística nacional en población mexicana, representativa del área rural y urbana por grupos de edad, donde se obtuvo una submuestra de sangre en 4.263 mujeres de 20 a 49 años de edad para medir las concentraciones séricas de ferritina, vitamina B12 y folato, indican que la prevalencia de deficiencias de este micronutriente fue del 1.9% (IC95% 1.3-2.8) (Teresa Shamah Levy & Cuevas, 2015).

Pese a que es necesario para planificar, desarrollar, ejecutar y evaluar políticas públicas enfocadas hacia el mejoramiento del estado nutricional, la prevención y el control de la deficiencia de este micronutriente, en Colombia no se cuenta con estudios que describan la prevalencia de deficiencia de folatos en la población. Únicamente está disponible una publicación de Salamanca y col en 2017 que reporta valores séricos de ácido fólico en 1.797 individuos mayores de 18 años atendidos en un hospital de alta complejidad en la ciudad de Bogotá. En esta publicación, reportan una media global de ácido fólico sérico de 11,61 ng/ml (DE: 6,05). Solo en el 2% de los individuos se reportaron valores séricos < 2 ng/ml (Salamanca, Ordóñez, Cardozo, & Suárez-Obando, 2017).

Sin embargo, a través de la Encuesta Nacional de Situación Nutricional del país (ENSIN 2005–2010) (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, 2005; Ministerio de la Protección Social, 2010), se conoció que los colombianos adultos (entre 18 y 64 años), presentan bajas ingestas de folato en sus dietas. En ese mismo año se determinó que 75% de las mujeres entre 19 y 50 años consumió como máximo 308 µg de folatos por día (Instituto Colombiano de Bienestar

Familiar, 2005) y en el 2010, se observó que sólo 50,5% de la población consumió frutas, 15,9% leguminosas y 9,6% verduras diariamente, alimentos considerados como principales fuentes de folato (Ministerio de la Protección Social, 2010). De acuerdo al Perfil de seguridad alimentaria y nutricional de Medellín y sus corregimientos del 2015, se encontró que la prevalencia de deficiencia de folato fue mayor en las mujeres (67.4%), a partir de los 14 años se incrementó el riesgo de deficiencia y las mujeres lactantes tuvieron el mayor riesgo (96.8%). El área rural fue la más afectada (73.5%) y la zona menos afectada fue la Centroriental (51.8%). Sin embargo, alrededor de una de cada dos personas presentaron riesgo, igual sucedió con los estratos cinco y seis (44.7% y 48.5% respectivamente) (Medellín, 2015).

Fortificación

La fortificación y el enriquecimiento de alimentos son dos estrategias a nivel poblacional que pueden mejorar los niveles de micronutriente (Lindsay, 2006). Estos dos enfoques emplean la misma técnica de añadir vitaminas o minerales a alimentos básicos como la harina. Se diferencian en su propósito: mientras que el enriquecimiento devuelve a los alimentos aquellos nutrientes que se han perdido durante su procesamiento o cocción, la fortificación añade determinados nutrientes que normalmente no están presentes en el alimento en cantidades relevantes desde el punto de vista nutricional (Lindsay, 2006).

A pesar de la falta de información sobre la prevalencia de la deficiencia del folato, el país cuenta con una política de fortificación de la harina de trigo con ácido fólico a través del decreto 1944 desde 1996, el cual establece la adición de 1.54 mg de ácido fólico por cada Kg de producto. Se desconoce el efecto de dicha fortificación en el perfil epidemiológico asociado a la deficiencia de esta vitamina, como la anemia macrocítica, hiperhomocisteinemia, defectos del tubo neural (DTN), entre otras patologías. Según el Manual de Fortificación con vitaminas y

minerales de harina de trigo y maíz, el consumo estimado de estos productos en Colombia es de 54 y 77 gr/día respectivamente (Quentin, 2004).

El año 2018 se publicaron los lineamientos técnicos y operativos para la Ruta Integral de Atención para la Promoción y Mantenimiento de la Salud y la Ruta Integral de Atención en Salud para la Población Materno Perinatal (Ministerio de Salud y Protección Social-Colciencias resolución 3280, 2018), las cuales recomiendan una suplementación diaria con 400 µg de ácido fólico tres meses previos a la concepción para prevenir los defectos del tubo neural. Sin embargo, se desconocen las concentraciones de folato en la etapa preconcepcional de las mujeres colombianas antes y después de la suplementación con estas dosis adoptadas por el ministerio de salud del país y sus beneficios en la población.

Vitamina B12

Generalidades, bioquímica y farmacocinética

La vitamina B12 es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en la naturaleza como cobalaminas, está compuesta por un anillo tetrapirrol llamado corrina, cobalto, 5, 6 dimetilbenzimidazol, ribosa y grupo aminopropanol tal como se muestra en la figura 4.

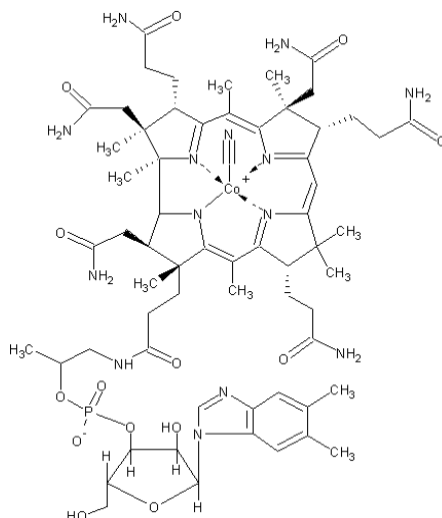


Figura 4. Estructura química la vitamina B12 (cobalamina). Tomado de (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

La hidroxicobalamina y la cianocobalamina son formas no fisiológicas de la cobalamina; en el organismo se transforman de forma espontánea en metil y 5' desoxiadenosil que son las formas fisiológicamente activas o coenzimas de la vitamina B12 (Vitamina B₁₂: metabolismo 1999, rev cubana). La cianocobalamina (B12- cristalina) es la forma medicamentosa más común de la vitamina B12 caracterizada por presentar en una de sus posiciones axiales un grupo cianuro (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

La vitamina B12 es sintetizada activamente por un gran número de bacterias intestinales del organismo humano. Sin embargo, su absorción es mínima ya que la síntesis ocurre en sitios muy distales al lugar de la absorción. Como consecuencia, la vitamina B12 debe ser necesariamente aportada por los alimentos, cuya mayor fuente dietética se encuentra en las proteínas animales como la carne, los huevos, la leche y el pescado. Se estima que en una persona sana el consumo diario de esta vitamina es de aproximadamente 2,4 µg, de los cuales únicamente entre el 50-60% son absorbidos (Nielsen, Rasmussen, Andersen, Nexø, & Moestrup, 2012). De manera

artificial, la vitamina B12 puede encontrarse en alimentos fortificados y suplementos cuyo aporte aproximado es de 5-7 $\mu\text{g}/\text{día}$.

Metabolismo de la vitamina B12: digestión, absorción, transporte y almacenamiento.

El metabolismo de la vitamina B12 es complejo y se compone de diferentes etapas en las que cualquier alteración podría producir una posible deficiencia (Andrès et al., 2004). Se absorbe en el íleon distal (figura 5). En la dieta se encuentra unida a proteínas, siendo liberada por la acidez y proteólisis gástrica. Posteriormente, se une a la proteína R (haptocorrina), secretada por las glándulas salivales y esofágicas. En el duodeno, el medio alcalino permite la liberación de la vitamina uniéndose al factor intrínseco (FI). En el enterocito, el complejo FI-B12 es captado por endocitosis mediada por cubilina. En el citoplasma de la célula endotelial, la B12 es liberada y posteriormente ligada principalmente a transcobalamina II (TCII), llegando vía circulación portal al hígado y finalmente a todos los tejidos y hematíes. Este proceso dura varias horas y el máximo de la vitamina en sangre se alcanza aproximadamente ocho horas después de la ingestión (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

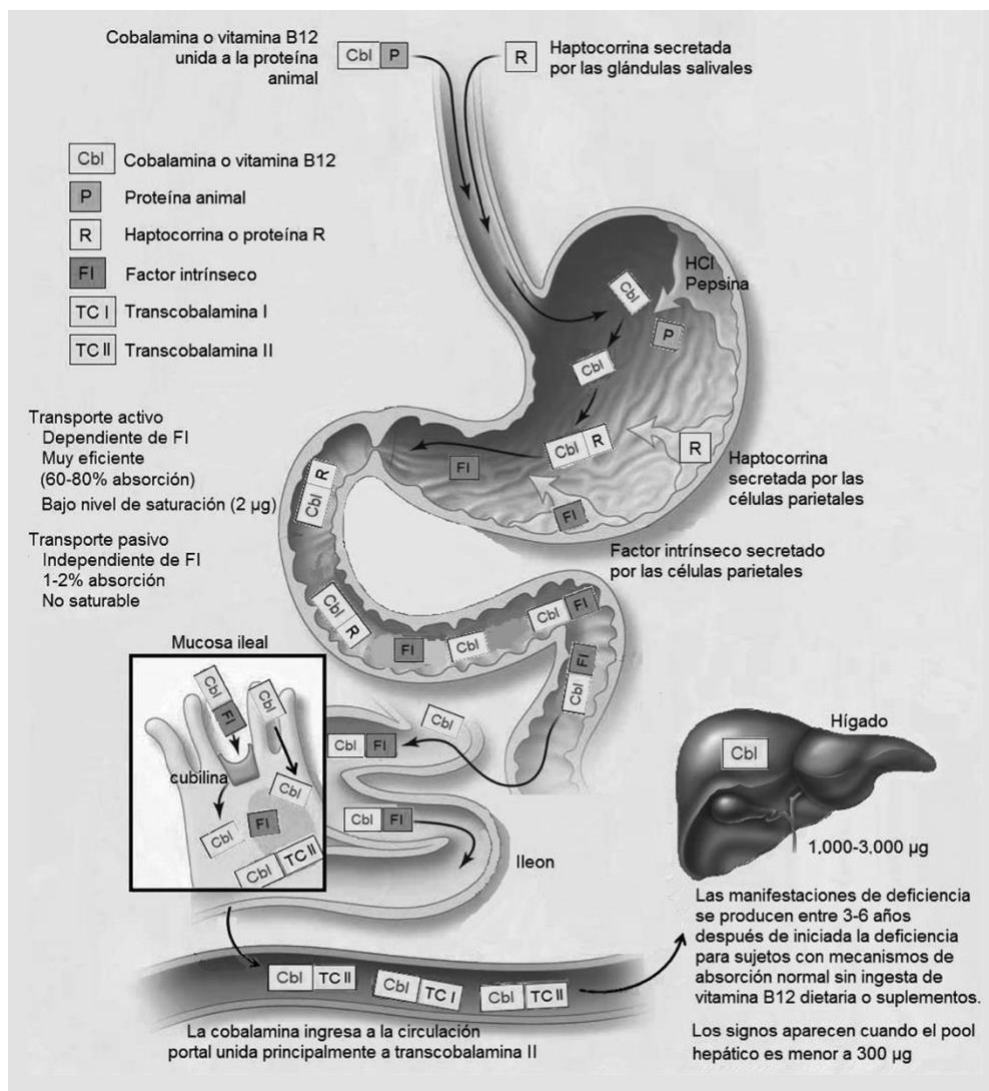


Figura 5. Aspectos fisiológicos de la vitamina B12 asociados a posibles causas de déficit.

Tomado (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

La absorción de vitamina B12 mediada por el FI es activa, muy eficiente y con un bajo nivel de saturación. También se ha descrito un mecanismo de transporte pasivo, independiente del FI y no saturable. Sin embargo, sólo entre 1-2% de una dosis ingerida es absorbida por esta vía. No obstante, el transporte pasivo adquiere importancia cuando disminuye o desaparece el FI y explica la adecuada absorción desde altas dosis orales en ausencia de FI como por ejemplo en

pacientes gastrectomizados (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

El almacenamiento de esta vitamina se da en el hígado (1.000- 3.000 µg). Por esta razón, las manifestaciones de su deficiencia se producen 3-6 años después de iniciada la deficiencia para personas con mecanismos de absorción normal sin ingesta de B12 en la dieta o suplementos. Los requerimientos diarios de B12 en personas sanas alcanzan el 0.1% de los depósitos. Los signos de deficiencia aparecen cuando la reserva corporal cae a menos de 300 µg (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

Como los folatos, la cobalamina participa en la circulación enterohepática. Entre 0.5 y 9 mg de cobalamina son secretados diariamente en la bilis unidos a la proteína R. Estos complejos cobalamina-proteína R son tratados en el intestino exactamente igual que aquellos que provienen del estómago, o sea, la cobalamina es liberada por digestión de la proteína R por las proteasas pancreáticas y entonces es tomada por el FI y reabsorbida. Se ha estimado que del 65 al 75 % de la cobalamina biliar es reabsorbida por este mecanismo. La circulación enterohepática genera un importante ahorro de B12 y permite comprender que cuando la carencia es por una insuficiencia dietética pura, el déficit se manifiesta más tardíamente (Andrès et al., 2004).

La vitamina B12 es esencial en numerosas reacciones bioquímicas en la naturaleza, la mayoría de las cuales implican redistribución de hidrógenos (H) o de carbonos (C), como por ejemplo la biosíntesis de la metionina (mamíferos) y la isomerización del metilmalonato a succinato (mamíferos). La primera es la síntesis del aminoácido metionina a partir de la homocisteína, reacción de especial interés, pues no sólo requiere metilcobalamina, sino también como coenzima (metiltetrahidrofolato) y la segunda es un paso en el catabolismo del propionato,

la conversión del metilmalonilCoA a succinilCoa (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

Deficiencia y Síntomas

Se ha estimado que el bajo nivel de vitamina B12 afecta a una gran porción de la población general, incluyendo a los adultos mayores. La deficiencia de vitamina B12 puede ser producida por varios factores como la dieta vegetariana; síndrome de malabsorción como la producida por la insuficiencia pancreática, enfermedad celíaca, anemia perniciosa y la resección quirúrgica intestinal; infecciones (infecciones crónicas con *Helicobacter pylori*); parasitosis; medicamentos como las biguanidas, óxido nitroso, neomicina, omeprazol y anticonceptivos orales (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

Las manifestaciones de la deficiencia de esta vitamina derivan de una disminución de la síntesis de ácidos nucleicos alterando la maduración nuclear y afectando preferentemente las células con rápida proliferación. Los signos y síntomas se observan principalmente a nivel hematológico y neurológico. Sin embargo la sintomatología es más probable que ocurra en deficiencias muy severas (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012).

Valores de referencia y prevalencia de la deficiencia de la vitamina B12

Los puntos de corte y valores de referencia de las concentraciones séricas o plasmáticas de la vitamina B12 establecidos por la OMS (de Benoist, 2008) son: >200-996 pg/mL valores normales; entre 150-200 pg/mL posible deficiencia y <150 pg/mL deficiencia (Allen, 2009).

La deficiencia de vitamina B12 es aún un problema nutricional importante en algunos países del mundo así como lo es la deficiencia subclínica que afecta grupos de edad definidos. Los niveles de B12 disminuyen con la edad, por esta razón los adultos mayores también tienen un alto riesgo de deficiencia de vitamina B12 debido a la absorción progresivamente deteriorada de la vitamina de los alimentos (A. Brito, Mujica-Coopman, López de Romaña, Cori, & Allen, 2015). En la última década, se reconoció que existían tasas de prevalencia alarmantemente altas de bajos niveles plasmáticos de vitamina B12 en las Américas (Allen, 2004; McLean, de Benoist, & Allen, 2008). Datos nacionales de México reportaron valores bajos (<148 pmol/L) y marginales (entre 148 and 221 pmol/L) de vitamina B12 en suero en el 23% y 24% de las mujeres adultas respectivamente para el año 2003 (Villalpando et al., 2003). Estudios locales reportaron valores bajos y marginales para este micronutriente en el 0% al 61% y 13% al 33% respectivamente en población de todas las edades y grupos fisiológicos de México, Venezuela, Guatemala, Cuba, Chile y Perú (A. Brito et al., 2015).

Sin embargo, después de la fortificación con ácido fólico, los datos nacionales de México en 2012 indicaron niveles bajos de vitamina B12 en el 9% entre mujeres adultas (A. Brito et al., 2015). En Costa Rica, la prevalencia de vitamina B12 baja, valores <148 pmol/L fueron del 5% y 7% entre mujeres en edad fértil y mujeres adultas respectivamente. En Ecuador, la prevalencia de los valores de vitamina B12 <221 pmol/L fue del 31%. En Argentina del 12% entre mujeres adultas, mientras que en Chile el 9% de las personas mayores presentaron vitamina B12 <148 pmol/L (A. Brito et al., 2015). En Colombia, la prevalencia de valores de B12 <221 pmol/L fueron del 37% mujeres adultas (Ministerio de la Protección Social, 2010).

Fortificación

En la actualidad se encuentra en discusión la fortificación de alimentos con B12 en forma masiva (Green, 2009). En nuestro país, la Estrategia Nacional para la Prevención y Control de las Deficiencias de Micronutrientes 2014 – 2021 contempla las siguientes líneas de acción para la prevención y control de las deficiencias de micronutrientes: 1. Diversificación de la alimentación. 2. Fortalecimiento de acciones prioritarias (pinzamiento del cordón umbilical cuando deje de latir, lactancia materna y alimentación complementaria y desparasitación). 3. Fortificación de alimentos de consumo masivo, de alimentos específicos y fortificación casera con micronutrientes en polvo. 4. Biofortificación o fortificación biológica de los alimentos. 5. Suplementación con Micronutrientes (Social, 2015). Sin embargo el decreto 1944 de 1996 por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo, no incluye la adición de vitamina B12.

Metabolismo de un solo carbono

El folato y la vitamina B12 son micronutrientes que comparten funciones (Carmel, Green, Rosenblatt, & Watkins, 2003; Shane, 2008), ambos sirven como coenzimas en el metabolismo de un carbono y sus funciones más importantes pueden dividirse en dos vías principales. En la primera, específicamente una unidad de carbono de serina o glicina reacciona con el tetrahidrofolato (THF) para formar metilen-THF. Este último puede usarse para la síntesis de timidilato, un nucleótido del ADN o para la síntesis de purinas. En la segunda, la vitamina B12 actúa como cofactor de la metionina sintasa (MS), que cataliza la remetilación de la homocisteína en metionina la cual a su vez es el precursor de la S-adenosil metionina (SAM), donante universal de los grupos metilo los cuales participan en cientos de reacciones incluyendo la metilación del ADN, una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas hasta la

fecha (Rampersaud, Bailey, & Kauwell, 2002; Selhub, Morris, Jacques, & Rosenberg, 2009; Taby & Issa, 2010).

Epigenética

La epigenética hace referencia al estudio de aquellos factores no genéticos, es decir, al estudio de la función génica que no está contenida en las secuencias de nucleótidos del ADN pero cuyas alteraciones estables modifican la expresión génica (Dueñas-González et al., 2005). Está definida como cambios heredables a través de la mitosis y potencialmente la meiosis (Taby & Issa, 2010) en la expresión génica que no son explicados por alteraciones en la secuencia de nucleótidos del ADN (Saavedra, Brebi, & Roa, 2012). La epigenética es un fenómeno bien establecido que juega un papel muy importante en diversos procesos biológicos como el desarrollo embriológico, el desarrollo del cáncer, enfermedades crónicas y degenerativas, respuesta inmune, el envejecimiento, entre muchos otros (Lorincz, 2016).

Las dos modificaciones epigenéticas mejor estudiadas hasta el momento son la metilación del ADN y la modificación de las histonas; recientemente otros fenómenos como los microRNA han sido sugeridos como los implicados en el silenciamiento transcripcional (Sandoval & Esteller, 2012; Taby & Issa, 2010).

Epigenética y cáncer

La búsqueda de una conexión entre la dieta y el cáncer humano tiene una larga historia en la investigación del cáncer, es un tema de gran importancia y hay suficiente evidencia científica que la sustenta, como se mencionó anteriormente. Su interés se enfoca en determinar y entender los mecanismos por los cuales los factores dietéticos podrían aumentar o disminuir el riesgo de cáncer. La constatación de que alterar la dieta puede alterar el estado epigenético de los genes y

que estas alteraciones epigenéticas pueden aumentar o disminuir el riesgo de cáncer es una noción más moderna, la cual fue impulsada en gran medida por los estudios en modelos animales. Las conexiones entre la dieta y las alteraciones epigenéticas, por un lado, y entre las alteraciones epigenéticas y el cáncer, por otro, están respaldadas tanto por estudios observacionales en humanos como por modelos animales (Sapienza & Issa, 2016).

Precisamente con respecto a cómo uno podría medir los efectos potenciales de la dieta en el epigenoma y el efecto del epigenoma sobre el riesgo de cáncer, tres mecanismos epigenéticos podrían hacer estas distinciones: la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y los microRNA. Sin embargo, y con especial relevancia para los efectos ambientales en el epigenoma, no es probable que las tres medidas de los mecanismos sean igualmente capaces de distinguir las diferencias epigenéticas entre individuos que pueden ser de interés clínico con respecto a la dieta/nutrición y otras exposiciones ambientales.

El alcance del problema radica en el nivel observado de variación interindividual, el tamaño del efecto esperado de la variable o exposición asociada a la enfermedad, y la precisión y el rendimiento con el que se pueden realizar las mediciones epigenéticas. Estas consideraciones hacen que la metilación del ADN sea el candidato más probable para ser un biomarcador de exposiciones ambientales. El ADN es una molécula altamente estable; los niveles de variación interindividual en la metilación global o específica del sitio varían pero están restringidos (es decir, la metilación en cualquier sitio puede variar, como una fracción de las moléculas medidas, entre 0 y 1); técnicas de alta precisión y altamente reproducibles están disponibles (Bibikova et al., 2011; Irizarry et al., 2008; Jelinek et al., 2012; Weber et al., 2005; Zuo, Tycko, Liu, Lin, & Huang, 2009); y estas técnicas pueden distinguir diferencias en las medias poblacionales de pequeña magnitud como las esperadas en muestras de tamaño moderado.

Por lo tanto, la variación interindividual es lo suficientemente baja y la precisión de la medición de la metilación del ADN es lo suficientemente alta como para que la medición de este mecanismo epigenético pueda ser utilizado para diferenciar los efectos de la dieta/nutrición en el epigenotipo, incluso si se espera que esos efectos sean pequeños. Con las tecnologías actuales, lo mismo no puede decirse para los otros mecanismos epigenéticos (Sapienza & Issa, 2016).

De hecho, la metilación del ADN se puede medir de forma precisa y sencilla a través de varios métodos moleculares y se ha convertido en una tecnología clave para la investigación y asistencia médica, ya que cumple un papel muy importante en la elucidación de la historia natural de numerosas patologías, diagnóstico y tratamiento a través del descubrimiento de drogas (Lorincz, 2016).

Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación de la posición 5' del anillo de citosina de un dinucleótido CpG, mediante la unión covalente de un grupo metilo mediada por la S-adenosil metionina (SAM) la cual actúa como donante de este grupo (Taby & Issa, 2010). Para llevar a cabo la metilación del ADN, el 5-metil tetrahidrofolato, una forma celular de folato, es remetilado por la Sintetasa de Metionina, para producir metionina, la cual a su vez es el precursor de SAM (figura 6). De este modo los grupos metilo van a ser transferidos a la secuencia CpG del ADN mediante una reacción catalizada por la ADN metiltransferasa (DNMTs) presente en la horquilla de replicación durante la fase S del ciclo celular (Rampersaud et al., 2002).

Los dinucleótidos CpG, usualmente los blancos de metilación del ADN en los mamíferos, están dispersos a lo largo del genoma y se presentan en menos abundancia de lo esperado; esto es

explicado evolutivamente a través de la desaminación espontánea de las citosinas en los sitios CpG y consecuente transformación a timinas (Taby & Issa, 2010). Sin embargo en ciertas áreas del genoma se encuentra una alta concentración de dinucleótidos CpG llamadas “islas CpG”. Estas islas en promedio son de alrededor de 1.000 pares de bases y se encuentran en la región 5’ del promotor de aproximadamente el 50% de los genes.

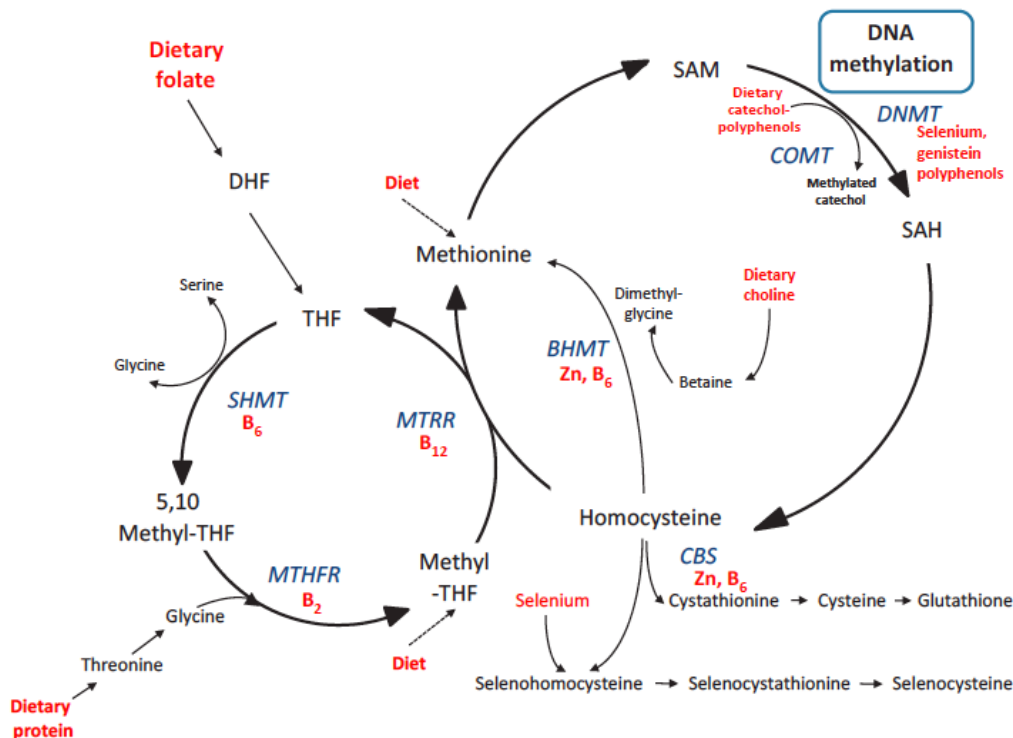


Figura 6. Ciclo metabólico del folato. Tomado de (McKay & Mathers, 2011).

El patrón de metilación de los residuos de citosina es heredable y es específico de especie y de cada tejido. En general, en una célula diferenciada normalmente, los sitios CpG diseminados por el genoma están altamente metilados, mientras que en la mayoría de las islas CpG dentro de los promotores están protegidas de la metilación. La metilación del ADN de las islas CpG localizadas en los promotores se ha correlacionado con el silenciamiento permanente de la expresión de un gen determinado, tal como sucede por ejemplo con la inactivación de uno de los

cromosomas X en las mujeres. La metilación del ADN lleva al silenciamiento de los genes a través de la inhibición directa de la unión de los factores de transcripción a sus sitios correspondientes y a través del reclutamiento de la familia de proteínas que contienen un dominio de unión al grupo metilo (MBDs, del inglés *Methyl CpG Binding Domain*) como se muestra en la figura 7, (Taby & Issa, 2010).

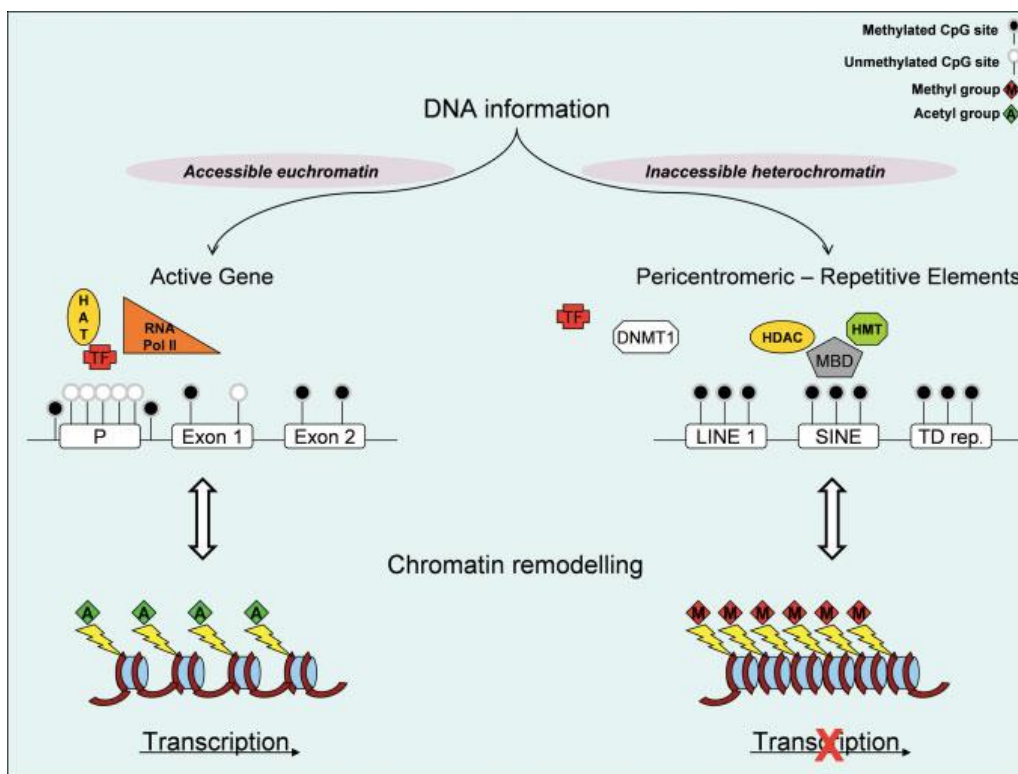


Figura 7. Regulación transcripcional normal en eucariotas superiores.

Tomado de (Taby & Issa, 2010). El ADN está empaquetado en bloques de construcción nucleosómicos de una manera que determina su accesibilidad al entorno nuclear y al estado transcripcional. (Izquierda) Los genes transcripcionalmente activos están marcados por promotores libres de metilación y una configuración de la cromatina altamente acetilada que permite el acceso a factores de transcripción y polimerasa II (pol II). (Derecha) Los elementos repetitivos son silenciados por altos niveles de metilación del ADN, metilación específica de histona lisina, y un estado cerrado de la cromatina. Un cambio de cromatina activa a inactiva caracteriza algunos genes en las células cancerosas. HAT indica histona acetiltransferasa; TF, factor de transcripción; ARN pol II, ARN pol II; DNMT1, ADN metiltransferasa 1; HDAC, histona desacetilasa; MBD, unión al grupo metilo; HMT, histona metiltransferasa; P, promotor génico; LINE1, elemento nuclear largo intercalado 1; SINE, elemento nuclear corto intercalado; TD rep, repeticiones en tándem.

Los cambios del patrón de metilación en humanos puede ocurrir bastante rápido, tomar solo unos pocos meses; por lo tanto, es una fuente para el descubrimiento de biomarcadores que preceden o evolucionan con la enfermedad (Lorincz et al., 2013; Mirabello et al., 2013). Los biomarcadores epigenéticos son especialmente importantes en enfermedades complejas de múltiples genes como el cáncer, pero el estudio de la metilación del ADN en particular está produciendo una gran cantidad de biomarcadores interesantes ya que puede medirse con buena precisión en biopsias de tejidos, células exfoliadas, sangre y otros fluidos y puede relacionarse con ubicaciones físicas exactas en el genoma; esta característica se presta más fácilmente para ser aplicada en el diagnóstico médico. Actualmente, se conocen cambios clínicamente relevantes en la metilación en muchos cánceres humanos como el cáncer de cuello uterino, próstata, mama, colon, vejiga, estómago, esófago y pulmón (Heyn et al., 2013; Lorincz, 2014; Louvanto et al., 2015; Vasiljević et al., 2013). La metilación diferencial puede tener un papel central en el desarrollo y el resultado de la mayoría de las malignidades humanas, si no en todas (Lorincz, 2016).

Metilación del ADN y Cáncer

La metilación aberrante del ADN es el primer marcador epigenético asociado con el cáncer como consecuencia de una alteración de una regulación génica normal. Estas alteraciones son de tres tipos: hipermetilación, hipometilación y pérdida de la impronta genómica, el cual es un proceso epigenético que implica la metilación y la modificación de histonas con el fin de lograr la expresión de genes monoalélicos sin alterar la secuencia genética. Este último es un fenómeno genético mediante el cual ciertos genes se expresan de manera específica y similar a la parental y

el cual se hereda mediante un proceso de herencia independiente de la herencia mendeliana clásica (Sandoval & Esteller, 2012).

La hiper o hipometilación de genes relevantes en la regulación del crecimiento celular es reconocido como el evento más importante en el origen del cáncer (Patel et al., 2012). La hipermetilación del ADN se refiere principalmente al aumento de la metilación específicamente en sitios que en condiciones normales no están metilados, y ocurre principalmente en las islas CpG de los promotores. Este fenómeno aberrante se ha asociado con la estabilización de la represión transcripcional como se explicó previamente y la pérdida de la función génica, y ocurre fundamentalmente en genes supresores de tumores (Sandoval & Esteller, 2012).

La hipometilación es asociada principalmente con la pérdida de la metilación del ADN en regiones extensas del genoma, aunque podría presentarse en regiones específicas. Feinberg y Vogelstein fueron los primeros en reportar la substancial hipometilación en genes de células cancerosas comparadas con células normales en diferentes tipos de cáncer. Algunos estudios han descrito hipometilación del ADN en cáncer colorrectal, gástrico y en melanomas (Sandoval & Esteller, 2012). La hipometilación del ADN ocurre en muchas áreas genómicas con pocos genes, incluyendo elementos repetitivos, retrotransposones e intrones, lo que conlleva a inestabilidad genómica. Durante la progresión tumoral, el grado de hipometilación global del ADN se incrementa.

Hay suficiente evidencia que soporta que en el cáncer ambas alteraciones coexisten: tumores malignos muestran hipometilación global e hipermetilación en regiones puntuales. No se conoce si un fenómeno antecede el otro o si ambos se presentan al mismo tiempo. En términos de carcinogénesis, la primera observación es hipometilación, luego se presenta una

hipermetilación en ciertas regiones que significa un silenciamiento de los genes supresores de tumores (Sandoval & Esteller, 2012).

Muy importante también mencionar, que se producen alteraciones en la metilación del ADN durante la carcinogénesis inducida por virus como en el cáncer cervical. Todos los virus asociados a tumores codifican oncoproteínas que influyen en la maquinaria de metilación del ADN y, por lo tanto, pueden alterar la expresión del gen huésped y viral. Las oncoproteínas codificadas por el VPH, el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de la hepatitis B (VHB) y los adenovirus inducen la expresión y/o estimulan la actividad del ADN metiltransferasa DNMT1. Además, las metiltransferasas de ADN DNMT3a y DNMT3b pueden activarse por acción de las oncoproteínas codificadas por VPH, VHB y VEB (Durzynska, Lesniewicz, & Poreba, 2017).

Epigenética - Metilación del ADN y Cáncer Cervical

De acuerdo a la historia natural y su agente causal, en el modelo de cáncer cervical es importante considerar los cambios epigenéticos que ocurren tanto en el genoma viral como en el de la célula hospedera (humano), los cuales pueden influenciar el proceso carcinogénico. Las alteraciones epigenéticas hasta la fecha reportadas relacionadas con el VPH son: metilación de los sitios de unión de E2 (K. Kim, Garner-Hamrick, Fisher, Lee, & Lambert, 2003), metilación de E6, E7 y LCR (Badal et al., 2003; Bhattacharjee & Sengupta, 2006; Ding et al., 2009; Hublarova et al., 2009; Piyathilake et al., 2011), la metilación de L1-L2 (Lorincz et al., 2013; Mirabello et al., 2012), la interacción de E6 y/o E7 con las DNMTs, la interacción de E7 con las Histona desacetilasas (HDACs) y la interacción de E6 con las Histonas acetiltransferasas (HATs) (Dueñas-González et al., 2005).

Los eventos relacionados con el ADN del hospedero son: hipermetilación regional del ADN (Flatley et al., 2009; Patel et al., 2012; Wentzensen, Sherman, Schiffman, & Wang, 2009),

hipometilación global del ADN (Flatley et al., 2009), patrón anormal de la cromatina, pérdida de la impronta, hiperfosforilación y acetilación de la histona 3 (H3) (Dueñas-González et al., 2005) y expresión aberrante de MicroRNAs (Fang, Zhang, & Jin, 2014) como se resume en la figura 8.

La mayoría de estos mecanismos epigenéticos tienen una interacción dinámica compleja los cuales participan en el mantenimiento de la infección persistente, la transformación celular y el desarrollo de cáncer invasivo por una desregulación de los supresores tumorales y los oncogenes (Durzynska et al., 2017).

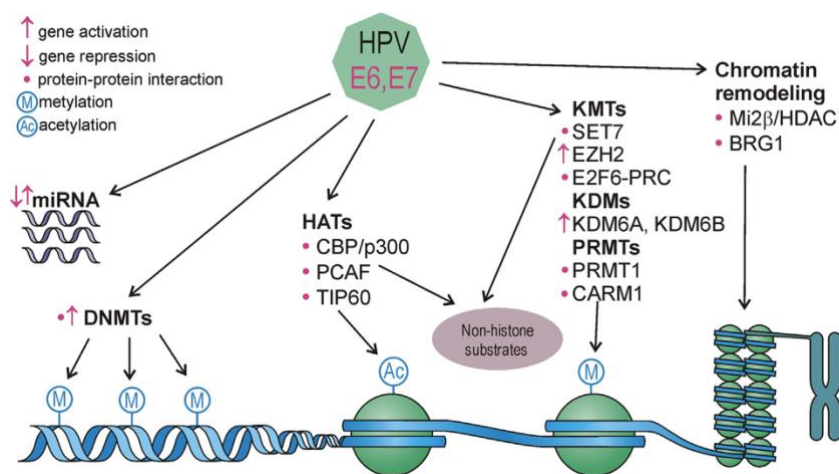


Figura 8. Representación esquemática de las interacciones HPV E6 y E7 con modificadores epigenéticos celulares.

Tomado de (Durzynska et al., 2017). Las oncoproteínas del VPH se unen y/o modulan la expresión de DNMT, las enzimas modificadoras de histonas, las subunidades de complejos de remodelación de cromatina y MicroARNs que finalmente conllevan a la alteración de la transcripción en las células huésped.

VPH y Metilación del ADN

Aunque la relación entre el VPH y la metilación aberrante en el cáncer de cuello uterino aún no se conoce con demasiados detalles, algunos autores han sugerido que el VPH interfiere con la maquinaria de metilación del ADN celular, ya sea para ocultarse o como parte de su ciclo viral (Kalantari et al., 2004; Leonard et al., 2012). También se ha propuesto que podría ser un

mecanismo de defensa del hospedero para suprimir la transcripción del ADN del agente “extraño”, o ser una estrategia usada por el virus para mantener infecciones persistentes, o ambas (McCabe, Davis, & Day, 2005; Patel et al., 2012; K. L. Richards et al., 2009). Recientemente, también se ha sugerido que para garantizar la viabilidad celular continua, el VPH se "auto-metila", regulando así la actividad oncogénica excesiva (De-Castro Arce, Göckel-Krzikalla, & Rösl, 2012).

Como se mencionó en el apartado metilación del ADN, la metilación del ADN humano ocurre predominantemente en áreas del genoma donde se encuentra una alta concentración de dinucleótidos CpG llamadas islas CpG. Sin embargo, dentro del genoma del VPH no hay islas CpG clásicas, y la metilación tiene lugar en las regiones de alta densidad y conservación de sitios CpG (Clarke et al., 2012; Galván et al., 2011).

Regulación de la metilación por las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR

Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR aumentan la expresión y la actividad de DNMT1 (Au Yeung et al., 2010). E6 lo hace degradando p53 (Au Yeung et al., 2010; Leonard et al., 2012) (Figura 9A). En las líneas celulares de cáncer cervical SiHa y CaSki, Au Yeung CL y colaboradores observaron que la caída de E6 se asocia con un aumento en p53 y una disminución en la expresión de DNMT1 (Au Yeung et al., 2010; Leonard et al., 2012). En contraste, Lin y colaboradores (Lin et al., 2010) demostraron que p53 regula negativamente la expresión de DNMT1 tanto en líneas celulares como en pacientes con cáncer de pulmón. p53 se une a la proteína de especificidad 1 (Sp1) y las proteínas remodeladoras de la cromatina, y este complejo se une a la región promotora de DNMT1. La formación del complejo impide que Sp1 active la transcripción de DNMT1 (Lin et al., 2010). Normalmente, Sp1 induce la degradación de p53 por ubiquitinación mediada por la proteína MDM2 (de sus siglas en inglés *Murine Doble Minute 2*)

- complejo Sp1 / p53 / MDM2 - e induce la sobreexpresión de DNMT. Los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en p53 y pacientes con alteraciones en p53 y / o Sp1 mostraron regiones promotoras hipermetiladas de genes supresores de tumores muy probablemente debido a la sobreexpresión de DNMT1 (Lin et al., 2010).

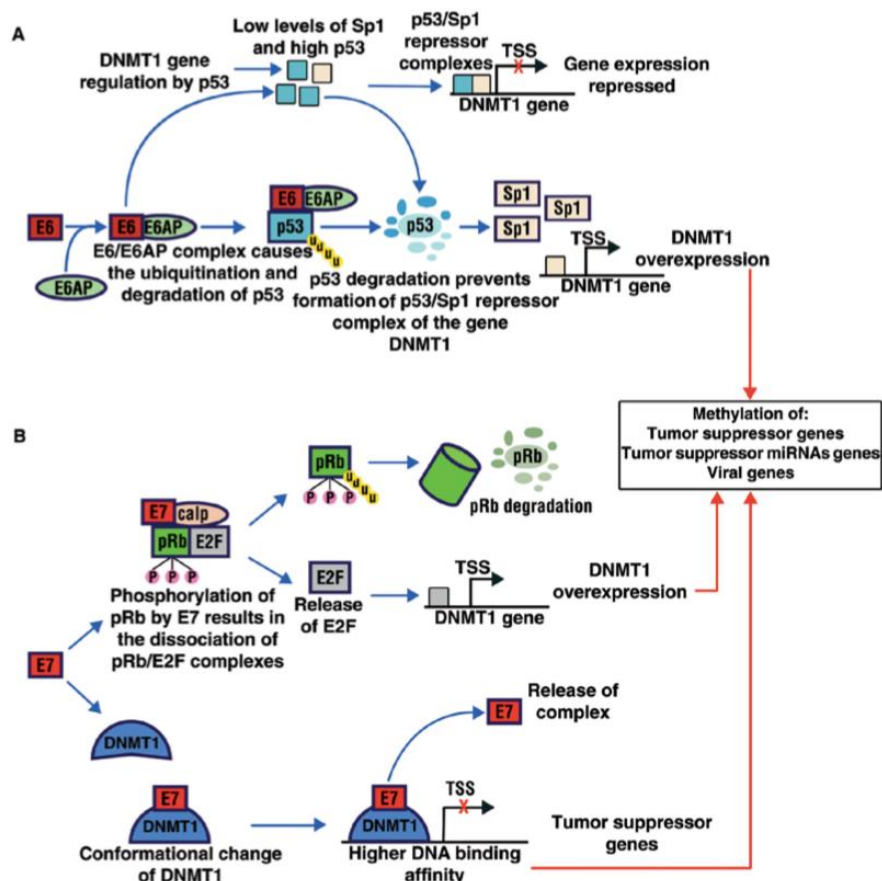


Figura 9. Regulación de la metilación de genes virales y celulares por las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR.

Tomado de (Jiménez-Wences, Peralta-Zaragoza, & Fernández-Tilapa, 2014). Las oncoproteínas E6 y E7 de HR-HPV aumentan la expresión y la actividad de las metiltransferasas de ADN, particularmente DNMT1. (A) La unión de p53 a Sp1 (p53 / Sp1) forma un complejo represor para la transcripción de DNMT1. La degradación de p53 por E6 evita la formación de este complejo represor y Sp1 induce la expresión y actividad de DNMT1. (B) E2F regula positivamente la actividad promotora de DNMT1. La unión de E7 a pRb (E7 / pRb) provoca la liberación de E2F, favoreciendo la expresión de DNMT1. La unión de E7 a DNMT1 (E7 / DNMT1) induce un cambio conformacional en DNMT1, exponiendo su sitio de unión de ADN y promoviendo la unión de ADN; una vez que el complejo E7 / DNMT1 se une al ADN, DNMT1 se cierra sobre el ADN y mantiene una interacción estable DNMT1 / ADN, y E7 se disocia del complejo. La sobreexpresión de DNMT1 da como resultado la hipermetilación de los promotores del gen supresor de tumores, lo que conduce a la transformación celular y la tumorigénesis. VPH-AR, VPH de alto riesgo; DNMT, ADN metiltransferasa.

La modulación de la expresión de DNMT1 por E7 (Figura 9B) puede ocurrir de dos maneras diferentes: i) indirectamente, a través de la unión de E7 a pRb, que libera el factor de transcripción E2F; dado que existen secuencias de unión a E2F conservadas en el sitio de inicio de la transcripción para DNMT1, la liberación de E2F da como resultado la regulación de la actividad del promotor de DNMT1 y ii) directamente, mediante la unión de E7 a DNMT1 (Burgers et al., 2007). Se ha propuesto que el complejo E7 / DNMT1 induce un cambio conformacional en DNMT1, exponiendo su sitio activo, promoviendo la unión de DNMT1 / ADN, y la unión a S-adenosil-L-metionina (Burgers et al., 2007). Una vez que el complejo E7 / DNMT1 / ADN se forma, E7 se disocia del complejo, y el DNMT1 se cierra en el ADN, manteniendo una interacción estable entre DNMT1 / ADN (Leonard et al., 2012; McCabe et al., 2005). El aumento en la actividad de DNMT1 causa una metilación aberrante del genoma celular, lo que resulta en el silenciamiento de los genes supresores de tumores y favorece la transformación celular (Burgers et al., 2007; McCabe et al., 2005).

Jin-Tao et al (J. T. Wang et al., 2014) informaron acerca el papel de la DNMT1 en la carcinogénesis cervical, utilizando métodos *in vitro* e *in vivo* y encontraron que los niveles bajos de folato sérico y la alta expresión de la proteína DNMT1 o el ARNm se asociaron significativamente con la carcinogénesis cervical ($p = 0,001$). Los cambios en la metilación del ADN viral están asociados con la capacidad oncogénica del HPV (Henken et al., 2007). Sin embargo, todavía hay resultados controvertidos con respecto a la participación del VPH en la metilación aberrante del ADN que se ha observado en el cáncer cervical (Jiménez-Wences et al., 2014)

Henken et al (Henken et al., 2007) utilizaron queratinocitos primarios del prepucio humano (PHFK) transfectados con VPH16 y VPH18 para descifrar los eventos más importantes en la

transformación mediada por los VPH-AR más frecuentemente relacionados con las lesiones NIC2+ y cáncer invasivo. Para ello utilizaron un sistema *in vitro* que consistió en pases en serie y encontraron que los queratinocitos transfectados desarrollaron gradualmente características displásicas que eran similares a las lesiones cervicales premalignas. Posterior a la inmortalización, solo los queratinocitos con ADN del VPH integrados en su genoma acumularon cambios en los patrones de metilación en las regiones promotoras de diferentes genes. Después de transfectar PHFKs con formas episómicas de VPH16 y VPH18, Leonard et al (Leonard et al., 2012) y Henken et al (Henken et al., 2007) observaron una sobreexpresión de las ADN metiltransferasas, específicamente de la DNMT1 y la DNMT3B (Figura 10).

Leonard y colaboradores (Leonard et al., 2012) también observaron diferencias en la expresión topográfica de las DNMT en relación con el genotipo viral. Después de la transfección con VPH16, la expresión nuclear de DNMT1 se restringió a las células en las capas de diferenciación basal y temprana y se redujo en las células más diferenciadas. Sin embargo, en las células transfectadas con VPH18, se observó la expresión nuclear de DNMT1 en las capas basal y suprabasal, así como en el estrato granuloso, y algunas células mostraron una tinción intensa con DNMT1.

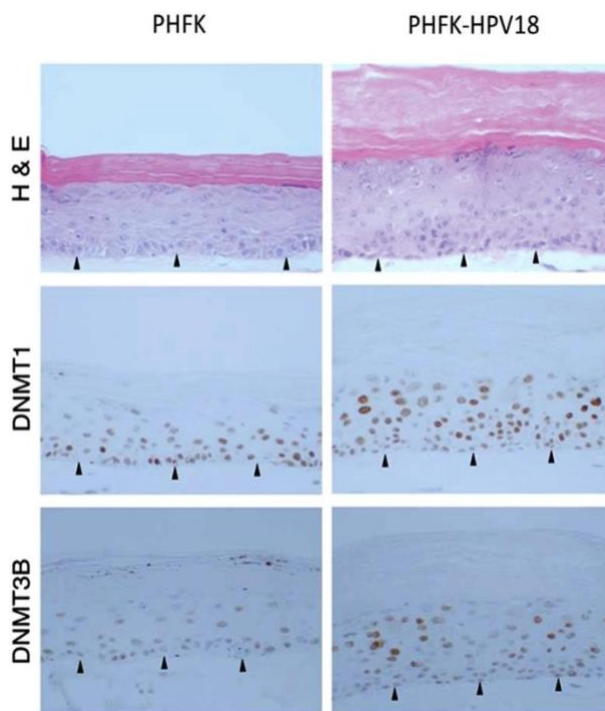


Figura 10. Cambios en la topografía e intensidad de la expresión de DNMT1 y DNMT3B antes y después de la transfección con HPV18.

Tomado de (Leonard et al., 2012). La capa basal se resalta con una flecha.

Resumen de la evidencia de la metilación viral

Uno de los primeros trabajos referentes en el tema de metilación del VPH fue llevado a cabo por Badal (Badal et al., 2003) en líneas celulares SiHa y CasKi que contienen una o múltiples copias del genoma viral respectivamente, utilizando la enzima de restricción dependiente de metilación McrBC. Encontró un perfil conservado de híper o hipometilación de sitios CpG; e hipermetilación en los segmentos genómicos que recubren los genes tardíos, mientras que el LCR y los oncogenes E6 y E7 no estaban metilados en las células SiHa. Sin embargo, al evaluarse muestras de exfoliados cervicales de mujeres sin lesiones, con lesiones precancerosas y lesiones invasivas en 81 pacientes (25 sin lesiones cervicales, 23 con algún grado de NIC y 33 con diagnóstico de cáncer invasivo), se encontró que a medida que aumenta la severidad de la lesión se presenta una disminución del estado de metilación esperado, que iba siendo más

evidente con la severidad de la lesión, por lo que la hipermetilación se encontró en 52% de las muestras de las mujeres sin lesiones, en el 21.7% de las mujeres con lesiones precancerosas y solo en el 6.1% de las muestras de mujeres con lesiones invasoras. Estos resultados llevan a los autores a postular que la transformación neoplásica puede ser suprimida por hipermetilación de genes, mientras que la hipometilación acompaña o causa la progresión del cáncer (Badal et al., 2003).

Otros estudios que coinciden con los hallazgos de Badal de que el aumento en la frecuencia de metilación en la región promotora de genes virales está relacionada con una menor progresión de la enfermedad, son los realizados por Hublarova en 2009 y Piyathilake en 2011 (Hublarova et al., 2009; Piyathilake et al., 2011); en ambos trabajos se determinó la metilación del promotor del gen E6 de VPH16 en 295 (103 correspondían a mujeres sin lesiones, 18 con NIC1, 143 NIC2/3 y 31 casos de cáncer) y 75 (30 mujeres diagnosticadas con NIC2+, incluyendo NIC2/3 o carcinoma *in situ* y 45 mujeres diagnosticadas con \leq NIC1) muestras cervicales respectivamente.

Estos resultados sin embargo, no coinciden con los reportados por Kalantari en 2004 en el que evaluaron en muestras de 115 pacientes (51 sin lesiones cervicales, 17 con algún grado de NIC y 47 con diagnóstico de cáncer escamoso) las modificaciones de los 19 dinucleótidos CpG dentro de del LCR y parte del gen L1 del VPH16, mediante la modificación con bisulfito, amplificación por PCR, clonación de ADN y secuenciación. En este estudio se observó una alta heterogeneidad del estado de metilación entre las pacientes e incluso entre diferentes muestras de la misma paciente. Sin embargo, la metilación en la mayoría de los genes evaluados fue consistentemente mayor en los cánceres en comparación con las lesiones preneoplásicas (Kalantari et al., 2004).

Los resultados hallados por Kalantri son congruentes con los encontrados por varios investigadores (Brandsma et al., 2009; Ding et al., 2009; Fernandez et al., 2009; Mirabello et al., 2012; C. Sun, Reimers, & Burk, 2011) en años posteriores, donde se soporta con una evidencia fuerte que un incremento en el estado de metilación de regiones específicas del virus como los genes L1 y L2 que codifican las proteínas de la cápside o sus genes oncogénicos especialmente E6, se correlacionan con estados avanzados de la enfermedad cervical.

La discrepancia observada puede ser el resultado de las diferencias en los tipos de técnicas utilizadas para el análisis de metilación, así como el estado del genoma del VPH en las muestras analizadas. Durante la infección productiva, el genoma del VPH existe en forma episomal. Pero en estadios neoplásicos muy avanzados, a menudo se encuentra que los genomas del VPH están integrados con el genoma del huésped (Durzynska et al., 2017).

Tabla 2. Resumen de la evidencia de la metilación en los genes de VPH

Estudio	Tipo de estudio	Tamaño de muestra	Técnica usada	Gen estudiado	Observaciones
Disminución de la metilación con la severidad de la lesión cervical					
Badal et al., 2003	Transveral	81 participantes (25 sin lesiones cervicales, 23 con algún grado de NIC y 33 con diagnóstico de cáncer invasivo)	Enzima de restricción dependiente de metilación McrBC	LCR y gen E6 del VPH16	Con el aumento de la severidad de la lesión se presenta una disminución en la metilación, se observó hipermetilación en el 52% de las muestras de las mujeres sin lesiones, en el 21.7% de las mujeres con lesiones precancerosas y solo en el 6.1% de las muestras de mujeres con lesiones invasoras.
Hublarova et al., 2009	Transveral	295 (103 correspondían a mujeres sin lesiones, 18 con NIC1, 143 NIC2/3 y 31 casos de cáncer)	Enzima de restricción dependiente de metilación McrBC	Promotor del gen E6 de VPH16	Se detectó metilación en el 81% (n = 21) de las mujeres sin lesiones VPH16 positivo en comparación con 62.5% en NIC1 (n = 8), 31.5% (n = 89) en NIC2/3 y 43.4% (n = 23) en cáncer invasivo (P <0.001).
Piyathilake et al., 2011	Transveral	75 (30 mujeres diagnosticadas con NIC2+, incluyendo NIC2/3 o carcinoma <i>in situ</i> y 45 mujeres diagnosticadas con ≤NIC1)	Pirosecuenciamiento	Promotor y potenciador del gen E6 de VPH16	La probabilidad de ser diagnosticado con NIC2+ fue 79% más bajas cuando el grado de metilación de los sitios potenciadores y promotores del VPH16 fue ≥9.5% (OR = 0.21; IC 95%, 0.06-0.79; P=0.02).
Piyathilake et al., 2014	Transveral	315 con NIC2+ o <CIN2	Pirosecuenciamiento	Promotor y potenciador del gen E6 de VPH16	las mujeres con folato plasmático y metilación más altos o aquellas con vitamina B12 y metilación más altas tenían 75% (P<0.01) y 60% (P= 0.02) menos de probabilidades de ser diagnosticadas con

					NIC2+ respectivamente.
Aumento de la metilación con la severidad de la lesión cervical					
Kalantari et al., 2004	Transveral	115 participantes (51 sin lesiones cervicales, 17 con algún grado de NIC y 47 con diagnóstico de cáncer escamoso)	Modificación con bisulfito	LCR y L1 de VPH16	La metilación fue consistentemente mayor en los casos de cáncer en comparación con las lesiones preneoplásicas.
Ding et al., 2009	Transveral	53 participantes (17 NIC1, 21 NIC2+ y 15 con cáncer escamoso)	Modificación con bisulfito	LCR, E6/E7 de VPH16	Se observó metilación progresiva de HPV16 LCR, con tasas de 5,9%, 33,3% y 53,3% en NIC1, NIC2/3 y cáncer, respectivamente (P<0,01). También se observó una tendencia hacia el aumento de la densidad de metilación de CpG. Topológicamente, se encontraron sitios más metilados en la región promotora E6 / E7 en cáncer, en comparación con NIC1 y NIC2/3.
Fernandez et al., 2009	Transveral	18 (mujeres sin lesiones, con lesiones preneoplásicas y cáncer escamoso)	Modificación con bisulfito	Todo el genoma de VPH16/18	La metilación aumenta progresivamente con el aumento de la severidad de la lesión, especialmente los genes L1, L2.
Mirabello et al., 2012	Casos y controles	108 (mujeres que aclararon infecciones por VPH, con infecciones persistentes y mujeres con NIC3)	Pirosecuenciamiento	Todo el genoma de VPH16	Aumento de la metilación en muestras de mujeres con lesiones comparadas con los controles en nueve sitios CpG de tres regiones genómicas: L1, L2 y E2 / E4. Se encontró una asociación con el riesgo de NIC3 (tercer tercil [alto] vs primer y segundo tercil).

					combinado [bajo], OR = 3.29 [IC 95% 1.16 a 9.34] y 11.12 [IC 95% = 2.29 a 76.80]) respectivamente.
Brentnall et al., 2014	Estudio de base poblacional	1493 participantes (556 tenían NIC2/3; 556 dieron positivo para HPV16 (323 NIC2/3), 201 para HPV18 (73 NIC2/3) y 202 para HPV31 (98 NIC2/3).	Pirosecuenciamiento	L1-L2 de VPH16, 18 y 31	La metilación ingremta con la severidad de las lesiones. Además es útil para hacer triaje de mujeres VPH positivas; se halló un área bajo la curva de 0.80 (IC 95% 0.78-0.82). Para una sensibilidad del 90%, la especificidad fue del 36% (33-40) y el valor predictivo positivo (VPP) fue del 46% (43-48).
Lorincz et al., 2016	Casos y controles	341 (38 con diagnóstico NIC2+)	Pirosecuenciamiento	L1-L2 del VPH16	La metilación ingremta con la severidad de las lesiones. La prueba de metilación de ADN para el triaje de mujeres positivas para VPH-AR en muestras de tamización podría ser un enfoque válido con un mejor rendimiento que la genotipificación.

Resumen de la evidencia de la metilación del huésped

Algunos genes en el hospedero han sido analizados y en varios de ellos se ha encontrado un patrón de metilación aberrante en sus regiones promotoras, que hace que éstos sean relevantes en lesiones preneoplásicas y cáncer cervical (Patel et al., 2012).

Hasta la fecha se han propuesto más de 100 genes humanos como posibles biomarcadores de metilación del cáncer cervical (Eijsink et al., 2012; Hansel et al., 2014; Hesselink et al., 2011; Hesselink et al., 2014; Kalantari et al., 2014; Lai et al., 2014; Lorincz, 2014; Lorincz et al., 2016; Vasiljević, Scibior-Bentkowska, Brentnall, Cuzick, & Lorincz, 2014; Verhoef et al., 2014; Wilhelm, 2014). Cada año se descubren nuevos genes usando enfoques cuasi-genómicos. Hasta ahora, no parece haber un solo gen que sea suficientemente sensible y específico para identificar NIC3, pero algunos paneles de genes parecen bastante prometedores (Lorincz, 2016). Los genes que se han observado en varios estudios consistentemente metilados en lesiones preneoplásicas son: DAPK1, CDH1, CDKN2A, JAM3, EPB41L3, TERT, GSTP1, CADM1 y TERT (Bierkens et al., 2013; Eijsink et al., 2012).

Con la evidencia más reciente y consistente, el Dr. Atila Lorincz propuso un clasificador llamado S5 el cual se basa en la metilación del ADN de las regiones tardías L1 y L2 de HPV16, HPV18, HPV31 y HPV33 combinadas con la región promotora del gen humano EPB41L3 para la detección de lesiones NIC2+ entre mujeres VPH positivo (Brentnall et al., 2014). En 2014 en población referida a colposcopia, reportaron una sensibilidad del 90%, una especificidad de 36% (IC 95%:33-40) y un valor predictivo positivo (VPP) de 46% (IC 95%: 43-48) para la detección de lesiones NIC2+ usando el clasificador. En 2016 el S5 fue validado en población de tamización (n=710). En este estudio se comparó el desempeño del S5 versus la genotipificación de HPV16/18. A un punto de corte predefinido, S5 mostró una mejor sensibilidad que la

genotipificación de HPV16/18 (74% vs. 54%, $p=0.04$) en la identificación de NIC2 entre mujeres VPH-AR positivas y una especificidad similar (65% vs. 71%, $p=0.07$). Sin embargo, cuando se modificó el valor de corte del S5 para permitir una sensibilidad igual a la de la genotipificación, se alcanzó una especificidad significativamente mayor del 91% ($P < 0,0001$) (Lorincz et al., 2016).

Recientemente el S5 también fue probado en un estudio de casos y controles anidado en el un ensayo clínico canadiense de base poblacional ($n=257$) que comparó la prueba de VPH versus la citología en base líquida para el tamizaje primario de cáncer cervical (Estudio FOCAL). Allí se encontró una sensibilidad y especificidad relativa para NIC3 del S5 del 93.2% (IC 95%: 81.4–98.0) y 41.8% (IC 95%: 35.2–48.8), en comparación con 86.4% (IC 95%: 75.0–95.7) y 49.8% (IC 95%: 43.1–56.6) para la combinación citología anormal/VPH16-18 positivo; aunque no se reportaron diferencias estadísticamente significativas, la alta sensibilidad y VPP para NIC3 del S5 lo hace compatible con los umbrales de EE. UU. y Europa para la derivación a colposcopia (Cook et al., 2019).

Planteamiento del problema

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares realizados en las últimas décadas han comprobado que la infección por genotipos oncogénicos de virus papiloma humano (VPH) es la causa necesaria para neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer de cérvix (Bosch & Muñoz, 2002; Walboomers et al., 1999). Si bien la infección por VPH tiene una alta prevalencia en la población, la gran mayoría de estas infecciones regresan espontáneamente (fenómeno de aclaramiento viral) y en la minoría en quienes se mantiene la infección (persistencia viral), existe un alto riesgo de desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC2) o más severo (NIC2+) que si no se tratan progresan a cáncer. Por lo tanto, hoy la infección por VPH es conocida como el factor etiológico necesario pero no suficiente para cáncer cervical. Hay evidencia de que ciertos cofactores del hospedero y del ambiente modifican el riesgo de que la infección viral persista o progrese a NIC2+ o cáncer (Kjellberg et al., 2000; Muñoz et al., 2006). Los cofactores hasta la fecha reconocidos que influyen el desarrollo del cáncer son el tabaquismo, el consumo prolongado de anticonceptivos hormonales, la multiparidad, la coinfección con otras infecciones de transmisión sexual, factores nutricionales (como los niveles de folatos y la vitamina B12) y factores como la carga viral, el genotipo de la infección y las variantes moleculares. Sin embargo, estos no explican todos los casos que ocurren a nivel mundial (Muñoz et al., 2006). Los bajos niveles de micronutrientes como el folato y la vitamina B12, han sido asociados con un mayor riesgo de varios cánceres debido a que son micronutrientes requeridos para la síntesis y reparación del ADN. Por un lado, los folatos son un cofactor esencial para la biosíntesis de *novó* de las purinas y el timidilato. El 5, 10-Metilen tetrahidrofolato, es una forma coenzimática intracelular del folato que es requerida para la conversión del desoxiuridilato en timidilato, el principal precursor de la timidina, una de las

bases nitrogenadas del ADN. De esta manera el folato es un factor importante en los procesos de síntesis, de estabilidad y reparación del ADN. Adicionalmente, el metabolismo de los folatos o metabolismo de un solo carbono como también se le conoce, es importante para la metilación del ADN. Este último es el proceso mediante el cual se agrega un grupo metilo (-CH₃) al ADN. La metilación del ADN es un evento molecular clave en la regulación de la expresión de genes, proceso en el cual juega un papel muy importante la vitamina B12 (Rampersaud et al., 2002; Selhub et al., 2009). Para la metilación del ADN, el 5-metil tetrahidrofolato, una forma celular de folato, es remetilado por la Sintetasa de Metionina, para producir metionina, la cual a su vez es el precursor del Sintetasa Adenosil Metionina, que es el donante primario de los grupos metilo que van a ser transferidos a la secuencia CpG del ADN, mediante la ADN metiltransferasa. El patrón de metilación en los residuos de citosina es heredable y es específico de especie y de tejido, y es un importante evento epigenético, en el cual se cambia o altera la expresión de genes sin necesidad del cambio de la secuencia de nucleótidos per se (Taby & Issa, 2010). Un consumo bajo de folatos podría resultar en la acumulación de altas concentraciones plasmáticas y celulares de homocisteína y acumulación de S-Adenosil Homocisteína, que en condiciones normales es un inhibidor potente de todas las enzimas metiltransferasas. En condiciones normales, el 70% de las islas CpG del ADN humano están metiladas. En deficiencia del folato e inhibición de las enzimas metiltransferasas se producen cambios en los patrones normales de la metilación del ADN y por lo tanto en la regulación de la expresión génica. Es por esto que la hipometilación del ADN inducida por la falta de folato puede predisponer a los defectos genéticos asociados con el desarrollo de neoplasias (Piyathilake et al., 2008). Por ejemplo, la hipometilación en sitios críticos de ADN se asocia con la activación de los oncogenes y puede inducir carcinogénesis; estudios han demostrado que la hipometilación del promotor del gen

ELMO3 induce la regulación positiva de su ARNm lo que resulta en la metástasis del cáncer de pulmón (Søes et al., 2014), la hipometilación de TKTL1 funciona como un oncogén que induce un fenotipo maligno de cáncer de cabeza y cuello (W. Sun et al., 2010) y la hipometilación de los genes STK31, COL17A1, Ribosomal DNA (Feng, Dong, Chang, Cui, & Xu, 2018) y WHSC1 (Yin, Sun, Ge, & Sun, 2017) se ha reportado en lesiones preneoplásicas y cáncer cervical. Por su parte, la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de genes supresores de tumores, los cuales normalmente no están metilados, evita la transcripción de los mismos y por tanto puede promover la carcinogénesis. Ha sido también observado que la hipermetilación de las islas CpG localizadas en la región larga de control (LCR) del genoma del VPH pueden regular la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Dueñas-González et al., 2005). Varios estudios hasta la fecha publicados sugieren que mujeres con bajos niveles circulantes de nutrientes como el folato y vitamina B12 tienen mayor probabilidad de presentar lesiones preneoplásicas del cérvix (Flatley et al., 2009; Gonzalez & Riboli, 2010; González et al., 2011; Piyathilake et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake et al., 2007); sin embargo, los hallazgos no son consistentes, en otros trabajos como los publicados por (Alberg et al., 2000; Herrero et al., 1991; Weinstein et al., 2001) se han observado resultados contradictorios. La mayoría de estos estudios han sido realizados principalmente en población de EE.UU., Europa y Asia y pocos han sido de carácter poblacional. Actualmente, no se han establecido asociaciones firmes entre los niveles de folato y el riesgo de la persistencia de la infección por VPH, las lesiones preneoplásicas o el cáncer cervical y los estudios previos se han visto severamente limitados por la falta de control de la infección por VPH (García-Closas et al., 2005; J. Yang et al., 2018). Hay un vacío en la evidencia sobre la influencia de estos micronutrientes y el riesgo de desarrollar lesiones de alto grado del cérvix; no se ha evaluado si los bajos niveles de micronutrientes se asocian con la

persistencia del VPH, si esto precede el desarrollo de lesiones preneoplásicas y su progresión a cáncer y esto ha sido reportado por García-Closas y col en una revisión de la literatura donde concluyó que de acuerdo a la evidencia, existe un probable efecto protector de los folatos y posiblemente de la vitamina B12 en la neoplasia cervical pero ella sugiere que son necesarios más estudios ya que hasta ahora no se han llegado a conclusiones definitivas. Es importante anotar que conocidos cofactores de riesgo para el cáncer de cuello uterino como el cigarrillo y el uso de anticonceptivos orales, pueden ocasionar una disminución de los niveles circulantes de carotenoides, vitamina C, folatos y vitamina B12 independientemente de la ingesta, pudiendo ser esta una razón para la asociación entre estos factores de riesgo y el cáncer. Dado que aún hay vacíos en el conocimiento sobre la relación de los micronutrientes tales como el folato y la vitamina B12 y el riesgo de cáncer cervical, las preguntas que nos planteamos en este proyecto son: ¿los niveles bajos de folatos y vitamina B12 se relacionan con el desarrollo de infecciones por VPH persistentes? La segunda pregunta que nos planteamos es: ¿los niveles bajos de estos micronutrientes se asocian con las lesiones de alto grado? Y la tercera pregunta: ¿Niveles bajos de folatos y vitamina B12 se relacionan con los niveles de la metilación del ADN del VPH (genes L1-L2) y el gen humano *EPB41L3*? Si existe una relación entre los niveles de los micronutrientes y la persistencia viral o las lesiones de alto grado, la suplementación con folato y B12 en las mujeres VPH positivo pudiera ser una estrategia que ayude a prevenir este cáncer.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivo general

Hipótesis: En mujeres VPH positivas los niveles bajos de folato y vitamina B12 se asocian con el riesgo de infecciones persistentes por el VPH, lesiones cervicales de alto grado y el estado de metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3*.

Objetivo: Estimar el riesgo de infecciones por HPV persistentes, lesiones cervicales de alto grado y los niveles de la metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3* asociados con bajos niveles de folato y vitamina B12 entre mujeres VPH positivas de una cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín, Colombia.

Hipótesis y objetivo específico 1

Hipótesis: Los bajos niveles de folato y vitamina B12 se asocian con el riesgo de infecciones persistentes y lesiones de alto grado del cérvix en mujeres VPH positivas.

Objetivo: Estimar el riesgo de infecciones por VPH persistentes y lesiones de alto grado del cérvix asociadas con bajos niveles de folato y vitamina B12 en mujeres VPH positivas de una cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín, Colombia.

Hipótesis objetivo específico 2

Hipótesis: Los bajos niveles de folato y vitamina B12 se asocian con altos niveles de la metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3*.

Objetivo: Estimar el riesgo de aumento de la metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3* asociados con bajos niveles de folato y vitamina B12 entre mujeres VPH positivas de una cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín, Colombia.

Bibliografía

- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, *71*(10), 1397-1421. doi:10.1016/j.bcp.2006.02.009
- Alberg, A. J., Selhub, J., Shah, K. V., Viscidi, R. P., Comstock, G. W., & Helzlsouer, K. J. (2000). The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *9*(7), 761-764.
- Allen, L. H. (2004). Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev*, *62*(6 Pt 2), S29-33; discussion S34. doi:10.1111/j.1753-4887.2004.tb00069.x
- Allen, L. H. (2008). Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull*, *29*(2 Suppl), S20-34; discussion S35-27. doi:10.1177/15648265080292S105
- Allen, L. H. (2009). How common is vitamin B-12 deficiency? *Am J Clin Nutr*, *89*(2), 693S-696S. doi:10.3945/ajcn.2008.26947A
- Andrès, E., Loukili, N. H., Noel, E., Kaltenbach, G., Abdelgheni, M. B., Perrin, A. E., . . . Blicklé, J. F. (2004). Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ*, *171*(3), 251-259. doi:10.1503/cmaj.1031155
- Au Yeung, C. L., Tsang, W. P., Tsang, T. Y., Co, N. N., Yau, P. L., & Kwok, T. T. (2010). HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep*, *24*(6), 1599-1604. doi:10.3892/or_00001023
- Badal, V., Chuang, L. S., Tan, E. H., Badal, S., Villa, L. L., Wheeler, C. M., . . . Bernard, H. U. (2003). CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol*, *77*(11), 6227-6234. doi:10.1128/jvi.77.11.6227-6234.2003
- Baena, A., Almonte, M., Valencia, M. L., Martínez, S., Quintero, K., & Sánchez, G. I. (2011). [Trends and social indicators of both mortality breast cancer and cervical cancer in Antioquia, Colombia, 2000-2007]. *Salud Publica Mex*, *53*(6), 486-492.
- Baena Ruiz, R., & Salinas Hernández, P. (2014). Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas*, *77*(3), 202-208. doi:10.1016/j.maturitas.2013.11.010
- Barchitta, M., Quattrocchi, A., Maugeri, A., Canto, C., La Rosa, N., Cantarella, M. A., . . . Agodi, A. (2017). LINE-1 hypermethylation in white blood cell DNA is associated with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *BMC Cancer*, *17*(1), 601. doi:10.1186/s12885-017-3582-0
- Bassett, J. K., Severi, G., Baglietto, L., MacInnis, R. J., Hoang, H. N., Hopper, J. L., . . . Giles, G. G. (2012). Weight change and prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*, *131*(7), 1711-1719. doi:10.1002/ijc.27414
- Beglin, M., Melar-New, M., & Laimins, L. (2009). Human papillomaviruses and the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*, *29*(9), 629-635. doi:10.1089/jir.2009.0075
- Bernard, H. U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*, *32* Suppl 1, S1-6. doi:10.1016/j.jcv.2004.10.021
- Bernard, H. U., Calleja-Macias, I. E., & Dunn, S. T. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, *118*(5), 1071-1076. doi:10.1002/ijc.21655
- Berumen, J., Ordoñez, R. M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S. C., Estrada, R. A., . . . Madrigal-de la Campa, A. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16

- and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 93(17), 1325-1330. doi:10.1093/jnci/93.17.1325
- Bhattacharjee, B., & Sengupta, S. (2006). CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*, 354(2), 280-285. doi:10.1016/j.virol.2006.06.018
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., . . . Shen, R. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288-295. doi:10.1016/j.ygeno.2011.07.007
- Bienkowska-Haba, M., Patel, H. D., & Sapp, M. (2009). Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS Pathog*, 5(7), e1000524. doi:10.1371/journal.ppat.1000524
- Bierkens, M., Hesselink, A. T., Meijer, C. J., Heideman, D. A., Wisman, G. B., van der Zee, A. G., . . . Steenbergen, R. D. (2013). CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int J Cancer*, 133(6), 1293-1299. doi:10.1002/ijc.28138
- Boccardo, E., Lepique, A. P., & Villa, L. L. (2010). The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 31(11), 1905-1912. doi:10.1093/carcin/bgq176
- Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., . . . Muñoz, N. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 26 Suppl 10, K1-16. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.064
- Bosch, F. X., & Muñoz, N. (2002). The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*, 89(2), 183-190. doi:10.1016/s0168-1702(02)00187-9
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., . . . Group, W. I. A. f. R. o. C. M. W. (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, 10(4), 321-322. doi:10.1016/s1470-2045(09)70096-8
- Brandsma, J. L., Sun, Y., Lizardi, P. M., Tuck, D. P., Zelterman, D., Haines, G. K., . . . Neapolitano, M. (2009). Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology*, 389(1-2), 100-107. doi:10.1016/j.virol.2009.03.029
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brentnall, A. R., Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Cadman, L., Austin, J., Szarewski, A., . . . Lorincz, A. T. (2014). A DNA methylation classifier of cervical precancer based on human papillomavirus and human genes. *Int J Cancer*, 135(6), 1425-1432. doi:10.1002/ijc.28790
- Brito, A., Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo. (2012). Folatos y vitamina B12 en la salud humana. In (Vol. 140 (11), pp. 1464-1475): Revista médica de Chile.
- Brito, A., Mujica-Coopman, M. F., López de Romaña, D., Cori, H., & Allen, L. H. (2015). Folate and Vitamin B12 Status in Latin America and the Caribbean: An Update. *Food Nutr Bull*, 36(2 Suppl), S109-118. doi:10.1177/0379572115585772
- Burchell, A. N., Winer, R. L., de Sanjosé, S., & Franco, E. L. (2006). Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/52-61. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.031

- Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., & Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*, *26*(11), 1650-1655. doi:10.1038/sj.onc.1209950
- Burk, R. D., Terai, M., Gravitt, P. E., Brinton, L. A., Kurman, R. J., Barnes, W. A., . . . Hildesheim, A. (2003). Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*, *63*(21), 7215-7220.
- Cao, D., Shen, K., Li, Z., Xu, Y., & Wu, D. (2016). Association between vitamin C Intake and the risk of cervical neoplasia: A meta-analysis. *Nutr Cancer*, *68*(1), 48-57. doi:10.1080/01635581.2016.1115101
- Carmel, R., Green, R., Rosenblatt, D. S., & Watkins, D. (2003). Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 62-81. doi:10.1182/asheducation-2003.1.62
- Casini, G. L., Graham, D., Heine, D., Garcea, R. L., & Wu, D. T. (2004). In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology*, *325*(2), 320-327. doi:10.1016/j.virol.2004.04.034
- Castellsagué, X., & Muñoz, N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 20-28.
- Castle, P. E., Rodríguez, A. C., Burk, R. D., Herrero, R., Wacholder, S., Alfaro, M., . . . Group, P. E. G. P. (2009). Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ*, *339*, b2569. doi:10.1136/bmj.b2569
- Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., & Harrison, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*, *5*(3), 557-567. doi:10.1016/s1097-2765(00)80449-9
- Chuang, S. C., Jenab, M., Heck, J. E., Bosetti, C., Talamini, R., Matsuo, K., . . . Hashibe, M. (2012). Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control*, *23*(1), 69-88. doi:10.1007/s10552-011-9857-x
- Clarke, M. A., Wentzensen, N., Mirabello, L., Ghosh, A., Wacholder, S., Harari, A., . . . Burk, R. D. (2012). Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *21*(12), 2125-2137. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0905
- Clifford, G. M., Gallus, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P. J., Vaccarella, S., . . . Group, I. H. P. S. S. (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, *366*(9490), 991-998. doi:10.1016/S0140-6736(05)67069-9
- Combata, A. L., Touzé, A., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y., Muñoz, N., & Coursaget, P. (2001). Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett*, *204*(1), 183-188. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10883.x
- Cook, D. A., Krajden, M., Brentnall, A. R., Gondara, L., Chan, T., Law, J. H., . . . Lorincz, A. T. (2019). Evaluation of a validated methylation triage signature for human papillomavirus positive women in the HPV FOCAL cervical cancer screening trial. *Int J Cancer*, *144*(10), 2587-2595. doi:10.1002/ijc.31976

- Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G., & Christensen, N. D. (2006). Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol*, *80*(18), 8940-8950. doi:10.1128/JVI.00724-06
- Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol*, *72*(1), 142-150.
- de Benoist, B. (2008). Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull*, *29*(2 Suppl), S238-244. doi:10.1177/15648265080292S129
- de Boer, M. A., Peters, L. A., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., . . . Fleuren, G. J. (2004). Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*, *94*(2), 488-494. doi:10.1016/j.ygyno.2004.05.037
- de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*, *141*(4), 664-670. doi:10.1002/ijc.30716
- de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., . . . Group, R. I. S. a. H. T. T. S. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, *11*(11), 1048-1056. doi:10.1016/S1470-2045(10)70230-8
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*(1), 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- De-Castro Arce, J., Göckel-Krzikalla, E., & Rösl, F. (2012). Silencing of multi-copy HPV16 by viral self-methylation and chromatin occlusion: a model for epigenetic virus-host interaction. *Hum Mol Genet*, *21*(8), 1693-1705. doi:10.1093/hmg/ddr604
- Ding, D. C., Chiang, M. H., Lai, H. C., Hsiung, C. A., Hsieh, C. Y., & Chu, T. Y. (2009). Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *147*(2), 215-220. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.08.023
- Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, *66*(6), 1191-1308.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, *25* Suppl 1, 2-23. doi:10.1002/rmv.1822
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30* Suppl 5, F55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Dueñas-González, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., & Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer*, *4*, 38. doi:10.1186/1476-4598-4-38
- Durzynska, J., Lesniewicz, K., & Poreba, E. (2017). Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat Res Rev Mutat Res*, *772*, 36-50. doi:10.1016/j.mrrev.2016.09.006
- Eijsink, J. J., Lendvai, Á., Deregowski, V., Klip, H. G., Verpooten, G., Dehaspe, L., . . . Wisman, G. B. (2012). A four-gene methylation marker panel as triage test in high-risk human papillomavirus positive patients. *Int J Cancer*, *130*(8), 1861-1869. doi:10.1002/ijc.26326

- Fang, J., Zhang, H., & Jin, S. (2014). Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol*, 35(6), 5083-5093. doi:10.1007/s13277-014-1737-z
- Feng, C., Dong, J., Chang, W., Cui, M., & Xu, T. (2018). The Progress of Methylation Regulation in Gene Expression of Cervical Cancer. *Int J Genomics*, 2018, 8260652. doi:10.1155/2018/8260652
- Fernandez, A. F., Rosales, C., Lopez-Nieva, P., Graña, O., Ballestar, E., Ropero, S., . . . Esteller, M. (2009). The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res*, 19(3), 438-451. doi:10.1101/gr.083550.108
- Field, C. J., Johnson, I. R., & Schley, P. D. (2002). Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol*, 71(1), 16-32.
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., & Garcea, R. L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 77(8), 4818-4826. doi:10.1128/jvi.77.8.4818-4826.2003
- Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A., & Powers, H. J. (2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(10), 2782-2789. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0493
- Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2002). Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*, 76(19), 10009-10014. doi:10.1128/jvi.76.19.10009-10014.2002
- Franco, E. L., Villa, L. L., Sobrinho, J. P., Prado, J. M., Rousseau, M. C., Désy, M., & Rohan, T. E. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*, 180(5), 1415-1423. doi:10.1086/315086
- Galván, S. C., Martínez-Salazar, M., Galván, V. M., Méndez, R., Díaz-Contreras, G. T., Alvarado-Hermida, M., . . . García-Carrancá, A. (2011). Analysis of CpG methylation sites and CGI among human papillomavirus DNA genomes. *BMC Genomics*, 12, 580. doi:10.1186/1471-2164-12-580
- García-Closas, R., Castellsagué, X., Bosch, X., & González, C. A. (2005). The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*, 117(4), 629-637. doi:10.1002/ijc.21193
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 75(3), 1565-1570. doi:10.1128/JVI.75.3.1565-1570.2001
- Glauert, H. P., Calfee-Mason, K., Stemm, D. N., Tharappel, J. C., & Spear, B. T. (2010). Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: a review. *Mol Nutr Food Res*, 54(7), 875-896. doi:10.1002/mnfr.200900482
- Gonzalez, C. A., & Riboli, E. (2010). Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer*, 46(14), 2555-2562. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.025
- González, C. A., Travier, N., Luján-Barroso, L., Castellsagué, X., Bosch, F. X., Roura, E., . . . Riboli, E. (2011). Dietary factors and in situ and invasive cervical cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer*, 129(2), 449-459. doi:10.1002/ijc.25679
- Green, R. (2009). Is it time for vitamin B-12 fortification? What are the questions? *Am J Clin Nutr*, 89(2), 712S-716S. doi:10.3945/ajcn.2008.26947E

- Guo, L., Zhu, H., Lin, C., Che, J., Tian, X., Han, S., . . . Mao, D. (2015). Associations between antioxidant vitamins and the risk of invasive cervical cancer in Chinese women: A case-control study. *Sci Rep*, 5, 13607. doi:10.1038/srep13607
- Hambidge, K. M. (2010). Micronutrient bioavailability: Dietary Reference Intakes and a future perspective. *Am J Clin Nutr*, 91(5), 1430S-1432S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674B
- Hamid, N. A., Brown, C., & Gaston, K. (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*, 66(10), 1700-1717. doi:10.1007/s00018-009-8631-7
- Hansel, A., Steinbach, D., Greinke, C., Schmitz, M., Eiselt, J., Scheungraber, C., . . . Dürst, M. (2014). A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PLoS One*, 9(3), e91905. doi:10.1371/journal.pone.0091905
- Henken, F. E., Wilting, S. M., Overmeer, R. M., van Rietschoten, J. G., Nygren, A. O., Errami, A., . . . Steenbergen, R. D. (2007). Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer*, 97(10), 1457-1464. doi:10.1038/sj.bjc.6604055
- Herrera M, J. (2016). Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). In A. M. Muñoz (Ed.), (Vol. 43 (4), pp. 336-345): *Revista chilena de nutrición*.
- Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Hutchinson, M., Morales, J., . . . Schiffman, M. (2000). Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*, 92(6), 464-474. doi:10.1093/jnci/92.6.464
- Herrero, R., Potischman, N., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Tenorio, F., . . . Gaitan, E. (1991). A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer. I. Dietary indicators. *Am J Epidemiol*, 134(11), 1335-1346. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116036
- Hertrampf, E., Cortés, F., Erickson, J. D., Cayazzo, M., Freire, W., Bailey, L. B., . . . Pfeiffer, C. (2003). Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr*, 133(10), 3166-3169. doi:10.1093/jn/133.10.3166
- Hesselink, A. T., Heideman, D. A., Steenbergen, R. D., Coupé, V. M., Overmeer, R. M., Rijkaart, D., . . . Snijders, P. J. (2011). Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: an objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *Clin Cancer Res*, 17(8), 2459-2465. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2548
- Hesselink, A. T., Heideman, D. A., Steenbergen, R. D., Gök, M., van Kemenade, F. J., Wilting, S. M., . . . Snijders, P. J. (2014). Methylation marker analysis of self-sampled cervico-vaginal lavage specimens to triage high-risk HPV-positive women for colposcopy. *Int J Cancer*, 135(4), 880-886. doi:10.1002/ijc.28723
- Heyn, H., Carmona, F. J., Gomez, A., Ferreira, H. J., Bell, J. T., Sayols, S., . . . Esteller, M. (2013). DNA methylation profiling in breast cancer discordant identical twins identifies DOK7 as novel epigenetic biomarker. *Carcinogenesis*, 34(1), 102-108. doi:10.1093/carcin/bgs321
- Ho, G. Y., Burk, R. D., Klein, S., Kadish, A. S., Chang, C. J., Palan, P., . . . Romney, S. (1995). Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 87(18), 1365-1371. doi:10.1093/jnci/87.18.1365

- Horvath, C. A., Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O., & Bogers, J. P. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology*, *7*, 11. doi:10.1186/1743-422X-7-11
- Howley PM, L. D. (2007). *Fields Virology. Papillomavirus* (P. M. H. David M. Knipe & D. E. G. associate editors Eds. 5th ed. Vol. One). Philadelphia, USA: Lippincot Williams & Wilkins
- Hublarova, P., Hrstka, R., Rotterova, P., Rotter, L., Coupkova, M., Badal, V., . . . Vojtesek, B. (2009). Prediction of human papillomavirus 16 e6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status. *Int J Gynecol Cancer*, *19*(3), 321-325. doi:10.1111/IGC.0b013e31819d8a5c
- Huertas-Salgado, A., Martín-Gámez, D. C., Moreno, P., Murillo, R., Bravo, M. M., Villa, L., & Molano, M. (2011). E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: an updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology*, *410*(1), 201-215. doi:10.1016/j.virol.2010.10.039
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. (2007). Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, *90*, 1-636.
- Hwang, J. H., Lee, J. K., Kim, T. J., & Kim, M. K. (2010). The association between fruit and vegetable consumption and HPV viral load in high-risk HPV-positive women with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Causes Control*, *21*(1), 51-59. doi:10.1007/s10552-009-9433-9
- Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, P., Instituto Nacional de Salud, Universidad de Antioquia, OPS. (2005). Encuesta Nacional de la Situación Nutricional de Colombia-ENSIN-. In (1st ed., pp. 229-261): Panamericana Firmas e Impresos.
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Carvalho, B., Wu, H., Brandenburg, S. A., Jeddeloh, J. A., . . . Feinberg, A. P. (2008). Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). *Genome Res*, *18*(5), 780-790. doi:10.1101/gr.7301508
- Jelinek, J., Liang, S., Lu, Y., He, R., Ramagli, L. S., Shpall, E. J., . . . Issa, J. P. (2012). Conserved DNA methylation patterns in healthy blood cells and extensive changes in leukemia measured by a new quantitative technique. *Epigenetics*, *7*(12), 1368-1378. doi:10.4161/epi.22552
- Jeon, S., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(5), 1654-1658. doi:10.1073/pnas.92.5.1654
- Jiménez-Wences, H., Peralta-Zaragoza, O., & Fernández-Tilapa, G. (2014). Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep*, *31*(6), 2467-2476. doi:10.3892/or.2014.3142
- Johnson, J., & de Mejia, E. G. (2011). Dietary factors and pancreatic cancer: the role of food bioactive compounds. *Mol Nutr Food Res*, *55*(1), 58-73. doi:10.1002/mnfr.201000420
- Johnson, K. M., Kines, R. C., Roberts, J. N., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*, *83*(5), 2067-2074. doi:10.1128/JVI.02190-08
- Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., . . . Keller, P. M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*, *274*(9), 5810-5822. doi:10.1074/jbc.274.9.5810

- Kaferle, J., & Strzoda, C. E. (2009). Evaluation of macrocytosis. *Am Fam Physician*, 79(3), 203-208.
- Kalantari, M., Calleja-Macias, I. E., Tewari, D., Hagmar, B., Lie, K., Barrera-Saldana, H. A., . . . Bernard, H. U. (2004). Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol*, 78(23), 12762-12772. doi:10.1128/JVI.78.23.12762-12772.2004
- Kalantari, M., Osann, K., Calleja-Macias, I. E., Kim, S., Yan, B., Jordan, S., . . . Bernard, H. U. (2014). Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: Considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia. *Virology*, 448, 314-321. doi:10.1016/j.virol.2013.10.032
- Kim, J., Kim, M. K., Lee, J. K., Kim, J. H., Son, S. K., Song, E. S., . . . Yun, Y. M. (2010). Intakes of vitamin A, C, and E, and beta-carotene are associated with risk of cervical cancer: a case-control study in Korea. *Nutr Cancer*, 62(2), 181-189. doi:10.1080/01635580903305326
- Kim, K., Garner-Hamrick, P. A., Fisher, C., Lee, D., & Lambert, P. F. (2003). Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol*, 77(23), 12450-12459. doi:10.1128/jvi.77.23.12450-12459.2003
- Kim, Y. I. (1999). Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem*, 10(2), 66-88. doi:10.1016/s0955-2863(98)00074-6
- Kines, R. C., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2009). The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(48), 20458-20463. doi:10.1073/pnas.0908502106
- Kjellberg, L., Hallmans, G., Ahren, A. M., Johansson, R., Bergman, F., Wadell, G., . . . Dillner, J. (2000). Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*, 82(7), 1332-1338. doi:10.1054/bjoc.1999.1100
- Lai, H. C., Ou, Y. C., Chen, T. C., Huang, H. J., Cheng, Y. M., Chen, C. H., . . . Wang, K. L. (2014). PAX1/SOX1 DNA methylation and cervical neoplasia detection: a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Cancer Med*, 3(4), 1062-1074. doi:10.1002/cam4.253
- Lazcano-Ponce, E., Herrero, R., Muñoz, N., Cruz, A., Shah, K. V., Alonso, P., . . . Hernández, M. (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*, 91(3), 412-420. doi:10.1002/1097-0215(20010201)91:3<412::aid-ijc1071>3.0.co;2-m
- Leonard, S. M., Wei, W., Collins, S. I., Pereira, M., Diyaf, A., Constandinou-Williams, C., . . . Woodman, C. B. (2012). Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, 33(7), 1286-1293. doi:10.1093/carcin/bgs157
- Lin, R. K., Wu, C. Y., Chang, J. W., Juan, L. J., Hsu, H. S., Chen, C. Y., . . . Wang, Y. C. (2010). Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res*, 70(14), 5807-5817. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4161
- Lindsay, A. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. In d. B. Bruno (Ed.): World Health Organization.
- Lohse, T., Faeh, D., Bopp, M., Rohrmann, S., & Group, S. N. C. S. (2016). Adherence to the cancer prevention recommendations of the World Cancer Research Fund/American

- Institute for Cancer Research and mortality: a census-linked cohort. *Am J Clin Nutr*, 104(3), 678-685. doi:10.3945/ajcn.116.135020
- Lopera, E. A., Baena, A., Florez, V., Montiel, J., Duque, C., Ramirez, T., . . . Sanchez, G. I. (2014). Unexpected inverse correlation between Native American ancestry and Asian American variants of HPV16 in admixed Colombian cervical cancer cases. *Infect Genet Evol*, 28, 339-348. doi:10.1016/j.meegid.2014.10.014
- Lorincz, A. T. (2014). Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. *Expert Rev Mol Diagn*, 14(3), 293-305. doi:10.1586/14737159.2014.897610
- Lorincz, A. T. (2016). Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. *Acta Cytol*, 60(6), 501-512. doi:10.1159/000450595
- Lorincz, A. T., Brentnall, A. R., Scibior-Bentkowska, D., Reuter, C., Banwait, R., Cadman, L., . . . Vasiljević, N. (2016). Validation of a DNA methylation HPV triage classifier in a screening sample. *Int J Cancer*, 138(11), 2745-2751. doi:10.1002/ijc.30008
- Lorincz, A. T., Brentnall, A. R., Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Castanon, A., Fiander, A., . . . Sasieni, P. (2013). HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. *Int J Cancer*, 133(3), 637-644. doi:10.1002/ijc.28050
- Louvanto, K., Franco, E. L., Ramanakumar, A. V., Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Koushik, A., . . . Team, B. o. C. C. R. S. (2015). Methylation of viral and host genes and severity of cervical lesions associated with human papillomavirus type 16. *Int J Cancer*, 136(6), E638-645. doi:10.1002/ijc.29196
- Mayne, S. T., Playdon, M. C., & Rock, C. L. (2016). Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(8), 504-515. doi:10.1038/nrclinonc.2016.24
- McCabe, M. T., Davis, J. N., & Day, M. L. (2005). Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res*, 65(9), 3624-3632. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2158
- McCredie, M. R., Sharples, K. J., Paul, C., Baranyai, J., Medley, G., Jones, R. W., & Skegg, D. C. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*, 9(5), 425-434. doi:10.1016/S1470-2045(08)70103-7
- McKay, J. A., & Mathers, J. C. (2011). Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol (Oxf)*, 202(2), 103-118. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02278.x
- McLean, E., de Benoist, B., & Allen, L. H. (2008). Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr Bull*, 29(2 Suppl), S38-51. doi:10.1177/15648265080292S107
- McNulty, H., Pentieva, K., Hoey, L., Strain, J., & Ward, M. (2012). Nutrition throughout life: folate. *Int J Vitam Nutr Res*, 82(5), 348-354. doi:10.1024/0300-9831/a000130
- Medellín, A. d. (2015). Perfil de seguridad alimentaria y nutricional de Medellín y sus corregimientos 2015. In U. d. Antioquia (Ed.).
- Meshkin, B., & Blum, K. (2007). Folate nutrigenetics: a convergence of dietary folate metabolism, folic acid supplementation, and folate antagonist pharmacogenetics. *Drug Metab Lett*, 1(1), 55-60. doi:10.2174/187231207779814319
- Ministerio de la Protección Social, P., Instituto Nacional de Salud, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. (2010). Encuesta de la situación Nutricional en Colombia. In (2nd ed. ed., pp. 268-337.). Bogotá: Da Vinci Editor & CÍA.

- Mirabello, L., Schiffman, M., Ghosh, A., Rodriguez, A. C., Vasiljevic, N., Wentzensen, N., . . . Lorincz, A. T. (2013). Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, *132*(6), 1412-1422. doi:10.1002/ijc.27750
- Mirabello, L., Sun, C., Ghosh, A., Rodriguez, A. C., Schiffman, M., Wentzensen, N., . . . Burk, R. D. (2012). Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J Natl Cancer Inst*, *104*(7), 556-565. doi:10.1093/jnci/djs135
- Modis, Y., Trus, B. L., & Harrison, S. C. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*, *21*(18), 4754-4762. doi:10.1093/emboj/cdf494
- Molano, M., Posso, H., Weiderpass, E., van den Brule, A. J., Ronderos, M., Franceschi, S., . . . Study, H. S. G. H. (2002). Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*, *87*(3), 324-333. doi:10.1038/sj.bjc.6600442
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, *10*(8), 550-560. doi:10.1038/nrc2886
- Moscicki, A. B., Schiffman, M., Kjaer, S., & Villa, L. L. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, *24 Suppl 3*, S3/42-51. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.018
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., . . . Group, I. A. f. R. o. C. M. C. C. S. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, *348*(6), 518-527. doi:10.1056/NEJMoa021641
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, *24 Suppl 3*, S3/1-10. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Muñoz, N., Hernandez-Suarez, G., Méndez, F., Molano, M., Posso, H., Moreno, V., . . . Group, I. N. d. C. H. S. (2009). Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*, *100*(7), 1184-1190. doi:10.1038/sj.bjc.6604972
- Nielsen, M. J., Rasmussen, M. R., Andersen, C. B., Nexø, E., & Moestrup, S. K. (2012). Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *9*(6), 345-354. doi:10.1038/nrgastro.2012.76
- Pardo C, d. V. E., Buitrago L, Gamboa O. (2017). *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia*. Bogotá D.C
- Parkin, D. M., Almonte, M., Bruni, L., Clifford, G., Curado, M. P., & Piñeros, M. (2008). Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine*, *26 Suppl 11*, L1-15. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.043
- Patel, D. A., Rozek, L. S., Colacino, J. A., Van Zomeren-Dohm, A., Ruffin, M. T., Unger, E. R., . . . Paskett, E. D. (2012). Patterns of cellular and HPV 16 methylation as biomarkers for cervical neoplasia. *J Virol Methods*, *184*(1-2), 84-92. doi:10.1016/j.jviromet.2012.05.022
- Pieroth, R., Paver, S., Day, S., & Lammersfeld, C. (2018). Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep*, *7*(3), 70-84. doi:10.1007/s13668-018-0237-y

- Pim, D., & Banks, L. (2010). Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*, *118*(6-7), 471-493. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02618.x
- Piyathilake, C. J., Badiga, S., Paul, P., Vijayaraghavan, K., Vedantham, H., Sudula, M., . . . Gravitt, P. E. (2010). Indian women with higher serum concentrations of folate and vitamin B12 are significantly less likely to be infected with carcinogenic or high-risk (HR) types of human papillomaviruses (HPVs). *Int J Womens Health*, *2*, 7-12. doi:10.2147/ijwh.s6522
- Piyathilake, C. J., Celedonio, J. E., Macaluso, M., Bell, W. C., Azrad, M., & Grizzle, W. E. (2008). Mandatory fortification with folic acid in the United States is associated with increased expression of DNA methyltransferase-1 in the cervix. *Nutrition*, *24*(1), 94-99. doi:10.1016/j.nut.2007.10.007
- Piyathilake, C. J., Henao, O. L., Macaluso, M., Cornwell, P. E., Meleth, S., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2004). Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res*, *64*(23), 8788-8793. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2402
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Alvarez, R. D., Bell, W. C., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2009). Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prev Res (Phila)*, *2*(7), 658-664. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0175
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Alvarez, R. D., Chen, M., Badiga, S., Edberg, J. C., . . . Johannig, G. L. (2011). A higher degree of methylation of the HPV 16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, *117*(5), 957-963. doi:10.1002/cncr.25511
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Brill, I., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2007). Lower red blood cell folate enhances the HPV-16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*, *23*(3), 203-210. doi:10.1016/j.nut.2006.12.002
- Quentin, J. (2004). FORTIFICATION HANDBOOK VITAMIN AND MINERAL FORTIFICATION OF WHEAT FLOUR AND MAIZE MEAL In M. Venkatesh (Ed.).
- Ragasudha, P. N., Thulaseedharan, J. V., Wesley, R., Jayaprakash, P. G., Lalitha, P., & Pillai, M. R. (2012). A case-control nutrigenomic study on the synergistic activity of folate and vitamin B12 in cervical cancer progression. *Nutr Cancer*, *64*(4), 550-558. doi:10.1080/01635581.2012.675618
- Rampersaud, G. C., Bailey, L. B., & Kauwell, G. P. (2002). Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: review and recommendations for practitioners. *J Am Diet Assoc*, *102*(9), 1273-1282. doi:10.1016/s0002-8223(02)90281-6
- Reddy, L., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther*, *99*(1), 1-13. doi:10.1016/s0163-7258(03)00042-1
- Richards, K. L., Zhang, B., Baggerly, K. A., Colella, S., Lang, J. C., Schuller, D. E., & Krahe, R. (2009). Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One*, *4*(3), e4941. doi:10.1371/journal.pone.0004941
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(5), 1522-1527. doi:10.1073/pnas.0508815103
- Rodríguez, A. C., Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., . . . Burk, R. D. (2010). Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical

- intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst*, 102(5), 315-324. doi:10.1093/jnci/djq001
- Rodríguez, A. C., Schiffman, M., Herrero, R., Wacholder, S., Hildesheim, A., Castle, P. E., . . . Group, P. E. G. (2008). Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*, 100(7), 513-517. doi:10.1093/jnci/djn044
- Saavedra, K. P., Brebi, P. M., & Roa, J. C. (2012). Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clin Epigenetics*, 4(1), 13. doi:10.1186/1868-7083-4-13
- Salamanca, L., Ordóñez, A., Cardozo, C., & Suárez-Obando, F. (2017). Valores séricos de ácido fólico en un grupo de pacientes mayores de 18 años de edad en un hospital de alta complejidad. In (Vol. 58). Bogotá: Universitas Médica.Pontificia Universidad Javeriana.
- Sandoval, J., & Esteller, M. (2012). Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev*, 22(1), 50-55. doi:10.1016/j.gde.2012.02.008
- Sapienza, C., & Issa, J. P. (2016). Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu Rev Nutr*, 36, 665-681. doi:10.1146/annurev-nutr-121415-112634
- Schiffman, M., Clifford, G., & Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*, 4, 8. doi:10.1186/1750-9378-4-8
- Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C., & Castle, P. E. (2011). Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 103(5), 368-383. doi:10.1093/jnci/djq562
- Schiller, J. T., Day, P. M., & Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*, 118(1 Suppl), S12-17. doi:10.1016/j.ygyno.2010.04.004
- Screen G, S. J., Groff J. (2010). *Advanced nutrition and human metabolism* (Fifth ed.). Canadá.
- Selhub, J., Morris, M. S., Jacques, P. F., & Rosenberg, I. H. (2009). Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*, 89(2), 702S-706S. doi:10.3945/ajcn.2008.26947C
- Shane, B. (2008). Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull*, 29(2 Suppl), S5-16; discussion S17-19. doi:10.1177/15648265080292S103
- Siegel, E. M., Salemi, J. L., Villa, L. L., Ferenczy, A., Franco, E. L., & Giuliano, A. R. (2010). Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 118(3), 289-294. doi:10.1016/j.ygyno.2010.05.022
- Social, M. d. S. y. P. n. (2015). Estrategia nacional para la prevención y control de las deficiencias de micronutrientes en Colombia 2014-2021. In. Bogotá D.C, Colombia.
- Sun, C., Reimers, L. L., & Burk, R. D. (2011). Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol*, 121(1), 59-63. doi:10.1016/j.ygyno.2011.01.013
- Sun, W., Liu, Y., Glazer, C. A., Shao, C., Bhan, S., Demokan, S., . . . Califano, J. A. (2010). TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization. *Clin Cancer Res*, 16(3), 857-866. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2604
- Søes, S., Daugaard, I. L., Sørensen, B. S., Carus, A., Mattheisen, M., Alsner, J., . . . Kristensen, L. S. (2014). Hypomethylation and increased expression of the putative oncogene

- ELMO3 are associated with lung cancer development and metastases formation. *Oncoscience*, 1(5), 367-374. doi:10.18632/oncoscience.42
- Taby, R., & Issa, J. P. (2010). Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*, 60(6), 376-392. doi:10.3322/caac.20085
- Teresa Shamah Levy, M. A. A., & Cuevas, C. y. L. (2015). Desnutrición y obesidad: doble carga en México. In (Vol. 16): Revista digital universitaria UNAM.
- Tomita, L. Y., D'Almeida, V., Villa, L. L., Franco, E. L., Cardoso, M. A., & Group, B. S. (2013). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism modify the association of dietary and circulating folate and vitamin B-6 with cervical neoplasia. *J Nutr*, 143(12), 2007-2014. doi:10.3945/jn.113.182212
- Tomita, L. Y., Longatto Filho, A., Costa, M. C., Andreoli, M. A., Villa, L. L., Franco, E. L., . . . Team, B. I. i. N. a. C. C. P. B. S. (2010). Diet and serum micronutrients in relation to cervical neoplasia and cancer among low-income Brazilian women. *Int J Cancer*, 126(3), 703-714. doi:10.1002/ijc.24793
- Tornesello, M. L., Duraturo, M. L., Salatiello, I., Buonaguro, L., Losito, S., Botti, G., . . . Buonaguro, F. M. (2004). Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol*, 74(1), 117-126. doi:10.1002/jmv.20154
- Trapp, D., Knez, W., & Sinclair, W. (2010). Could a vegetarian diet reduce exercise-induced oxidative stress? A review of the literature. *J Sports Sci*, 28(12), 1261-1268. doi:10.1080/02640414.2010.507676
- Trottier, G., Boström, P. J., Lawrentschuk, N., & Fleshner, N. E. (2010). Nutraceuticals and prostate cancer prevention: a current review. *Nat Rev Urol*, 7(1), 21-30. doi:10.1038/nrurol.2009.234
- Tsai, T. C., & Chen, S. L. (2003). The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*, 148(8), 1445-1453. doi:10.1007/s00705-003-0111-z
- Vasiljević, N., Ahmad, A. S., Beesley, C., Thorat, M. A., Fisher, G., Berney, D. M., . . . Lorincz, A. T. (2013). Association between DNA methylation of HSPB1 and death in low Gleason score prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 16(1), 35-40. doi:10.1038/pcan.2012.47
- Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Brentnall, A. R., Cuzick, J., & Lorincz, A. T. (2014). Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecol Oncol*, 132(3), 709-714. doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.001
- Verhoef, V. M., Heideman, D. A., van Kemenade, F. J., Rozendaal, L., Bosgraaf, R. P., Hesselink, A. T., . . . Meijer, C. J. (2014). Methylation marker analysis and HPV16/18 genotyping in high-risk HPV positive self-sampled specimens to identify women with high grade CIN or cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 135(1), 58-63. doi:10.1016/j.ygyno.2014.08.003
- Villa, L. L., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., & Franco, E. L. (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, 81(Pt 12), 2959-2968. doi:10.1099/0022-1317-81-12-2959
- Villalpando, S., Montalvo-Velarde, I., Zambrano, N., García-Guerra, A., Ramírez-Silva, C. I., Shamah-Levy, T., & Rivera, J. A. (2003). Vitamins A, and C and folate status in Mexican

- children under 12 years and women 12-49 years: a probabilistic national survey. *Salud Publica Mex*, 45 Suppl 4, S508-519. doi:10.1590/s0036-36342003001000007
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., . . . Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F
- Wang, J. T., Ding, L., Jiang, S. W., Hao, J., Zhao, W. M., Zhou, Q., . . . Zhang, L. (2014). Folate deficiency and aberrant expression of DNA methyltransferase 1 were associated with cervical cancerization. *Curr Pharm Des*, 20(11), 1639-1646. doi:10.2174/13816128113199990543
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*, 37(8), 853-862. doi:10.1038/ng1598
- Weinstein, S. J., Ziegler, R. G., Frongillo, E. A., Colman, N., Sauberlich, H. E., Brinton, L. A., . . . Bisogni, C. A. (2001). Low serum and red blood cell folate are moderately, but nonsignificantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in U.S. women. *J Nutr*, 131(7), 2040-2048. doi:10.1093/jn/131.7.2040
- Wentzensen, N., Sherman, M. E., Schiffman, M., & Wang, S. S. (2009). Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol*, 112(2), 293-299. doi:10.1016/j.ygyno.2008.10.012
- Wentzensen, N., & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*, 23(4), 315-330. doi:10.1155/2007/678793
- Wilhelm, T. (2014). Phenotype prediction based on genome-wide DNA methylation data. *BMC Bioinformatics*, 15, 193. doi:10.1186/1471-2105-15-193
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., Xi, L. F., Cherne, S., O'Reilly, S., . . . Koutsky, L. A. (2011). Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(4), 699-707. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1108
- Wiseman, M. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc*, 67(3), 253-256. doi:10.1017/S002966510800712X
- Xi, L. F., Carter, J. J., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Lee, S. K., . . . Koutsky, L. A. (2002). Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university Students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(4), 343-351.
- Yamada, T., Wheeler, C. M., Halpern, A. L., Stewart, A. C., Hildesheim, A., & Jenison, S. A. (1995). Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*, 69(12), 7743-7753.
- Yang, J., Yang, A., Wang, Z., Wang, W., Wang, Y., Wang, J., . . . Hao, M. (2018). Interactions between serum folate and human papillomavirus with cervical intraepithelial neoplasia risk in a Chinese population-based study. *Am J Clin Nutr*, 108(5), 1034-1042. doi:10.1093/ajcn/nqy160

- Yang, R., Day, P. M., Yutzy, W. H., Lin, K. Y., Hung, C. F., & Roden, R. B. (2003). Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol*, *77*(6), 3531-3541. doi:10.1128/jvi.77.6.3531-3541.2003
- Yin, Z., Sun, Y., Ge, S., & Sun, J. (2017). Epigenetic activation of WHSC1 functions as an oncogene and is associated with poor prognosis in cervical cancer. *Oncol Rep*, *37*(4), 2286-2294. doi:10.3892/or.2017.5463
- Zehbe, I., Voglino, G., Delius, H., Wilander, E., & Tommasino, M. (1998). Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, *352*(9138), 1441-1442. doi:10.1016/S0140-6736(05)61263-9
- Zhang, X., Dai, B., Zhang, B., & Wang, Z. (2012). Vitamin A and risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*, *124*(2), 366-373. doi:10.1016/j.ygyno.2011.10.012
- Zhou, X., & Meng, Y. (2016). Association between serum folate level and cervical cancer: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*, *293*(4), 871-877. doi:10.1007/s00404-015-3852-5
- Zuo, T., Tycko, B., Liu, T. M., Lin, J. J., & Huang, T. H. (2009). Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics*, *1*(2), 331-345. doi:10.2217/epi.09.31
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, *2*(5), 342-350. doi:10.1038/nrc798

Metodología y resultados

Capítulo 2:

Asociación entre los niveles de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12 con infecciones por VPH persistentes en mujeres de una cohorte con citología ASC-US

Introducción

La infección con 13 genotipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) es la causa necesaria para desarrollar lesiones precancerosas conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer (Muñoz et al., 2006; Walboomers et al., 1999). Las infecciones por VPH son extremadamente comunes, especialmente en mujeres jóvenes (Cuschieri et al., 2004; Dunne et al., 2007; Herrero et al., 2005; Khan et al., 2005; H. Trottier & Franco, 2006). De hecho, el 80% de la población sexualmente activa en algún momento de la vida ha tenido una infección por VPH (Syrjänen et al., 1990). En las edades de mayor actividad sexual, la prevalencia de las infecciones subclínicas por VPH (presencia de ADN viral con morfología normal o cambios benignos en las células del cuello uterino) pueden ser de hasta 40% en la población femenina, con una tasa de infección anual entre el 10 y 15%. La prevalencia disminuye al 5–10% en los grupos de edad mayores a 30 años (Castellsagué, 2008). Sin embargo, entre el 90 y 95% de estas infecciones son eliminadas espontáneamente en un término aproximado de 24 meses (Franco et al., 1999; Rodríguez et al., 2008; Winer et al., 2011). El porcentaje de las infecciones que persisten por más de 24 meses es muy bajo (<10%), pero estas infecciones persistentes tienen un alto riesgo no solo de mantenerse persistentes sino de convertirse en lesiones de alto grado y eventualmente en cáncer de cuello uterino (Rodríguez et al., 2008; Schiffman & Rodríguez,

2008; Wright et al., 2003). Numerosos estudios epidemiológicos han proporcionado información valiosa sobre la frecuencia y la duración de la infección persistente con diferentes genotipos de VPH (Koshiol et al., 2008; Rositch et al., 2012). Se ha observado que la mediana de la duración de la infección por VPH es en promedio de 9,8 meses (Moscicki AB, 2020; Rositch et al., 2012) y que la mediana de la duración de la persistencia (generalmente definida como dos o más pruebas de ADN del VPH positivas con 6 o 12 meses de diferencia) está influenciada por la duración del seguimiento, la frecuencia de las visitas, la sensibilidad de la prueba de VPH y la definición de eliminación o aclaramiento de la infección (es decir, una o dos pruebas negativas) (Moscicki AB, 2020). Los factores de riesgo asociados con adquisición de la infección por HPV están claramente relacionados con el comportamiento sexual del individuo. Los más importantes son: el comienzo de las relaciones sexuales a temprana edad y el elevado número de parejas sexuales durante toda la vida (Moscicki et al., 2006; Muñoz et al., 2009). Existen tres tipos de co-factores que influyen en si una infección por VPH persistirá lo suficiente como para que se desarrollen las lesiones preneoplásicas. Estos cofactores incluyen variables propias del virus, del huésped y del comportamiento del individuo. Los factores virales incluyen diferencias genéticas (y posiblemente epigenéticas) del genotipo de VPH que influyen mucho en el riesgo de desarrollo de precáncer (Schiffman et al., 2016). Por ejemplo, la infección por HPV16 y algunas variantes moleculares de este genotipo están asociadas con un riesgo de precáncer que es un orden de magnitud más alto que otros tipos que también se clasifican como cancerígenos (HPV51, HPV56 y HPV59). Sin embargo, en el ensayo clínico PATRICIA, en las mujeres control (de 15 a 25 años), la mediana del tiempo hasta la eliminación del VPH16 fue de 17 meses y no significativamente más larga que la mediana (rango 11 a 14 meses) para los genotipos 31, 33 y 45 (Moscicki AB, 2020). La respuesta inmune del huésped (por ejemplo, la influencia de la

infección por VIH) es el otro determinante importante que contribuye en la persistencia y progresión de la infección. Co-factores del comportamiento que incluyen fumar, la multiparidad (haber tenido 5 embarazos a término o más) y el uso a largo plazo de los anticonceptivos hormonales (>5 años) también influyen en el riesgo de que infecciones por VPH conduzcan a un estado precanceroso (Moscicki AB, 2020; Schiffman et al., 2016). Otros estudios han demostrado que el estado nutricional, en particular los bajos niveles de los micronutrientes involucrados en el metabolismo de un solo carbono, como el folato y la vitamina B12, aumentan el riesgo de cáncer cervical y que también pueden influir en la persistencia de la infección por VPH (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2004; Sedjo et al., 2002). La explicación biológica que posiblemente sustenta la relación entre los niveles de folato y vitamina B12 y el riesgo de cáncer cervical, es el papel de estos dos micronutrientes en la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM) (Bailey & Gregory, 1999; Choi & Mason, 2000), el cual es el principal donante de los grupos metilo (Selhub & Miller, 1992) los cuales participan en cientos de reacciones incluyendo la metilación del ADN (Selhub et al., 2009). Algunos (Asemi, Vahedpoor, Jamilian, Bahmani, & Esmailzadeh, 2016; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Tomita et al., 2013; Tong et al., 2011), pero no todos (Alberg et al., 2000; Herrero et al., 1991; Weinstein et al., 2001) los estudios epidemiológico han sugerido que la ingesta/suplementación de folato, así como los niveles circulantes de folato, juegan un papel en la historia natural y en la carcinogénesis cervical. Hasta la fecha, la mayoría de estos estudios han sido realizados principalmente en USA, Europa y Asia y pocos han sido de carácter poblacional. Adicionalmente, muy pocos se han hecho con un numero grande de población con infecciones persistentes, por lo que no se ha establecido una asociación firme entre los niveles de folato y el riesgo de la persistencia de la infección por VPH, las lesiones preneoplásicas o el cáncer. Además, los estudios previos se han

visto severamente limitados por la falta de control de la infección por VPH; es decir, que los casos y controles incluidos en estos estudios no están pareados por el estatus de VPH (García-Closas et al., 2005; J. Yang et al., 2018). Con el siguiente análisis, nuestro objetivo fue determinar la asociación entre las infecciones por VPH persistentes y los niveles séricos de 5MTHF, ácido fólico y la vitamina B12 en un grupo de mujeres VPH positivo con citología ASC-US de Medellín, Colombia.

Métodos

Diseño del estudio

Este es un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de mujeres con citología ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) de Medellín, Colombia que participaron en el estudio ASCUS-COL.

El ASCUS-COL es un ensayo clínico pragmático diseñado con el objetivo de comparar en condiciones rutinarias de tamización cervical oportunista, la efectividad de la colposcopia inmediata, la citología convencional a los 6 y 12 meses y la prueba de VPH para detectar NIC2+ (neoplasia intraepitelial cervical grado 2 o más severo) y la eficiencia para reducir NIC2+ no detectado por las estrategias de manejo, después de 24 meses de seguimiento a las mujeres con citología ASC-US.

Contexto del estudio

Entre enero de 2011 y enero de 2014, en el ASCUS-COL se reclutaron 2.661 mujeres de los servicios de tamización de tres Empresas Promotoras de Salud (EPSs) que prestaban sus servicios en la ciudad de Medellín, Colombia. En el momento de la inclusión al estudio, las

participantes fueron asignadas al azar a una de las tres estrategias para recibir manejo clínico rutinario en sus respectivas Instituciones Prestadoras de servicios de Salud (IPS). Las participantes fueron seguidas cada 12 meses durante 2 años desde la fecha de reclutamiento; en cada visita el personal clínico diligenció un cuestionario de datos personales y factores de riesgo, se realizó un examen pélvico, se recolectaron muestras para citología convencional, prueba de VPH de alto riesgo (VPH-AR), y muestras de sangre periférica para estudios posteriores como se muestra en la figura 1.

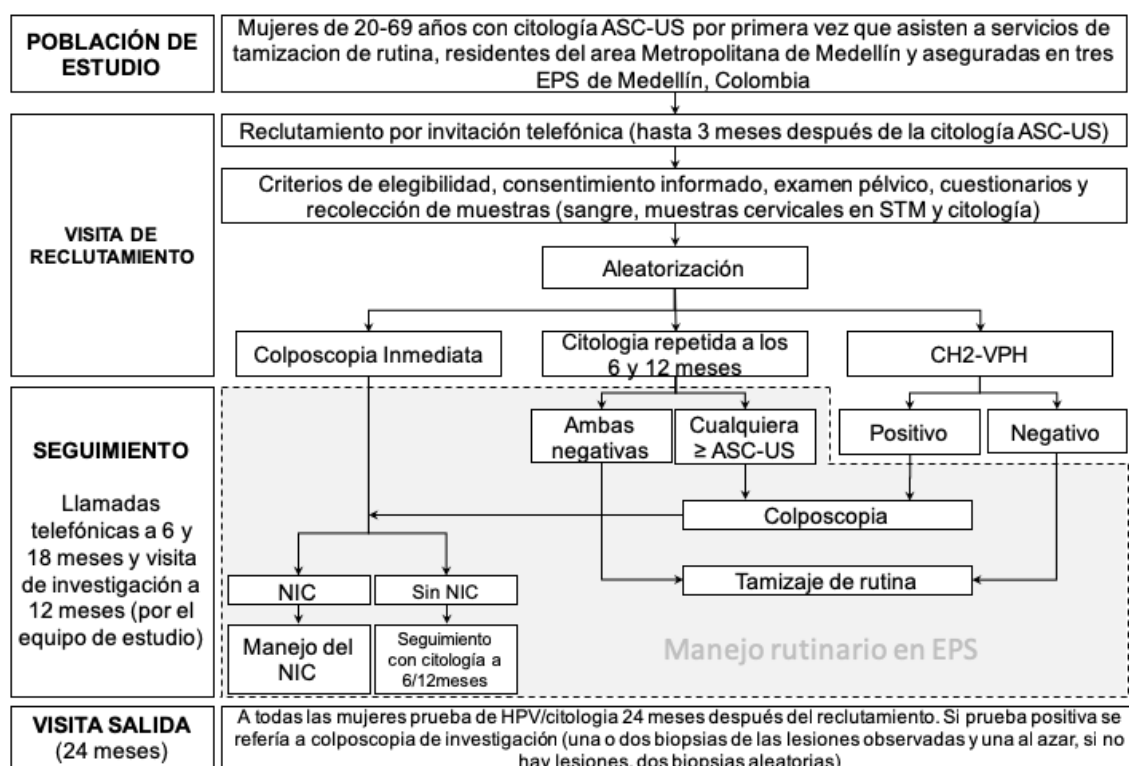


Figura 1. Diseño del estudio ASCUS-COL.

El manejo rutinario fue proporcionado por las EPSs e IPSs de acuerdo a las pautas nacionales para el manejo clínico de mujeres con citología ASC-US. Según lo emitido en el estándar técnico para la detección temprana del cáncer de cuello uterino, en su momento, resolución 412 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia; las mujeres con CIN1 fueron seguidas con citología a los 6 y 12 meses y una colposcopia si había un diagnóstico \geq ASC-US. Las mujeres con NIC2 / 3 recibieron procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa (LEEP) o escisión con asa grande de la zona de transformación (LLETZ). A las mujeres con cáncer se les realizó histerectomía, radioterapia, braquiterapia o quimioterapia.

Para finalizar con el seguimiento del estudio y con el objetivo de detectar las lesiones NIC2+ que no fueron diagnosticadas por las EPSs durante los 24 meses previos, a todas las mujeres independientemente de la estrategia de manejo asignada en la visita de reclutamiento, se les realizó la prueba de VPH para la detección de genotipos de alto riesgo (VPH-AR) y una citología convencional. Las mujeres con ambas pruebas negativas tuvieron una salida segura del estudio; aquellas que tuvieron la prueba VPH-AR positiva y/o un resultado de la citología \geq ASC-US fueron remitidas a una colposcopia/biopsia estrictamente controlada por el personal del estudio para asegurar la calidad de dicho procedimiento. La colposcopia/biopsia fue realizada por una ginecóloga colposcopista calificada. Se tomaron 2 biopsias de las lesiones observadas y una biopsia aleatoria del epitelio aparentemente sano; en caso de no observar ninguna lesión, la ginecóloga tomó 2 biopsias aleatorias del epitelio aparentemente sano. Todas las mujeres incluidas en el ASCUS-COL dieron consentimiento y permitieron el uso de las muestras biológicas tomadas para estudios futuros.

Participantes

En el ASCUS-COL se incluyeron mujeres entre 20 y 69 años, con una citología ASC-US por primera vez informada dentro de los tres meses previos al reclutamiento y residentes en la ciudad de Medellín o el Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Fueron excluidas las mujeres que tenían una citología anormal previa o si habían recibido tratamiento por patología cervical previamente (esto incluye el procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa (LEEP) o histerectomía). Se excluyeron también las mujeres con alguna discapacidad mental que no les permitiera comprender el consentimiento informado, mujeres embarazadas y mujeres con

condiciones de inmunosupresión como HIV así como las mujeres que planeaban mudarse fuera del área de estudio.

Los casos y controles para este estudio fueron seleccionados entre las mujeres VPH positivas de acuerdo al resultado de la prueba de VPH de la visita de reclutamiento (línea de base o cita 00). Los casos fueron pareados por edad (± 7 años) y tiempo al diagnóstico (± 6 meses) con los controles.

Desenlaces (persistencia / aclaramiento)

Persistencia (casos): se definió infección persistente a aquella infección por VPH-AR que se detectó en las mujeres del ASCUS-COL por medio de la prueba Captura de Híbridos 2, tanto en la visita del reclutamiento (visita 00) como en la visita de salida (a los 24 meses de seguimiento). En otras palabras, las mujeres positivas para la prueba de VPH-AR en la visita de reclutamiento y visita de salida, se consideraron con infecciones persistentes.

Aclaramiento (controles): se definió infección aclarada a aquella infección por VPH-AR que se detectó en las mujeres del ASCUS-COL por medio de la prueba Captura de Híbridos 2, en la visita 00 que no fue detectada a los 24 meses de seguimiento.

Métodos de laboratorio

Recolección y preparación de las muestras de suero para cuantificación de micronutrientes

Las muestras para la cuantificación de los niveles de micronutrientes fueron tomadas en el momento del reclutamiento de las participantes mediante venopunción en tubo vacutainer seco de 10mL. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2.000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 min dentro de los 20 min posteriores a la recolección de la muestra y los sueros fueron almacenados a -80° C. Para la cuantificación de los micronutrientes, las muestras fueron

descongeladas a temperatura ambiente. En un tubo eperndorff, a 100 μL de suero se le adicionaron 660 μL de hexano; se mezcla por vórtex y se dejó reaccionar 15 min a temperatura ambiente. Luego, la mezcla de suero con el hexano se centrifugó por 5 min a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante (capa de hexano) y a la fase acuosa restante se le adicionó 50 μL de una solución de Dithiothreitol (DTT) (10 mg/mL) agua:metanol 50:50 v/v, y se mezcló por vórtex durante un minuto.

Posteriormente se adicionaron 500 μL de una solución que contenía 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de ácido ascórbico y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de ácido cítrico en metanol, se mezcló por vórtex durante 2 min y se centrifugó por 20 min a 12000 rpm. Al sobrenadante se le vertió nitrógeno (al 99.9% de pureza en gas) hasta secar el tubo. Los tubos secos se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

Para el análisis, al tubo seco se le agregó 180 μL de una solución compuesta por acetonitrilo: agua (1:9) con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido cítrico y 10 mg/mL de DTT). Todo el contenido del tubo se pasó a través de un filtro de 0.45 micrómetros y un diámetro de 10 mm. El contenido filtrado se transfirió a un vial inserto para HPLC (por sus siglas en inglés High-Pressure Liquid Chromatography).

Recolección de muestras e identificación de infección con VPH

Se recogieron muestras cervicales de las mujeres usando un citocepillo (HC Cervical Sampler) las cuales posteriormente se transfirieron a un tubo que contenía 1 mL de Specimen Transport Medium TM (STM). El ensayo Captura de Híbridos 2 (CH2) de la casa comercial Qiagen HPV (QIAGEN, Gaithersburg, MD, USA), fue utilizada para la detección del ADN del VPH en los exfoliados cervicales de las mujeres que participaron en el estudio ASCUS-COL. Esta prueba es un ensayo hibridación de ADN-ARN que por medio de la amplificación de la

señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca detecta de manera cualitativa un conjunto de 13 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) en muestras cervicouterinas. La prueba se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante en las instalaciones del Grupo de Infección y Cáncer en la Universidad de Antioquia. Las unidades relativas de luz superiores o iguales a 1 (≥ 1) se consideraron resultados positivos.

Las concentraciones circulantes de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12, fueron estimadas en suero recolectado en la línea de base (visita de ingreso) al estudio ASCUS-COL. La medición de los micronutrientes se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander como se describió previamente por Wang y colaboradores en 2014 (X. Wang et al., 2014). A continuación, se describe detalladamente el método.

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

El Cromatógrafo Líquido Elite LabChrom, HITACHI se utilizó para los análisis de HPLC. La separación de los micronutrientes se realizó con la columna analítica BEH C18 (2.1 mm \times 50 mm I.D., 1.7 m, Waters, USA) a 40 ° C. Se usó agua ultra pura preparada con un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Francia).

- Estándares, calibradores y curvas de estandarización

Preparación de los estándares (stock)

Los estándares de ácido fólico, 5-metiltetrahidrofolato (5MTHF) y cianocobalamina (vitamina B12) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA.) así como el DTT. El ácido fórmico y el acetonitrilo de grado HPLC se compraron de Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Los

tiempos de retención de los estándares se verificaron con el Espectrómetro de Masas Amazon X con ionización por Electrospray y Analizador de Trampa iónica (EIS-IT), Bruker.

Los estándares de ácido fólico (AF), 5-metiltetrahidrofolato (5MTHF) y vitamina B12 fueron preparados a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una solución acetonitrilo/agua (1/9) que además contenía 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, ácido cítrico y DTT para inhibir la oxidación. Para obtener dicha concentración se pesó 1 mg de Ácido Fólico, 1 mg de 5MTHF, 1 mg de ácido ascórbico 1 mg de ácido cítrico, 1mg de DTT y se agregaron 147 μL del estándar de la vitamina B12 que estaba a una concentración de 10 mM (este volumen corresponde a 1 mg). Posteriormente todos los solutos se disolvieron en 10 mL de una solución acetonitrilo/agua (1/9): 1 mL de acetonitrilo + 9 mL de agua.

Preparación de los calibradores del 5MTHF y la vitamina B12

Los calibradores del B12 y el 5MTHF fueron preparados a partir de la solución estándar de la siguiente manera:

1. Volumen final para cada calibrador 2 mL
2. Las Concentraciones para las curvas de calibración de 5MTHF y B12 fueron: 1, 5, 10, 20, 35, 50, 65, 80 y 100 ppm.
3. En la tabla 1 siguiente se describe el volumen de la solución stock y el volumen del diluyente (solución acetonitrilo/agua (1/9) que además contenía 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ácido cítrico y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DTT).

Tabla 1. Preparación de los calibradores 5MTHF y vitamina B12

ppm	Cantidad de stock (mL)	Cantidad de diluyente (mL)	Volumen final (mL)
100	2	0	2
80	1.6	0.4	2
65	1.3	0.7	2
50	1	1	2
35	0.7	1.3	2
20	0.4	1.6	2
10	0.2	1.8	2
5	0.1	1.9	2
1	0.02	1.98	2

Preparación de los calibradores del ácido fólico

Los calibradores para el ácido fólico fueron preparados a partir de la solución estándar a la cual además se le adicionó NaOH para ajustar el pH y poder diluir el estándar que en otras condiciones o a otro pH no disuelve. Se procedió de la siguiente manera:

1. Volumen final para cada calibrador 2mL
2. Las Concentraciones para las curvas de calibración de AF fueron: 1, 5, 15, 20, 25, 35, 50, 65, 80 y 100 ppm.
3. En la tabla 2 se describe el volumen de la solución stock y el volumen del diluyente (solución acetonitrilo/agua (1/9) que además contenía 100 µg/mL de ácido ascórbico, 100 µg/mL ácido cítrico y 100 µg/mL DTT).

Tabla 2. Preparación de los calibradores de ácido fólico

ppm	Cantidad de stock (mL)	Cantidad de diluyente (mL)	Volumen final (mL)
100	2	0	2
80	1.6	0.4	2
65	1.3	0.7	2
50	1	1	2
35	0.7	1.3	2
20	0.4	1.6	2
15	0.3	1.7	2
10	0.2	1.8	2
5	0.1	1.9	2
1	0.02	1.98	2

Preparación de las curvas de calibración

Para realizar las curvas de calibración se procedió a realizar una tabla en el programa Excel con las integrales mAU correspondientes a cada una de las concentraciones (1,5, 10, 20, 35, 50, 65, 80 y 100 ppm) para el 5MTHF y la vitamina B12 y 1, 5, 15, 20, 25, 35, 50, 65, 80 y 100 ppm para el AF como se muestra en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Datos para la construcción de la curva de calibración para el 5MTHF y Vitamina B12

ppm	Área Bajo la curva 5MTHF	Área Bajo la curva B12
1	14.24	24.44
5	220.51	139.18
10	479.11	250.85
20	1361.6	672.67
35	2369.95	1092.65
50	3088.22	1649.1
65	4714.17	2341.07
80	5193.79	2729.1
100	7291.07	3181.28

Tabla 4. Datos para la construcción de la curva de calibración para el ácido fólico

pmm	Área Bajo la curva AF
1	63,21
5	230,64
15	712,20
20	884,92
25	917,41
35	1727,21
50	2228,74
65	3382,33
80	3635,95
100	5226,90

Posteriormente se realizó un gráfico de dispersión con líneas rectas y marcadores donde el eje X correspondió a las partes por millón (ppm) y el eje Y a los valores de la integral mAU. Se calculó en Excel las ecuaciones para cada una de las líneas rectas. El R^2 obtenido debe ser lo más cercano a 1 en las mejores condiciones, figuras 2 y 3.

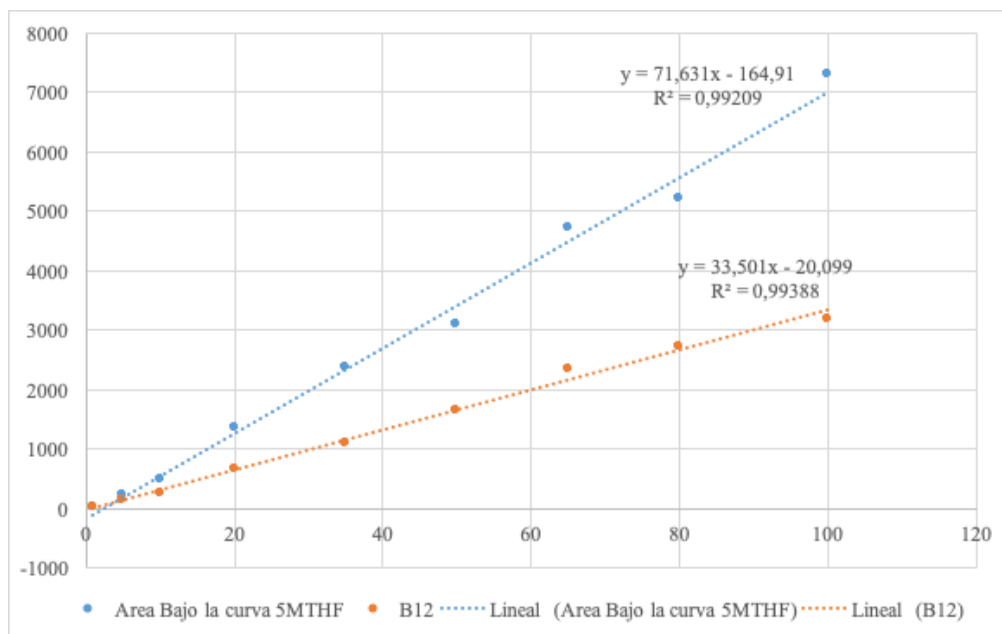


Figura 2. Curva de calibración para 5MTHF y vitamina B12. Se presenta la ecuación del gráfico y el R cuadrado para cada micronutriente. En el eje Y el área bajo la curva y en el eje X las ppm. En azul la curva para el 5MTHF y en naranja para la vitamina B12.

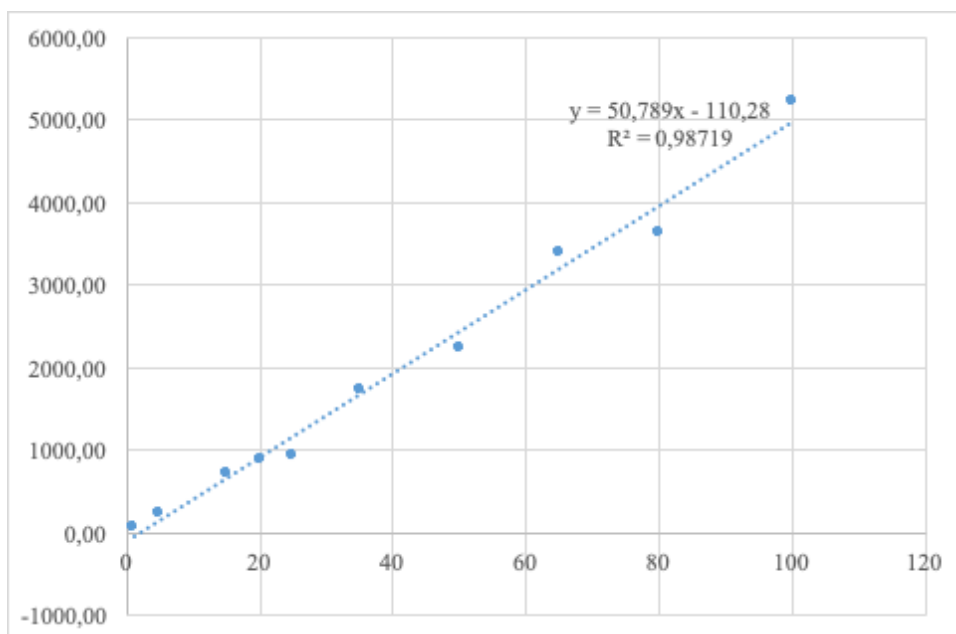


Figura 3. Curva de calibración ácido fólico. Se presenta la ecuación del gráfico y el R cuadrado. En el eje Y el área bajo la curva y en el eje X las ppm. En azul la curva para el Ácido fólico.

- Condiciones del equipo de HPLC y preparación de la fase móvil

Parámetros del equipo: se estableció un flujo de 1.00/min y una presión de 287 bares. Se utilizó una absorbancia UV 280 nm para el 5MTHF, el ácido fólico y la vitamina B12. El tiempo total de análisis para cada muestra fue 8.2 minutos y el volumen de cada inyección fue de 10 μ l.

Preparación de la fase móvil: La fase móvil estuvo compuesta por 0.1% (V/V) de ácido fórmico en agua (eluyente B) y acetonitrilo (eluyente D) como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Composición de la fase móvil en el tiempo (gradiente de elución).

min	Solvente			
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
0.00	0.0	90.0	0.0	10.0
4.00	0.0	80.0	0.0	20.0
5.00	0.0	80.0	0.0	20.0
6.00	0.0	90.0	0.0	10.0
8.00	0.0	90.0	0.0	10.0

*Tiempo de equilibrio: 1 minuto

- Estimación de la concentración de los micronutrientes

El programa Hystar de Bruker se utilizó para interpretar y procesar los datos y estimar las concentraciones de los micronutrientes obtenidos por HPLC de la siguiente manera: 1. Se cargó el cromatograma de cada muestra 2. Se definieron los picos de interés de manera automática y en algunos casos de manera manual (figura 4) y 3. Se hizo la integración de los picos de interés como se muestra en la figura 5, para obtener el área bajo la curva para cada uno de los tres micronutrientes analizados en el equipo de HPLC.

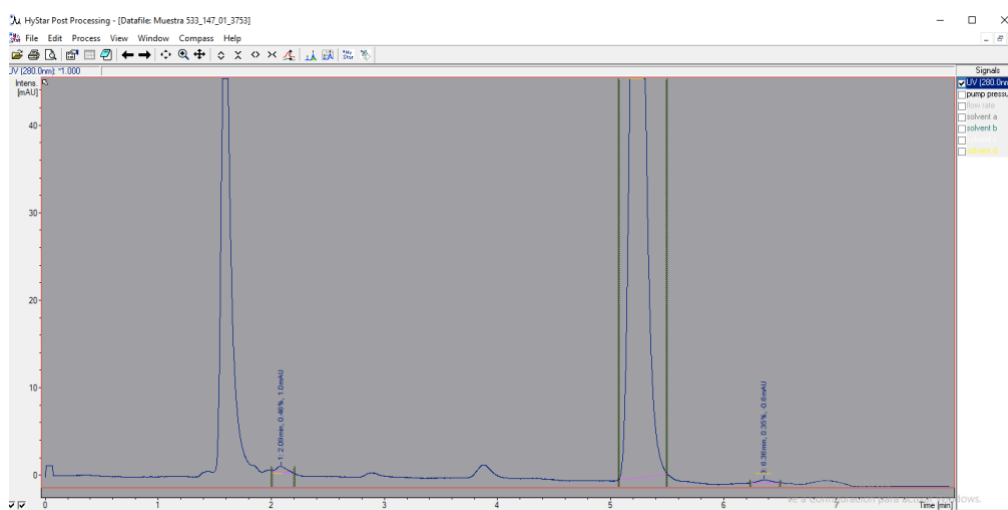


Figura 4. Cromatograma definición de los picos de manera automática o manual. Selección de los picos de interés y tiempos de retención. En el eje Y el valor mAU y en el eje X el tiempo de retención en minutos

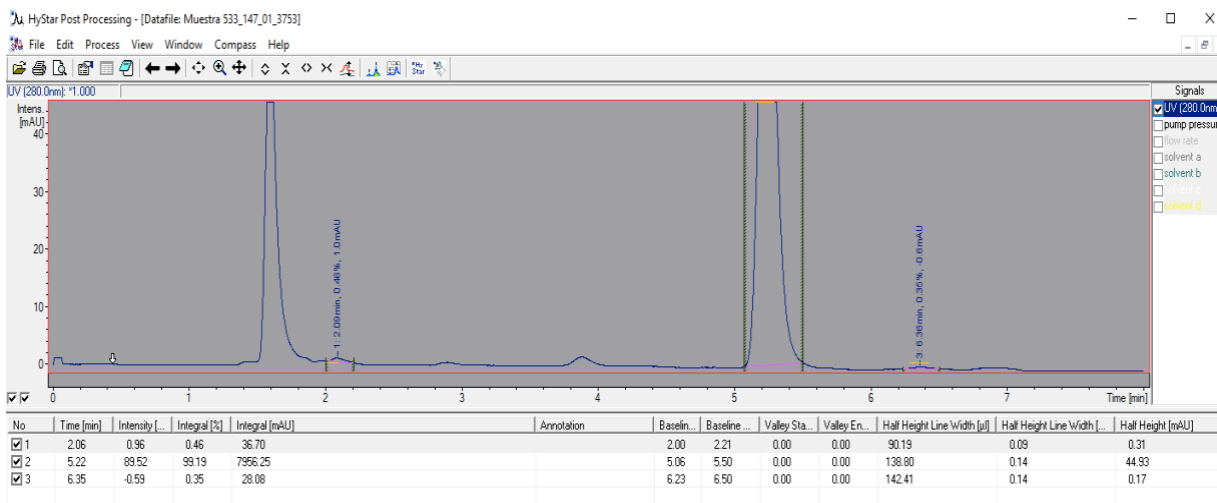


Figura 5. Cromatograma. Integración de los picos de interés. Se indica el tiempo de retención (min) y el área bajo la curva para cada uno de los tres micronutrientes (5MTHF, ácido fólico y vitamina B12)

Cálculo de los picos y áreas bajo la curva de los metabolitos de interés en cada muestra analizada

Cada uno de estándares de los micronutrientes medidos y los tiempos de retención obtenidos en el equipo de HPLC, fueron validados en el espectrómetro de masas Amazon X con ionización por electrospray y analizador de trampa ionica (EIS-IT) de Bruker. Para el 5MTHF el tiempo de retención fue de 2.4 hasta 2.9 min; para el ácido fólico entre 5.3 y 6.0 min y para la vitamina B12 el tiempo de retención fue entre 6.2 y 6.5 min.

Una vez se calcularon los picos de interés y se integraron usando el programa Hystar de Bruker se procedió a identificar la Integral mAU, este valor es el que nos permitió obtener las concentraciones de los micronutrientes a partir de las curvas de estandarización. Con base en las ecuaciones de la recta obtenidos para cada micronutriente en la curva de estandarización, se procedió a pasar la Integral mAU a ppm despejando la variable X de la ecuación para cada muestra analizada.

Una vez obtenidos los resultados en ppm, éstos se convirtieron a ng/mL para el 5MTHF y el Ácido Fólico y a pg/mL los resultados para la vitamina B12 usando las ecuaciones como se describe en el siguiente apartado.

Ecuación para la obtención de ng/mL a partir de ppm para el 5MTHF

$$5MTHF: X \text{ (ppm)} = (Y + 164.91) / 71.631$$

Ejemplo: si la integral [mAU] obtenida del cromatograma es = 20.24

$$\text{ppm} = (20.24 + 164.91) / 71.631 \text{ ppm} = 2.58$$

Sabemos que 1 ppm = 1mg/L, entonces:

$$2.58 \text{ ppm} = 2.58 \text{ mg}$$

L

Para convertir los mg/L a ng/ml se procedió así:

$$2.58 \text{ mg} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10^6 \text{ ng}}{1 \text{ mg}} = 2580 \text{ ng/mL}$$

Ecuación para la obtención de ng/mL a partir de ppm para el Ácido Fólico

$$AF: X \text{ (ppm)} = (Y + 110.28) / 50.789$$

Ejemplo: si la integral [mAU] obtenida del cromatograma es = 13200.97

$$\text{ppm} = (13200.97 + 110.28) / 50.789 \text{ ppm} = 262.09$$

Sabemos que 1 ppm = 1mg/L, entonces:

$$262.09 \text{ ppm} = 262.09 \text{ mg}$$

L

Para convertir los mg/L a ng/ml se procedió así:

$$262.09 \text{ mg} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10^6 \text{ ng}}{1 \text{ mg}} = 262090 \text{ ng/mL}$$

Ecuación para la obtención de pg/mL a partir de ppm para la vitamina B12

$$B12: X \text{ (ppm)} = (Y + 20.099) / 33.501$$

Ejemplo: si la integral [mAU] obtenida del cromatograma es = 76.81

$$\text{ppm} = (76.81 + 20.099) / 33.501 \text{ ppm} = 2.89$$

Sabemos que 1 ppm = 1 mg/L, entonces:

$$2.89 \text{ ppm} = 2.89 \text{ mg}$$

L

Para convertir los mg/L a pg/ml se procedió así:

$$2.89 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \text{ mg}} = 2'892.720 \text{ pg/mL}$$

Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra y el análisis del poder para probar esta hipótesis del estudio fue realizada con el software STATA 13 (StataCorp LLC, Texas, EE. UU.). Para los cálculos de análisis de potencia y tamaño de muestra, se asumieron las siguientes condiciones: alpha (α) se fijó en los niveles de 0.05. La proporción de controles con niveles bajos de micronutrientes se tomó de las siguientes referencias: Para la vitamina B12 se consideró la publicación realizada por Shamah-Levy (Teresa Shamah-Levy 2015) donde se reportó que la deficiencia de esta vitamina alcanza cifras entre el 8 y 15% en mujeres mexicanas. Para los niveles de folatos también se tomó como referencia los datos publicados por Shamah-Levy donde se reporta prevalencia de deficiencia de folatos del 2% en población mexicana. Debido a la heterogeneidad en la prevalencia de la deficiencia de estos micronutrientes, a la heterogeneidad de poblaciones donde se realizaron las determinaciones y a los diferentes diseños de los estudios tenidos en cuenta para

este fin, se hicieron cálculos de tamaños de muestra con probabilidades de exposición a bajos niveles de micronutrientes en el 2%, 8% y 15% de los controles. Los cálculos de tamaño de muestra se realizaron con *odds ratios* previstos desde 1.25 hasta 2 asumiendo una potencia de 80% con niveles de confianza de 0.05. Las tablas 6, 7 y 8 muestran los cálculos de tamaño de muestra usando un nivel de confianza de 0.05 con diferentes proporciones de bajos niveles de micronutrientes entre los controles.

Alpha: Probabilidad de Error Tipo I	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Poder	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Probabilidad de la Exposición entre controles	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Proporción de Casos y Controles	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
odds Ratio hipotético	1.25	1.35	1.40	1.50	1.75	2
Tamaño de muestra	28968	15462	12100	8080	3966	2442

Tabla 6. Cálculo del tamaño de muestra (bajos niveles vs. altos niveles de micronutrientes). Probabilidad de exposición entre controles del 2%

Alpha: Probabilidad de Error Tipo I	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Poder	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Probabilidad de la Exposición entre controles	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Proporción de Casos y Controles	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
odds Ratio hipotético	1.25	1.35	1.40	1.50	1.75	2
Tamaño de muestra	7822	4196	3292	2208	1096	682

Tabla 7. Cálculo del tamaño de muestra (bajos niveles vs. altos niveles de micronutrientes). Probabilidad de exposición entre controles del 8%

Alpha: Probabilidad de Error Tipo I	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Poder	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Probabilidad de la Exposición entre controles	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Proporción de Casos y controles	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
odds ratio hipotético	1.25	1.35	1.40	1.50	1.75	2
Tamaño de muestra	4590	2476	1948	1314	660	416

Tabla 8. Cálculo del tamaño de muestra (bajos niveles vs. altos niveles de micronutrientes). Probabilidad de exposición entre controles del 15%

Para alcanzar un poder mínimo de 80% cuando el *odds ratio* hipotético es igual o mayor a dos, cuando la proporción de bajos niveles de micronutrientes es del 15% o mayor se requerirían 208 casos y 208 controles. Es decir, que un tamaño de muestra de 298 casos y 298 controles aseguraría un poder del 92%. Sin embargo, para el análisis del 5MTHF solo se lograron incluir 384 muestras de 192 casos y 192 controles; para el ácido fólico se lograron incluir 566 muestras de 283 casos y 283 controles y para la vitamina B12 solo se lograron incluir 118 muestras de 59 casos y 59 controles. En estas circunstancias el poder *Post-hoc* fue del 76.9% para los análisis con el 5MTHF, del 90.6% para los análisis con ácido fólico y solo del 31.8% para los análisis con la vitamina B12.

Operacionalización de las variables de desenlace, sociodemográficas y de confusión.

Como variables sociodemográficas se consideraron la EPS a la cual pertenecía en el momento de ingreso al estudio, el estado marital y el nivel educativo. La EPS se presenta como EPS1 (privada), 2 (pública) o 3 (privada); el estado marital fue categorizado como: mujeres casadas, divorciadas o solteras y el nivel educativo como: secundaria incompleta (incluye las mujeres sin

educación y las que tenían primaria completa o incompleta), secundaria completa y educación superior (incluye técnica, tecnología, universitaria y posgrado).

De acuerdo a la historia natural de la enfermedad y por su relación con el posible desenlace (persistencia) o la exposición (niveles de micronutrientes) se consideraron la edad al ingreso al estudio, la edad de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales, el número de hijos nacidos vivos y el uso de anticonceptivos hormonales como posibles factores de confusión. La edad fue categorizada por décadas, la edad de la primera relación sexual se categorizó en tres grupos, las que tuvieron la primera relación sexual después de los veinte años (≥ 20 años), entre los 16-19 años y a los 15 años o antes (≤ 15). El número de parejas sexuales en toda la vida fue categorizada así: 1-2 parejas, 3-4 parejas y ≥ 5 parejas. El número de hijos nacidos vivos se categorizó en: sin hijos, 1-2 hijos y ≥ 3 . Por último, el uso de anticonceptivos hormonales se categorizó de la siguiente manera: no uso durante la vida, menos de cinco años de uso y cinco años o más de uso de los anticonceptivos. Las concentraciones de micronutrientes se dividieron en tres categorías, y los sujetos se clasificaron con concentraciones normales, posiblemente deficientes y deficientes según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS): 6-20 ng/mL, 3.0 -5.9 ng/mL y < 3 ng/mL para el folato y sus metabolitos y $>200-996$ pg/mL, 150-200 pg/mL y < 150 pg/mL para la vitamina B12.

Análisis estadísticos

Inicialmente se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables sociodemográficas y factores de riesgo incluyendo los 298 casos y correspondientes controles que es el tamaño de muestra que garantizaba un poder del 92% asumiendo una exposición de bajos niveles de folato en el 15% de la población. También se llevó a cabo el mismo análisis incluyendo solamente los casos y los correspondientes casos incluidos (5MTHF n=192 casos y n=192 controles; ácido

fólico n=283 casos y n=283 controles; y vitamina B12 n=59 casos y n=59 controles). Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U Mann-Whitney fueron usadas para comparar entre casos y controles las proporciones, medias y medianas respectivamente. Se compararon las medianas de las concentraciones de micronutrientes entre casos y controles usando la prueba U Mann-Whitney o Kruskal Wallis según el número de los grupos de comparación. Se compararon entre casos y controles las proporciones de los individuos con niveles de micronutrientes normales vs individuos con concentraciones posiblemente deficientes y deficientes. También se compararon las concentraciones de los individuos con niveles de micronutrientes deficientes con los individuos con concentraciones posiblemente deficientes y normales combinados. Para estimar asociación de los niveles de micronutrientes con la persistencia de la infección por VPH, se usó un análisis de regresión logística no condicional obteniendo las respectivas razones de *odds ratio* (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%. Los modelos de regresión logística se especificaron mediante un indicador binario de persistencia (sí / no) como variable dependiente y las concentraciones séricas de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12 como predictor independiente de interés primario. Para llevar a cabo los modelos y determinar las variables por las cuales ajustarlo, se realizaron análisis de correspondencia y matrices de asociación con todas las variables sociodemográficas y factores de riesgo para la infección por VPH y NIC incluidas en los cuestionarios del estudio. En el análisis de correspondencia se identificaron las variables explicativas del modelo así como las variables relacionadas entre sí. Las variables que resultaron ser explicativas fueron corroboradas en la matriz de asociación a través de pruebas Chi cuadrado pareadas, figuras 6 y 7.

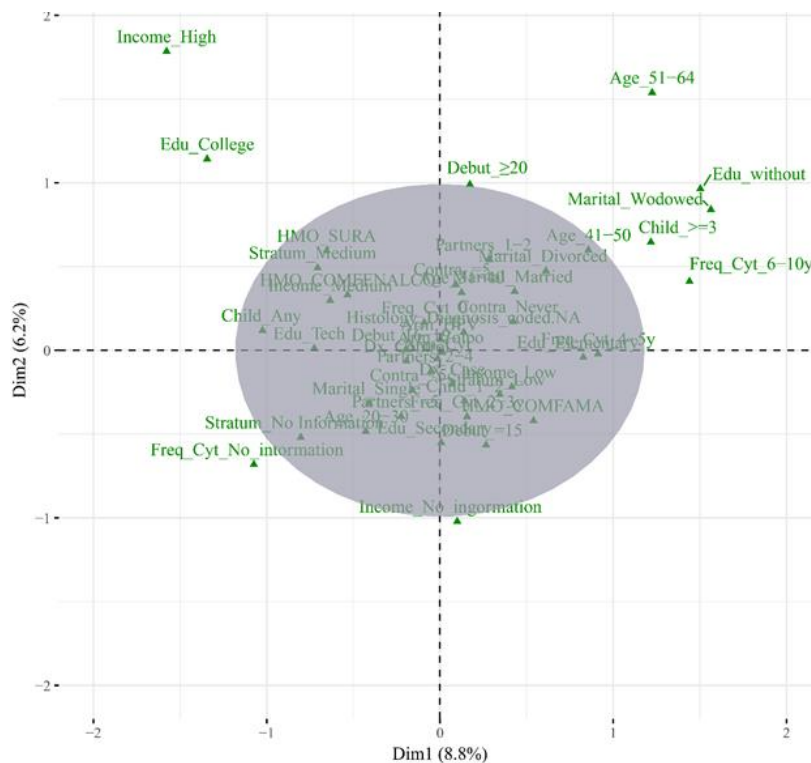


Figura 6. Análisis de correspondencia que incluye información de 298 casos y 298 controles.

En este gráfico se encuentran representadas las variables sociodemográficas y factores de riesgo para la persistencia categorizados como se describió anteriormente. Las categorías que se ubican cerca al origen del gráfico (círculo gris), son categorías que no contribuyen a la explicación del modelo. Estas categorías no están asociadas a otras variables, en esta región del plano nada se asocia con nada. Las categorías por fuera del origen del gráfico, contribuyen a la explicación del modelo y fueron tenidas en cuenta para ajustar el mismo.

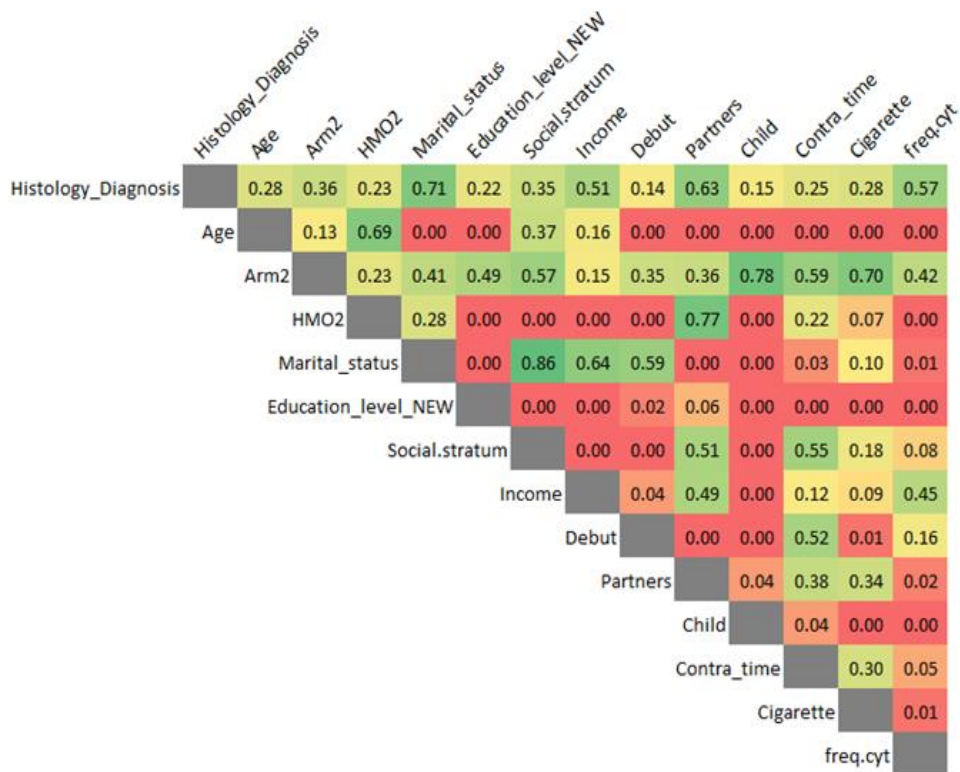


Figura 7. Matriz de asociación que incluye información de 298 casos y 298 controles.

En este gráfico se presenta la matriz de asociación la cual corresponde a pruebas Chi cuadrado pareadas. Se observa el respectivo valor p para cada comparación entre las variables. El color rojo indica asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Las variables que mostraron asociación fueron tenidas en cuenta como variables a incluir en el modelo.

Los análisis de correspondencia y matrices de asociación se realizaron tanto para los 298 casos y 298 controles seleccionados para la determinación de los micronutrientes (figuras 16 y 17), así como para los casos y controles con resultado para los micronutrientes 5MTHF y Ácido fólico de manera independiente (figuras suplementarias 1 y 2).

El efecto de los niveles de los micronutrientes fue estimado mediante análisis bivariados categorizando la variable de acuerdo a las recomendaciones de la OMS, valores normales posiblemente deficientes y deficientes tanto para los folatos como para la vitamina B12. Posteriormente, se evaluó el efecto de los niveles de los micronutrientes ajustado por los

cofactores de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de correspondencia y matriz de asociación; las variables por las cuales fue ajustado el modelo fueron: edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos hormonales y frecuencia de realización de la citología. Los resultados de los análisis de correspondencia y matrices de asociación no fueron diferentes si se compara el análisis que incluye los 298 casos y 298 controles seleccionados para la determinación de los micronutrientes con los análisis para cada micronutriente realizados con el número de casos y controles con resultado disponible. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software STATA 13 (StataCorp LLC, Texas, EE. UU.) y el paquete estadístico R (Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-projecto.org>).

Consideraciones éticas

El ASCUS-COL y este proyecto cumplieron con la Resolución colombiana 8430 de 1993 para realizar estudios en seres humanos y se realizaron siguiendo las pautas del CIOMS (Sciences, 2002). Los comités de ética para la experimentación humana de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) (Resolución 08-036- 171) y la Escuela de Medicina (Resolución 004/2008) de la Universidad de Antioquia aprobaron este estudio. Las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado que incluía la autorización para utilizar sus muestras y datos para futuras investigaciones. Todos los datos recopilados y almacenados dentro del estudio fueron salvaguardados por el Investigador Principal y se garantizó la confidencialidad, el anonimato y la protección de los datos. Solo los datos y las muestras de ensayos anónimos se pueden compartir con otros investigadores para estudios futuros. Se eliminaron los identificadores personales de las muestras y se asignó un código interno del estudio que puede vincularse a los datos clínicos,

pero no directamente a los identificadores personales. Las participantes en el estudio no tuvieron acceso a la información de identificación de los participantes.

Resultados

Participantes

En el estudio ASCUS-COL se identificaron 1.122 mujeres VPH-AR positivas en la línea de base tal como se muestra en la figura 8. Entre las mujeres VPH-AR positivas en la línea de base, 342 volvieron a ser positivas para VPH-AR en la prueba de la visita de salida (24 meses después del reclutamiento). A las 342 participantes con infección persistente (casos) se les identificó una mujer emparejada por edad y por tiempo al diagnóstico (± 6 meses). Cuarenta y cuatro controles tuvieron que ser excluidos debido a que no cumplían con los criterios de aclaramiento natural de la infección por VPH (se verificó en los expedientes de esas 44 mujeres y se encontró que se les había realizado una conización durante el período de seguimiento). Por tanto estos controles y sus 44 correspondientes (44 casos) fueron excluidos (se excluyeron ya que no habían controles disponibles a los que se les hubieran determinado los niveles de micronutrientes). Finalmente, 298 mujeres con infección por VPH persistente y 298 mujeres con infección por VPH aclarada fueron identificadas en el estudio ASCUS-COL.

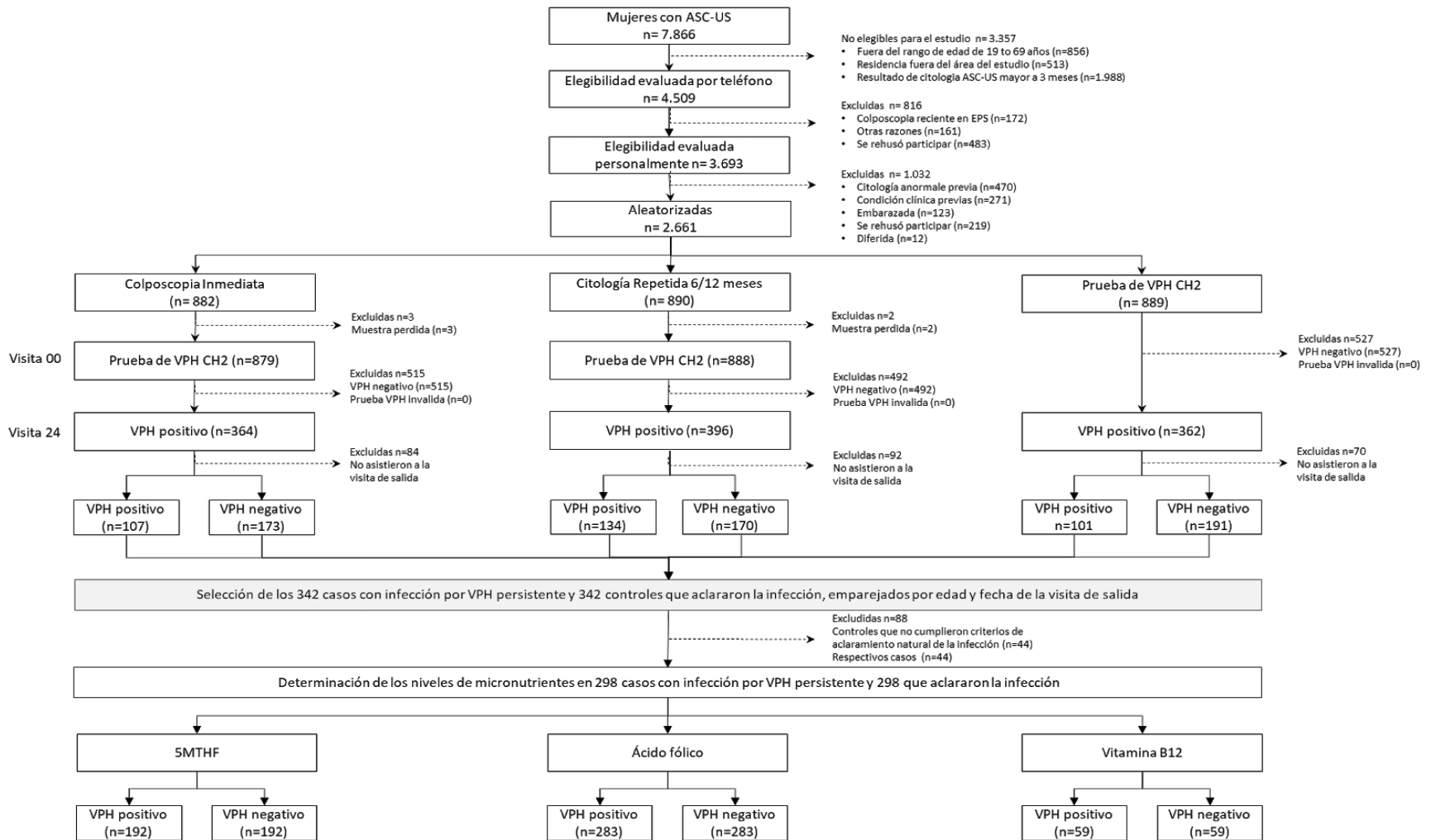


Figura 8. Flujograma del estudio. ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado, **CH2:** Prueba captura de híbridos 2, **VPH:** Virus Papiloma Humano. Se indica el número de mujeres con citología ASC-US aleatorizadas en el ASCUS-COL. El número de mujeres VPH positivo en la línea de base (visita 00) para cada una de las estrategias de manejo y el resultado de la misma prueba a los 24 meses de seguimiento (visita 24). Finalmente se muestra el número de mujeres con infección por VPH persistente y aclarada incluidas en este análisis y la cantidad de casos y controles por micronutriente a los que se les pudo determinar.

Los niveles de 5MTHF pudieron ser determinados en un total de 201 casos y 210 controles. Sin embargo, los análisis estadísticos también se llevaron a cabo incluyendo solamente los casos y controles pareados (n= 192 pares). Los niveles de ácido fólico fueron determinados en un total de 285 casos y 288 controles y también se realizaron análisis estadísticos incluyendo solamente los casos y controles pareados (n=283 pares). Los niveles de vitamina B12 fueron determinados en un total de 60 casos y 70 controles también se presentarán los análisis en los casos y controles pareados (n=59 pares) (figura 8).

Características de las participantes

En la tabla 9 se describe la distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo conocidos para la adquisición y desarrollo de infecciones por VPH persistentes y lesiones cervicales asociadas a esta infección, en los casos y los controles incluidos en este estudio. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles para ninguna de las variables sociodemográficas o factores de riesgo. La media de la edad en el momento de la inclusión al estudio fue 32.2 años (DS 9.5). La mitad de las mujeres estaban aseguradas en la EPS 2 (pública), el 55.4% estaban solteras y el 34.1% tenía educación primaria o ninguna educación.

Aproximadamente, la mitad de las mujeres tuvieron su primera relación sexual entre los 16 y 19 años; no hubo diferencias entre el número de compañeros sexuales durante toda la vida (el 32.2% tuvieron entre 1 y 2, el 34.4% entre 3 y 4 y 33.4% tuvieron 5 o más parejas). El 52% de las mujeres tenían entre 1 y 2 hijos, mientras que el 20% tres o más. Casi la tercera parte de las mujeres han usado anticonceptivos hormonales por 5 o más años. La mayoría, 77.5% nunca han

fumado cigarrillos y la frecuencia en la realización de la citología cervicouterina fue de una o más veces al año en el 66.4% de las mujeres.

Tabla 9. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para la persistencia de la infección por VPH entre casos y controles

Características	Total	Controles	Casos	P
	N=596	N=298	N=298	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.0 [10.3]	32.0 [10.1]	32.1 [10.6]	0.956
20-30	336 (56.4)	164 (55.0)	172 (57.7)	0.185
31-40	129 (21.6)	73 (24.5)	56 (18.8)	
41-50	89 (14.9)	45 (15.1)	44 (14.8)	
51-64	42 (7.1)	16 (5.4)	26 (8.7)	
EPS				
1	143 (24.0)	70 (23.5)	73 (24.5)	0.254
2	312 (52.3)	149 (50.0)	163 (54.7)	
3	141 (23.7)	79 (26.5)	62 (20.8)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	212 (35.6)	115 (38.6)	97 (32.6)	0.193
Divorciada/separada/viuda	54 (9.0)	29 (9.7)	25 (8.4)	
Soltera	330 (55.4)	154 (51.7)	176 (59.0)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	203 (34.1)	103 (34.6)	100 (33.6)	0.555
Secundaria completa	204 (34.2)	96 (32.2)	108 (36.2)	
Técnico - tecnológico/ universitario	189 (31.7)	99 (33.2)	90 (30.2)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.2 [3.2]	17.3 [3.5]	17.2 [3.0]	0.605
≥20	99 (16.6)	49 (16.4)	50 (16.8)	0.603
16-19	322 (54.0)	156 (52.4)	166 (55.7)	
≤15	175 (29.4)	93 (31.2)	82 (27.5)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	3.0 [1-98]	3.0 [-98]	3.0 [1-98]	0.246
1-2	192 (32.2)	105 (35.2)	87 (29.2)	0.283
3-4	205 (34.4)	97 (32.6)	108 (36.2)	
≥5	199 (33.4)	96 (32.2)	103 (34.6)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1.0 [0-9]	1.0 [0-9]	1.0 [0-8]	0.890
0	176 (29.5)	92 (30.9)	84 (28.2)	0.773
1-2	308 (51.7)	151 (50.7)	157 (52.7)	

≥3	112 (18.8)	55 (18.4)	57 (19.1)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
Mediana [Rango]	2.5 [0-27]	3.0 [0-27]	2.3 [0-23]	0.477
0	94 (15.8)	43 (14.4)	51 (17.1)	0.667
<5	339 (56.9)	172 (57.7)	167 (56.0)	
≥5	163 (27.4)	83 (27.9)	80 (26.9)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	462 (77.5)	236 (79.2)	226 (75.8)	0.578
En el pasado	39 (6.5)	19 (6.4)	20 (6.7)	
Actualmente	95 (15.9)	43 (14.4)	52 (17.5)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	396 (66.4)	207 (69.5)	189 (63.4)	0.382
Una vez cada 2- 3 años	129 (21.6)	59 (19.8)	70 (23.5)	
Menos de una vez cada 4-5 años	43 (7.2)	21 (7.1)	22 (7.4)	
No sabe/ No responde	28 (4.7)	11 (3.7)	17 (5.7)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Cuando se compararon las mismas características sociodemográficas y factores de riesgo para los casos y controles con resultado para cada uno de los micronutrientes de manera independiente (5MTHF n=192 casos y n=192 controles; ácido fólico n=283 casos y n=283 controles; y vitamina B12 n=59 casos y n=59 controles), no se observaron diferencias estadísticamente significativas, tablas suplementarias 1, 2 y 3. En las tablas suplementarias 4 y 5 se comparan las características sociodemográficas y factores de riesgo de los casos y controles incluidos y excluidos en cada micronutriente. No se observaron diferencias significativas para los individuos con y sin resultado de 5MTHF y vitamina B12 (tablas suplementaria 4 y 5). Esto nos permite sugerir que la exclusión de los casos y correspondientes controles no alteró la distribución de las características sociodemográficas y de los factores de riesgo de los grupos de estudio.

Niveles de micronutrientes

5MTHF

Se muestra la distribución de los niveles séricos de 5MTHF entre casos y controles en la tabla 10 y en la figura 9. El rango de la concentración del 5MTHF en los casos fue de 2.4 - 8.1 ng/mL; y en los controles 2.4 - 6.4 ng/mL. En el análisis incluyendo todos los casos (n=201) y controles (n=210) no se observaron diferencias en las medianas de la concentración del micronutriente, (2.8 ng/mL para los casos y 2.7 ng/mL para los controles, $p= 0.073$), ni tampoco cuando en el análisis se incluyeron solamente los casos y controles pareados, (192 pares) (2.8 ng/mL para los casos y 2.7 ng/mL, $p= 0.084$). Se observó que el 0.5%, 34.4% y 65.1% de los individuos del grupo control y el 1.6%, 34.9% y 63.5% de los casos, tenían niveles normales, posiblemente deficientes y niveles deficientes de ésta coenzima este respectivamente y estas proporciones fueron similares ($p= 0.593$).

Tabla 10. Distribución de los niveles séricos de 5 MTHF

Características	Sin parear		P	Pareados		P
	Casos	Controles		Casos	Controles	
	N= 201	N= 210		N= 192	N= 192	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Concentración						
Mediana[rango]	2.8 [2.4 - 8.1]	2.7 [2.4 - 6.4]	0.073	2.8 [2.4 - 8.1]	2.7 [2.4 - 6.4]	0.084
Categorías OMS						
Normal (6 -20 ng/mL)	3 (1.5)	1 (0.5)	0.575	3 (1.6)	1 (0.5)	0.593
Posible deficiencia (3 -5.9 ng/mL)	69 (34.3)	72 (34.3)		67 (34.9)	66 (34.4)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	129 (64.2)	137 (65.2)		122 (63.5)	125 (65.1)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

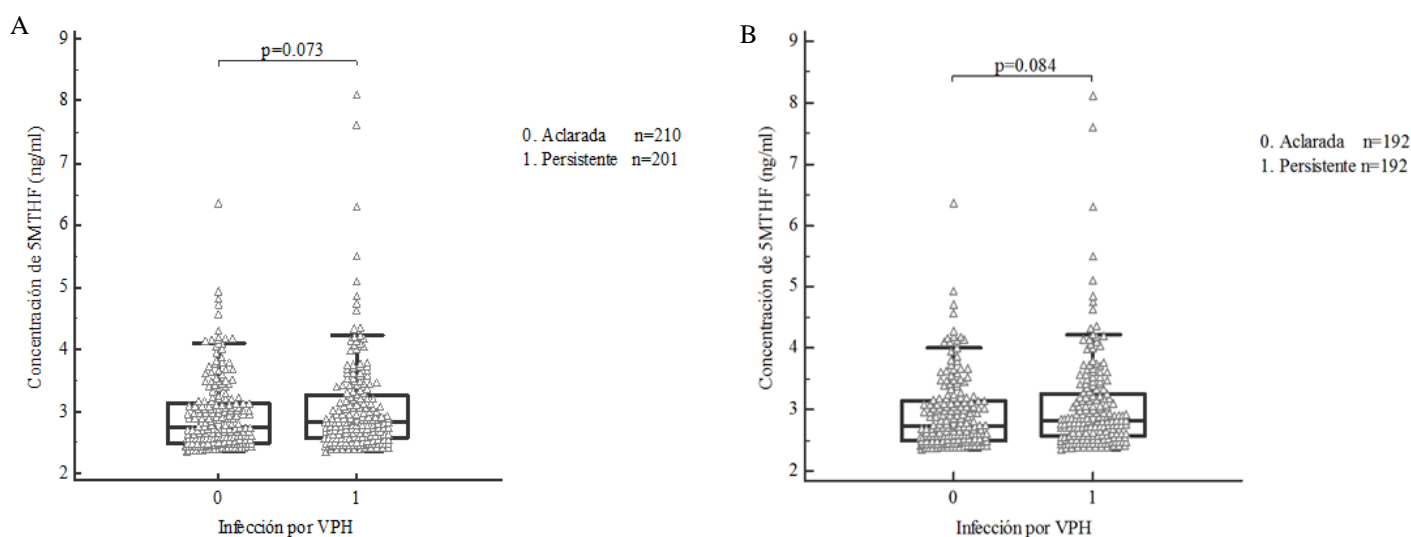


Figura 9. Distribución de los niveles séricos de 5MTHF determinados por el método HPLC.

A. Distribución del 5MTHF entre casos (infección persistente) y controles (infección aclarada) sin emparejar. Prueba U Mann-Whitney $p=0.073$. B. Distribución de 5MTHF entre casos (infección persistente) y controles (infección aclarada) pareados. $p=0.084$ Prueba Mann-Whitney

Ácido fólico

Se muestra la distribución de los niveles séricos del ácido fólico entre casos y controles en la tabla 11 y en la figura 10. El rango de la concentración del ácido fólico para los casos fue de 0.08 - 21.5 ng/mL respectivamente; y para los controles 0.03 - 21.8 ng/mL. En el análisis incluyendo todas las muestras sin emparejar, (n=285) casos y (n=288) controles, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las medianas de la concentración del micronutriente, (2.2 ng/mL para los casos y 2.1 ng/mL para los controles, (p= 0.156), ni tampoco cuando en el análisis se incluyeron solamente los casos y controles pareados, (283 pares). En el análisis restringido a los casos y controles pareados, 283 individuos para cada grupo de comparación, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas. La mediana de la concentración fue 2.2 ng/mL para los casos y 2.03 ng/mL para los controles, (p= 0.176). No se observaron diferencias significativas de acuerdo a las categorías de la OMS, 6%, 24.7% y 69.3% de los individuos del grupo control y tuvieron niveles normales, posiblemente deficientes y niveles deficientes de 5MTHF respectivamente; mientras que el 9.9%, 25.8% y 64.3% de los casos tenían niveles normales, posiblemente deficientes y niveles deficientes respectivamente (p= 0.195).

Tabla 11. Distribución de los niveles séricos de Ácido Fólico

Características	Sin parear		P	Pareados		P
	Casos N= 285	Controles N= 288		Casos N= 283	Controles N= 283	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Concentración						
Mediana[rango]	2.2 [0.08 –21.5]	2.1 [0.03 – 21.8]	0.156	2.2 [0.08 – 21.5]	2.03 [0.03- 21.8]	0.176
Categorías OMS						
Normal (6 -20 ng/mL)	29 (10.2)	17 (5.9)	0.142	28 (9.9)	17 (6.0)	0.195
Posible deficiencia (3 -5.9 ng/mL)	74 (26.0)	72 (25.0)		73 (25.8)	70 (24.7)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	182 (63.8)	199 (69.1)		182 (64.3)	196 (69.3)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

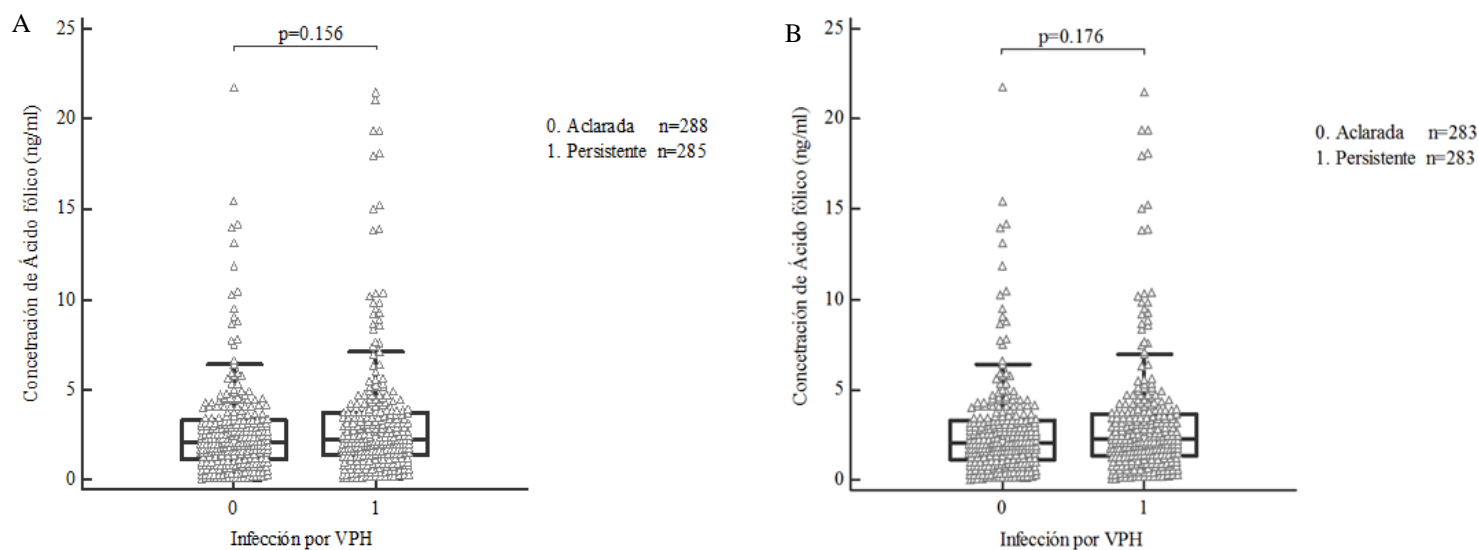


Figura 10. Distribución de los niveles de Ácido fólico determinados por el método HPLC.

A. Distribución de Ácido fólico entre casos (infección persistente) y controles (infección aclarada) sin emparejar. Prueba U Mann-Whitney $p=0.156$. **B.** Distribución de Ácido fólico entre casos (infección persistente) y controles (infección aclarada) pareados. $p=0.176$ Prueba Mann-Whitney.

Vitamina B12

Se muestra la distribución de los niveles séricos de vitamina B12 entre casos y controles en la tabla 12 y en la figura 11. El rango de la concentración de la vitamina B12 para los casos fue de 85.1 - 2315 pg/mL; y para los controles 79.1 - 1593.7 pg/mL respectivamente. En el análisis incluyendo todos los casos (n= 60) y controles (n=70) sin emparejar, no se observaron diferencias estadísticas en cuanto a las medianas de la concentración de la vitamina, (214.8 pg/mL para los casos y 261.6 pg/mL para los controles, (p= 0.370). En el análisis restringido a los casos y controles pareados, (59 pares), tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas. La mediana de la concentración fue 214.9 pg/mL para los casos y 285.9 pg/mL para los controles, (p= 0.176). No se observaron diferencias significativas de acuerdo a las categorías de la OMS, se observó que el 64.4%, 11.9% y 23.7% de los individuos del grupo control tienen niveles normales, posiblemente deficientes y niveles deficientes de vitamina B12 respectivamente; entre los casos, 57.6%, 8.5% y 33.9% tenían niveles normales, posiblemente deficientes y niveles deficientes respectivamente (p= 0.446).

Tabla 12. Distribución de los niveles séricos de vitamina B12

Características	Sin emparejar		P	Pareados		P
	Casos	Controles		Casos	Controles	
	N= 60	N= 70		N= 59	N= 59	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Concentración						
Mediana [rango]	214.8 [85.1 – 2315]	261.6 [79.1 – 1593.7]	0.370	214.9 [85.1 – 2315]	285.9 [86.0- 1593]	0.176
Categorías OMS						
Normal (> 200- 996 pg/mL)	34 (56.7)	42 (60.0)	0.672	34 (57.6)	38 (64.4)	0.446
Posible deficiencia (150 -200 pg/mL)	5 (8.3)	8 (11.4)		5 (8.5)	7 (11.9)	
Deficiencia (< 150 pg/mL)	21 (35.0)	20 (28.6)		20 (33.9)	14 (23.7)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

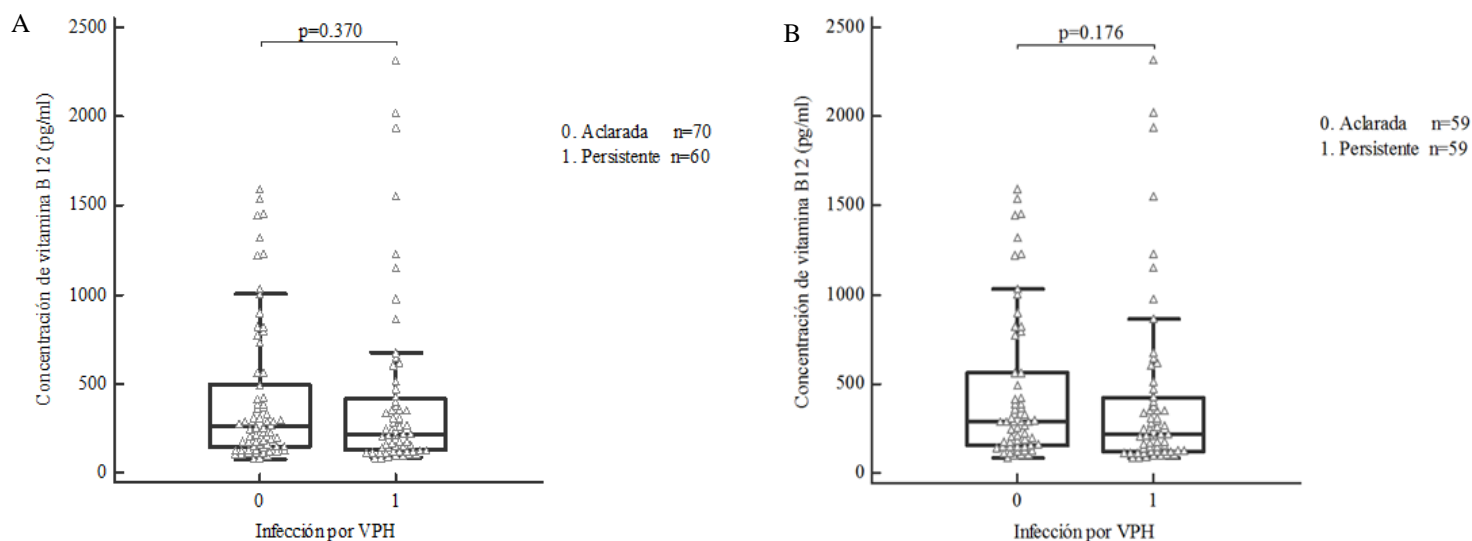


Figura 11. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método HPLC.

A. Distribución de la vitamina B12 entre casos (infección persistente) y controles (infección aclarada) sin emparejar. Prueba U Mann-Whitney $p=0.370$. **B.** Distribución de la vitamina B12 entre casos (infección persistente) y controles (infección aclarada) pareados. $p=0.176$ Prueba Mann-Whitney.

Asociación entre niveles de micronutrientes e infección por VPH persistente

5MTHF

En el modelo de regresión logística presentado en la tabla 13, tanto en el análisis bivariado como en el ajustado, estar soltera fue la única variable asociada con la persistencia de la infección por VPH, OR 1.75 (IC95% 1.06- 2.86) $p=0.027$. Comparados con los niveles normales, los niveles posiblemente deficientes y deficientes de 5MTHF no se asociaron con menor o mayor riesgo de tener una infección persistente, OR 0.93 (IC95% 0.62- 1.42) $p=0.749$.

Ácido Fólico

En el modelo de regresión logística presentado en la tabla 14, tanto en el análisis bivariado como en el ajustado, estar soltera fue la única variable asociada con la persistencia de la infección por VPH, OR 1.64 (IC95% 1.07- 2.49) $p=0.022$. Comparados con los niveles normales, los niveles posiblemente deficientes y deficientes de ácido fólico no se asociaron con menor o mayor riesgo de tener una infección persistentemente, OR 0.80 (IC95% 0.56- 1.14) $p=0.212$.

Tabla 13. Asociación entre los niveles de 5MTHF y otros factores de riesgo para infecciones persistentes por VPH-AR

Factores de riesgo	Controles n=192	Casos n=192	OR^a (IC 95%)	Valor P	OR^b (IC 95%)	Valor P
Edad (años)						
20-30	107	110	1.00 (referencia)			
31-40	41	35	0.83 (0.49- 1.40)	0.487		
41-50	33	28	0.83 (0.47- 1.46)	0.509		
51-62	11	19	1.68 (0.76- 3.70)	0.197		
Estado Marital						
Casada/unión libre	82	64	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
Divorciada/separada/viuda	17	15	1.13 (0.52- 2.44)	0.754	1.17 (0.52- 2.64)	0.705
Soltera	93	113	1.56 (1.02- 2.39)	0.042	1.75 (1.06- 2.86)	0.027
Nivel educativo						
Técnico-tecnológico/universitario	67	60	1.00 (referencia)			
Secundaria completa	61	70	1.28 (0.79- 2.09)	0.320		
Sin educación/primaria completa o incompleta	64	62	1.08 (0.66- 1.77)	0.755		
Edad de la primera relación sexual (años)						
≥20	26	35	1.00 (referencia)			
16-19	106	107	0.75 (0.42- 1.33)	0.326		
≤15	60	50	0.62 (0.33- 1.16)	0.136		
Número de parejas sexuales en toda la vida						
1-2	70	60	1.00 (referencia)			
3-4	62	72	1.35 (0.84- 2.20)	0.219		
≥5	60	60	1.17 (0.71- 1.92)	0.543		
Número de hijos						
0	60	55	1.00 (referencia)			
1-2	93	101	1.18 (0.75- 1.88)	0.472		
≥3	39	36	1.01 (0.56- 1.80)	0.981		
Años de uso de anticonceptivos hormonales						
0	27	26	1.00 (referencia)			

<5	113	112	1.03 (0.57- 1.87)	0.925
≥5	52	54	1.08 (0.56- 2.09)	0.823
Frecuencia de la citología				
Una o más veces al año	127	124	1.00 (referencia)	
Una vez cada 2-3 años	44	43	1.00 (0.61- 1.63)	0.997
Menos de una vez cada 4-5 años	13	13	1.02 (0.46- 2.30)	0.954
No sabe/no responde	8	12	1.54 (0.61- 3.89)	0.365
Niveles de 5MTHF				
Normal / Posible deficiencia (3 – 20 ng/mL)	67	70	1.00 (referencia)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	125	122	0.93 (0.62- 1.42)	0.749

^a Análisis bivariado. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología

Tabla 14. Asociación entre los niveles de Ácido fólico y otros factores de riesgo para infecciones persistentes por VPH-AR

Factores de riesgo	Controles n=283	Casos n=283	OR ^a (IC 95%)	Valor P	OR ^b (IC 95%)	Valor P
Edad (años)						
20-30	154	161	1.00 (referencia)			
31-40	69	55	0.76 (0.50- 1.16)	0.203		
41-50	44	41	0.89 (0.55- 1.44)	0.638		
51-62	16	26	1.55 (0.80- 3.01)	0.191		
Estado Marital						
Casada/unión libre	112	91	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
Divorciada/separada/viuda	27	24	1.09 (0.59- 2.02)	0.775	1.11 (0.58- 2.11)	0.757
Soltera	144	168	1.44 (1.01- 2.05)	0.046	1.64 (1.07- 2.49)	0.022
Nivel educativo						
Técnico-tecnológico/universitario	96	89	1.00 (referencia)			
Secundaria completa	90	105	1.26 (0.84- 1.88)	0.264		
Sin educación/primaria completa o incompleta	97	89	0.99 (0.66- 1.49)	0.960		
Edad de la primera relación sexual (años)						
≥20	49	50	1.00 (referencia)			
16-19	144	154	1.05 (0.67- 1.65)	0.840		
≤15	90	79	0.86- 0.52- 1.41)	0.552		
Número de parejas sexuales en toda la vida						
1-2	101	83	1.00 (referencia)			
3-4	91	103	1.38 (0.92- 2.06)	0.121		
≥5	91	97	1.30 (0.86- 1.95)	0.211		
Número de hijos						
0	85	77	1.00 (referencia)			
1-2	145	151	1.15 (0.78- 1.69)	0.476		
≥3	53	55	1.15 (0.70- 1.86)	0.585		

Años de uso de anticonceptivos hormonales

0	38	44	1.00 (referencia)	
<5	167	160	0.83 (0.51- 1.34)	0.444
≥5	78	79	0.87 (0.51- 1.49)	0.624

Frecuencia de la citología

Una o más veces al año	199	180	1.00 (referencia)	
Una vez cada 2-3 años	53	65	1.36 (0.90- 2.05)	0.150
Menos de una vez cada 4-5 años	20	21	1.16 (0.61- 2.21)	0.650
No sabe/no responde	11	17	1.71 (0.78- 3.74)	0.181

Niveles de Ácido Fólico

Normal / Posible deficiencia (3 -20 ng/mL)	87	101	1.00 (referencia)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	196	182	0.80 (0.56- 1.14)	0.212

^a Análisis bivariado. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología

Discusión

En estudios previos, los carotenoides, el retinol, la vitamina C, la vitamina E, los folatos y la vitamina B12 se han investigado como posibles modificadores de la persistencia del VPH y el riesgo de cáncer cervical (Abike et al., 2011; Chih, Lee, Colville, Binns, & Xu, 2013; García-Closas et al., 2005; Piyathilake et al., 2004; Sedjo et al., 2003; Sedjo et al., 2002; Siegel et al., 2010). Hasta donde sabemos, ningún estudio previo ha evaluado la asociación entre la persistencia del VPH y los niveles séricos de folatos y vitamina B12 en las mujeres de países latinoamericanos. Nosotros diseñamos un estudio epidemiológico de casos y controles anidado en una cohorte, para evaluar si los bajos niveles de 5MTHF, el ácido fólico y la vitamina B12 estaban asociados con la infección por VPH persistente. El estudio se realizó en un grupo de mujeres VPH positivas con citología ASC-US de Medellín, Colombia. Comparamos las concentraciones de los micronutrientes en mujeres positivas persistentemente para la prueba de VPH-AR CH2 al tiempo cero y a los 24 meses de seguimiento con mujeres que aclararon la infección por VPH.

No identificamos diferencias en cuanto a las características sociodemográficas y factores de riesgo de los casos y controles incluidos en este análisis. Sin embargo, co-factores del comportamiento que incluyen fumar, la multiparidad (haber tenido 5 embarazos a término o más) y el uso a largo plazo de los anticonceptivos hormonales (>5 años) también se han relacionado con el riesgo de que infecciones por VPH sean persistentes y conduzcan a un estado precanceroso (Moscicki AB, 2020; Schiffman et al., 2016). Una de las principales razones por las cuales probablemente no evidenciamos esta asociación es que la mayoría de mujeres incluidas en este estudio nunca han fumado y han tenido solo uno o dos embarazos a término. Nosotros tampoco tuvimos la genotipificación del ADN viral razón por la cual no pudimos

determinar si hay una asociación entre el genotipo de la infección y la persistencia como se ha sugerido en algunos estudios (Schiffman et al., 2016); (Moscicki AB, 2020).

Observamos que de la mitad y casi un tercio de los casos y los controles, respectivamente, tienen deficiencia de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12. Estas cifras son concordantes con los datos publicados por la OMS donde se reporta que la deficiencia de estos micronutrientes es un problema de salud pública que afecta a millones de personas en todo el mundo independientemente de factores como la infección por VPH (de Benoist, 2008). Sin embargo estos hallazgos, son contrarios a los datos reportados para las Américas donde la deficiencia de folato es menor al 1% en la población chilena (Hertrampf et al., 2003) y menor al 2% en población mexicana (Teresa Shamah Levy & Cuevas, 2015). En Colombia no se cuenta con estudios que describan la prevalencia de deficiencia de folatos en la población general. Únicamente está disponible una publicación de Salamanca y colaboradores en 2017 que reporta valores séricos de ácido fólico en 1.797 individuos mayores de 18 años atendidos en un hospital de alta complejidad en la ciudad de Bogotá. En esta publicación, reportan una media global de ácido fólico sérico de 11,61 ng/mL (DS: 6.05). Solo en el 2% de los individuos se reportaron valores séricos < 2 ng/mL (Salamanca et al., 2017). Sin embargo, a través de la Encuesta Nacional de Situación Nutricional del país (ENSIN 2005–2010) (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, 2005; Ministerio de la Protección Social, 2010), se conoció que los colombianos adultos (entre 18 y 64 años), presentan bajas ingestas de folato en sus dietas. En ese mismo año se determinó que 75% de las mujeres entre 19 y 50 años consumió como máximo 308 µg de folatos por día (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, 2005). La encuesta ENSIN del 2015 reportó que las mujeres en edad fértil tienen una concentración media de vitamina B12 de 440,5 pg/mL, lo que refleja buenos depósitos. La vitamina B12 hace parte de la

estrategia de fortificación de harina de trigo con hierro y vitaminas del complejo B. La prevalencia de deficiencia de vitamina B12 fue de 3.5 % (Social, 2015).

Con respecto a la asociación de los niveles de micronutrientes y la infección persistente por VPH, nuestros hallazgos sugieren que en esta población de mujeres colombianas con citología ASC-US, después de ajustar por las variables potencialmente confusoras, el metabolito circulante del folato (5MTHF), el ácido fólico y la vitamina B12 no se asociaron significativamente con el riesgo de persistencia de la infección por VPH. Algunos estudios han reportado la existencia de una asociación protectora entre los niveles circulantes o dietarios de folato, vitamina B12 y la persistencia de la infección por VPH (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2004; Sedjo et al., 2002). Piyathilake 2004 reportó que las mujeres con altos niveles de folato tenían mayor probabilidad de que siendo VPH positivas, tenían una mayor probabilidad de aclarar la infección (OR 2.50, IC95% 1.8- 5.30). En el estudio de Sedjo RL, Inserra P, en 2002, aunque ellos no observaron una asociación con el ácido fólico y la vitamina B12 en la dieta, los niveles plasmáticos de vitamina B12 se asociaron con un menor riesgo de persistencia del VPH en una cohorte de 201 jóvenes analizadas en Arizona, (P for trend, 0.037) después de ajustar por edad, edad de la primera relación sexual, estado marital, hábito de fumar, raza e índice de masa corporal. Las mujeres con niveles circulantes de vitamina B12 en el tercil superior (>493.2 pg/ml) tuvieron menor probabilidad de tener una infección persistente (OR ajustado 0.4; IC95% 0.17-0.96) (Sedjo et al., 2002). Hasta la fecha solo hay un estudio (Abike et al., 2011) que compara los niveles de folato y vitamina B12 en mujeres con diferentes resultados de citología cervicouterina (negativa para malignidad n=32, ASC-US n=30, LIE-BG n=30 y LIE-AG=30). En el estudio publicado por Abike y col se concluyó que la deficiencia de folato predispone a infecciones persistentes y la displasia cervical incrementaba. Las concentraciones de folato

sérico en los grupos de pacientes fueron: LIE-AG 10.0 ± 0.4 ng/mL, LIE-BG 10.6 ± 0.5 ng/mL, ASC-US 11.1 ± 0.8 ng/ml y negativo 11.9 ± 0.5 ng/ml $p < 0.005$ (Abike et al., 2011). Sin embargo, en una revisión exhaustiva realizada por García-Closas (García-Closas et al., 2005), se sugiere que aunque existe cierto apoyo epidemiológico para el papel de los folatos y la vitamina B12 en la carcinogénesis cervical, la evidencia disponible que tiene en cuenta la infección por VPH aún no es convincente y menciona que hay una falta de estudios prospectivos que usen técnicas más sensibles para la determinación de la infección. Una revisión más reciente sobre la prevención de la infección por VPH y el cáncer cervical, reportó que los niveles circulantes de folato o vitamina B12 no se asociaron significativamente con la persistencia de infección por VPH (Chih et al., 2013).

Las limitaciones de nuestro estudio también deben ser consideradas al interpretar estos hallazgos. En este trabajo se definió persistencia como infección por VPH-AR que se detectó en las mujeres por medio de la prueba Captura de Híbridos 2 (CH2), tanto en la visita del reclutamiento (visita 00) como en la visita de salida (a los 24 meses de seguimiento), no tuvimos disponible la genotipificación para ceñirnos estrictamente a la definición epidemiológica de persistencia. Reconocemos que existe la probabilidad de que las participantes hayan aclarado la infección tiempo después del reclutamiento y que hayan adquirido una nueva infección cerca de la visita de salida o que la infección en la visita de reclutamiento y la infección en la visita de salida sea por genotipos diferentes y de este modo propiciar una clasificación incorrecta de la enfermedad lo que explicaría que no se encontrara una asociación significativa entre los niveles de micronutrientes con el riesgo de persistencia de la infección por VPH en este estudio; sin embargo sabemos que esta posibilidad es muy baja (Gravitt & Winer, 2017; Rodríguez et al., 2008).

En datos no publicados del ASCUS-COL se observó que la probabilidad de tener una prueba negativa entre la visita de ingreso al estudio y la visita de salida fue <2%. Se ha reportado en la literatura que a los 24 meses de adquirir una infección por VPH, las infecciones que van a aclarar lo han hecho, por ello aquellas mujeres que resulten VPH positivas luego de este tiempo tienen una verdadera infección persistente y un riesgo mayor de desarrollar una lesión cervical de alto grado (Rodríguez et al., 2008). Se ha demostrado que el riesgo de una lesión intraepitelial cervical grado 3 o peor (NIC3+) a 12 años luego de dos pruebas CH2 positivas con un lapso de 18 meses de diferencia es del 21% (Castle et al., 2012). Este conocimiento valida la definición de persistencia usada en nuestro estudio.

Nuestros resultados también podrían verse afectados por la medición de los micronutrientes que no pudo hacerse en la totalidad de las muestras, especialmente para la vitamina B12. Sin embargo, nosotros utilizamos el HPLC acoplado a la espectrometría de masas para la medición de dichos micronutrientes; hasta la fecha es el método más moderno y sensible para la detección de folato y B12 en muestras de suero y plasma comparado con el método microbiológico y los radioinmunoensayos (Kits comerciales). Este método permite la medición de los diferentes metabolitos del folato y no solo del folato total como lo hacen los otros métodos (Shane, 2011) y de esta manera diferenciar el folato metabolizado del no metabolizado. También realizamos análisis para comparar las características sociodemográficas y factores de riesgo de las mujeres a las que se les pudo determinar los niveles de cada uno de los micronutrientes de manera independiente con las de las mujeres a las que no se les pudieron determinar y no encontramos diferencias significativas, lo que haría pensar que la falta de resultados en la totalidad de muestras no afectó los resultados obtenidos. No tuvimos información sobre el patrón dietario pero reconocemos que esta medición es una limitación común de los estudios epidemiológicos

nutricionales debido al sesgo de memoria que conlleva a una posible sobreestimación o subestimación sistemática en las mediciones de las concentraciones de los micronutrientes. No obtuvimos información acerca del consumo de suplementos, medicamentos o alcohol en estas mujeres y sabemos también que los bajos niveles de estos micronutrientes, especialmente los folatos pudieron ser afectados por el consumo de estos productos; sin embargo, entre los criterios de exclusión para el estudio ASCUS- COL era tener una enfermedad crónica como las de tipo autoinmune o cáncer. Este criterio de alguna manera excluye la posibilidad de que las participantes estén consumiendo anticonvulsivantes, barbitúricos, metotrexato o pirimetamina que son los medicamentos que comúnmente disminuyen las concentraciones de los folatos. Con respecto a los suplementos, del estudio se excluyeron las mujeres embarazadas quienes son a las que se les formulan estos micronutrientes. Nosotros tampoco observamos en el estudio que los individuos tuvieran niveles altos de ácido fólico ($>20\text{ng/mL}$) el cual es el metabolito del folato no metabolizado; este parámetro también apunta a que las participantes incluidas en este estudio no tomaban suplementos en el momento del reclutamiento y que los niveles de micronutrientes encontrados realmente reflejan las concentraciones reales de los mismos.

En conclusión, los resultados de este estudio indican los niveles de folato son bajos tanto en casos como controles. Esta observación no solo podría ser explicada por la fortificación per se, sino también por aspectos como la temperatura de cocción o almacenamiento de los alimentos fortificados como las harinas. La proporción de la exposición (bajos niveles de micronutrientes) es igual en ambos grupos, lo que no nos permite encontrar asociaciones entre los niveles circulantes de 5MTHF, ácido fólico y de vitamina B12 y el riesgo de persistencia de la infección por VPH en mujeres VPH positivo con citología ASC-US de Medellín, Colombia. El no tener la genotipificación de las muestras en la línea de base y a los 24 meses de seguimiento también

incide en la posibilidad de no haber encontrado diferencias significativas; las mujeres con infecciones por VPH16/18 los cuales son los genotipos de alto riesgo que más se han relacionado con las infecciones persistentes, probablemente tengan más bajos niveles de estas vitaminas en comparación con las mujeres con infecciones por otros genotipos.

Se necesitarían más estudios que evalúen la prevalencia de la deficiencia de folatos y B12 en la población colombiana, no solamente en las poblaciones especiales como las mujeres embarazadas y los niños menores de 5 años. Es importante conocer y monitorear si las políticas públicas como la fortificación de la harina de trigo realmente son efectivas. De la misma manera se requieren más estudios donde se evalúe si los niveles de folato y B12 se asocian con la adquisición de la infección de VPH como lo reporta la autora Chandrika en 2004; de esta manera se podría hacer una mejor comprensión del papel de estos micronutrientes en la historia natural de enfermedad.

Bibliografía

- Abike, F., Engin, A. B., Dunder, I., Tapisiz, O. L., Aslan, C., & Kutluay, L. (2011). Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias. *Arch Gynecol Obstet*, *284*(1), 209-214. doi:10.1007/s00404-010-1650-7
- Alberg, A. J., Selhub, J., Shah, K. V., Viscidi, R. P., Comstock, G. W., & Helzlsouer, K. J. (2000). The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *9*(7), 761-764.
- Asemi, Z., Vahedpoor, Z., Jamilian, M., Bahmani, F., & Esmailzadeh, A. (2016). Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, *32*(6), 681-686. doi:10.1016/j.nut.2015.12.028
- Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1999). Folate metabolism and requirements. *J Nutr*, *129*(4), 779-782. doi:10.1093/jn/129.4.779
- Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, *110*(3 Suppl 2), S4-7. doi:10.1016/j.ygyno.2008.07.045
- Castle, P. E., Glass, A. G., Rush, B. B., Scott, D. R., Wentzensen, N., Gage, J. C., . . . Wacholder, S. (2012). Clinical human papillomavirus detection forecasts cervical cancer risk in women over 18 years of follow-up. *J Clin Oncol*, *30*(25), 3044-3050. doi:10.1200/JCO.2011.38.8389
- Chih, H. J., Lee, A. H., Colville, L., Binns, C. W., & Xu, D. (2013). A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *Nutr Cancer*, *65*(3), 317-328. doi:10.1080/01635581.2013.757630
- Choi, S. W., & Mason, J. B. (2000). Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*, *130*(2), 129-132. doi:10.1093/jn/130.2.129
- Cuschieri, K. S., Cubie, H. A., Whitley, M. W., Seagar, A. L., Arends, M. J., Moore, C., . . . McGoogan, E. (2004). Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*, *57*(1), 68-72. doi:10.1136/jcp.57.1.68
- de Benoist, B. (2008). Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull*, *29*(2 Suppl), S238-244. doi:10.1177/15648265080292S129
- Dunne, E. F., Unger, E. R., Sternberg, M., McQuillan, G., Swan, D. C., Patel, S. S., & Markowitz, L. E. (2007). Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*, *297*(8), 813-819. doi:10.1001/jama.297.8.813
- Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A., & Powers, H. J. (2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *18*(10), 2782-2789. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0493
- Franco, E. L., Villa, L. L., Sobrinho, J. P., Prado, J. M., Rousseau, M. C., Désy, M., & Rohan, T. E. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*, *180*(5), 1415-1423. doi:10.1086/315086
- García-Closas, R., Castellsagué, X., Bosch, X., & González, C. A. (2005). The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*, *117*(4), 629-637. doi:10.1002/ijc.21193

- Gravitt, P. E., & Winer, R. L. (2017). Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*, 9(10). doi:10.3390/v9100267
- Herrero, R., Castle, P. E., Schiffman, M., Bratti, M. C., Hildesheim, A., Morales, J., . . . Burk, R. D. (2005). Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*, 191(11), 1796-1807. doi:10.1086/428850
- Herrero, R., Potischman, N., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Tenorio, F., . . . Gaitan, E. (1991). A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer. I. Dietary indicators. *Am J Epidemiol*, 134(11), 1335-1346. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116036
- Hertrampf, E., Cortés, F., Erickson, J. D., Cayazzo, M., Freire, W., Bailey, L. B., . . . Pfeiffer, C. (2003). Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr*, 133(10), 3166-3169. doi:10.1093/jn/133.10.3166
- Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, P., Instituto Nacional de Salud, Universidad de Antioquia, OPS. (2005). Encuesta Nacional de la Situación Nutricional de Colombia-ENSIN-. In (1st ed., pp. 229-261): Panamericana Firms e Impresos.
- Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., . . . Schiffman, M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, 97(14), 1072-1079. doi:10.1093/jnci/dji187
- Koshiol, J., Lindsay, L., Pimenta, J. M., Poole, C., Jenkins, D., & Smith, J. S. (2008). Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*, 168(2), 123-137. doi:10.1093/aje/kwn036
- Ministerio de la Protección Social, P., Instituto Nacional de Salud, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. (2010). Encuesta de la situación Nutricional en Colombia. In (2nd ed. ed., pp. 268-337.). Bogotá: Da Vinci Editor & CÍA.
- Moscicki, A. B., Schiffman, M., Kjaer, S., & Villa, L. L. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/42-51. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.018
- Moscicki AB, S. M., Franceschi Silvia. (2020). Chapter 9 -The Natural History of Human Papillomavirus Infection in Relation to Cervical Cancer. In.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1-10. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Muñoz, N., Hernandez-Suarez, G., Méndez, F., Molano, M., Posso, H., Moreno, V., . . . Group, I. N. d. C. H. S. (2009). Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*, 100(7), 1184-1190. doi:10.1038/sj.bjc.6604972
- Piyathilake, C. J., Henao, O. L., Macaluso, M., Cornwell, P. E., Meleth, S., Heimbarger, D. C., & Partridge, E. E. (2004). Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res*, 64(23), 8788-8793. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2402
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Alvarez, R. D., Bell, W. C., Heimbarger, D. C., & Partridge, E. E. (2009). Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2(7), 658-664. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0175

- Rodríguez, A. C., Schiffman, M., Herrero, R., Wacholder, S., Hildesheim, A., Castle, P. E., . . . Group, P. E. G. (2008). Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*, *100*(7), 513-517. doi:10.1093/jnci/djn044
- Rositch, A. F., Burke, A. E., Viscidi, R. P., Silver, M. I., Chang, K., & Gravitt, P. E. (2012). Contributions of recent and past sexual partnerships on incident human papillomavirus detection: acquisition and reactivation in older women. *Cancer Res*, *72*(23), 6183-6190. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2635
- Salamanca, L., Ordóñez, A., Cardozo, C., & Suárez-Obando, F. (2017). Valores séricos de ácido fólico en un grupo de pacientes mayores de 18 años de edad en un hospital de alta complejidad. In (Vol. 58). Bogotá: Universitas Médica Pontificia Universidad Javeriana.
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., . . . Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16086. doi:10.1038/nrdp.2016.86
- Schiffman, M., & Rodríguez, A. C. (2008). Heterogeneity in CIN3 diagnosis. *Lancet Oncol*, *9*(5), 404-406. doi:10.1016/S1470-2045(08)70110-4
- Sciences, C. f. I. O. o. M. (2002). International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. *Bull Med Ethics*(182), 17-23.
- Sedjo, R. L., Fowler, B. M., Schneider, A., Henning, S. M., Hatch, K., & Giuliano, A. R. (2003). Folate, vitamin B12, and homocysteine status. findings of no relation between human papillomavirus persistence and cervical dysplasia. *Nutrition*, *19*(6), 497-502. doi:10.1016/s0899-9007(02)01096-1
- Sedjo, R. L., Inserra, P., Abrahamsen, M., Harris, R. B., Roe, D. J., Baldwin, S., & Giuliano, A. R. (2002). Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *11*(4), 353-359.
- Selhub, J., & Miller, J. W. (1992). The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*, *55*(1), 131-138. doi:10.1093/ajcn/55.1.131
- Selhub, J., Morris, M. S., Jacques, P. F., & Rosenberg, I. H. (2009). Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*, *89*(2), 702S-706S. doi:10.3945/ajcn.2008.26947C
- Shane, B. (2011). Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr*, *94*(1), 337S-342S. doi:10.3945/ajcn.111.013367
- Siegel, E. M., Salemi, J. L., Villa, L. L., Ferenczy, A., Franco, E. L., & Giuliano, A. R. (2010). Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, *118*(3), 289-294. doi:10.1016/j.ygyno.2010.05.022
- Social, M. d. S. y. P. n. (2015). Estrategia nacional para la prevención y control de las deficiencias de micronutrientes en Colombia 2014-2021. In Bogotá D.C, Colombia.
- Sycuro, L. K., Xi, L. F., Hughes, J. P., Feng, Q., Winer, R. L., Lee, S. K., . . . Koutsky, L. A. (2008). Persistence of genital human papillomavirus infection in a long-term follow-up study of female university Students. *J Infect Dis*, *198*(7), 971-978. doi:10.1086/591625
- Syrjänen, K., Hakama, M., Saarikoski, S., Väyrynen, M., Yliskoski, M., Syrjänen, S., . . . Castrén, O. (1990). Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human

- papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis*, 17(1), 15-19.
- Teresa Shamah Levy, M. A. A., & Cuevas, C. y. L. (2015). Desnutrición y obesidad: doble carga en México. In (Vol. 16): Revista digital universitaria UNAM.
- Tomita, L. Y., D'Almeida, V., Villa, L. L., Franco, E. L., Cardoso, M. A., & Group, B. S. (2013). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism modify the association of dietary and circulating folate and vitamin B-6 with cervical neoplasia. *J Nutr*, 143(12), 2007-2014. doi:10.3945/jn.113.182212
- Tong, S. Y., Kim, M. K., Lee, J. K., Lee, J. M., Choi, S. W., Friso, S., . . . Lee, J. P. (2011). Common polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in women with low serum folate and vitamin B12. *Cancer Causes Control*, 22(1), 63-72. doi:10.1007/s10552-010-9675-6
- Trottier, H., & Franco, E. L. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24 Suppl 1, S1-15. doi:10.1016/j.vaccine.2005.09.054
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., . . . Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F
- Wang, X., Zhang, T., Zhao, X., Guan, Z., Wang, Z., Zhu, Z., . . . Niu, B. (2014). Quantification of folate metabolites in serum using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 962, 9-13. doi:10.1016/j.jchromb.2014.05.023
- Weinstein, S. J., Ziegler, R. G., Frongillo, E. A., Colman, N., Sauberlich, H. E., Brinton, L. A., . . . Bisogni, C. A. (2001). Low serum and red blood cell folate are moderately, but nonsignificantly associated with increased risk of invasive cervical cancer in U.S. women. *J Nutr*, 131(7), 2040-2048. doi:10.1093/jn/131.7.2040
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., Xi, L. F., Cherne, S., O'Reilly, S., . . . Koutsky, L. A. (2011). Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(4), 699-707. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1108
- Wright, T. C., Cox, J. T., Massad, L. S., Carlson, J., Twiggs, L. B., Wilkinson, E. J., & Workshop, A.-s. C. (2003). 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*, 7(3), 154-167. doi:10.1097/00128360-200307000-00002
- Yang, J., Yang, A., Wang, Z., Wang, W., Wang, Y., Wang, J., . . . Hao, M. (2018). Interactions between serum folate and human papillomavirus with cervical intraepithelial neoplasia risk in a Chinese population-based study. *Am J Clin Nutr*, 108(5), 1034-1042. doi:10.1093/ajcn/nqy160

Material suplementario

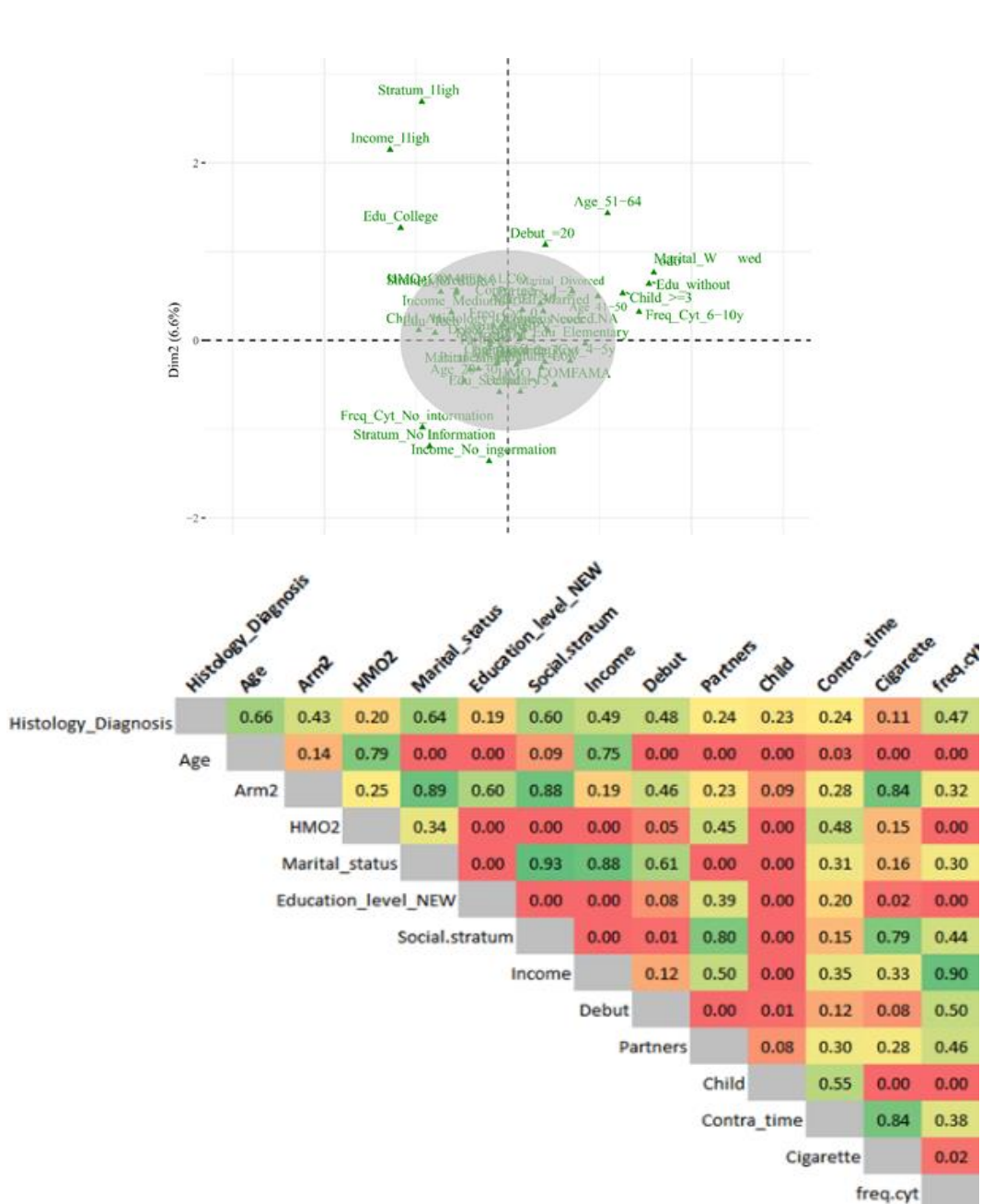


Figura suplementaria 1. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el 5MTHF. n=192/192

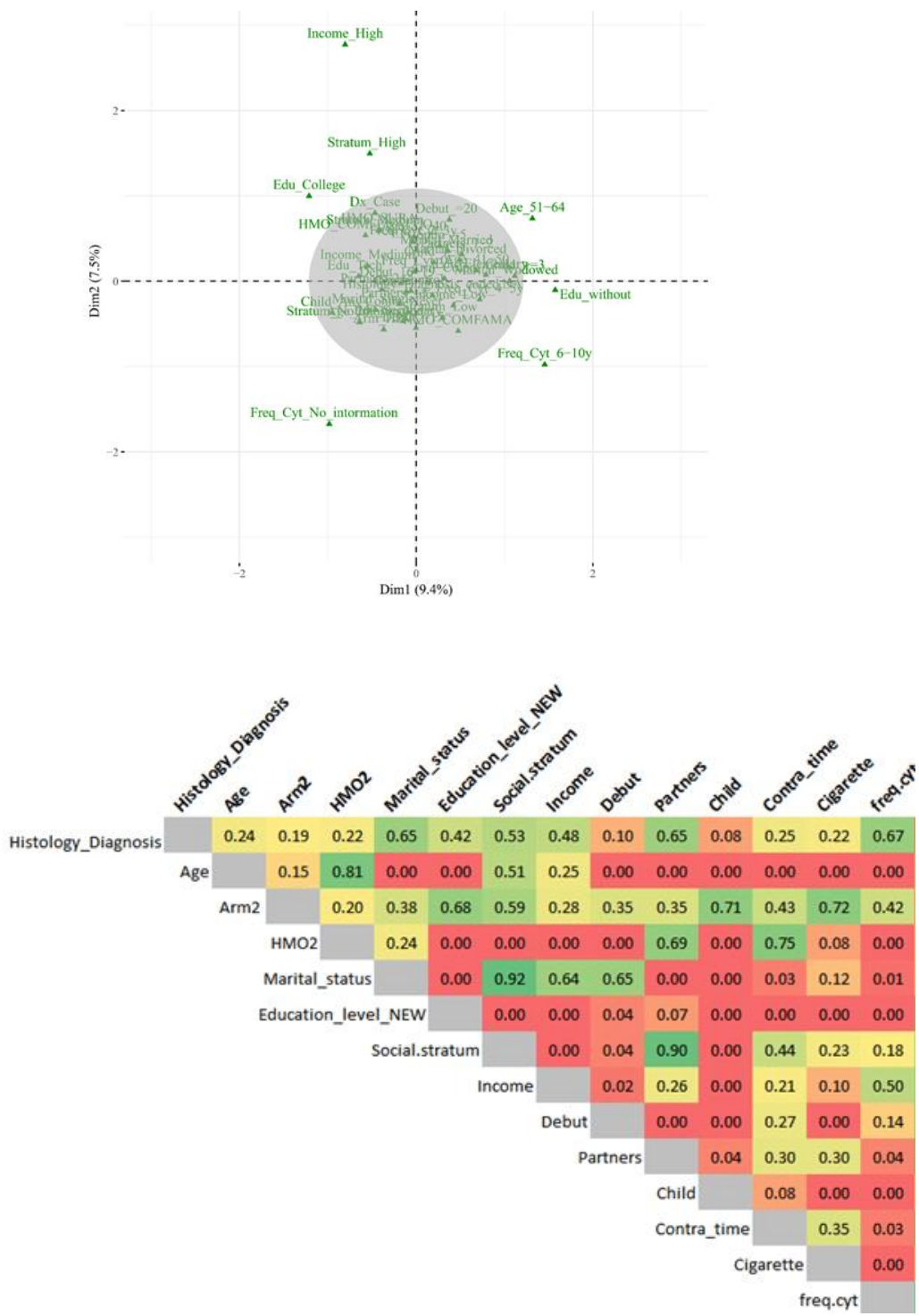


Figura suplementaria 2. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el Ácido fólico. n=283/283

Tabla suplementaria 1. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos en el análisis del 5MTHF

Características	Total	Controles	Casos	P
	N=384	N=192	N=192	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.2 [10.6]	32.0 [10.3]	32.3 [10.9]	0.8142
20-30	217 (56.5)	107 (55.7)	110 (57.3)	0.383
31-40	76 (19.8)	41 (21.4)	35 (18.2)	
41-50	61 (15.9)	33 (17.2)	28 (14.6)	
51-64	30 (7.8)	11 (5.7)	19 (9.9)	
EPS				
1	85 (22.1)	43 (22.4)	42 (21.9)	0.078
2	201 (52.4)	91 (47.4)	110 (57.3)	
3	98 (25.5)	58 (30.2)	40 (20.8)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	146 (38.0)	82 (42.7)	64 (33.3)	0.117
Divorciada/separada/viuda	32 (8.3)	17 (8.9)	15 (7.8)	
Soltera	206 (53.7)	93 (48.4)	113 (58.9)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	127 (33.1)	67 (34.9)	60 (31.3)	0.596
Secundaria completa	131 (34.1)	61 (31.8)	70 (36.5)	
Técnico - tecnológico/ universitario	126 (32.8)	64 (33.3)	62 (32.3)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.2 [3.1]	17.0 [3.2]	17.4 [3.0]	0.308
≥20	61 (15.9)	26 (13.5)	35 (18.2)	0.326
16-19	213 (55.5)	106 (55.2)	107 (55.7)	
≤15	110 (28.7)	60 (31.3)	50 (26.0)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	3.0 [1-98]	3.0 [1-98]	3.0 [1-98]	0.653
1-2	130 (33.9)	70 (36.5)	60 (31.3)	0.469
3-4	134 (34.9)	62 (32.3)	72 (37.5)	
≥5	120 (31.3)	60 (31.3)	60 (31.3)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1 [0-9]	1 [0-9]	1 [0-5]	0.944
0	115 (30.0)	60 (31.3)	55 (28.7)	0.716

1-2	194 (50.5)	93 (48.4)	101 (52.6)	
≥3	75 (19.5)	39 (20.3)	36 (18.8)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
Mediana [Rango]	2.96 [0-27]	3.0 [0-27]	2.54 [0-23]	0.913
0	53 (13.8)	27 (14.1)	26 (13.5)	0.970
<5	225 (58.6)	113 (58.9)	112 (58.3)	
≥5	106 (27.6)	52 (27.1)	54 (28.1)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	297 (77.3)	148 (77.1)	149 (77.6)	0.990
En el pasado	28 (7.3)	14 (7.3)	14 (7.3)	
Actualmente	59 (15.4)	30 (15.6)	29 (15.1)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	251 (65.4)	127 (66.2)	124 (64.6)	0.838
Una vez cada 2- 3 años	87 (22.7)	44 (22.9)	43 (22.4)	
Menos de una vez cada 4-5 años	26 (6.7)	13 (6.7)	13 (6.7)	
No sabe/ No responde	20 (5.2)	8 (4.2)	12 (6.3)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Tabla suplementaria 2. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos en el análisis del Ácido Fólico

Características	Total	Controles	Casos	P
	N=566	N=283	N=283	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.2 [10.4]	32.2 [10.1]	32.2 [10.7]	0.987
20-30	315 (55.7)	154 (54.4)	161 (56.9)	0.238
31-40	124 (21.9)	69 (24.4)	55 (19.4)	
41-50	85 (15.0)	44 (15.6)	41 (14.5)	
51-64	42 (7.4)	16 (5.6)	26 (9.2)	
EPS				
1	124 (21.9)	62 (21.9)	62 (21.9)	0.219
2	303 (53.5)	143 (50.5)	160 (56.5)	
3	139 (24.6)	78 (27.6)	61 (21.6)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	203 (35.9)	112 (39.6)	91 (32.2)	0.123
Divorciada/separada/viuda	51 (9.0)	27 (9.5)	24 (8.4)	
Soltera	312 (55.1)	144 (50.9)	168 (59.4)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	185 (32.7)	96 (33.9)	89 (31.5)	0.414
Secundaria completa	195 (34.5)	90 (31.8)	105 (37.1)	
Técnico - tecnológico/ universitario	186 (32.8)	97 (34.3)	89 (31.4)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.3 [3.3]	17.4 [3.6]	17.2 [3.0]	0.543
≥20	99 (17.5)	49 (17.3)	50 (17.7)	0.588
16-19	298 (52.7)	144 (50.9)	154 (54.4)	
≤15	169 (29.9)	90 (31.8)	79 (27.9)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	3 [1-98]	3 [1-98]	3 [1-98]	0.262
1-2	184 (32.5)	101 (35.7)	83 (29.3)	0.260
3-4	194 (34.3)	91 (32.2)	103 (36.4)	
≥5	188 (33.2)	91 (32.2)	97 (34.3)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1 [0-9]	1 [0-9]	1 [0-8]	0.868
0	162 (28.6)	85 (30.0)	77 (27.2)	0.758
1-2	296 (52.3)	145 (51.2)	151 (53.4)	

≥ 3	108 (19.1)	53 (18.7)	55 (19.4)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
Mediana [Rango]	3.0 [0-27]	3.0 [0-27]	2.5 [0-23]	0.7489
0	82 (14.5)	38 (13.4)	44 (15.6)	0.743
<5	327 (57.8)	167 (59.0)	160 (56.5)	
≥ 5	157 (27.7)	78 (27.6)	79 (27.9)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	435 (76.9)	223 (78.8)	212 (74.9)	0.499
En el pasado	39 (6.9)	19 (6.7)	20 (7.1)	
Actualmente	92 (16.3)	41 (14.5)	51 (18.0)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	379 (67.0)	199 (70.3)	180 (63.6)	0.323
Una vez cada 2- 3 años	118 (20.9)	53 (18.7)	65 (23.0)	
Menos de una vez cada 4-5 años	41 (7.2)	20 (7.1)	21 (7.4)	
No sabe/ No responde	28 (4.9)	11 (3.9)	17 (6.0)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Tabla suplementaria 3. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos en el análisis de la Vitamina B12

Características	Total	Controles	Casos	P
	N=118	N=59	N=59	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	34.7 [12.0]	34.6 [12.3]	34.8 [11.8]	0.1944
20-30	55 (46.6)	28 (47.5)	27 (45.8)	0.994
31-40	24 (20.3)	12 (20.3)	12 (20.3)	
41-50	24 (20.3)	12 (20.3)	12 (20.3)	
51-64	15 (12.7)	7 (11.9)	8 (13.6)	
EPS				
1	21 (17.8)	9 (15.3)	12 (20.3)	0.648
2	59 (50.0)	29 (49.2)	30 (50.9)	
3	38 (32.2)	21 (35.6)	17 (28.8)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	50 (42.4)	29 (49.2)	21 (35.6)	0.121
Divorciada/separada/viuda	11 (9.3)	7 (11.9)	4 (6.8)	
Soltera	57 (48.3)	23 (39.0)	34 (57.6)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	39 (33.1)	19 (32.2)	20 (33.9)	0.587
Secundaria completa	40 (33.9)	18 (30.5)	22 (37.3)	
Técnico - tecnológico/ universitario	39 (33.1)	22 (37.3)	17 (28.8)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.5 [3.5]	17.7 [3.8]	17.3 [3.1]	0.099
≥20	27 (22.9)	14 (23.7)	13 (22.0)	0.934
16-19	58 (49.2)	28 (47.5)	30 (50.9)	
≤15	33 (28.0)	17 (28.8)	16 (27.1)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	3 [1-98]	3 [1-98]	3 [1-15]	0.208
1-2	43 (36.4)	26 (44.1)	17 (28.8)	0.078
3-4	39 (33.1)	14 (23.7)	25 (42.4)	
≥5	36 (30.5)	19 (32.2)	17 (28.8)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1 [0-5]	1 [0-5]	1 [0-5]	0.463
0	38 (32.2)	22 (37.3)	16 (27.1)	0.183

1-2	58 (49.2)	24 (40.7)	34 (57.6)	
≥3	22 (18.6)	13 (22.0)	9 (15.3)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
Mediana [Rango]	2.4 [0-22]	2.1 [0-20]	2.5 [0-22]	0.947
0	16 (13.6)	8 (13.6)	8 (13.6)	0.916
<5	68 (57.6)	35 (59.3)	33 (55.9)	
≥5	34 (28.8)	16 (27.1)	18 (30.5)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	90 (76.3)	46 (78.0)	44 (74.6)	0.875
En el pasado	10 (8.5)	5 (8.5)	5 (8.5)	
Actualmente	18 (15.3)	8 (13.6)	10 (17.0)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	79 (67.0)	40 (67.8)	39 (66.1)	0.959
Una vez cada 2- 3 años	20 (17.0)	9 (15.3)	11 (18.6)	
Menos de una vez cada 4-5 años	11 (9.3)	6 (10.2)	5 (8.5)	
No sabe/ No responde	8 (6.8)	4 (6.8)	4 (6.8)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Tabla suplementaria 4. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos y excluidos para los análisis del 5MTHF

Características	Controles		P*	Casos		P*
	Incluidos N=210	Excluidos N=88		Incluidos N=201	Excluidos N=97	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Edad, años						
Media [DS]	32.0 [10.0]	32.0 [10.2]		32.2 [11.0]	31.6 [9.6]	
20-30	115 (54.8)	49 (55.7)	0.664	117 (58.2)	55 (56.7)	0.385
31-40	49 (23.3)	24 (27.2)		35 (17.4)	21 (21.6)	
41-50	35 (16.7)	10 (11.4)		28 (13.9)	16 (16.5)	
51-64	11 (5.2)	5 (5.7)		21 (10.5)	5 (5.2)	
EPS						
1	46 (21.9)	24 (27.3)	0.175	44 (21.9)	29 (29.9)	0.188
2	102 (48.6)	47 (53.4)		117 (58.2)	46 (47.4)	
3	62 (29.5)	17 (19.3)		40 (19.9)	22 (22.7)	
Estado Marital						
Casada/unión libre	85 (40.5)	30 (34.1)	0.584	69 (34.3)	28 (28.9)	0.520
Divorciada/separada/viuda	20 (9.5)	9 (10.2)		15 (7.5)	10 (10.3)	
Soltera	105 (50.0)	49 (55.7)		117 (58.2)	59 (60.8)	
Nivel educativo						
Sin educación - Primaria completa o incompleta	70 (33.4)	29 (32.9)	0.899	67 (33.4)	23 (23.7)	0.184
Secundaria completa	69 (32.8)	27 (30.7)		72 (35.8)	36 (37.1)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	71(33.8)	32 (36.4)		62 (30.8)	38 (39.2)	
Edad de la primera relación sexual, años						
Media [DS]	17.1 [3.5]	17.7 [3.5]		17.3 [3.0]	17.0 [3.0]	
≥20	29 (13.8)	20 (22.7)	0.126	35 (17.4)	15 (15.4)	0.885
16-19	116 (55.2)	40 (45.5)		112 (55.7)	54 (55.7)	
≤15	65 (31.0)	28 (31.8)		54 (26.9)	28 (28.9)	
Número de parejas sexuales						
Mediana [Rango]	3.0 [1-98]	3.0 [1-98]		3.0 [1-98]	4.0 [1-98]	
1-2	73 (34.8)	32 (36.4)	0.931	65 (32.3)	22 (22.7)	0.099
3-4	68 (32.4)	29 (32.9)		74 (36.8)	34 (35.0)	
≥5	69 (32.8)	27 (30.7)		62 (30.8)	42 (42.3)	
Número de hijos						
Mediana [Rango]	1.0 [0-9]	1.0 [0-4]	0.217	1.0 [0-5]	1.0 [0-8]	0.863
0	64 (30.5)	28 (31.8)		55 (27.4)	29 (29.9)	

1-2	102 (48.6)	49 (55.7)		108 (53.7)	49 (50.5)	
≥3	44 (20.9)	11 (12.5)		38 (18.9)	19 (19.6)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales						
Mediana [Rango]	3.0 [0-27]	3.0 [0-26.5]		2.5 [0-23]	2.0 [0-20]	
0	29 (13.8)	14 (15.9)	0.765	29 (14.4)	22 (22.7)	0.207
<5	124 (59.1)	48 (54.5)		116 (57.7)	51 (52.6)	
≥5	57 (27.1)	26 (29.6)		56 (27.86)	24 (24.7)	
Uso de cigarrillo						
Nunca	161 (76.7)	75 (85.2)	0.209	152 (75.6)	74 (76.3)	0.969
En el pasado	14 (6.6)	5 (5.7)		14 (7.0)	6 (6.2)	
Actualmente	35 (16.7)	8 (9.1)		35 (17.4)	17 (17.5)	
Frecuencia de realización de la citología						
Una o más veces cada año	140 (66.7)	67 (76.1)	0.227	129 (64.2)	60 (61.9)	0.928
Una vez cada 2- 3 años	48 (22.9)	11 (12.5)		45 (22.4)	25 (25.8)	
Menos de una vez cada 4-5 años	14 (6.6)	7 (8.0)		15 (7.5)	7 (7.2)	
No sabe/ No responde	8 (3.8)	3 (3.4)		12 (5.9)	5 (5.1)	

*Prueba Chi cuadrado de Pearson

Tabla suplementaria 5. Comparación de las características sociodemográficas y factores de riesgo de los individuos incluidos y excluidos para los análisis de la vitamina B12

Características	Controles		P*	Casos		P*
	Incluidos N=70	Excluidos N=228		Incluidos N=60	Excluidos N=238	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Edad, años						
Media [DS]	34.0 [11.7]	31.4 [10.1]		35.2 [11.8]	31.3 [9.4]	
20-30	33 (47.1)	131 (57.5)	0.143	27 (45.0)	145 (60.9)	0.093
31-40	17 (24.3)	56 (24.6)		12 (20.0)	44 (18.5)	
41-50	13 (18.6)	32 (14.0)		13 (21.7)	31 (13.0)	
51-64	7 (10.0)	9 (3.9)		8 (13.3)	18 (7.6)	
EPS						
1	14 (20.0)	56 (24.6)	0.235	12 (20.0)	61 (25.6)	0.248
2	32 (45.7)	117 (51.3)		31 (51.7)	132 (55.5)	
3	24 (34.3)	55 (24.1)		17 (28.3)	45 (18.9)	
Estado Marital						
Casada/unión libre	33 (47.1)	82 (36.0)	0.145	21 (35.0)	76 (31.9)	0.089
Divorciada/separada/viuda	8 (11.4)	21 (9.2)		5 (8.3)	20 (8.4)	
Soltera	29 (41.5)	125 (54.8)		34 (56.7)	142 (59.7)	
Nivel educativo						
Sin educación - Primaria completa o incompleta	24 (34.3)	75 (32.9)	0.975	17 (28.3)	73 (30.7)	0.914
Secundaria completa	22 (31.4)	74 (32.4)		23 (38.3)	85 (35.7)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	24 (34.3)	79 (34.7)		20 (33.4)	80 (33.6)	
Edad de la primera relación sexual, años						
Media [DS]	17.6 [3.6]	17.2 [3.4]		17.5 [3.3]	17.1 [3.0]	
≥20	15 (21.3)	34 (14.9)	0.321	14 (23.3)	36 (15.1)	0.304
16-19	37 (52.9)	119 (52.2)		30 (50.0)	136 (57.2)	
≤15	18 (25.7)	75 (32.9)		16 (26.7)	66 (27.7)	
Número de parejas sexuales						
Mediana [Rango]	3.0 [1-98]	3.0 [1-98]		3.0 [1-15]	3.5 [1-98]	
1-2	30 (42.9)	75 (32.9)	0.242	17 (28.3)	70 (29.4)	0.582
3-4	18 (25.7)	79 (34.7)		25 (41.7)	83 (34.9)	
≥5	22 (31.4)	74 (32.4)		18 (30.0)	85 (35.7)	
Número de hijos						
Mediana [Rango]	1.0 [0-5]	1.0 [0-9]	0.124	1.0 [0-5]	1.0 [0-8]	0.553
0	26 (37.1)	66 (28.9)		16 (26.7)	68 (28.6)	

1-2	28 (40.0)	123 (54.0)		35 (58.3)	122 (51.2)	
≥3	16 (22.9)	39 (17.1)		9 (15.0)	48 (20.2)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales						
Mediana [Rango]	2.2 [0-20]	3.0 [0-27]		2.5 [0-22]	2.5 [0-23]	
0	10 (14.3)	33 (14.5)	0.897	8 (13.3)	43 (18.1)	0.634
<5	39 (55.7)	133 (58.3)		34 (56.7)	133 (55.9)	
≥5	21 (30.0)	62 (27.2)		18 (30.0)	62 (26.0)	
Uso de cigarrillo						
Nunca	55 (78.6)	181 (79.4)	0.653	44 (73.3)	182 (76.5)	0.522
En el pasado	6 (8.5)	13 (5.7)		6 (10.0)	14 (5.9)	
Actualmente	9 (12.9)	34 (14.9)		10 (16.7)	42 (17.6)	
Frecuencia de realización de la citología						
Una o más veces cada año	47 (67.3)	160 (70.2)	0.302	40 (66.7)	149 (62.6)	0.756
Una vez cada 2- 3 años	12 (17.1)	47 (20.6)		11 (18.3)	59 (24.8)	
Menos de una vez cada 4-5 años	6 (8.6)	15 (6.6)		5 (8.3)	17 (7.1)	
No sabe/ No responde	5 (7.1)	6 (2.6)		4 (6.7)	13 (5.5)	

*Prueba Chi cuadrado de Pearson

Capítulo 3:

Asociación entre los niveles de folato y vitamina B12 determinados mediante radioinmunoensayo con lesiones cervicales de alto grado en mujeres VPH positivo con citología ASC-US

Introducción

La infección persistente con genotipos oncogénicos o de alto riesgo del Virus de Papiloma Humano (VPH) es la causa necesaria para el desarrollo de las lesiones precancerosas de alto grado o neoplasia intraepitelial cervical (NIC grado 2 -NIC2-, grado 3 -NIC3- y carcinoma in situ) y cáncer cervical (Muñoz et al., 2006; Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 2002). La alta prevalencia de infecciones por VPH en relación con la baja incidencia de NIC2+ y cánceres sugieren que la gran mayoría de estas infecciones no conducen al cáncer y que otros factores ambientales o del huésped como la inmunocompetencia, el uso de anticonceptivos hormonales, el tabaquismo, la paridad, el genotipo y la dieta modifican el riesgo de progresión de las infecciones por VPH (Goodman et al., 2007; Moscicki AB, 2020; Rositch et al., 2012; Schiffman et al., 2016; Stern, 2005; Winer et al., 2011).

Varios estudios han investigado la influencia del estado nutricional, específicamente la asociación entre los niveles séricos del folato y la vitamina B12 y el riesgo de adquirir una infección por VPH de alto riesgo o el riesgo de desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 o más severo (NIC2+) (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake et al., 2007). El folato también conocido como vitamina B9 es un micronutriente hidrosoluble el cual los humanos son incapaces de sintetizar, por lo tanto es un requerimiento dietético (Herrera M, 2016; Screen G, 2010). El

folato y la vitamina B12 son micronutrientes que comparten funciones (Carmel et al., 2003; Shane, 2008), ambos sirven como coenzimas en el metabolismo de un carbono y sus funciones más importantes pueden dividirse en dos vías principales. La primera, la síntesis de timidilato, un nucleótido del ADN o para la síntesis de purinas; y la segunda, la vitamina B12 actúa como cofactor de la metionina sintasa (MS), que cataliza la remetilación de la homocisteína en metionina, la cual a su vez es el precursor de la S-adenosil metionina (SAM), donante universal de los grupos metilo los cuales participan en cientos de reacciones incluyendo la metilación del ADN, una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas hasta la fecha (Rampersaud et al., 2002; Selhub et al., 2009). Varios factores afectan la absorción de estos micronutrientes, afectando las concentraciones circulantes; entre ellos se encuentra: el consumo de alcohol, las enfermedades hepáticas, el consumo de anticonceptivos orales, el metrotexato, el trimetoprim, algunos anticonvulsivantes y las sulfazalazinas; así como el consumo de tabaco (A. Brito, Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo, 2012; Herrera M, 2016).

En estudios epidemiológicos como el realizado por Piyathilake y colaboradores en una cohorte de mujeres con citología anormal (ASC-US y LIEBG) de Birmingham, Alabama, observaron que las concentraciones circulantes más altas de folato se asociaron con una menor probabilidad de adquirir una infección por VPH de alto riesgo y una menor probabilidad de tener una infección persistente, y cuando se está infectado, una mayor probabilidad de eliminar la infección (Piyathilake et al., 2004). En un trabajo posterior en la misma población, los investigadores evaluaron si las concentraciones circulantes de folato modificaban el riesgo de NIC2+ asociado a diferentes genotipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR); los investigadores observaron que las mujeres con niveles de folato más bajo y VPH positivo para cualquiera de

los 13 tipos de alto riesgo, tenían el doble de probabilidades de tener NIC2+ (Piyathilake et al., 2007). Más importante aún, también demostraron que las mujeres con bajos niveles de folato y positivas para el VPH-16 tienen nueve veces más probabilidades de ser diagnosticadas con NIC2+ que las mujeres VPH 16 negativo (positivas para los otros genotipos de VPH-AR) que tienen niveles normales, lo que sugiere un efecto específico de los niveles de folato en la infección por el VPH 16, el genotipo más comúnmente encontrado y más carcinogénico (Piyathilake et al., 2007). En 1996, el gobierno colombiano ordenó la fortificación de la harina de trigo con vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido fólico y hierro para prevenir y controlar las deficiencias de micronutrientes en el país (Decreto número 1944 de 1996. Presidencia de Colombia). Sin embargo, el impacto de este programa de fortificación en Colombia no se estudia ni se informa adecuadamente especialmente en la población adulta.

El propósito de este análisis fue evaluar las asociaciones entre las concentraciones séricas de folato y vitamina B12 y el riesgo de NIC2+ en un subconjunto de mujeres VPH positivo entre 20 y 69 años con citología ASC-US residentes en la ciudad de Medellín y el área metropolitana del Valle de Aburrá, utilizando dos métodos de cuantificación de los micronutrientes, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y el radioinmunoensayo.

Métodos

Diseño del estudio

Este es un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín- Colombia, que participaron en el ensayo clínico pragmático ASCUS-COL. El ASCUS-COL fue descrito con detalle en el capítulo dos de esta tesis.

Contexto del estudio

El contexto de ASCUS-COL, los tiempos de seguimiento y la recolección de los datos fueron descritos en el capítulo dos de esta tesis.

Participantes

Las características de las participantes incluidas en el ASCUS-COL también fueron descritas en el capítulo anterior. Brevemente, se incluyeron mujeres entre 20 y 69 años, con una citología ASC-US por primera vez residentes en la ciudad de Medellín o el Área Metropolitana del valle de Aburrá. Fueron excluidas las mujeres que tenían una citología anormal previa o si habían recibido tratamiento por patología cervical previamente, las mujeres con alguna discapacidad mental que les permitiera comprender el consentimiento informado, mujeres embarazadas y mujeres con condiciones de inmunosupresión o que planeaban mudarse fuera del área de estudio.

Los casos y controles para este análisis fueron seleccionados entre las mujeres VPH positivo de acuerdo al resultado de la prueba de VPH de la visita de reclutamiento (línea de base o cita 00) quienes además tenían por lo menos un resultado de biopsia durante el período de seguimiento. Estas biopsias fueron releídas por un panel de patólogos expertos de manera independiente. Los casos fueron pareados por edad (± 7 años) y tiempo al diagnóstico (± 6

meses) con los controles. Los casos y controles fueron pareados por edad y tiempo al diagnóstico.

Definición del desenlace (Lesiones de alto grado del cérvix)

Para definir el desenlace se tuvieron en cuenta los resultados de las biopsias tomadas en colposcopia a las mujeres participantes en el estudio ASCUS-COL en cualquier momento del seguimiento o visita de salida. Los investigadores del ASCUS-COL conocieron que las biopsias tomadas durante el seguimiento obedecían la visualización de cambios en el cérvix sugestivos de una lesión durante la colposcopia; mientras que las biopsias tomadas en la visita de salida fueron producto de una colposcopia estrictamente controlada por el personal del estudio para asegurar la calidad de dicho procedimiento. Este procedimiento fue realizado por una ginecóloga colposcopista entrenada y calificada a la cual se le indicó que debía tomar 2 biopsias de las lesiones observadas y una biopsia aleatoria del epitelio aparentemente sano; en caso de no observar ninguna lesión, la ginecóloga debió tomar 2 biopsias aleatorias epitelio aparentemente sano. Todos los resultados de las biopsias, en adelante diagnósticos histológicos, fueron recuperados de los laboratorios de patología a través de los registros de las IPSs, EPSs o búsqueda manual en registros clínicos. Entre las 2.661 participantes del ASCUS-COL sin importar el estatus de VPH en la línea de base, 1.374 mujeres tenían al menos un diagnóstico histológico (298 en la visita de salida) de los cuales 540 fueron insatisfactorios / NIC1+ y el resto negativos. Un panel externo de expertos (dos patólogos) revisó a ciegas e independientemente el 90% de todos los casos insatisfactorios / NIC1+ y el 20% de los diagnósticos negativos seleccionados al azar del seguimiento y el 96% de todos los diagnósticos de la visita de salida. Para los diagnósticos finales de aquellas participantes cuya patología no fue revisada por el panel, se utilizó el diagnóstico emitido por el laboratorio de patología.

Definición de casos:

El desenlace primario de este análisis, son las mujeres con diagnóstico de lesiones de alto grado, es decir con el diagnóstico histológico confirmado de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o más severo (NIC2+) entre los que se incluyen NIC2, NIC3 o carcinoma *in situ*, carcinoma escamocelular, y adenocarcinomas que fueron diagnosticados en las mujeres del proyecto ASCUS-COL.

Definición de controles:

Mujeres sin lesiones del cérvix o con lesiones de bajo grado. Es decir, con diagnóstico histológico confirmado Negativo para malignidad o de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1 (NIC1) que fueron diagnosticados en las mujeres del proyecto ASCUS-COL.

Métodos de laboratorio**Test de VPH**

Como se mencionó en el capítulo dos, la prueba Captura de Híbridos 2 (CH2) de la casa comercial Qiagen HPV (QIAGEN, Gaithersburg, MD, EE. UU.) fue utilizada para determinar el estatus de VPH en los exfoliados cervicales tomados en la visita de ingreso al estudio ASCUS-COL. Estas muestras fueron recolectadas usando el citocepillo (HC Cervical Sampler) las cuales posteriormente fueron transferidas a un tubo que contenía 1 ml de Specimen Transport Medium™ (STM) y procesadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Medición de micronutrientes

En este capítulo se presentan los resultados de las mediciones de las concentraciones circulantes de los micronutrientes realizadas por dos técnicas. Las concentraciones fueron estimadas en el suero recolectado en la línea de base (visita de ingreso) al estudio ASCUS-COL.

- **Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)**

Con esta técnica se determinaron las concentraciones circulantes de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12. La medición de los micronutrientes se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander como lo describió previamente (X. Wang et al. / J. Chromatogr. B 962 .2014). En el capítulo dos se describió con detalle la preparación de estándares, calibradores y curvas de calibración; las condiciones del equipo y preparación de la fase móvil; la preparación de las muestras y la estimación de la concentración de los micronutrientes.

- **Radioinmunoensayo**

Con esta técnica se determinaron las concentraciones circulantes de folato total y vitamina B12. Después de la recolección, todas las muestras de sangre se procesaron dentro de los 20 primeros minutos posteriores a la recolección y se conservaron a -80 ° C hasta que se realizaron los ensayos. Las concentraciones de folato sérico y vitamina B12 se determinaron en sueros con el estuche comercial SimulTRAC-SNB Vitamin B12 / Folate RIA utilizando protocolos previamente establecidos y validados en el Laboratorio de Ciencias de la Nutrición en la Universidad de Alabama en Birmingham. El estuche comercial SimulTRAC-SNB es un radioinmunoensayo que cuantifica la vitamina B12 y el folato en suero o plasma humano. Brevemente, el radioinmunoensayo es una técnica competitiva en la que la molécula antigénica

que se quiere determinar compete por unirse a un anticuerpo específico con un trazador radioactivo. Se basa en la reacción ANTÍGENO – ANTICUERPO, en la que el antígeno se une a su anticuerpo específico sin establecer enlaces químicos, sino que se unen por fuerzas débiles tales como atracciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas, etc. La formación de complejos radioactivos (Ag-Ac) varía en función de la concentración del antígeno no marcado: a mayor concentración del antígeno no marcado, mayor formación de complejos antígeno-anticuerpo no marcados, y menor formación de complejos radioactivos, y viceversa. En este caso, el folato y la vitamina B12 sin marcar compiten con sus equivalentes marcados por el limitado número de lugares de unión disponibles en su ligadora específica, con lo que se reduce la cantidad ligada de folato o vitamina B12 marcadas. Por lo tanto, el nivel de radiactividad ligada es inversamente proporcional a la concentración en la muestra del individuo. En el estuche comercial SimulTRAC-SNB, los niveles de folato y vitamina B12 se determinan simultáneamente en un único tubo. Los trazadores de folato y vitamina B12, los fijadores y los estándares se suministran en forma combinada. El folato (como ácido pteroilglutámico –PGA) se utiliza como estándar y trazador en una mezcla de incubación a pH 9.5. A este pH de fijación tanto el ácido 5-metiltetrahidrofólico (MTFA) en la muestra del individuo como el PGA en los estándares tienen igual afinidad por el fijador de la leche. Los dos marcadores, el ^{57}Co para la vitamina B12 y el ^{125}I para el folato, producen niveles de energías fácilmente separados por muchos contadores comerciales de dos canales.

Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra y el análisis del poder para probar esta hipótesis del estudio fue realizada con el software STATA 13 (StataCorp LLC, Texas, EE. UU.) Para los cálculos de

análisis de potencia y tamaño de muestra, se asumieron las siguientes condiciones: alpha (α) se fijó en el nivel de 0.05. La proporción de controles con niveles bajos de micronutrientes se tomó de las siguientes referencias: Para la vitamina B12 se consideró la publicación realizada por Shamah-Levy (Teresa Shamah-Levy 2015) donde se reportó que la deficiencia de esta vitamina alcanza cifras entre el 8 y 15% en mujeres mexicanas. Para los niveles de folatos no se encontraron datos colombianos; se tomó como referencia los datos publicados por Shamah-Levy donde se reporta prevalencia de deficiencia de folatos del 2% en población mexicana. Debido a la poca consistencia de este dato, a la heterogeneidad de poblaciones donde se realizaron y a los diferentes diseños de los estudios tenidos en cuenta, se hicieron cálculos para los diferentes modelos. Los cálculos de tamaño de muestra se realizaron con *odds ratios* previstos desde 1.25 hasta 2 asumiendo una potencia de 80% con niveles de confianza de 0.05.

El número de mujeres VPH-AR positivo en el reclutamiento con lesiones cervicales de alto grado fue de 185). Asumiendo un poder mínimo de 80% cuando el *odd ratio* hipotético es igual o mayor a dos y la proporción de bajos niveles de micronutrientes del 15% o mayor. El tamaño de muestra obtenido de 185 casos y 185 controles, aseguraría un poder del 75.4%. Sin embargo, dado que para las mediciones con el radioinmunoensayo se tuvieron que excluir 16 casos y 16 controles ya que no se tuvo muestra de suero disponible, y se pudieron determinar las concentraciones de los micronutrientes en 169 casos y 169 controles, el poder de este análisis es del 71.5%. Para las mediciones realizadas con el HPLC, por razones técnicas solo se logró determinar la concentración de 5MTHF en 272 muestras, 136 casos y 136 controles; el ácido fólico en 342 muestras, 171 casos y 171 controles y para la vitamina B12 solo se determinaron en 74 muestras, 37 casos y 37 controles. Bajo estas circunstancias el estudio tuvo un poder del

62% para los análisis con el 5MTHF, del 72% para los análisis con ácido fólico, y sólo del 21.6% para los análisis con la vitamina B12.

Operacionalización de las variables cuantitativas

De acuerdo a la historia natural de la enfermedad y por su relación con el posible desenlace (NIC2+) o la exposición (niveles de micronutrientes) se consideraron la edad al ingreso al estudio, la edad de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales, el número de hijos nacidos vivos, y el uso de anticonceptivos hormonales como posibles factores de confusión.

La edad fue categorizada por décadas, la edad de la primera relación sexual se categorizó en tres grupos, las que tuvieron la primera relación sexual después de los veinte años (≥ 20 años), entre los 16-19 años, y a los 15 años o antes (≤ 15). El número de parejas sexuales en toda la vida fue categorizado así: 1-2 parejas, 3-4 parejas, y ≥ 5 parejas. El número de hijos nacidos vivos se categorizó en: sin hijos, 1-2 hijos, y ≥ 3 . Por último, el uso de anticonceptivos hormonales se categorizó de la siguiente manera: no uso durante la vida, menos de cinco años de uso, o cinco años o más de uso. Las concentraciones de micronutrientes se ordenaron en tres categorías, y los sujetos se clasificaron con concentraciones normales, posiblemente deficientes, y deficientes según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) así: 6-20 ng/mL, 3.0-5.9 ng/mL y < 3 ng/mL para el folato y sus metabolitos y > 200 -996 pg/mL, 150-200 pg/mL y < 150 pg/mL para la vitamina B12.

Análisis estadístico

Inicialmente se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables sociodemográficas y factores de riesgo incluyendo todos los 185 casos NIC2+ diagnosticados en el estudio ASCUS-COL y sus correspondientes 185 controles que es el tamaño de muestra que garantizaba un poder

del 74.5% asumiendo una exposición de bajos niveles de folato en el 15% de la población. También se llevó a cabo el mismo análisis excluyendo los casos y controles que no tuvieron la muestra de suero disponible para las cuantificaciones con el radioinmunoensayo (n=169 casos y n=169 controles), y los casos y controles en donde no funcionó la técnica por HPLC, 5MTHF n=136 casos y n=136; ácido fólico n=171 casos y n=171 controles; y n=37 casos y n=37 controles para la vitamina B12). Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U Mann-Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, y medianas respectivamente. Las medianas de las concentraciones de micronutrientes entre casos y controles fueron comparadas usando la prueba U Mann-Whitney o Kruskal Wallis de acuerdo al tipo de variable. Se compararon las concentraciones de los micronutrientes deficientes con las probablemente deficientes y normales combinadas. Para estimar asociación de los niveles de micronutrientes con las lesiones cervicales de alto grado (NIC2+), se usó un análisis de regresión logística no condicional obteniendo las respectivas razones de *odds ratio* (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%. Los modelos de regresión logística se especificaron mediante un indicador binario de NIC2+ (sí / no) como variable dependiente y las concentraciones séricas folato total y vitamina B12 para el caso del radioinmunoensayo y de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12 para el caso de las mediciones realizadas con el HPLC como predictor independiente de interés primario. Para llevar a cabo los modelos y determinar las variables por las cuales ajustarlo, se realizaron análisis de correspondencia y matrices de asociación con todas las variables sociodemográficas y factores de riesgo para la infección por VPH y NIC incluidas en los cuestionarios del estudio, figuras 1, 2,3 y 4.

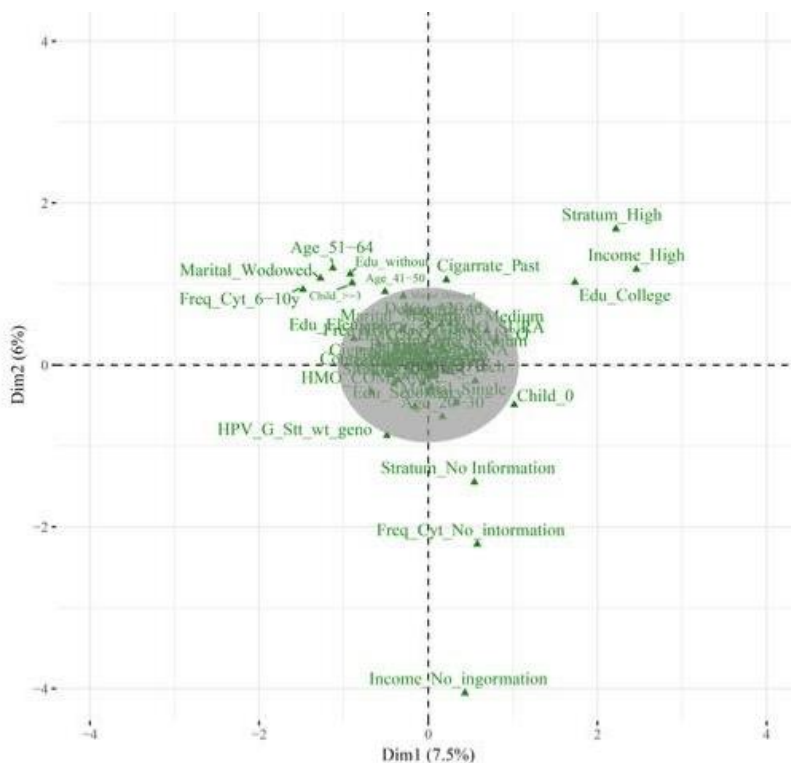


Figura 1. Análisis de correspondencia que incluye información de 185 casos y 185 controles.

En este gráfico se encuentran representadas las variables sociodemográficas y factores de riesgo categorizadas. Las categorías que se ubican cerca al origen del gráfico (círculo gris), son categorías que no contribuyen a la explicación del modelo. Estas categorías no están asociadas a otras variables, en esta región del plano nada se asocia con nada. Las categorías por fuera del origen del gráfico, contribuyen a la explicación del modelo y fueron tenidas en cuenta para ajustar el mismo.

	Histology	Age	Arm2	HMO2	Marital_status	Education_level	Social.stratum_DANE	Income	Debut	Partners	Child	Contra_time	Cigarette	freq.cyt
Histology		0.17	0.19	0.32	0.18	0.19	0.24	0.21	0.08	0.11	0.43	0.05	0.70	0.42
Age			0.96	0.66	0.00	0.00	0.30	0.72	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
Arm2				0.70	0.63	0.73	0.37	0.38	0.47	0.63	0.35	0.34	0.73	0.72
HMO2					0.03	0.00	0.00	0.00	0.07	0.63	0.00	0.01	0.05	0.01
Marital_status						0.34	0.65	0.68	0.48	0.00	0.00	0.51	0.34	0.00
Education_level							0.00	0.00	0.05	0.18	0.00	0.00	0.01	0.19
Social.stratum_DANE								0.00	0.09	0.18	0.03	0.07	0.04	0.13
Income									0.56	0.62	0.00	0.03	0.12	0.02
Debut										0.00	0.03	0.92	0.10	0.11
Partners											0.61	0.50	0.05	0.22
Child												0.20	0.03	0.00
Contra_time													0.36	0.23
Cigarette														0.10
freq.cyt														

Figura 2. Matriz de asociación que incluye información de 185 casos y 185 controles.

En este gráfico se presenta la matriz de asociación la cual corresponde a pruebas Chi cuadrado pareadas. Se observa el respectivo valor p para cada comparación entre las variables. El color rojo indica asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Las variables que mostraron asociación fueron tenidas en cuenta como variables a incluir en el modelo.

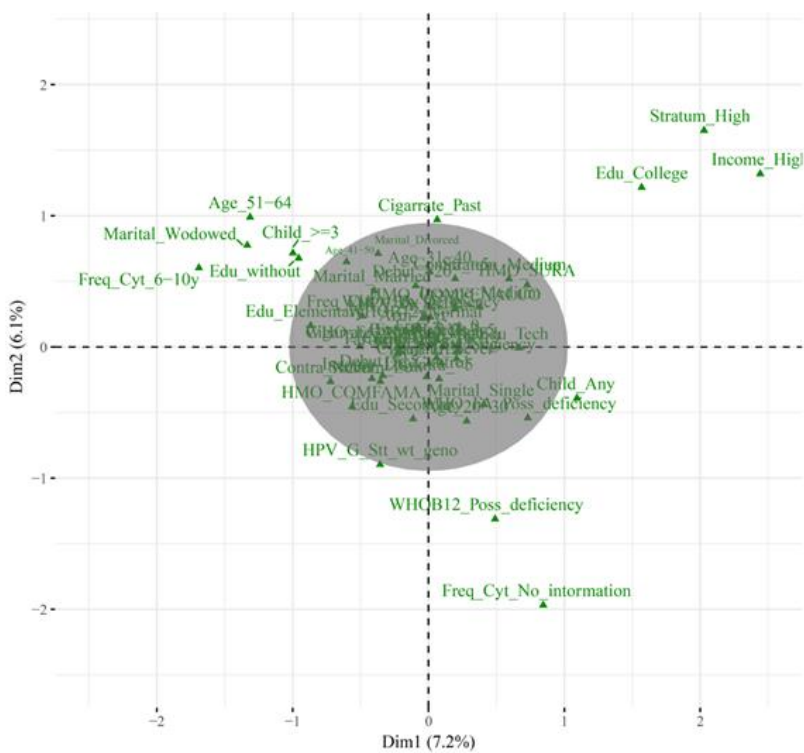


Figura 3. Análisis de correspondencia que incluye información de 169 casos y 169 controles.

En este gráfico se encuentran representadas las variables sociodemográficas y factores de riesgo categorizadas. Las categorías que se ubican cerca al origen del gráfico (círculo gris), sin categorías que no contribuyen a la explicación del modelo. Estas categorías no están asociadas a otras variables. En esta región del plano nada se asocia con nada. Las categorías por fuera del origen, contribuyen a la explicación del modelo y fueron tenidas en cuenta como variables a incluir en el modelo.

	Histology	Age	Arm	HMO	Marital_status	Education_level	Social.stratum_DANE	Income	Debut	Partners	Child	Contra_time	Cigarette	freq.cyt
Histology		0,18	0,20	0,45	0,18	0,32	0,33	0,28	0,08	0,13	0,21	0,01	0,74	0,27
Age			0,91	0,76	0,00	0,00	0,41	0,52	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,00
Arm				0,82	0,63	0,59	0,26	0,38	0,36	0,72	0,63	0,41	0,68	0,90
HMO					0,09	0,00	0,00	0,00	0,10	0,30	0,00	0,02	0,09	0,20
Marital_status						0,32	0,57	0,51	0,45	0,00	0,00	0,50	0,29	0,00
Education_level							0,00	0,00	0,03	0,26	0,00	0,00	0,00	0,05
Social.stratum_DANE								0,00	0,23	0,19	0,03	0,07	0,01	0,13
Income									0,50	0,40	0,00	0,02	0,12	0,07
Debut										0,00	0,05	0,76	0,12	0,14
Partners											0,82	0,49	0,04	0,41
Child												0,43	0,02	0,00
Contra_time													0,52	0,12
Cigarette														0,02
freq.cyt														

Figura 4. Matriz de asociación que incluye información de 169 casos y 169 controles.

En este gráfico se presenta la matriz de asociación la cual corresponde a pruebas Chi cuadrado pareadas. Se observa el respectivo valor p para cada comparación entre las variables. El color rojo indica asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Las variables que mostraron asociación fueron tenidas en cuenta como variables a incluir en el modelo.

Los análisis de correspondencia y matrices de asociación se realizaron tanto para los 185 casos y 185 controles seleccionados para la determinación de los micronutrientes por HPLC (figuras 1-4) así como para los casos y controles demuestras seleccionadas para la determinación de la concentración de los micronutrientes por el método del radioinmunoensayo (n=169 casos y n=169 controles). También se realizaron para los casos y controles con resultado por HPLC para los micronutrientes 5MTHF (n=136/136) y Ácido fólico (n=171/171) de manera independiente (figuras suplementarias 1 y 2).

El efecto de los niveles de los micronutrientes fue estimado mediante análisis bivariados categorizando la variable de acuerdo a las recomendaciones de la OMS, valores normales posiblemente deficientes y deficientes tanto para el 5MTHF, el ácido fólico como para la vitamina B12. Posteriormente, se evaluó el efecto de los niveles de los micronutrientes ajustado por los cofactores de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de correspondencia y matriz de asociación; las variables que se asociaron significativamente y son explicativas del modelo se eligieron para ajustar el modelo. Las variables fueron: edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos hormonales, y frecuencia de realización de la citología. Los resultados de los análisis de correspondencia y matrices de asociación no fueron diferentes si se compara el análisis que incluye los 298 casos y 298 controles seleccionados para la determinación de los micronutrientes con los análisis para cada micronutriente realizados con el número de casos y controles con resultado disponible. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software STATA 13 (StataCorp LLC, Texas, EE. UU.) y el paquete estadístico R (Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>).

Consideraciones éticas

Las consideraciones éticas tenidas en cuenta para este análisis fueron las mismas descritas en el capítulo dos. El proyecto de investigación en el que está enmarcada esta tesis cuenta con el aval del Comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) (Resolución 08-036-171) y la Escuela de Medicina (Resolución 004/2008) de la Universidad de Antioquia. Todas las mujeres del ASCUS-COL incluidas en este análisis firmaron el consentimiento informado que incluía la autorización para utilizar sus muestras y datos en futuras investigaciones. A las mujeres a las cuales se les detectó una lesión NIC2+ durante el seguimiento del estudio, se les realizó tratamiento inmediato por parte de sus EPS. A aquellas participantes a las cuales se les detectó la lesión solo hasta la relectura de las placas histológicas por el panel de patólogos expertos, se les remitió inmediatamente por parte del grupo de investigación a sus EPS para que recibieran el respectivo tratamiento.

Resultados

Participantes

Entre las mujeres VPH-AR positivo en la visita 00 del estudio, 734 resultados de patología fueron recuperados por personal del ASCUS-COL de laboratorios clínicos y EPSs los cuales además fueron releídos por un panel de patólogos expertos. Entre las 734 participantes con resultado de patología, se observaron 185 casos cuyo peor diagnóstico fue lesiones NIC2+ y 549 \leq NIC1 durante todo el período de seguimiento y visita de salida. Se seleccionaron 185 participantes con diagnóstico NIC2+ como casos y 185 participantes con diagnóstico \leq NIC1 como controles para cumplir los propósitos de este análisis. Para los análisis de cuantificación realizados con el radioinmunoensayo, 18 casos y 18 controles tuvieron que ser eliminados ya que

no se encontró suero disponible en la línea de base para los análisis de laboratorio y por esa razón, finalmente 169 mujeres con NIC2+ (125 NIC2, 40 NIC3 y 4 cánceres) y 169 mujeres \leq NIC1 (130 NEG y 39 NIC1) fueron incluidas en este análisis como se muestra en la figura 5. La cuantificación de los micronutrientes con la técnica de HPLC pudo ser realizada en las siguientes muestras: el 5MTHF pudo ser determinado en un total de 136 casos (100 NIC2, 34 NIC3, y 2 cánceres) y sus respectivos controles (102 NEG y 34 NIC1); de ácido fólico en un total de 171 casos (126 NIC2, 41 NIC3, y 4 cánceres) y sus respectivos controles (131 NEG y 40 NIC1) y la vitamina B12 en un total de 37 casos (29 NIC2, 7 NIC3, y 1 cáncer) y sus respectivos controles (32 NEG y 5 NIC1), figura 6.

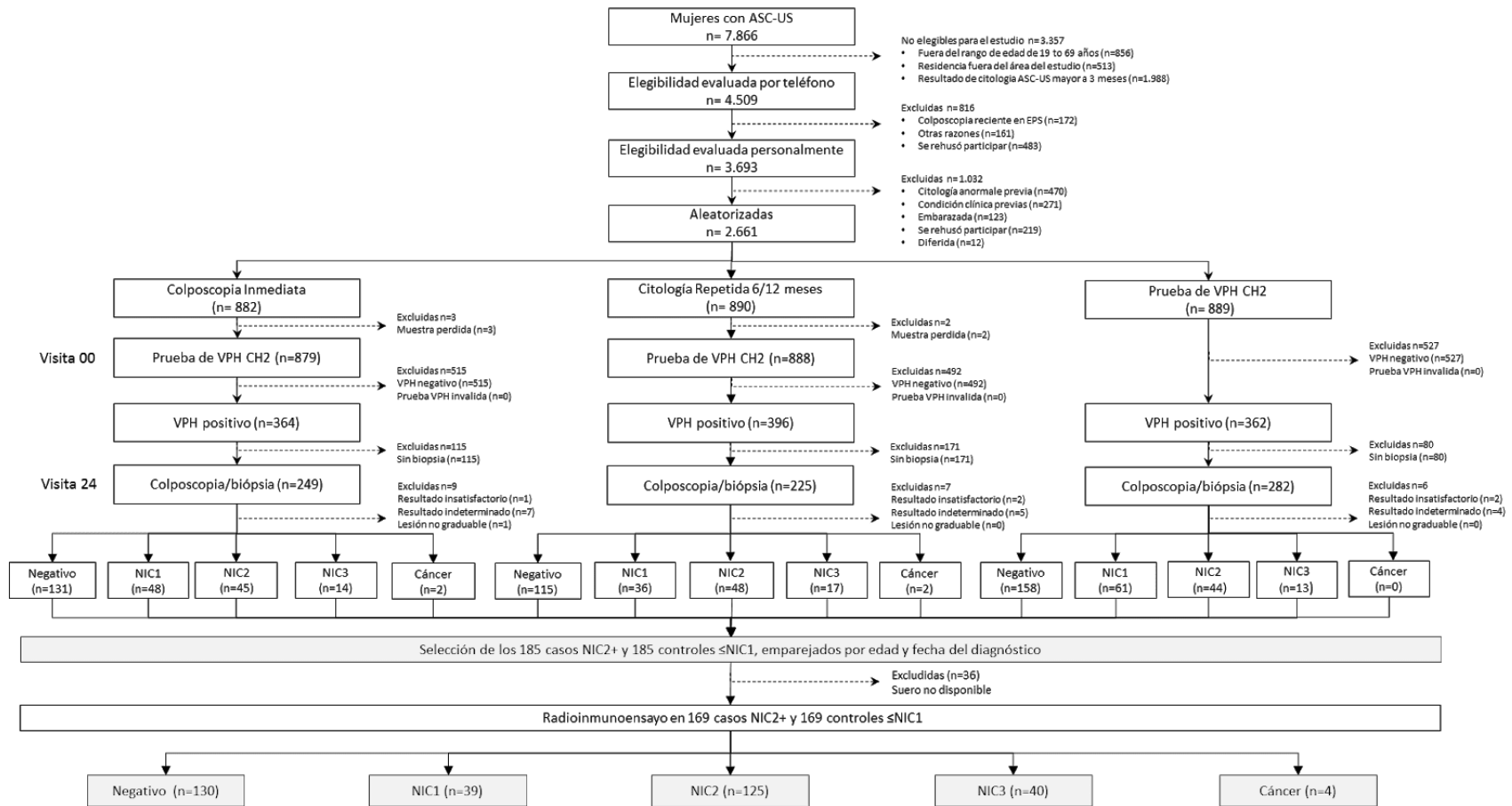


Figura 5. Flujograma del estudio ASC-US y selección de muestras para la determinación de las concentraciones de micronutrientes en suero usando la técnica del radioinmunoensayo.

ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado, CH2: Prueba captura de híbridos 2, VPH: Virus Papiloma Humano. Se indica el número de mujeres con citología ASC-US aleatorizadas en el ASCUS-COL, el número de mujeres VPH+ en la línea de base (visita 00) para estrategia de manejo, así como el número de mujeres con alguna colposcopia biopsia recuperadas y el peor diagnóstico para cada una durante el estudio. Finalmente se indica el número de mujeres a las cuales se les determinaron los niveles de los micronutrientes con el radioinmunoensayo.

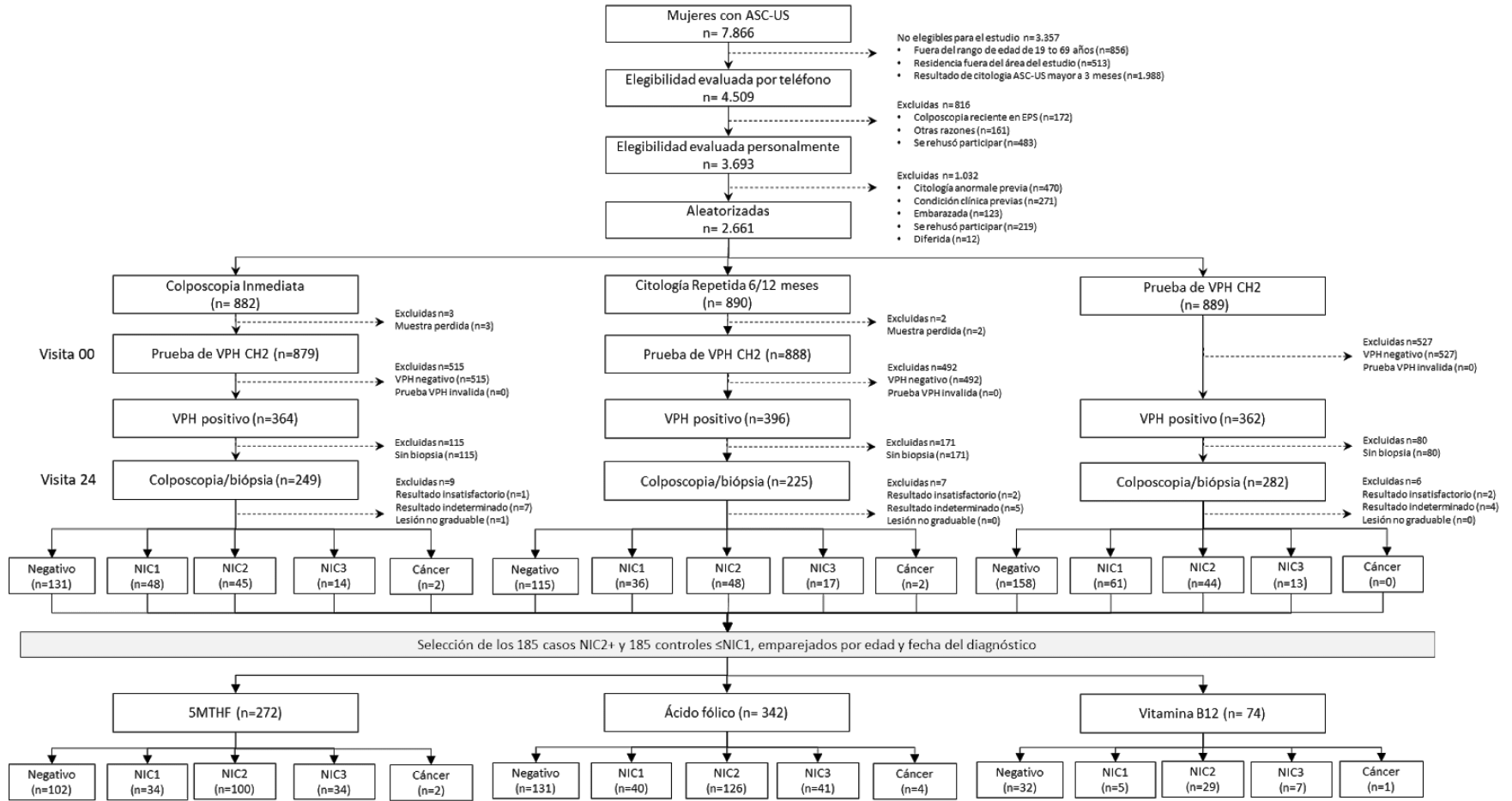


Figura 6. Flujograma del estudio ASC-US y selección de muestras para la determinación de las concentraciones de micronutrientes en suero usando la técnica HPLC.

ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado, CH2: Prueba captura de híbridos 2, VPH: Virus Papiloma Humano. Se indica el número de mujeres con citología ASC-US aleatorizadas en el ASCUS-COL, el número de mujeres VPH+ en la línea de base (visita 00) para estrategia de manejo, así como el número de mujeres con alguna colposcopia biopsia recuperadas y el peor diagnóstico para cada una durante el estudio. Finalmente se indica el número de mujeres a las cuales se les determinaron los niveles de los micronutrientes con el HPLC.

Para efectos de organización y mejor entendimiento, de este punto en adelante se presentarán primero los resultados obtenidos por el radioinmunoensayo y después los obtenidos por el método HPLC.

Características de las participantes de las que se obtuvieron concentraciones de los micronutrientes con el método radioinmunoensayo

En la tabla 1 se describen la distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo conocidos para el desarrollo de lesiones NIC2+ en los casos y en los controles incluidos en este estudio. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles para las variables sociodemográficas (edad, EPS, estado marital y nivel educativo). La media de la edad fue 32 años (DS 9.5). Casi la mitad de las mujeres estaban aseguradas en la EPS 2, el 51.8% estaban solteras. El 32.2% solo con educación primaria o sin educación. Más de la mitad de las mujeres tuvieron su primera relación sexual entre los 16 y 19 años (54.1%); no hubo diferencias en el número de compañeros sexuales durante toda la vida (29.9% entre 1 y 2, el 32.0% entre 3 y 4, y el 38.1% 5 o más parejas). El cincuenta y seis por ciento tenía entre 1 y 2 hijos, el 17.5% tres hijos o más. El uso de anticonceptivos hormonales fue estadísticamente diferente entre casos y controles; casi el 20% de los controles nunca los habían usado mientras que el 39% de los casos los habían usado durante 5 años o más ($p=0.012$). La mayoría de las mujeres (75%) nunca habían fumado cigarrillos y en cuanto a la frecuencia en la realización de la citología, el 63% de las mujeres se la realizan una o más veces al año.

Tabla 1. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles

Características	Controles	Casos	Total	P
	N=169	N=169	N=338	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.1[9.5]	32.2 [9.6]	32.2 [9.5]	0.937
20-30	89 (52.7)	90 (53.3)	179 (53.0)	0.184
31-40	43 (25.4)	49 (29.0)	92 (27.2)	
41-50	32 (18.9)	20 (11.8)	52 (15.4)	
51-64	5 (3.0)	10 (5.9)	15 (4.4)	
EPS				
1	38 (22.5)	48 (28.4)	86 (25.4)	0.453
2	80 (47.3)	75 (44.4)	155 (45.9)	
3	51 (30.2)	46 (27.2)	97 (28.7)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	61 (36.1)	79 (46.7)	140 (41.4)	0.136
Divorciada/separada/viuda	13 (7.7)	10 (5.9)	23 (6.8)	
Soltera	95 (56.2)	80 (47.4)	175 (51.8)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	54 (31.9)	55 (32.5)	109 (32.2)	0.991
Secundaria completa	63 (37.3)	62 (36.7)	125 (37.0)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	52 (30.8)	52 (30.8)	104 (30.8)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.7 [4.0]	16.8 [2.5]	17.3 [3.4]	0.011
≥20	37 (21.9)	23 (13.6)	60 (17.8)	0.080
16-19	91 (53.8)	92 (54.4)	183 (54.1)	
≤15	41 (24.3)	54 (32.0)	95 (28.1)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	4.0 [1-98]	3.0 [1-98]	3.5 [1-98]	0.559
1-2	57 (33.7)	44 (26.0)	101 (29.9)	0.127
3-4	46 (27.2)	62 (36.7)	108 (32.0)	
≥5	66 (39.1)	63 (37.3)	129 (38.1)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	0.129
0	52 (30.8)	38 (22.5)	90 (26.6)	0.213
1-2	88 (52.1)	101 (59.7)	189 (55.9)	

≥3	29 (17.1)	30 (17.8)	59 (17.5)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
Mediana [Rango]	2.5 [0-26]	3.5 [0-23]	3.0 [0-26]	0.099
0	32 (18.9)	17 (10.1)	49 (14.5)	0.012
<5	93 (55.0)	87 (51.5)	180 (49.1)	
≥5	44 (31.4)	65 (38.5)	109 (36.4)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	126 (74.6)	128 (75.7)	254 (75.1)	0.743
En el pasado	18 (10.7)	14 (8.3)	32 (9.5)	
Actualmente	25 (14.7)	27 (16.0)	52 (15.4)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	108 (63.9)	104 (61.5)	212 (62.7)	0.228
Una vez cada 2- 3 años	38 (22.5)	42 (24.9)	80 (23.7)	
Menos de una vez cada 4-5 años	14 (8.3)	20 (11.8)	34 (10.1)	
No sabe/ No responde	9 (5.3)	3 (1.8)	12 (3.5)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Niveles de micronutrientes

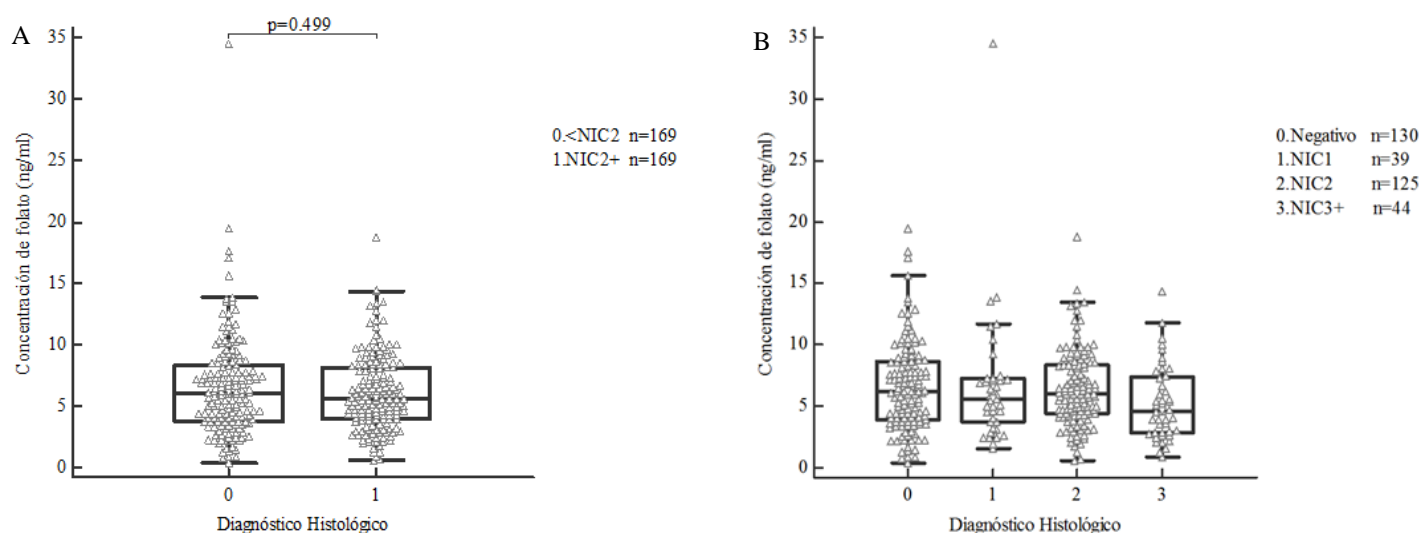
Folato

Se muestra la distribución de los niveles séricos de folato entre casos y controles en la tabla 2 y en la figura 7. El rango de la concentración del folato para los casos fue de 0.6 - 18.8 ng/mL; y en los controles 0.4 - 34.5 ng/mL. En el análisis entre los 169 casos y 169 controles, no se observaron diferencias en las medianas de la concentración del micronutriente (5.6 ng/mL para los casos y 6.1 ng/mL para los controles, $p=0.499$). Se observó que el 51.5%; 33.1%, y 15.4% de los individuos del grupo control y el 45.6%, 38.4%, y 16.0% de los casos, tenían niveles de folato normales, posiblemente deficientes y deficientes de este micronutriente respectivamente y estas proporciones fueron similares ($p=0.523$).

Tabla 2. Distribución de los niveles séricos de folato

	Casos N= 169 n (%)	Controles N= 169 n (%)	p
Concentración folato , ng /mL			
Mediana [rango]	5.6 [0.6 – 18.8]	6.1 [0.4 – 34.5]	0.499
Categorías OMS			
Normal (6 -20 ng/mL)	77 (45.6)	87 (51.5)	0.523
Posible deficiencia (3 -5.9 ng/mL)	65 (38.4)	56 (33.1)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	27 (16.0)	26 (15.4)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

**Figura 7. Distribución de los niveles de folato determinados por el método radioinmunoensayo.**

A. Comparación de la distribución del folato entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2). Prueba U Mann-Whitney p=0.499. **B.** Comparación de la distribución del folato entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado de cérvix. p=0.102 Prueba Kruskal Wallis.

En el análisis donde se comparan los niveles de folato entre las mujeres sin lesiones cervicales, las diagnosticadas con NIC1, NIC2, y las diagnosticadas con NIC3+, no se observaron diferencias estadísticamente significativas; la mediana de la concentración de folato fue 6.2 ng/mL, 5.7 ng/mL, 6.0 ng/mL, y 4.7 ng/mL respectivamente ($p= 0.102$). Sin embargo, si se restringe el análisis a la comparación de las concentraciones del folato de las mujeres sin lesiones cervicales ($n=130$) con las diagnosticadas con NIC3+ ($n=44$), encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.031$); lo mismo ocurre si se comparan las concentraciones del folato de las mujeres con lesiones NIC2 ($n=125$) con las diagnosticadas con NIC3+ ($n=44$) $p=0.016$, Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones del folato para diferentes grados de displasia cervical

	Negativos N=130	NIC1 N=39	NIC2 N=125	NIC3+ N=44
Concentración ng/mL				
[Mediana/rango]	[6.2/0.4 - 19.5]	[5.7/1.6 - 34.5]	[6.0/0.6 - 18.8]	[4.7/0.9 - 14.4]

Se compararon las concentraciones del folato entre los diferentes grados de displasia cervical usando la prueba U Mann-Whitney. Comparación entre negativos y NIC3+ $p=0.031$; entre negativos y NIC2 $p=0.947$; entre negativos y NIC1 $p=0.444$, entre NIC1 y NIC2 $p=0.471$; entre NIC1 y NIC3+ $p=0.239$; entre NIC2 y NIC3+ **0.016**.

Vitamina B12

En la tabla 4 y en la figura 8 se muestra la distribución de los niveles séricos de vitamina B12 entre casos y controles. El rango de la concentración de la vitamina B12 en los casos fue 4.6 - 942.4 pg/mL y en los controles 5.7- 942.4 pg/mL. Entre los 169 casos y 169 controles, no se observaron diferencias en las medianas de la concentración del micronutriente (342.1 pg/mL para los casos y 337.5 pg/mL para los controles, $p=0.250$). En el análisis comparando los niveles de B12 entre las mujeres sin lesiones cervicales, las diagnosticadas con NIC1, NIC2, y las diagnosticadas con NIC3+, tampoco se observaron diferencias en las medianas de la

concentración de este micronutriente (341.1 pg/mL; 311.0 pg/mL; 336.6 pg/mL y 360.2 pg/mL respectivamente, $p= 0.613$). Se observó que el 81.1%, 8.3% y 10.6% de los individuos del grupo control y el 84.0%, 7.7%, y 8.3% de los casos tenían niveles normales, posiblemente deficientes y deficientes de este micronutriente respectivamente y estas proporciones fueron similares ($p=0.731$)

Tabla 4. Distribución de los niveles séricos de la vitamina B12

	Casos N= 169	Controles N= 169	p
	n (%)	n (%)	
Concentración vitamina B12 , pg/mL			
Mediana [rango]	342.1 [4.6 – 942.4]	337.5 [5.7 – 942.4]	0.250
Niveles de vitamina B12, categorías OMS			
Normal (>200 pg/mL)	137 (81.1)	142 (84.0)	0.731
Posible deficiencia (150-200 pg/mL)	14 (8.3)	13 (7.7)	
Deficiencia (< 150 pg/mL)	18 (10.6)	14 (8.3)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

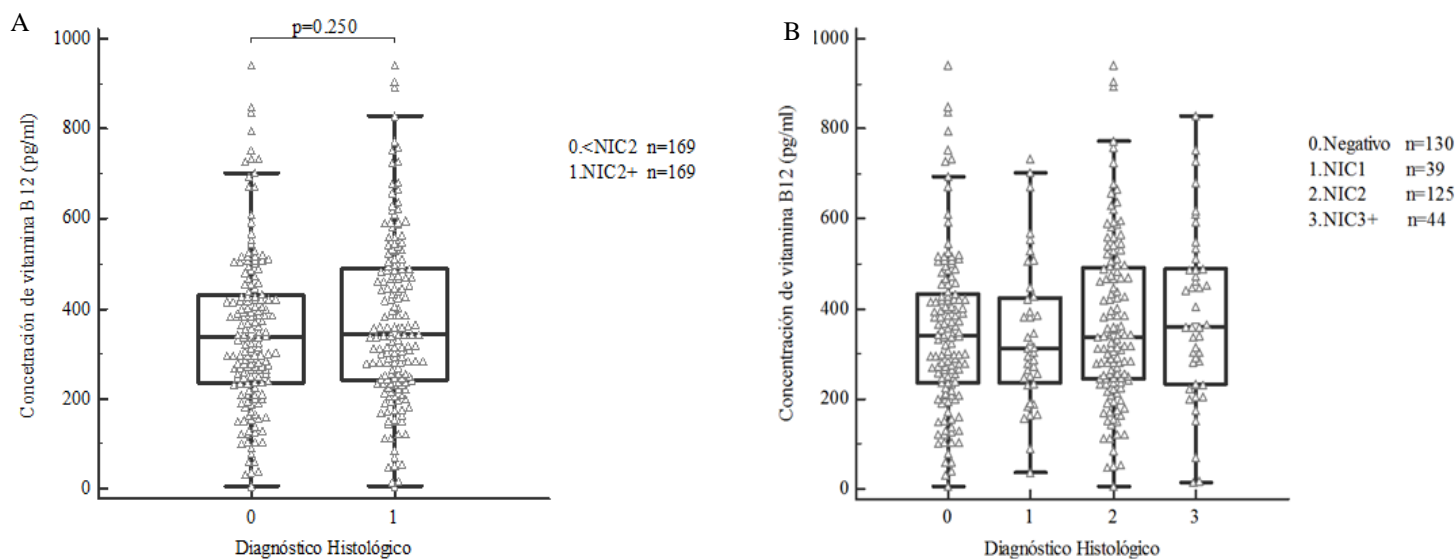


Figura 8. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método radioinmunoensayo.

A. Distribución de la vitamina B12 entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2). Prueba U Mann-Whitney $p=0.250$. **B.** Distribución de la vitamina B12 entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado de cérvix. $p=0.613$ Prueba Kruskal Wallis.

Asociación entre niveles de folato y vitamina B12 y las lesiones cervicales de alto grado (NIC2+)

En el análisis bivariado presentado en la tabla 5, las mujeres con nivel educativo técnico-tecnológico tenían 59% menor probabilidad de tener una lesión NIC2+ comparadas con las mujeres de otros niveles educativos [OR 0.41 (IC95% 0.18-0.93)] $p=0.033$. El inicio de las relaciones sexuales a los 15 años o antes, tener entre 3 y 4 parejas sexuales en toda la vida así como el uso de anticonceptivos hormonales por 5 años o más, se asocia con un mayor riesgo de NIC2+, OR 2.12 (IC95% 1.10- 4.10), OR 1.75 (IC95% 1.01- 3.02), y OR 2.78 (IC95% 1.38- 5.61). En el análisis ajustado, el nivel educativo técnico-tecnológico y el uso de anticonceptivos hormonales se asocian significativamente con el riesgo del NIC2+ $p=0.035$ y $p=0.006$ respectivamente. Comparadas con las que tienen niveles de folato normales, las que tienen posible deficiencia y deficiencia no tienen mayor riesgo de NIC2+, OR 1.31 (IC95% 0.82- 2.10)

p=0.259 y OR 1.17 (IC95% 0.63- 2.18) p=0.613. Con respecto a la vitamina B12, tampoco se observó riesgo de NIC2+ asociado a los niveles normales, posiblemente deficientes o deficientes, OR 0.90 (IC95% 0.41- 1.98) p=0.785 y OR 0.75 (IC95% 0.36- 1.57) p=0.445.

Tabla 5. Asociación entre los niveles de folato, vitamina B12 y otros factores de riesgo para lesiones cervicales de alto grado (NIC2+)

Factores de riesgo	<NIC2 n=169	NIC2+ n=169	OR ^a (IC 95%)	P	OR ^b (IC 95%)	P
<u>Edad (años)</u>						
20-30	89	90	1.00 (referencia)			
31-40	43	49	1.13 (0.68- 1.86)	0.642		
41-50	32	20	0.62 (0.33- 1.16)	0.135		
51-62	5	10	1.98 (0.65- 6.02)	0.230		
<u>Estado Marital</u>						
Casada/unión libre	61	79	1.00 (referencia)			
Divorciada/separada	8	8	0.57 (0.25- 1.27)	0.624		
Viuda	5	2	0.33 (0.07- 1.53)	0.169		
Soltera	95	80	0.75 (0.52- 1.08)	0.059		
<u>Nivel educativo</u>						
Universitario o superior	13	24	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
Técnico-tecnológico	41	31	0.41 (0.18- 0.93)	0.033	0.39 (0.16- 0.94)	0.035
Secundaria completa	63	62	0.53 (0.25- 1.14)	0.105	0.61 (0.25- 1.49)	0.283
Primaria Completa	45	45	0.54 (0.25- 1.19)	0.129	0.60 (0.23- 1.56)	0.295
Ninguno	7	7	0.54 (0.16- 1.88)	0.335	0.41 (0.09- 1.02)	0.239
<u>Edad de la primera relación sexual (años)</u>						
≥20	37	23	1.00 (referencia)			
16-19	91	92	1.62 (0.90- 2.95)	0.110		
≤15	41	54	2.12 (1.10- 4.10)	0.026		
<u>Número de parejas sexuales en toda la vida</u>						
1-2	57	44	1.00 (referencia)			
3-4	46	62	1.75 (1.01- 3.02)	0.046		

≥5	66	63	1.24 (0.73- 2.09)	0.426		
<u>Número de hijos</u>						
0	52	38	1.00 (referencia)			
1-2	88	101	1.57 (0.95- 2.61)	0.081		
≥3	29	30	1.42 (0.73- 2.74)	0.302		
<u>Años de uso de anticonceptivos hormonales</u>						
0	32	17	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
<5	93	87	1.76 (0.91- 3.4)	0.091	2.07 (1.00- 4.25)	0.047
≥5	44	65	2.78 (1.38- 5.61)	0.004	3.03 (1.37- 6.72)	0.006
<u>Frecuencia de la citología</u>						
Una o más veces al año	108	104	1.00 (referencia)			
Una vez cada 2-3 años	38	42	1.15 (0.69- 1.92)	0.600		
Una vez cada 4-5 años	11	16	1.51 (0.67- 3.41)	0.320		
Menos de una vez cada 6 años	3	4	1.38 (0.30- 6.34)	0.675		
No sabe/no responde	9	3	0.35 (0.09- 1.31)	0.119		
<u>Niveles de folato</u>						
Normal (6 -20 ng/mL)	87	77	1.00 (referencia)			
Posible deficiencia (3 -5.9 ng/mL)	56	65	1.31 (0.82- 2.10)	0.259		
Deficiencia (< 3 ng/mL)	26	27	1.17 (0.63- 2.18)	0.613		
<u>Niveles de Vitamina B12</u>						
Normal (> 200- 996 pg/mL)	137	142	1.00 (referencia)			
Posible deficiencia (150 -200 pg/mL)	14	13	0.90 (0.41- 1.98)	0.785		
Deficiencia (< 150 pg/mL)	18	14	0.75 (0.36- 1.57)	0.445		

^a Modelo bivariado. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos uso de anticonceptivos y frecuencia de citología.

Características de las participantes de las que se obtuvieron concentraciones de los micronutrientes con el método HPLC

En la tabla 6 se describen las características sociodemográficas y factores de riesgo conocidos para el desarrollo de lesiones NIC2+ en casos y en controles. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles para las variables sociodemográficas (edad, EPS, estado marital y nivel educativo). La media de la edad fue 32.3 años (DS 9.4). El 42.2% de las mujeres estaban aseguradas en la EPS 2, el 51.6% estaban solteras. El 34% solo tenían educación primaria o no tenían educación. Observamos una diferencia estadísticamente significativa en la edad de inicio de las relaciones sexuales, los casos iniciaron más tempranamente comparadas con los controles ($p=0.016$). Más de la mitad de las mujeres tuvieron su primera relación sexual entre los 16 y 19 años (53.8%); no hubo diferencias entre el número de compañeros sexuales durante toda la vida (29.2% entre 1 y 2, 31.1% entre 3 y 4, y 39.7% 5 o más parejas). El cincuenta y seis por ciento tenía entre 1 y 2 hijos, 17.3% tres hijos o más. El uso de anticonceptivos hormonales fue estadísticamente diferente entre casos y controles; casi el 20% de los controles nunca los habían usado mientras que el 36.8% de los casos los habían usado durante 5 años o más $p=0.047$. La mayoría de las mujeres (75.4%) nunca habían fumado cigarrillos y en cuanto a la frecuencia en la realización de la citología, el 62.4% de las mujeres se la realizan una o más veces al año.

Tabla 6. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles

Características	Controles	Casos	Total	P
	N=185	N=185	N=370	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media[DS]	32.1 [9.4]	32.4 [9.4]	32.3 [9.4]	0.839
20-30	98 (53.0)	95 (51.4)	193 (52.2)	0.168
31-40	47 (25.4)	57 (30.8)	104 (28.1)	
41-50	34 (18.4)	22 (11.9)	56 (15.1)	
51-64	6 (3.2)	11 (5.9)	17 (4.6)	
EPS				
1	47 (25.4)	60 (32.4)	107 (28.9)	0.322
2	81 (43.8)	75 (40.5)	156 (42.2)	
3	57 (30.8)	50 (27.1)	107 (28.9)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	67 (36.2)	86 (46.4)	153 (41.4)	0.125
Divorciada/separada/viuda	15 (8.1)	11 (5.9)	26 (7.0)	
Soltera	103 (55.7)	88 (47.6)	191 (51.6)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	61 (33.0)	65 (35.1)	126 (34.0)	0.885
Secundaria completa	70 (37.8)	66 (35.7)	136 (36.8)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	54 (29.2)	54 (29.2)	108 (29.2)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.7 [4.0]	16.8 [2.5]	17.3 [3.3]	0.016
≥20	41 (22.2)	25 (13.5)	66 (17.8)	0.076
16-19	97 (52.4)	102 (55.1)	199 (53.8)	
≤15	47 (25.4)	58 (31.4)	105 (28.4)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [rango]	4.0 [1-98]	4.0 [1-98]	4.0 [1-98]	0.424
1-2	62 (33.5)	46 (24.9)	108 (29.2)	0.115
3-4	50 (27.0)	65 (35.1)	115 (31.1)	
≥5	73 (39.5)	74 (40.0)	147 (39.7)	
Número de hijos				
Mediana [rango]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	0.188
0	54 (29.2)	43 (23.2)	97 (26.2)	0.428
1-2	100 (54.1)	109 (59.0)	209 (56.5)	
≥3	31 (16.8)	33 (17.8)	64 (17.3)	

Años de consumo de anticonceptivos hormonales

Mediana [rango]	2.5 [0-26]	3.1 [0-23]	3.0 [0-26]	0.155
0	36 (19.5)	23 (12.4)	59 (16.0)	0.047
<5	100 (54.1)	94 (50.8)	194 (52.4)	
≥5	49 (26.5)	68 (36.8)	117 (31.6)	

Uso de cigarrillo

Nunca	136 (73.5)	143 (77.3)	279 (75.4)	0.696
En el pasado	18 (9.7)	15 (8.1)	33 (8.9)	
Actualmente	31 (16.8)	27 (14.6)	58 (15.7)	

Frecuencia de realización de la citología

Una o más veces cada año	117 (63.2)	114 (61.6)	231 (62.4)	0.289
Una vez cada 2- 3 años	43 (23.2)	48 (26.0)	91 (24.6)	
Menos de una vez cada 4-5 años	16 (8.7)	20 (10.8)	36 (9.7)	
No sabe/ No responde	9 (4.9)	3 (1.6)	12 (3.2)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Cuando se compararon las mismas características sociodemográficas y factores de riesgo para los casos y controles con resultado para cada uno de los micronutrientes de manera independiente, (5MTHF n=136 casos y n=136 controles; ácido fólico n=171 casos y n=171 controles; y vitamina B12 n=37 casos y n=37 controles), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles para los micronutrientes 5MTHF y vitamina B12. Sin embargo, entre los 171 casos y 171 controles a los que se les pudo determinar la concentración de ácido fólico, se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al uso de anticonceptivos hormonales entre casos y controles, el 18.7% de los controles nunca los habían usado mientras que el 38% de los casos los habían usado durante 5 años o (más p=0.023) (tablas suplementarias 1,2 y 3).

Niveles de micronutrientes determinados por HPLC

5MTHF

En la tabla 7 y en la figura 9 se muestra la distribución de los niveles de 5MTHF entre casos y controles. El rango de la concentración del 5MTHF en los casos fue de 2.4 -7.6 ng/mL; y en los controles de 2.4 - 5.5 ng/mL. En el análisis incluyendo todos los casos (n=138) y controles (n=130) no se observaron diferencias en las medianas de la concentración de este metabolito, (2.9 ng/ml para los casos y 2.8 ng/mL para los controles, p=0.278) ni tampoco cuando él se incluyeron solamente los casos y controles pareados, (136 pares) (2.9 ng/mL para los casos y 2.7 ng/mL para los controles, p= 0.086). Se observó que el 0%, 33.1%, y 66.9% de los individuos del grupo control y el 0.7%; 36.8%, y 62.5% de los casos, tenían niveles normales, posiblemente deficientes y deficientes de 5MTHF respectivamente y que estas proporciones fueron similares (p=0.480).

Tabla 7. Distribución de los niveles séricos de 5MTHF

	Casos N= 136	Controles N= 136	p
	n (%)	n (%)	
Concentración 5MTHF, ng/mL			
Mediana [rango]	2.9 [2.4 – 7.6]	2.7 [2.4 – 5.5]	0.086
Niveles de 5MTHF, categorías OMS			
Normal (6 -20 ng/mL)	1 (0.7)	0 (0.0)	0.480
Posible deficiencia (3 -5.9 ng/mL)	50 (36.8)	45 (33.1)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	85 (62.5)	91 (66.9)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

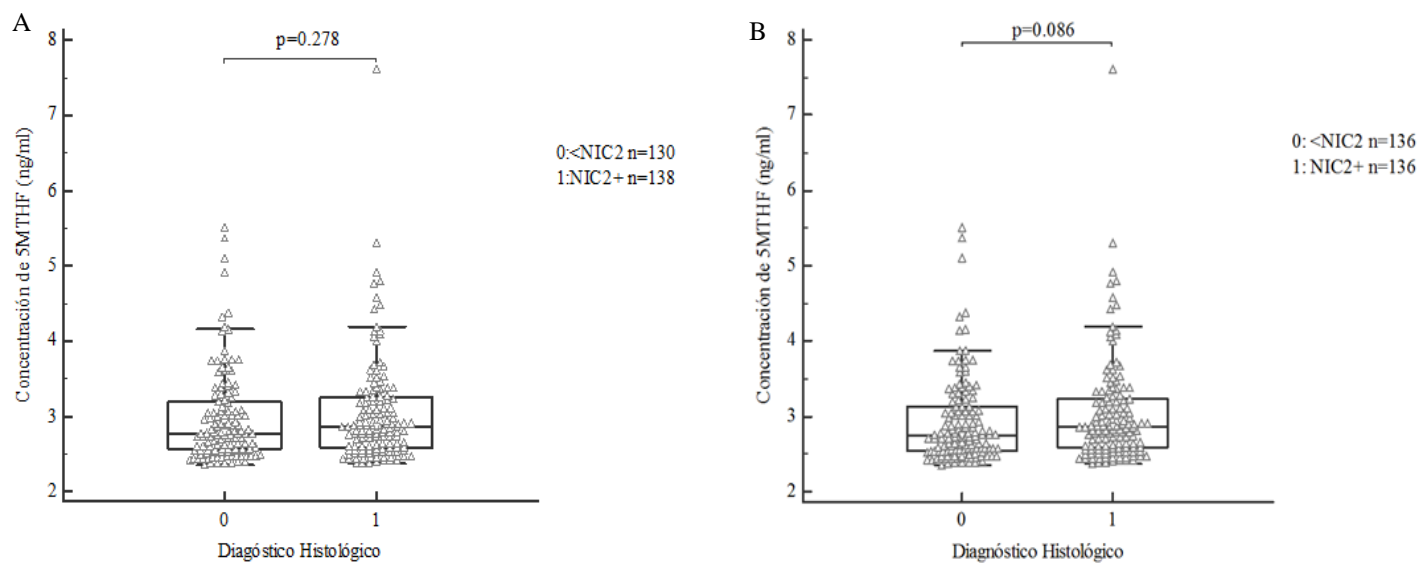


Figura 9. Distribución de los niveles de 5MTHF determinados por el método HPLC entre casos y controles.

A. Distribución del 5MTHF entre casos (NIC2+) y controles (<math><math><math>$$</math></math></math></math> sin emparejar. Prueba U Mann-Whitney $p=0.278$. **B.** Distribución del 5MTHF entre casos (NIC2+) y controles (<math><math><math>$$</math></math></math></math> pareados. $p=0.086$ Prueba Mann-Whitney.

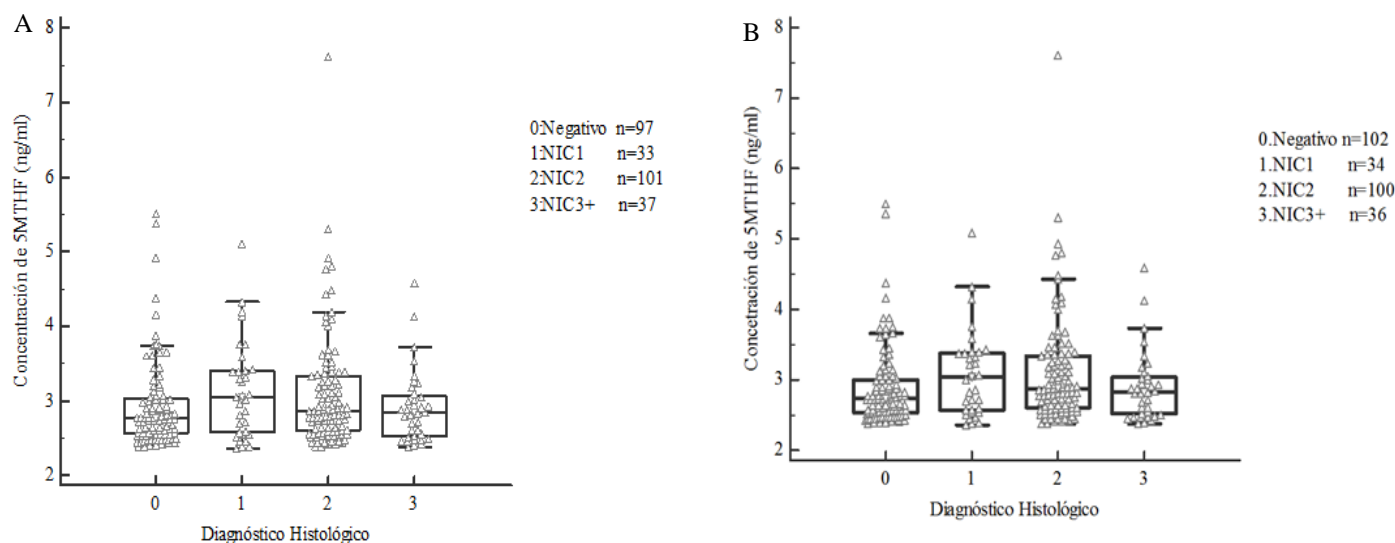


Figura 10. Distribución de los niveles de 5MTHF determinados por el método HPLC.

A. Distribución del 5MTHF entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado de cérvix sin emparejar. $p=0.114$ Prueba Kruskal Wallis. **B.** Distribución del 5MTHF entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado del cérvix pareados. $p=0.048$ Prueba Kruskal Wallis.

En el análisis donde se comparan los niveles de 5MTHF entre las mujeres sin lesiones cervicales, las diagnosticadas con NIC1, NIC2, y las diagnosticadas con NIC3+, no se observaron diferencias estadísticamente significativas; la mediana de la concentración del 5MTHF fue 2.7 ng/mL, 3.0 ng/mL, 2.9 ng/mL, y 2.8 ng/mL respectivamente ($p=0.048$), figura 10. Sin embargo, si se restringe el análisis a la comparación de las concentraciones del 5MTHF de las mujeres diagnosticadas con NIC2 ($n=100$) con las diagnosticadas con NIC3+ ($n=36$), encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.009$) Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de 5MTHF para los diferentes grados de displasia cervical

	Negativos	NIC1	NIC2	NIC3+
	N=102	N=34	N=100	N=36
Concentración ng/mL				
Mediana [rango]	2.7 [2.4 – 5.5]	3.0 [2.4 – 5.1]	2.9 [2.4 – 7.6]	2.8 [2.4 – 4.6]

Comparación de las concentraciones del folato entre los diferentes grados de displasia cervical usando la prueba U Mann-Whitney. Comparación entre negativos y NIC3+ $p=0.502$; entre negativos y NIC2 **$p=0.009$** ; entre negativos y NIC1 $p=0.096$, entre NIC1 y NIC2 $p=0.979$; entre NIC1 y NIC3+ $p=0.217$; entre NIC2 y NIC3+ 0.201.

Ácido fólico

En la tabla 9 y en la figura 11 se muestra la distribución de los niveles de ácido fólico entre casos y controles. El rango de la concentración del ácido fólico de los casos fue de 0.1 - 21.0 ng/mL; y de los controles de 0.09 - 21.5 ng/mL. En el análisis incluyendo todos los casos ($n=171$) y ($n=180$) no se observaron diferencias en las medianas de la concentración del micronutriente, (2.3 ng/mL para los casos y 2.2 ng/mL para los controles, $p=0.304$) ni tampoco cuando en el análisis se incluyeron solamente los casos y controles pareados, (171 pares) (2.3 ng/mL para los

casos y 2.2 ng/mL para los controles, $p=0.389$). Se observó que el 6.4%; 17.5%, y 76.1% de los individuos del grupo control y el 7.0%; 21.1%, y 71.9% de los casos, tenían niveles normales, posiblemente deficientes y deficientes respectivamente y estas proporciones fueron similares ($p=0.784$).

Tabla 9. Distribución de los niveles séricos de Ácido Fólico

	Casos N= 171 n (%)	Controles N= 171 n (%)	p
Concentración ácido fólico, ng/mL			
Mediana [rango]	2.3 [0.1 – 21.0]	2.2 [0.09– 21.5]	0.389
Niveles de ácido fólico, categorías OMS			
Normal (6 -20 ng/mL)	12 (7.0)	11 (6.4)	0.784
Posible deficiencia (3 -5.9 ng/mL)	36 (21.1)	30 (17.5)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	123 (71.9)	130 (76.1)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

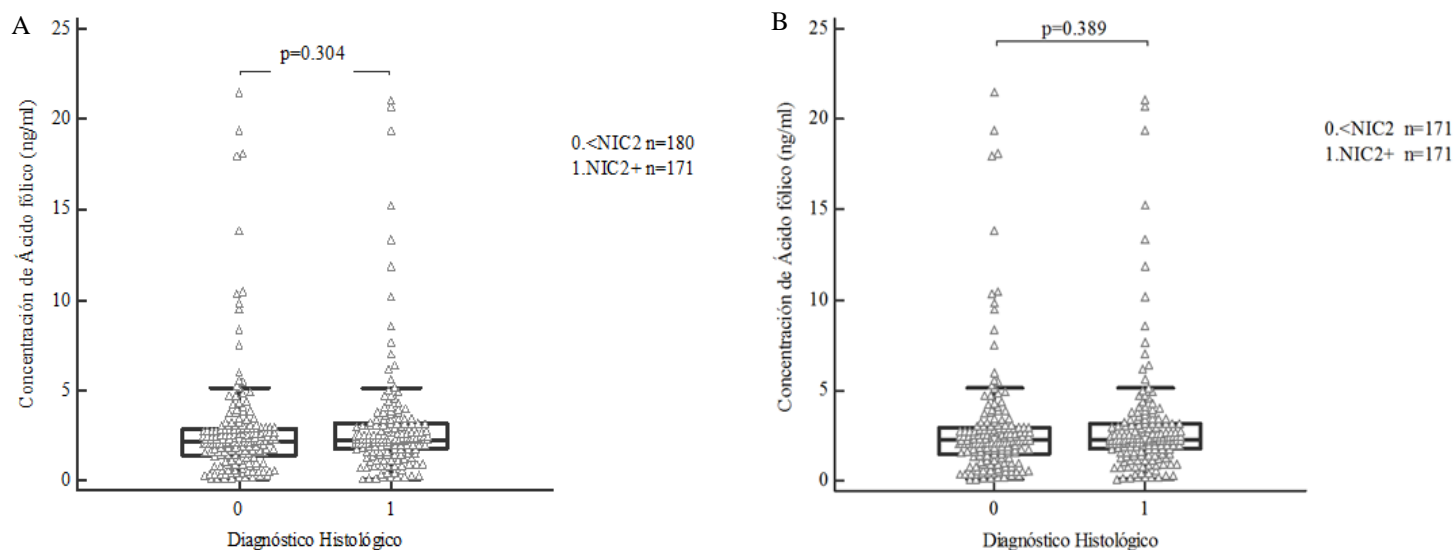


Figura 11. Distribución de los niveles de ácido fólico determinados por el método HPLC.

A. Distribución del ácido fólico entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2) sin emparejar. Prueba U Mann-Whitney $p=0.304$. **B.** Distribución del ácido fólico entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2) pareados. $p=0.389$ Prueba Mann-Whitney.

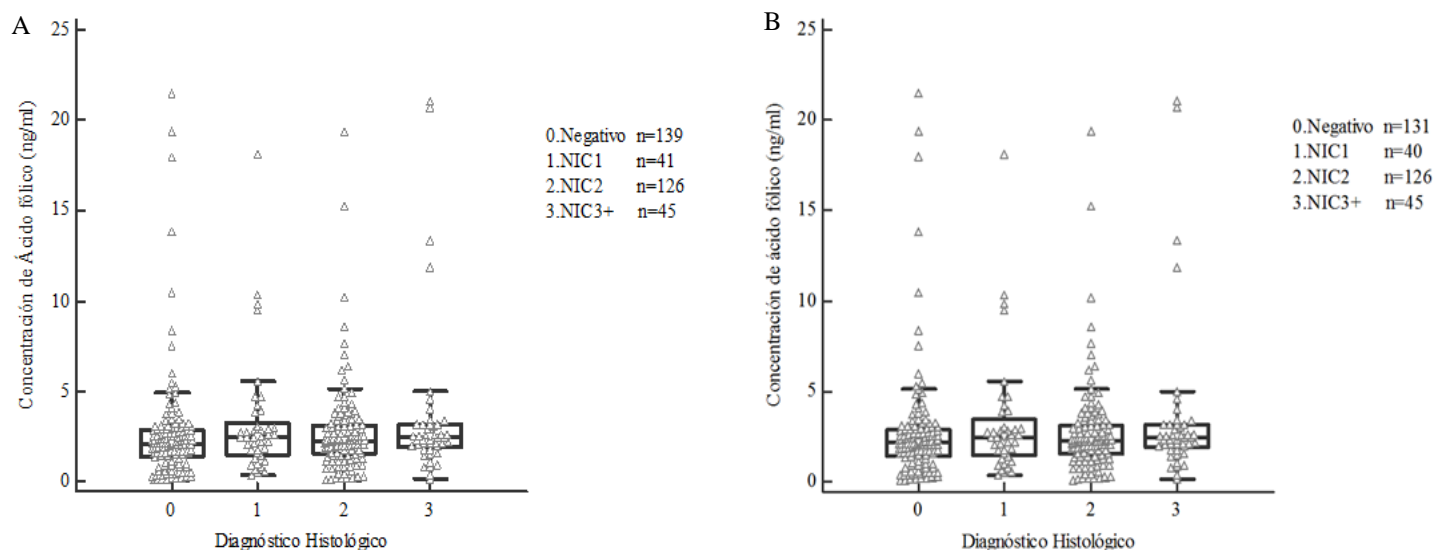


Figura 12. Distribución de los niveles de ácido fólico determinados por el método HPLC.

A. Distribución del ácido fólico entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado de cérvix sin emparejar. $p=0.269$ Prueba Kruskal Wallis. **B.** Distribución del ácido fólico entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado del cérvix pareados. $p=0.366$ Prueba Kruskal Wallis.

En el análisis donde se comparan los niveles de ácido fólico entre las mujeres sin lesiones cervicales, las diagnosticadas con NIC1, NIC2, y las diagnosticadas con NIC3+, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.366$), figura 12.

Vitamina B12

En la tabla 10 y en la figura 13 se muestra la distribución de los niveles de vitamina B12 entre casos y controles. El rango de la concentración de la vitamina B12 en los casos fue 97.2 - 2314.9 pg/mL; y en los controles 85.3 - 1444.0 pg/mL. En el análisis incluyendo todos los casos ($n=38$) y controles ($n=37$), no se observaron diferencias en las medianas de la concentración del micronutriente, (280.9 pg/mL para los casos y 195.5 pg/mL para los controles, $p=0.244$) ni

tampoco cuando en el análisis se incluyeron solamente los casos y controles pareados, (37 pares) (275.4 pg/mL para los casos y 195.5 pg/mL para los controles, $p=0.111$). Se observó que el 48.6%, 16.2%, y 35.2% de los individuos del grupo control y el 59.5%, 13.5%, y 27.0% de los casos, tenían niveles normales, posiblemente deficientes y deficientes de este micronutriente respectivamente y estas proporciones fueron similares ($p=0.643$).

Tabla 10. Distribución de los niveles séricos de la vitamina B12

	Casos N= 37 n (%)	Controles N= 37 n (%)	p
Concentración vitamina B12 , pg/mL			
Mediana [rango]	275.4 [97.2 – 2314.9]	195.5 [85.3 – 1444.0]	0.111
Niveles de vitamina B12, categorías OMS			
Normal (>200 pg/mL)	22 (59.5)	18 (48.6)	0.643
Posible deficiencia (150-200 pg/mL)	5 (13.5)	6 (16.2)	
Deficiencia (< 150 pg/mL)	10 (27.0)	13 (35.2)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones y medianas entre casos y controles

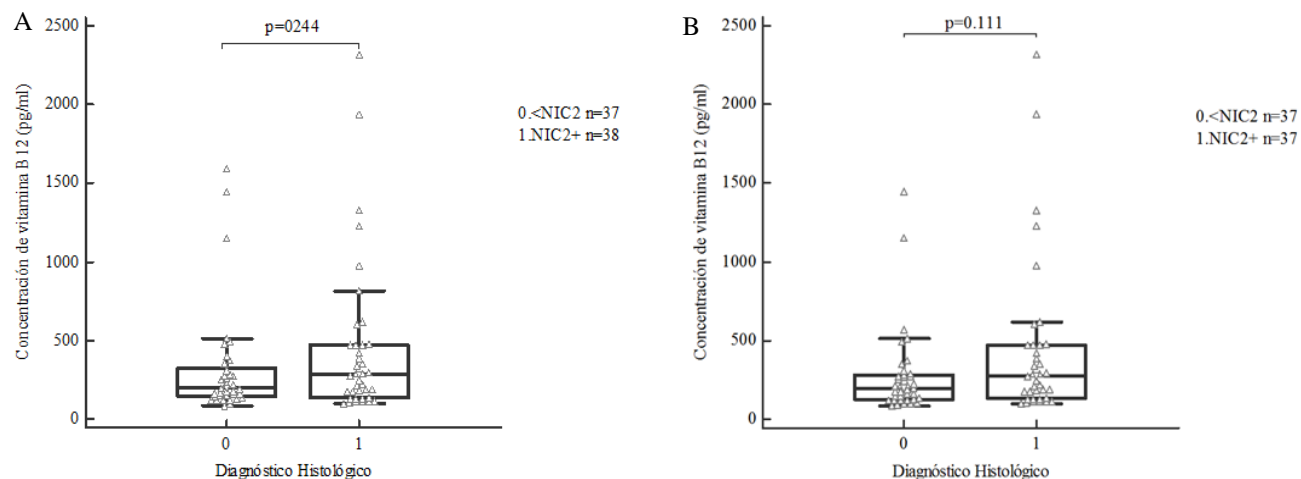


Figura 13. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método HPLC.

A. Distribución de la de vitamina B12 entre casos ($NIC2+$) y controles (<math><NIC2</math>) sin emparejar. Prueba U Mann-Whitney $p=0.244$. **B.** Distribución de la vitamina B12 entre casos ($NIC2+$) y controles (<math><NIC2</math>) pareados. $p=0.111$ Prueba Mann-Whitney.

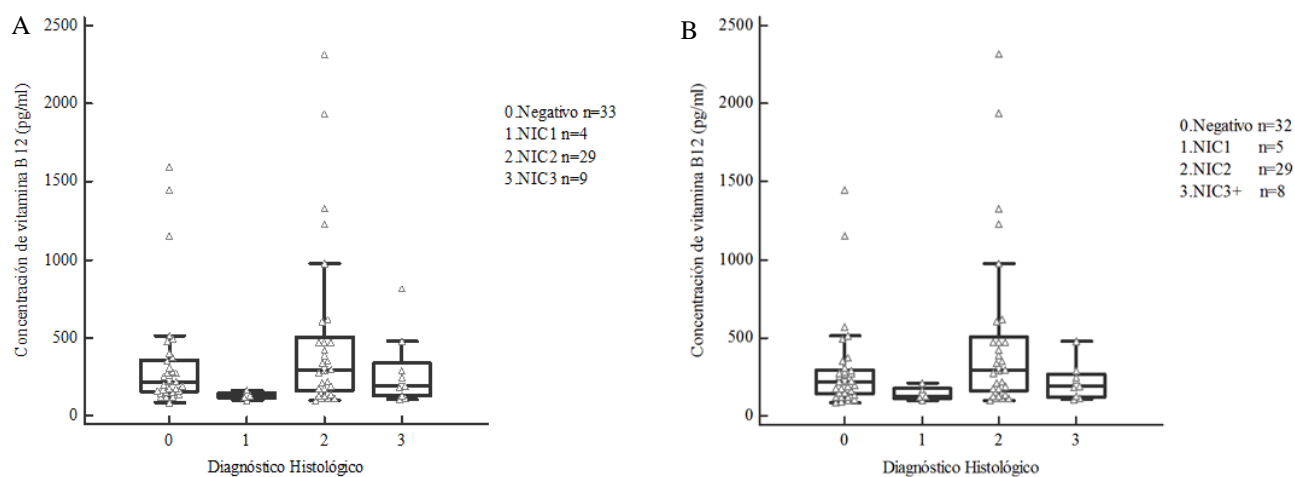


Figura 14. Distribución de los niveles de vitamina B12 determinados por el método HPLC.

A. Distribución de la vitamina B12 entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado de cérvix sin emparejar. $p=0.072$ Prueba Kruskal Wallis. **B.** Distribución de la vitamina B12 entre mujeres sin lesiones, con lesiones de bajo grado y con lesiones de alto grado de cérvix pareados. $p=0.062$ Prueba Kruskal Wallis.

En el análisis donde se comparan los niveles de vitamina B12 entre las mujeres sin lesiones cervicales, las diagnosticadas con NIC1, NIC2, y las diagnosticadas con NIC3+, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.062$), figura 14.

Asociación entre niveles de micronutrientes y lesiones cervicales de alto grado (NIC2+)

5MTHF

En el análisis bivariado presentado en la tabla 11, el nivel educativo técnico-tecnológico se asocia con menor probabilidad de tener una lesión NIC2+ [OR 0.32 (IC95% 0.13-0.81)] $p=0.015$ y el uso de anticonceptivos hormonales por 5 años o más, se asocia con un mayor riesgo de NIC2+, OR 2.29 (IC95% 1.01- 5.16) $p=0.046$. En el análisis ajustado, el nivel educativo técnico-tecnológico y el uso de anticonceptivos hormonales por 5 años o más continúa asociándose siguen siendo variables significativas ($p=0.017$) y ($p=0.049$) respectivamente. Las demás variables sociodemográficas y factores de riesgo no se asociaron significativamente con el riesgo de NIC2+. Con respecto a los niveles del 5MTHF, las mujeres con concentraciones deficientes comparadas con aquellas que tienen concentraciones normales o posiblemente deficientes no tienen mayor riesgo de lesiones cervicales de alto grado OR 0.82 (IC95% 0.50- 1.36) $p=0.447$.

Ácido Fólico

En el modelo de regresión logística presentado en la tabla 12, tanto en el análisis bivariado como en el ajustado, el nivel educativo técnico-tecnológico se asocia con menor riesgo de NIC2+ $p=0.030$. El uso de anticonceptivos hormonales por 5 años o más, se asocia con un mayor riesgo de NIC2+, OR 2.91 (IC95% 1.34- 6.32) $p=0.007$. En el análisis bivariado, haber iniciado las relaciones sexuales a los 15 años o menos, se asoció con el riesgo de NIC2+ ($p=0.038$), sin embargo, este efecto desapareció en el modelo ajustado. Con respecto a los niveles de ácido

fólico, las mujeres con concentraciones deficientes comparadas con aquellas que tienen concentraciones normales o posiblemente deficientes no tienen mayor riesgo de lesiones cervicales de alto grado OR 0.81 (IC95% 0.50- 1.361) p=0.389.

Tabla 11. Relación entre los niveles de 5MTHF y otros factores de riesgo con el diagnóstico NIC2+

Factores de riesgo	<NIC2 n=136	NIC2+ n=136	OR ^a (IC 95%)	P	OR ^b (IC 95%)	P
Edad (años)						
20-30	77	78	1.00 (referencia)			
31-40	36	39	1.07 (0.62- 1.86)	0.811		
41-50	20	14	0.69 (0.32- 1.47)	0.335		
51-62	3	5	1.65 (0.38- 7.12)	0.505		
Estado Marital						
Casada/unión libre	50	64	1.00 (referencia)			
Divorciada/separada /viuda	10	7	0.55 (0.19- 1.53)	0.253		
Soltera	76	65	0.67 (0.41- 1.10)	0.111		
Nivel educativo						
Universitario o superior	10	22	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
Técnico-tecnológico	36	26	0.32 (0.13- 0.81)	0.015	0.31 (0.12- 0.81)	0.017
Secundaria completa	51	51	0.46 (0.20- 1.08)	0.074	0.49 (0.19- 1.27)	0.142
Primaria Completa	33	32	0.44 (0.18- 1.08)	0.072	0.43 (0.15- 1.21)	0.110
Ninguno	7	5	0.32 (0.08- 1.28)	0.107	0.24 (0.05- 1.17)	0.078
Edad de la primera relación sexual (años)						
≥20	25	18	1.00 (referencia)			
16-19	72	76	1.47 (0.74- 2.91)	0.275		
≤15	39	42	1.50 (0.71- 3.15)	0.290		
Número de parejas sexuales en toda la vida						
1-2	45	36	1.00 (referencia)			
3-4	39	51	1.63 (0.89- 2.99)	0.111		
≥5	52	49	1.18 (0.66- 2.12)	0.584		
Número de hijos						

0	39	33	1.00 (referencia)			
1-2	79	84	1.26 (0.72- 2.19)	0.421		
≥3	18	19	1.25 (0.56- 2.76)	0.585		
Años de uso de anticonceptivos hormonales						
0	20	13	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
<5	79	68	1.32 (0.61- 2.86)	0.475	1.39 (0.61- 3.14)	0.430
≥5	37	55	2.29 (1.01- 5.16)	0.046	2.43 (1.00- 5.90)	0.049
Frecuencia de la citología						
Una o más veces al año	91	80	1.00 (referencia)			
Una vez cada 2-3 años	30	38	1.44 (0.82- 2.54)	0.205		
Menos de una vez cada 4-5 años	9	15	1.90 (0.79- 4.57)	0.154		
No sabe/no responde	6	3	0.57 (0.14- 2.35)	0.435		
Niveles de 5MTHF						
Normal / Posible deficiencia (3 - 20ng/mL)	45	51	1.00 (referencia)			
Deficiencia (< 3 ng/mL)	91	85	0.82 (0.50- 1.36)	0.447		

^a Modelo bivariado. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología

Tabla 12. Relación entre los niveles de Ácido fólico y otros factores de riesgo con el diagnóstico NIC2+

Factores de riesgo	Controles n=171	Casos n=171	OR ^a (IC 95%)	Valor P	OR ^b (IC 95%)	Valor P
Edad (años)						
20-30	91	90	1.00 (referencia)			
31-40	44	51	1.17 (0.71- 1.93)	0.532		
41-50	31	20	0.65 (0.35- 1.23)	0.186		
51-62	5	10	2.02 (0.66- 6.15)	0.215		
Estado Marital						
Casada/unión libre	62	80	1.00 (referencia)			
Divorciada/separada /viuda	13	10	0.60 (0.25- 1.45)	0.254		
Soltera	96	81	0.65 (0.42- 1.02)	0.061		
Nivel educativo						
Universitario o superior	13	24	1.00 (referencia)		1.00 (referencia)	
Técnico-tecnológico	43	32	0.40 (0.18- 0.91)	0.029	0.38 (0.16- 0.91)	0.030
Secundaria completa	63	63	0.54 (0.25- 1.16)	0.144	0.58 (0.25- 1.38)	0.219
Primaria Completa	45	45	0.54 (0.25- 1.20)	0.129	0.55 (0.22- 1.39)	0.207
Ninguno	7	7	0.54 (0.16- 1.88)	0.335	0.39 (0.09- 1.68)	0.207
Edad de la primera relación sexual (años)						
≥20	38	24	1.00 (referencia)			
16-19	90	93	1.64 (0.91- 2.94)	0.100		
≤15	43	54	1.99 (1.04- 3.81)	0.038		
Número de parejas sexuales en toda la vida						
1-2	56	44	1.00 (referencia)			
3-4	47	63	1.71 (0.99- 2.95)	0.055		
≥5	68	64	1.20 (0.71- 2.02)	0.498		

Número de hijos

0	52	38	1.00 (referencia)	
1-2	89	103	1.58 (0.96- 2.63)	0.075
≥3	30	30	1.37 (0.71- 2.64)	0.349

Años de uso de anticonceptivos hormonales

0	32	17	1.00 (referencia)	1.00 (referencia)	
<5	92	89	1.82 (0.9- 3.51)	0.074	0.029
≥5	47	65	2.60 (1.30- 5.23)	0.007	0.007

Frecuencia de la citología

Una o más veces al año	110	105	1.00 (referencia)	
Una vez cada 2-3 años	39	43	1.16 (0.69- 1.92)	0.579
Menos de una vez cada 4-5 años	13	20	1.61 (0.76- 3.40)	0.211
No sabe/no responde	9	3	0.35 (0.09- 1.33)	0.122

Niveles de Ácido Fólico

Normal / Posible deficiencia (3 - 20ng/mL)	41	48	1.00 (referencia)	
Deficiencia (< 3 ng/mL)	130	123	0.81 (0.50- 1.31)	0.389

^a Modelo bivariado. ^b Modelo por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología

Discusión

Este análisis fue diseñado para evaluar si los bajos niveles de folato y vitamina B12 estaban asociados con las lesiones cervicales grado dos o más (NIC2+) en una cohorte de mujeres VPH positivo con citología ASC-US de Medellín, Colombia. Los niveles séricos de folato y vitamina B12 fueron determinados por dos técnicas, el radioinmunoensayo y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en muestras recolectadas en el momento del ingreso de las participantes a la cohorte de seguimiento. Con el radioinmunoensayo se determinaron las concentraciones séricas de folato total y vitamina B12, mientras que con el HPLC se determinaron las concentraciones de los metabolitos del folato: 5MTHF (85% del folato total) y ácido fólico (la forma sintética usada en suplementos y alimentos fortificados), y la vitamina B12. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio colombiano que reporta las concentraciones séricas de estos dos micronutrientes en una población diferente a las mujeres gestantes y los niños menores de cinco años. Con respecto a las variables sociodemográficas y factores de riesgo, encontramos que el nivel educativo técnico-tecnológico se asocia con menor riesgo de NIC2+ y el consumo de anticonceptivos hormonales por más de 5 años se asocia con mayor riesgo de NIC2+. Esta última asociación ha sido documentada previamente en la literatura (Muñoz et al., 2006). Según los valores de referencia tenidos en cuenta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), observamos que el 16% de los casos y el 15.3% de los controles tenían concentraciones deficientes de folato (<3 ng/mL) y que el 8,3% de los casos y el 10,6% de los controles tenían valores deficientes de B12 (<150 pg/mL), de acuerdo a los resultados de las concentraciones obtenidas con el radioinmunoensayo. Las concentraciones obtenidas con el HPLC son, como se esperaba, más bajas teniendo en cuenta que se están cuantificando metabolitos y no la totalidad del micronutriente. La proporción de individuos con deficiencia de folatos encontrada en nuestro estudio es mayor en comparación a los datos reportados para las Américas donde la deficiencia

de folato es menor al 1% en población chilena (Hertrampf et al., 2003) y menor al 2% en población mexicana (Teresa Shamah Levy & Cuevas, 2015). En Medellín, de acuerdo al perfil de seguridad alimentaria y nutricional de Medellín y sus corregimientos, se encontró que la prevalencia de deficiencia de folato fue mayor en las mujeres (67.4%) y que esta aumenta a partir de los 14 años (Medellín, 2015), cifras más altas de las encontradas en este estudio. Teniendo en cuenta que Colombia tiene un plan nacional de fortificación de harina de trigo desde 1996, esperábamos encontrar niveles normales de ácido fólico; sin embargo, encontramos que solo el 7% de los casos y 6.4% de los controles alcanzaron valores normales de este metabolito. Solo un individuo tuvo concentraciones séricas por encima de los 20ng/ml. Es necesario tener en cuenta que los niveles de ácido fólico no dependerán solo de la cantidad adicionada a la harina de este micronutriente, hay que contemplar el efecto de la temperatura y los procesos de cocción empleados para la fabricación de los productos que finalmente consume la población, pero esto no es un objetivo de este estudio. Las observaciones referentes a la concentración de vitamina B12 son similares a las cifras reportadas en los datos nacionales de México, Costa Rica, Argentina y Chile (A. Brito et al., 2015). Debido a que encontramos mayor riesgo de NIC2+ entre las mujeres que usaban anticonceptivos hormonales y que el uso de estos últimos pueden afectar la absorción y disponibilidad del folato y la vitamina B12, exploramos si había diferencias significativas de los niveles circulantes de los micronutrientes entre quienes los consumen y quienes no los consumen. No encontramos diferencias significativas tanto para los niveles de folato $p=0.212$ ni para la vitamina B12 $p=0.462$ (datos no mostrados).

Con respecto a la asociación de los niveles de micronutrientes y las lesiones NIC2+, nuestros hallazgos sugieren que en esta población de mujeres colombianas con citología ASC-US, después de ajustar por las variables potencialmente confusoras, los niveles circulantes del folato (5MTHF y Ácido Fólico) y de vitamina B12 no se asociaron significativamente con el riesgo de NIC2+.

Sin embargo, al realizar un análisis restringido a la comparación de la concentración de folato determinado mediante el radioinmunoensayo entre las participantes sin lesiones (n=130) y las participantes diagnosticadas con NIC3+ (n=44), encontramos diferencias estadísticamente significativas $p=0.031$. Varios estudios han investigado o reportado la influencia del estado nutricional, específicamente la asociación entre los niveles séricos del folato y la vitamina B12 y el riesgo de desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 o más severo (NIC2+) (Abike et al., 2011; Chih et al., 2013; Flatley et al., 2009; García-Closas et al., 2005; Piyathilake et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake et al., 2007; Sedjo et al., 2003; Sedjo et al., 2002; Siegel et al., 2010). Algunos han informado una asociación protectora entre los niveles circulantes o dietarios de folato y la vitamina B12 y la displasia cervical (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake et al., 2007; Sedjo et al., 2002). Piyathilake y col, en una cohorte de mujeres de Birmingham, Alabama, observaron que las mujeres con niveles de folato más bajo y VPH positivo para cualquiera de los 13 tipos de alto riesgo, tenían el doble de probabilidades de tener NIC2+ (Piyathilake et al., 2007). Más importante aún, también demostraron que las mujeres con bajos niveles de folato y positivas para el VPH-16 tienen nueve veces más probabilidades de ser diagnosticadas con NIC2+ que las que tienen niveles normales, lo que sugiere un efecto específico de los niveles de folato en la infección por en el VPH 16, el genotipo más comúnmente encontrado y más carcinogénico (Piyathilake et al., 2007). Sin embargo, en una revisión realizada por García-Closas (García-Closas et al., 2005), se sugiere que aunque existe apoyo epidemiológico para el papel de los folatos y la vitamina B12 en la carcinogénesis cervical, la evidencia disponible aún no es convincente. Una revisión más reciente sobre la prevención de la infección por VPH y el cáncer cervical a través del consumo de minerales y vitaminas, también reportó que los niveles circulantes de folato o vitamina B12 no se asociaron significativamente con la persistencia de

infección por VPH y el cáncer pero sí con el desarrollo de lesiones preneoplásicas (Chih et al., 2013).

La asociación observada entre los bajos niveles de folato total y el riesgo de NIC3+ y no con el riesgo de NIC2+, pueden ser explicados por varias razones: 1) los niveles de folato pueden verse afectados en las etapas tardías de la enfermedad donde hay una máxima expresión de las oncoproteínas virales que inducen las enzimas metiltransferasas del ADN y con ello promover la depleción del folato. 2) A pesar de que los diagnósticos histológicos fueron releídos por un panel de patólogos expertos, los diagnósticos NIC2 son difíciles de reproducir (Castle, Stoler, Solomon, & Schiffman, 2007; Stoler, Schiffman, & Group, 2001); de hecho aunque este diagnóstico es el umbral para la realización de tratamiento, sabemos que el 40% de estas lesiones pueden desaparecer espontáneamente. Las lesiones NIC3, son verdaderas predecesoras del cáncer invasivo. 3) Este análisis también pudo verse afectado por la medición de los micronutrientes que no pudo hacerse en la totalidad de las muestras especialmente para la vitamina B12 con la técnica de HPLC. Sin embargo, pudimos hacer las determinaciones de las concentraciones de las mismas vitaminas con el radioinmunoensayo en las mismas muestras, y los resultados que obtuvimos, aunque técnicamente no son comparables, son absolutamente consistentes en cuanto a la asociación con el riesgo de NIC2+. También realizamos análisis para comparar las características sociodemográficas y factores de riesgo de las mujeres con y sin resultado para cada uno de los micronutrientes determinados con el HPLC de manera independiente y no encontramos diferencias significativas, lo que nos lleva a pensar que la falta de resultados en la totalidad de muestras no afectó los resultados del estudio. 4) No tuvimos información sobre la ingesta dietética pero reconocemos que esta medición es una limitación común de los estudios epidemiológicos nutricionales debido al sesgo de memoria que conlleva a una posible sobreestimación o subestimación sistemática en las mediciones de las concentraciones de los

micronutrientes. 5) No obtuvimos información acerca del consumo de suplementos, medicamentos o alcohol en estas mujeres y sabemos también que los bajos niveles de estos micronutrientes, especialmente los folatos pudieron ser afectados por el consumo de estos productos. Sin embargo, uno de los criterios de exclusión para el estudio ASCUS- COL era tener una enfermedad crónica como las de tipo autoinmune o cáncer, este criterio disminuyó la posibilidad de que las participantes estuvieran consumiendo anticonvulsivantes, barbitúricos, metotrexato o pirimetamina que son medicamentos que comúnmente disminuyen las concentraciones de folatos. Con respecto a los suplementos, al estudio no ingresaron mujeres embarazadas, a quienes sistemáticamente se les formulan estos micronutrientes. En el estudio no observamos individuos con niveles altos de ácido fólico ($>20\text{ng/mL}$) el cual es el metabolito del folato no metabolizado; este parámetro también apunta a que las participantes incluidas en este estudio no tomaban suplementos en el momento del reclutamiento y que los niveles de micronutrientes encontrados reflejan las concentraciones obtenidas a partir de la dieta que usualmente tienen las participantes. 6) No contamos con la genotipificación para la realización de este análisis. Es probable que restringiendo los análisis a las mujeres con infecciones por VPH16/18 se pueda observar una asociación tal como se ha descrito en otras publicaciones; sin embargo, se requiere un mayor tamaño de muestra para asegurar suficientes casos y controles con infecciones por esos dos genotipos para tener un análisis con suficiente poder. Finalmente, el poder que obtuvimos para este análisis fue del 71.5%, este poder alcanzado no nos permite rechazar la posibilidad de que realmente si haya una asociación entre los bajos niveles de micronutrientes y el riesgo de NIC2+ pero que por la limitación del tamaño de muestra no pudimos encontrarla.

En conclusión, los resultados de este análisis indican que a pesar de que Colombia cuenta con una política para la fortificación de harina de trigo con ácido fólico desde hace más de 20 años la

prevalencia de niveles deficientes entre la población estudiada es mayor a la reportada en otros países latinoamericanos y es similar entre los casos y controles incluidos en este análisis. Esto último dificulta encontrar asociaciones entre los niveles circulantes de ácido fólico y las lesiones NIC2+.

Se necesitan más estudios epidemiológicos que evalúen la prevalencia de la deficiencia de folatos y B12 en la población colombiana, no solamente en las poblaciones especiales como las mujeres embarazadas y los niños menores de 5 años de manera que se puedan tener referencias más adecuadas para poder hacer comparaciones. Es importante conocer y monitorear si las políticas públicas como la fortificación de la harina de trigo realmente son efectivas, si los procesos de cocción son los adecuados o si el consumo de los alimentos fortificados es frecuente. De la misma manera se requieren estudios donde se incluyan un mayor número de mujeres diagnosticadas con lesiones NIC3+ y de esta manera determinar si verdaderamente los niveles circulantes de estos micronutrientes cumplen un papel importante dentro del modelo de cáncer cervical (fracción atribuible).

Bibliografía

- Abike, F., Engin, A. B., Dunder, I., Tapisiz, O. L., Aslan, C., & Kutluay, L. (2011). Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias. *Arch Gynecol Obstet*, 284(1), 209-214. doi:10.1007/s00404-010-1650-7
- Brito, A., Hertrampf, Eva, Olivares, Manuel, Gaitán, Diego, Sánchez, Hugo, Allen, Lindsay H, & Uauy, Ricardo. (2012). Folatos y vitamina B12 en la salud humana. In (Vol. 140 (11), pp. 1464-1475): Revista médica de Chile.
- Brito, A., Mujica-Coopman, M. F., López de Romaña, D., Cori, H., & Allen, L. H. (2015). Folate and Vitamin B12 Status in Latin America and the Caribbean: An Update. *Food Nutr Bull*, 36(2 Suppl), S109-118. doi:10.1177/0379572115585772
- Carmel, R., Green, R., Rosenblatt, D. S., & Watkins, D. (2003). Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 62-81. doi:10.1182/asheducation-2003.1.62
- Chih, H. J., Lee, A. H., Colville, L., Binns, C. W., & Xu, D. (2013). A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *Nutr Cancer*, 65(3), 317-328. doi:10.1080/01635581.2013.757630
- Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A., & Powers, H. J. (2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(10), 2782-2789. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0493
- García-Closas, R., Castellsagué, X., Bosch, X., & González, C. A. (2005). The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*, 117(4), 629-637. doi:10.1002/ijc.21193
- Goodman, M. T., Shvetsov, Y. B., McDuffie, K., Wilkens, L. R., Zhu, X., Franke, A. A., . . . Hernandez, B. Y. (2007). Hawaii cohort study of serum micronutrient concentrations and clearance of incident oncogenic human papillomavirus infection of the cervix. *Cancer Res*, 67(12), 5987-5996. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0313
- Herrera M, J. (2016). Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). In A. M. Muñoz (Ed.), (Vol. 43 (4), pp. 336-345): *Revista chilena de nutrición*.
- Hertrampf, E., Cortés, F., Erickson, J. D., Cayazzo, M., Freire, W., Bailey, L. B., . . . Pfeiffer, C. (2003). Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr*, 133(10), 3166-3169. doi:10.1093/jn/133.10.3166
- Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, P., Instituto Nacional de Salud, Universidad de Antioquia, OPS. (2005). Encuesta Nacional de la Situación Nutricional de Colombia-ENSIN-. In (1st ed., pp. 229-261): Panamericana Firmas e Impresos.
- Medellín, A. d. (2015). Perfil de seguridad alimentaria y nutricional de Medellín y sus corregimientos 2015. In U. d. Antioquia (Ed.).
- Ministerio de la Protección Social, P., Instituto Nacional de Salud, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. (2010). Encuesta de la situación Nutricional en Colombia. In (2nd ed. ed., pp. 268-337.). Bogotá: Da Vinci Editor & CÍA.
- Moscicki AB, S. M., Franceschi Silvia. (2020). Chapter 9 -The Natural History of Human Papillomavirus Infection in Relation to Cervical Cancer. In.

- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, *24 Suppl 3*, S3/1-10.
doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Piyathilake, C. J., Badiga, S., Paul, P., Vijayaraghavan, K., Vedantham, H., Sudula, M., . . . Gravitt, P. E. (2010). Indian women with higher serum concentrations of folate and vitamin B12 are significantly less likely to be infected with carcinogenic or high-risk (HR) types of human papillomaviruses (HPVs). *Int J Womens Health*, *2*, 7-12.
doi:10.2147/ijwh.s6522
- Piyathilake, C. J., Henao, O. L., Macaluso, M., Cornwell, P. E., Meleth, S., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2004). Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res*, *64*(23), 8788-8793. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2402
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Alvarez, R. D., Bell, W. C., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2009). Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prev Res (Phila)*, *2*(7), 658-664. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0175
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Brill, I., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2007). Lower red blood cell folate enhances the HPV-16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*, *23*(3), 203-210. doi:10.1016/j.nut.2006.12.002
- Rampersaud, G. C., Bailey, L. B., & Kauwell, G. P. (2002). Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: review and recommendations for practitioners. *J Am Diet Assoc*, *102*(9), 1273-1282. doi:10.1016/s0002-8223(02)90281-6
- Rositch, A. F., Burke, A. E., Viscidi, R. P., Silver, M. I., Chang, K., & Gravitt, P. E. (2012). Contributions of recent and past sexual partnerships on incident human papillomavirus detection: acquisition and reactivation in older women. *Cancer Res*, *72*(23), 6183-6190. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2635
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., . . . Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16086. doi:10.1038/nrdp.2016.86
- Screen G, S. J., Groff J. (2010). *Advanced nutrition and human metabolism* (Fifth ed.). Canadá.
- Sedjo, R. L., Fowler, B. M., Schneider, A., Henning, S. M., Hatch, K., & Giuliano, A. R. (2003). Folate, vitamin B12, and homocysteine status. findings of no relation between human papillomavirus persistence and cervical dysplasia. *Nutrition*, *19*(6), 497-502.
doi:10.1016/s0899-9007(02)01096-1
- Sedjo, R. L., Inserra, P., Abrahamsen, M., Harris, R. B., Roe, D. J., Baldwin, S., & Giuliano, A. R. (2002). Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *11*(4), 353-359.
- Selhub, J., Morris, M. S., Jacques, P. F., & Rosenberg, I. H. (2009). Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*, *89*(2), 702S-706S.
doi:10.3945/ajcn.2008.26947C
- Shane, B. (2008). Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull*, *29*(2 Suppl), S5-16; discussion S17-19.
doi:10.1177/15648265080292S103
- Siegel, E. M., Salemi, J. L., Villa, L. L., Ferenczy, A., Franco, E. L., & Giuliano, A. R. (2010). Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, *118*(3), 289-294. doi:10.1016/j.ygyno.2010.05.022

- Stern, P. L. (2005). Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S72-81. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.005
- Teresa Shamah Levy, M. A. A., & Cuevas, C. y. L. (2015). Desnutrición y obesidad: doble carga en México. In (Vol. 16): Revista digital universitaria UNAM.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., . . . Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., Xi, L. F., Chernes, S., O'Reilly, S., . . . Koutsky, L. A. (2011). Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(4), 699-707. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1108
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2(5), 342-350. doi:10.1038/nrc798

Material suplementario

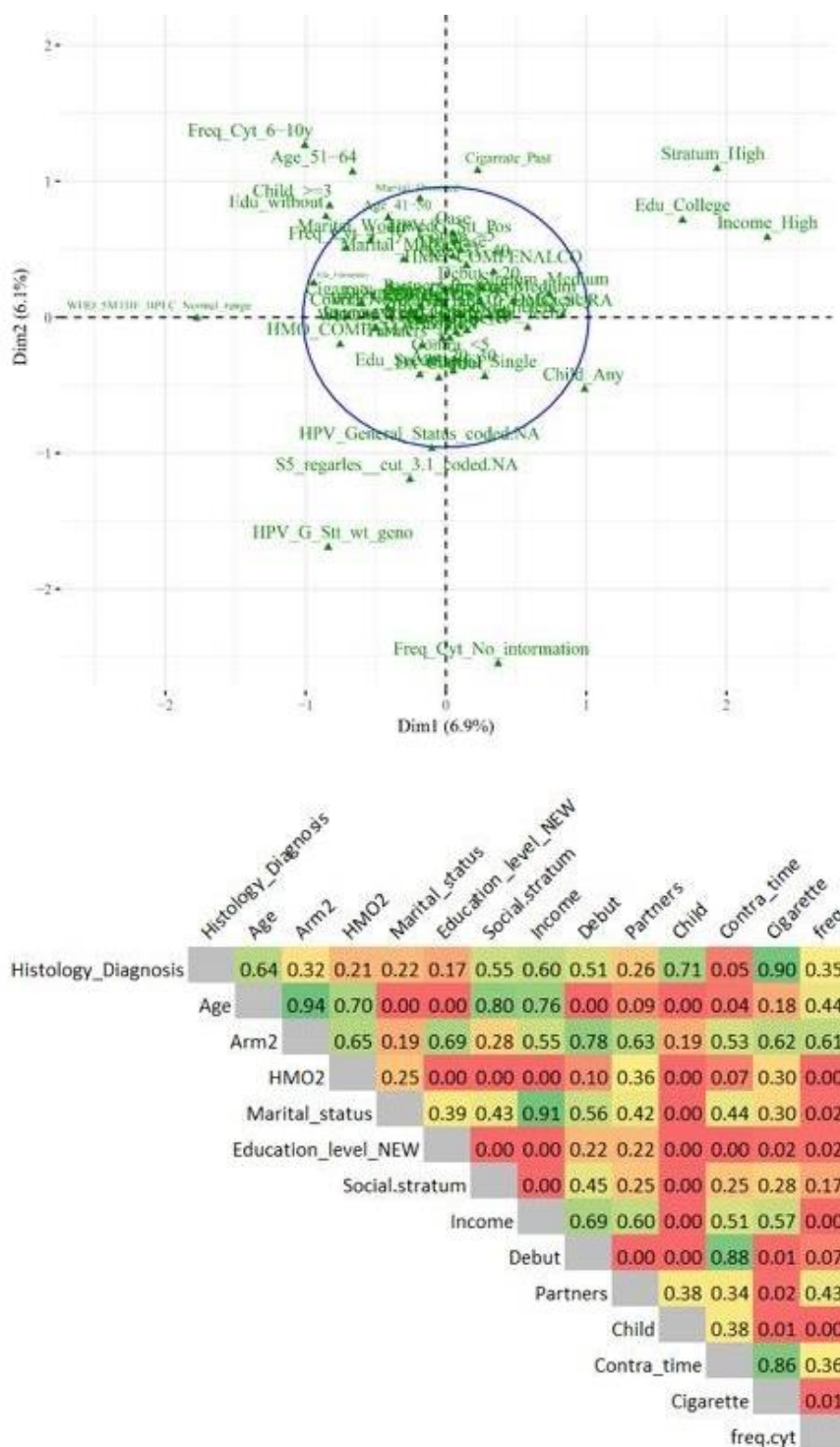


Figura suplementaria 1. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el 5MTHF. n=136/136

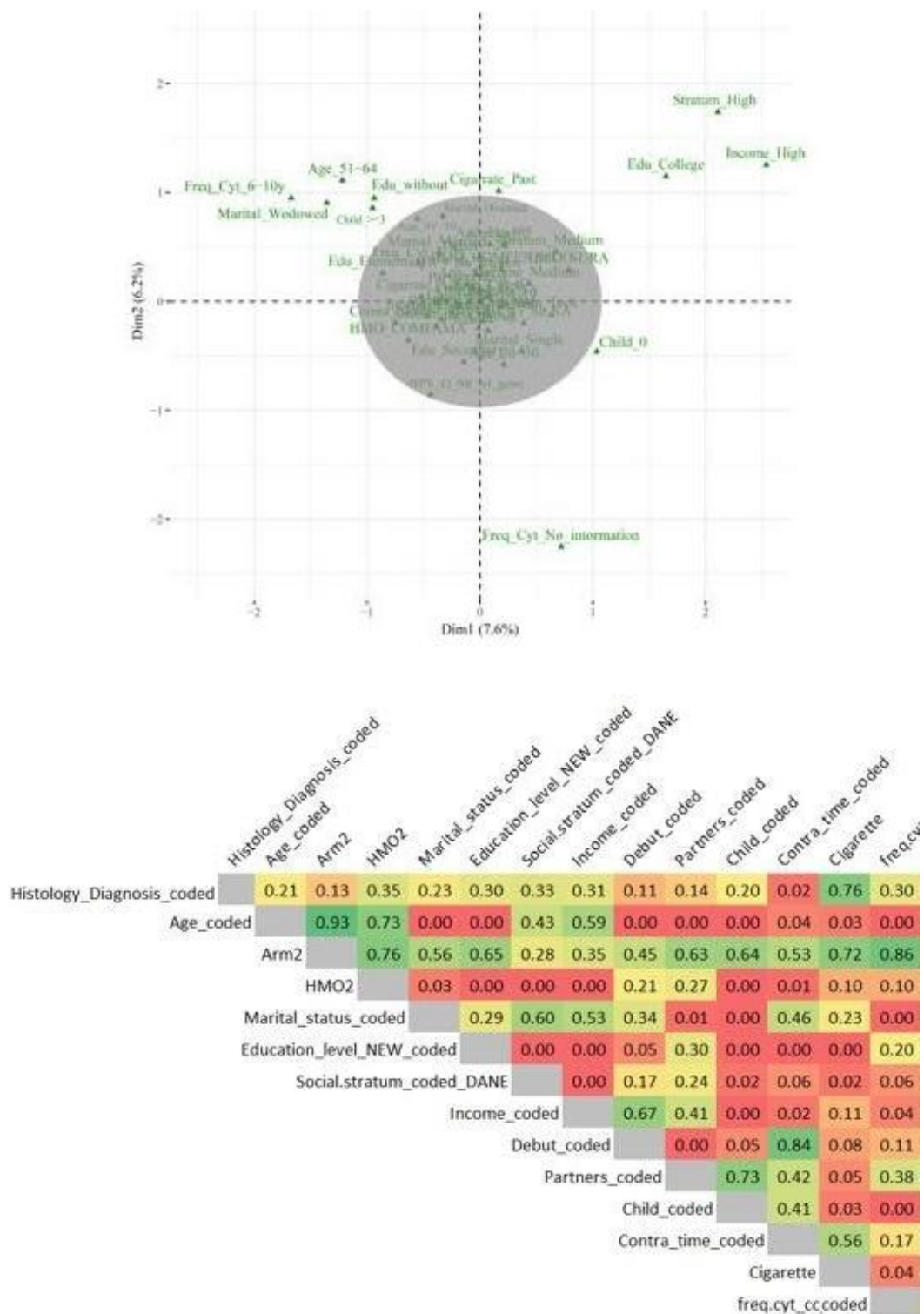


Figura suplementaria 2. Análisis de correspondencia y matriz de asociación para el Ácido fólico n=171/171

Tabla suplementaria 1. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles con resultado disponible de 5MTHF

Características	Controles	Casos	Total	P
	N=136	N=136	N=272	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.1[8.9]	31.4 [8.9]	31.2 [8.9]	0.812
20-30	77 (56.6)	78 (57.4)	155 (57.0)	0.640
31-40	36 (26.5)	39 (28.7)	75 (27.6)	
41-50	20 (14.7)	14 (10.3)	34 (12.5)	
51-64	3 (2.2)	5 (3.7)	8 (2.9)	
EPS				
1	29 (21.3)	41 (30.2)	70 (25.7)	0.209
2	62 (45.6)	59 (43.4)	121 (44.5)	
3	45 (33.1)	36 (26.5)	81 (29.8)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	50 (36.8)	64 (47.1)	114 (41.9)	0.212
Divorciada/separada/viuda	10 (7.3)	7 (5.1)	17 (6.3)	
Soltera	76 (55.9)	65 (47.8)	141 (51.8)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	46 (33.8)	48 (35.3)	94 (34.6)	0.919
Secundaria completa	50 (36.8)	51 (37.5)	101 (37.1)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	40 (29.4)	37 (27.2)	77 (28.3)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.4 [3.9]	16.9 [2.4]	17.2 [3.2]	0.233
≥20	25 (18.4)	18 (13.2)	43 (15.8)	0.507
16-19	72 (52.9)	76 (55.9)	81 (29.8)	
≤15	39 (28.7)	42 (30.9)		
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	3.5 [1-25]	3.0 [1-98]	3.0 [1-98]	0.679
1-2	45 (33.1)	36 (26.5)	81 (29.8)	0.261
≥3	39 (28.7)	51 (37.5)	90 (33.1)	
≥5	52 (38.2)	49 (36.0)	101 (37.1)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	0.451
0	39 (28.7)	33 (24.3)	72 (26.5)	0.712
1-2	79 (58.1)	84 (61.8)	163 (59.9)	
≥3	18 (13.2)	19 (13.9)	37 (13.6)	

Años de consumo de anticonceptivos hormonales

Mediana [Rango]	2.8 [0-26]	3.6 [0-23]	3.0 [0-26]	0.155
0	20 (14.7)	13 (9.6)	33 (12.2)	0.054
<5	79 (58.1)	68 (50.0)	147 (54.0)	
≥5	37 (27.2)	55 (40.4)	92 (33.8)	

Uso de cigarrillo

Nunca	110 (80.9)	108 (79.4)	218 (80.2)	0.897
En el pasado	9 (6.6)	11 (8.1)	20 (7.3)	
Actualmente	17 (12.5)	17 (12.5)	34 (12.5)	

Frecuencia de realización de la citología

Una o más veces cada año	91 (66.9)	80 (58.8)	171 (62.9)	0.246
Una vez cada 2- 3 años	30 (22.1)	38 (28.0)	68 (25.0)	
Menos de una vez cada 4-5 años	9 (6.6)	15 (11.0)	24 (8.8)	
No sabe/ No responde	6 (4.4)	3 (2.2)	9 (3.3)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Tabla suplementaria 2. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles con resultado disponible de Ácido fólico

Características	Controles	Casos	Total	P
	N=171 n (%)	N=171 n (%)	N=342 n (%)	
Edad, años				
20-30	91 (53.2)	90 (52.6)	181 (52.9)	0.873
31-40	44 (25.7)	51 (29.8)	95 (27.8)	0.207
41-50	31 (18.1)	20 (11.7)	51 (14.9)	
51-64	5 (2.9)	10 (5.9)	15 (4.4)	
EPS				
1	38 (22.2)	49 (28.7)	87 (25.4)	0.354
2	78 (45.6)	75 (43.8)	153 (44.7)	
3	55 (32.2)	47 (27.5)	103 (29.8)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	62 (36.3)	80 (46.8)	142 (41.5)	0.139
Divorciada/separada/viuda	13 (7.6)	10 (5.9)	23 (6.7)	
Soltera	96 (56.1)	81 (47.4)	177 (51.8)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	56 (32.8)	56 (32.8)	112 (32.8)	1.000
Secundaria completa	63 (36.8)	63 (36.8)	126 (36.8)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	52 (30.4)	52 (30.4)	104 (30.4)	
Edad de la primera relación sexual, años				
≥20	38 (22.2)	24 (14.0)	62 (18.1)	0.108
16-19	90 (52.6)	93 (54.4)	183 (53.5)	
≤15	43 (25.2)	54 (31.6)	97 (28.4)	
Número de parejas sexuales				
1-2	56 (32.8)	44 (25.7)	100 (29.2)	0.143
3-4	47 (27.5)	63 (36.8)	110 (32.2)	
≥5	68 (39.8)	64 (37.4)	132 (38.6)	
Número de hijos				
0	52 (30.4)	38 (22.2)	90 (26.3)	0.202
1-2	89 (52.1)	103 (60.2)	192 (56.1)	
≥3	30 (17.5)	30 (17.5)	60 (17.5)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
0	32 (18.7)	17 (9.9)	49 (14.3)	0.023
<5	92 (53.8)	89 (52.1)	181 (52.9)	

≥ 5	47 (27.5)	65 (38.0)	112 (32.8)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	127 (74.3)	130 (76.0)	257 (75.2)	0.758
En el pasado	18 (10.5)	14 (8.2)	32 (9.4)	
Actualmente	26 (15.0)	27 (15.8)	53 (15.5)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	110 (64.3)	105 (61.4)	215 (62.9)	0.187
Una vez cada 2- 3 años	39 (2.8)	43 (25.2)	82 (24.0)	
Menos de una vez cada 4-5 años	13 (7.6)	20 (11.7)	33 (9.6)	
No sabe/ No responde	9 (5.3)	3 (1.8)	12 (3.5)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Tabla suplementaria 3. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles con resultado disponible de vitamina B12

Características	Controles	Casos	Total	P
	N=37	N=37	N=74	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.1 [9.5]	32.2 [9.6]	32.2 [9.5]	0.878
20-30	14 (37.8)	15 (40.5)	29 (39.2)	0.642
31-40	13 (35.1)	16 (43.2)	29 (39.2)	
41-50	8 (21.6)	4 (10.8)	12 (16.2)	
51-64	2 (5.4)	2 (5.4)	4 (5.4)	
EPS				
1	11 (29.7)	12 (32.4)	23 (31.1)	0.605
2	16 (43.2)	12 (32.4)	28 (37.8)	
3	10 (27.0)	13 (35.1)	23 (31.1)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	12 (32.4)	19 (51.4)	31 (41.9)	0.232
Divorciada/separada/viuda	4 (10.8)	2 (5.4)	6 (8.1)	
Soltera	21 (56.8)	16 (43.2)	37 (50.0)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	10 (27.0)	16 (43.2)	26 (35.1)	0.135
Secundaria completa	14 (37.8)	15 (40.5)	29 (39.2)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	13 (35.1)	6 (16.2)	19 (25.7)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.7 [4.0]	16.8 [2.5]	17.3 [3.4]	0.543
≥20	9 (24.3)	10 (27.0)	19 (25.7)	0.961
16-19	19 (51.4)	18 (48.7)	37 (50.0)	
≤15	9 (24.3)	9 (24.3)	18 (24.3)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [rango]	4.0 [1-98]	3.0 [1-98]	3.5 [1-98]	0.978
1-2	11 (29.7)	12 (32.4)	23 (31.1)	0.884
3-4	13 (35.1)	11 (29.7)	24 (32.4)	
≥5	13 (35.1)	14 (37.8)	27 (36.5)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	0.701
0	9 (24.3)	6 (16.2)	15 (20.3)	0.481
1-2	21 (56.8)	26 (70.3)	47 (63.5)	
≥3	7 (18.9)	5 (13.5)	12 (16.2)	

**Años de consumo de
anticonceptivos hormonales**

Mediana [Rango]	2.5 [0-26]	3.5 [0-23]	3.0 [0-26]	0.399
0	3 (8.1)	5 (13.5)	8 (10.8)	0.365
<5	23 (62.2)	17 (46.0)	40 (54.1)	
≥5	11 (29.7)	15 (40.5)	26 (35.1)	

Uso de cigarrillo

Nunca	29 (78.4)	28 (75.7)	57 (77.0)	0.679
En el pasado	2 (5.4)	4 (10.8)	6 (8.1)	
Actualmente	6 (16.2)	5 (13.5)	11 (14.9)	

**Frecuencia de realización de la
citología**

Una o más veces cada año	23 (62.2)	21 (56.8)	44 (59.5)	0.056
Una vez cada 2- 3 años	6 (16.2)	14 (37.8)	20 (27.0)	
Menos de una vez cada 4-5 años	5 (13.5)	2 (5.4)	7 (9.5)	
No sabe/ No responde	3 (8.1)	0 (0.0)	3 (4.0)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles.

Capítulo 4:

Relación de los niveles de folato y vitamina B12 con los niveles de metilación de los genes

L1- L2 del Virus del Papiloma Humano y del gen humano EPB41L3

Los resultados de este capítulo incluyen resultados parciales de la cuantificación de los niveles de la metilación de los genes virales L1- L2 y el gen humano EPB41L3 producto de la pasantía en Queen Mary University of London y tesis doctoral de Arianis Tatiana Ramírez Pineda.

Introducción

La metilación del ADN es un proceso biológico mediante el cual se agregan grupos metilo a los nucleótidos de citosina en regiones conocidas como las islas de citosina (CpG) de la molécula de ADN. La metilación puede cambiar la actividad de un segmento de ADN sin cambiar la secuencia. Cuando se encuentra en un promotor de genes, la metilación del ADN generalmente actúa inhibiendo la unión del factor de transcripción a dicha región y por tanto regula negativamente la transcripción de los genes (Mahmoud & Ali, 2019; Mikeska & Craig, 2014). La metilación del ADN es una modificación epigenética crítica en diversos procesos biológicos como el desarrollo embriológico, enfermedades crónicas como el cáncer, la respuesta inmune, el envejecimiento, entre muchos otros (Lorincz, 2016). La metilación del ADN es alterada en respuesta y depende de los niveles de varios micronutrientes como el folato y la vitamina B12 (Crider, Yang, Berry, & Bailey, 2012; Mahajan et al., 2019). En el metabolismo de un solo carbono, en el cual se generan los grupos metilo que modifican al nucleótido citosina del ADN, el folato actúa como un portador de un carbono y la vitamina B12 actúa como cofactor de la enzima

metionina sintasa (MS) para dar origen a la S-adenosín metionina (SAM). Este último es identificado como el principal compuesto que dona grupos metilo para la metilación del ADN (Herrera M, 2016). Algunos autores han observado que la metilación global del ADN disminuye con la depleción del folato, mientras que aumenta con la suplementación del mismo (K. C. Kim, Friso, & Choi, 2009; McKay, Waltham, Williams, & Mathers, 2011).

La metilación también depende de la actividad de las metiltransferasas de ADN DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (DNMTs del inglés *DNA methyltransferases enzymes* or DNA MTases). Estas enzimas pueden clasificarse además como metiltransferasas de *novo*, enzimas que pueden metilar secuencias de CpG previamente no metiladas o metiltransferasas de mantenimiento, que copian marcas de metilación preexistentes en nuevas cadenas de ADN durante la replicación. DNMT1 predominantemente metila los dinucleótidos CpG hemimetilados como metiltransferasa de mantenimiento, mientras que la DNMT3A y la DNMT3B catalizan la metilación de ADN de *novo* (Robert et al., 2003). La hiper o hipometilación y por tanto la regulación negativa o positiva de la expresión génica dependen de los niveles de la expresión de las DNMTs (Kanai & Hirohashi, 2007; Morey Kinney et al., 2008). Estudios previos diseñados para dilucidar el mecanismo subyacente detrás de las aberraciones en el perfil de metilación del genoma que ocurren en algunos cánceres, han demostrado que la dieta deficiente en folato aumenta la expresión de las proteínas DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y la proteína con dominio de unión a metil-CpG (MBDs, del inglés *Methyl CpG Binding Proteins*) en hígados de ratas durante las primeras etapas de tumorigénesis (Ghoshal et al., 2006) así como hipermetilación específica de genes como PTPRO (del inglés *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O*) se ha observado en diferentes tipos de cáncer humano, incluidos el de colon (Mori et al., 2004) y pulmón (Motiwala et al., 2004). Tanto en estudios en humanos como experimentos *in vitro* se ha

demostrado relación entre los niveles de folato, la metilación del ADN y la probabilidad de desarrollar lesiones preneoplásicas de alto grado.

Flatley y colaboradores en 2009 han reportado que las concentraciones bajas de folato se asocian con mayor probabilidad de la infección por VPH-AR ($P = 0.031$) y con un diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical o cáncer cervical invasivo ($P < 0.05$). La hipometilación global del ADN fue mayor en mujeres con cáncer invasivo de cuello uterino que en los otros grupos de comparación ($P < 0.05$). Un grupo de tres genes supresores de tumores, *CDH1*, *DAPK* y *HIC1* mostró una proporción significativamente mayor de la metilación del promotor con la progresión de la lesión, 2.3%, 10.4% y 20% en diagnósticos negativos para lesión intraepitelial, en neoplasias intraepiteliales grado 2 (NIC2) y cáncer respectivamente ($P < 0.05$). (Flatley et al., 2009). Utilizando queratinocitos de prepucio humano (PHFK) transfectados con VPH16 y VPH18, Henken y col (Henken et al., 2007) demostraron además que la infección con genotipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR), per se también induce una sobreexpresión de las ADN metiltransferasas, específicamente de las DNMT1 y DNMT3B. Leonard y colaboradores (Leonard et al., 2012) observaron diferencias en la expresión de la tinción nuclear de DNMT1, esta no solo se observó en la capa basal sino también en las células de la capa suprabasales que se extienden al estrato granuloso. Normalmente cuando no hay infección con VPH-AR la expresión de DNMT1 está restringida solo a los núcleos de las células de la capa basal.

Estas observaciones han sido sustentadas científicamente en estudios de cohorte que han demostrado que la hipermetilación del genoma del VPH y de genes del hospedero se asocian con mayor probabilidad de progresión a lesiones precancerosas de alto grado en mujeres positivas para VPH-AR debido a alteraciones en las funciones de productos génicos que regulan la supresión tumoral (Lorincz, 2016; Steenbergen, Snijders, Heideman, & Meijer, 2014). Los genes L1 y L2 que codifican para las proteínas de la cápside son los que exhiben mayor hipermetilación

entre las mujeres diagnosticadas con NIC2+ comparadas con aquellas sin lesión o con una lesión leve (\leq NIC1); y se ha comprobado que el aumento de la metilación de regiones en estos genes está en relación directa con el aumento de la probabilidad de desarrollar una lesión de alto grado (Vasiljević et al., 2014; Wentzensen et al., 2012). Entre una gran cantidad de genes humanos sugeridos, la metilación del promotor o los intrones de los genes supresores de tumores *CADMI*, *MAL*, *EPB41L3*, *TERT*, *PAX1*, *SOX1* y *LMX1* han demostrado tener utilidad clínica (Brentnall et al., 2014), El Dr. Lorincz y col desarrollaron un clasificador llamado S5 que determina el nivel de la metilación del ADN de los genes L1 y L2 de VPH16, VPH18, VPH31 y VPH33 y la región promotora del gen humano *EPB41L3* (Brentnall et al., 2014; Lorincz et al., 2016). En un trabajo previo realizado en el grupo Infección y Cáncer, hemos observado que en las mujeres del estudio “Comparación de la colposcopia inmediata, repetición de la citología convencional y la prueba de HPV-AR para el manejo de la citología ASC-US en los servicios de salud de rutina de Medellín, Colombia: ensayo ASCUS-COL” la mediana de la metilación de S5 aumentó significativamente con la severidad del diagnóstico histopatológico (Prueba de Cuzick $\chi^2 = 42.6$, $p < 0.001$). Basados en esta información, nuestro objetivo en este análisis fue evaluar si el aumento de la metilación de los genes virales L1 y L2 y el gen humano *EPB41L3* se asocia con el riesgo de lesiones de alto grado de cérvix y si este riesgo es aún mayor en mujeres que además de altos niveles de metilación tienen bajos niveles de folato y vitamina B12.

Métodos

Diseño del estudio

Este es un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de mujeres con citología ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) de Medellín, Colombia que participaron en el estudio ASCUS-COL.

El ASCUS-COL es un ensayo clínico pragmático diseñado con el objetivo de comparar en condiciones rutinarias de tamización cervical oportunista, la efectividad de la colposcopia inmediata, la citología convencional a los 6 y 12 meses y la prueba de VPH para detectar neoplasia intraepitelial cervical grado 2 o más severo (NIC2+) y la eficiencia para reducir NIC2+ no detectado por las estrategias de manejo después de 24 meses de seguimiento a las mismas mujeres. Los detalles de este ensayo clínico fueron descritos en el capítulo dos de esta tesis.

Contexto del estudio

Brevemente, entre enero de 2011 y enero de 2014, en el ASCUS-COL se reclutaron 2.661 mujeres con citología ASC-US de los servicios de tamización de tres Empresas Promotoras de Salud (EPSs) que prestaban sus servicios en la ciudad de Medellín, Colombia. En la visita de reclutamiento, las participantes fueron asignadas al azar a una de las tres estrategias (colposcopia, citología repetida a los 6 y 12 meses o a la prueba de VPH) de manejo clínico rutinario en sus respectivas Instituciones Prestadoras de servicios de Salud (IPS). El seguimiento se realizó cada 12 meses durante 2 años desde la fecha de reclutamiento y en cada visita el personal clínico diligenció un cuestionario de datos personales y factores de riesgo, se realizó examen pélvico, se recolectaron muestras para citología convencional, prueba de VPH de alto riesgo (VPH-AR) y muestras de sangre periférica para estudios posteriores. A los 24 meses de seguimiento, con el

objetivo de detectar las lesiones NIC2+ no diagnosticadas por las EPSs durante los 24 meses previos, a todas las mujeres independientemente de la estrategia de manejo clínico asignada en la visita de reclutamiento, se les realizó la prueba de VPH para la detección de genotipos de alto riesgo (VPH-AR) y citología convencional. Las mujeres con ambas pruebas negativas tuvieron una salida segura del estudio mientras que aquellas que tuvieron la prueba VPH-AR positiva y / o un resultado de la citología \geq ASC-US fueron remitidas a una colposcopia/biopsia estrictamente controlada por el personal del estudio para asegurar la calidad de dicho procedimiento. Durante la colposcopia se tomaron 2 biopsias de las lesiones observadas y una biopsia aleatoria del epitelio aparentemente sano; en caso de no observar ninguna lesión, se tomaron 2 biopsias aleatorias del epitelio aparentemente sano.

Tal como se explicó en el capítulo tres, las biopsias tomadas en colposcopia a las mujeres del estudio ASCUS-COL en cualquier momento del seguimiento o visita de salida, fueron usadas para definir si las participantes tuvieron o no una lesión NIC2+. Todas las mujeres incluidas en el ASCUS-COL permitieron el uso de las muestras biológicas tomadas para estudios futuros.

Participantes

Las características de las participantes incluidas en el ASCUS-COL fueron descritas con detalle en el capítulo dos de esta tesis. Se incluyeron mujeres entre 20 y 69 años, con una citología ASC-US por primera vez residentes en la ciudad de Medellín o el Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Fueron excluidas las mujeres que tenían una citología anormal previa, las que habían recibido tratamiento por patología cervical previamente, las mujeres con alguna discapacidad intelectual que les permitiera comprender los beneficios o riesgos de participar en el estudio, mujeres embarazadas y mujeres con condiciones de inmunosupresión o que planeaban mudarse fuera del área de estudio.

Los casos y controles para el análisis que se presenta en este capítulo, fueron seleccionados entre las mujeres VPH positivo de acuerdo al resultado de la prueba de VPH de la visita de reclutamiento (línea de base o cita 00) quienes además tenían por lo menos un resultado de biopsia durante los 24 meses de seguimiento y que contaban con el resultado del clasificador S5. Los casos y controles fueron pareados por edad y tiempo al diagnóstico.

Definición del desenlace (Lesiones de alto grado del cérvix NIC2+)

La definición de este desenlace fue detallada en el capítulo tres de esta tesis. Se tuvieron en cuenta los mismos lineamientos para la recuperación de los resultados de biopsias tomadas en colposcopia así como para la relectura de las mismas con el fin de obtener los diagnósticos finales para cada participante en el estudio ASCUS-COL.

Definición de casos: Mujeres con diagnóstico de lesiones de alto grado, es decir con diagnóstico histológico confirmado de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o más severo (NIC2+) entre los que se incluyen NIC2, NIC3 o carcinoma *in situ*, carcinoma escamocelular, y adenocarcinomas.

Definición de controles: Mujeres sin lesiones del cérvix o con lesiones de bajo grado. Es decir, con diagnóstico histológico confirmado Negativo para malignidad o diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1 (NIC1).

Definición de la variable independiente:

Metilación alta o baja de los genes virales L1 y L2 y el gen humano EPB41L. Se definió como metilación alta al resultado del clasificador S5 por encima del punto de corte ≥ 2.8 .

Variable de interacción: Niveles de los micronutrientes folato y vitamina B12 de acuerdo a las categorías establecidas por la OMS.

Métodos de laboratorio

Recolección de muestras e identificación de infección con VPH

Como se explicó en los capítulos anteriores, se recogieron muestras cervicales de las mujeres usando un citocepillo (HC Cervical Sampler) las cuales posteriormente se transfirieron a un tubo que contenía 1 ml de Specimen Transport Medium TM (STM). El ensayo Captura de Híbridos 2 (CH2) de la casa comercial Qiagen HPV (QIAGEN, Gaithersburg, MD, EE. UU.), fue utilizada para la detección del ADN del VPH en los exfoliados cervicales de las mujeres que participaron en el estudio ASCUS-COL. Esta prueba es un ensayo hibridación de ADN-ARN que por medio de la amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca detecta de manera cualitativa un conjunto de 13 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) en muestras cervicouterinas. La prueba se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante en las instalaciones del Grupo de Infección y Cáncer en la Universidad de Antioquia. Las unidades relativas de luz superiores o iguales a 1 (≥ 1) se consideraron resultados positivos.

Extracción de ADN

Del contenido residual de células cervicales almacenadas a -30°C en el tubo de STM desnaturalizado para realizar la prueba de CH2 se extrajo el ADN a partir de 200 μL . Brevemente, las muestras de STM se digirieron durante 2 horas a 55°C en presencia de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K y Laureth-12 al 10%. Las muestras se centrifugaron a la velocidad máxima en una microcentrífuga Eppendorf y se pusieron en bloques de calor a 95°C durante 10 min. Después se realizó la precipitación del ADN con acetato de amonio 5M y etanol al 70%;

posteriormente, el ADN se lavó, se secó y se resuspendió en 100 μ L de tampón TE (10 mM TRIS / 0.1 mM EDTA) (Gravitt et al., 2000). La calidad y cantidad de ADN fueron evaluadas usando el Nanodrop y la amplificación por PCR para la variante MID856 como control interno (Santos et al., 2010). El ADN extraído se almacenó a -30° C y se envió congelado en hielo seco a la Universidad Queen Mary de Londres donde se realizó la prueba de metilación clasificador 5.

Genotipificación del VPH

La genotipificación del VPH se realizó de forma independiente y a ciegas en 5 μ L de una dilución 1:10 de cada muestra en el Instituto de Investigación Médica Queen's de la Universidad de Edinburg (Edinburg, Reino Unido) utilizando la prueba CLART® HPV4 (Genomica®, Madrid, España). Esta prueba utiliza cebadores de consenso MY09 / 11 biotinilados y detecta 13 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), un presunto HPV66 de bajo riesgo, y 20 genotipos de bajo riesgo (26, 53, 70, 73, 82, 85, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 89) (Bonde et al., 2018).

Prueba de metilación de ADN (Clasificador S5)

Los ensayos de metilación se basaron en la PCR de punto final y la pirosecuenciación cuantitativa de amplicones usando cebadores para 6 regiones objetivo que cubren en total 22 posiciones CpG del gen humano EPB41L3 y las regiones tardías (L1 y L2) de HPV16, HPV18 y HPV31 y HPV33 (Vasiljević et al., 2014). Brevemente, se usaron 100 ng de ADN para la conversión de bisulfito donde las citosinas no metiladas se convirtieron en uracilo con el kit de metilación de ADN EZ (Zymo research, Irvine, CA). El ADN convertido (2 μ L/por muestra) se amplificó mediante cebadores de PCR independientes de metilación y se confirmó la calidad del ADN amplificado en un instrumento de electroforesis capilar QIAxel (Qiagen). Veinticinco μ L de

producto de PCR se utilizaron para la pirosecuenciación (PyromarkQ96 ID Platform, Qiagen, Alemania). La puntuación S5 se definió como 30.9 (EPB41L3) + 13.7 (HPV16L1) + 4.3 (HPV16L2) + 8.4 (HPV18L2) + 22.4 (HPV31L1) + 20.3 (HPV33L2) con sitios CpG individuales como lo describió Brentnall y col en 2014 (Brentnall et al., 2014).

Medición de las concentraciones de folato y vitamina B12

Las concentraciones de estos dos micronutrientes fueron estimadas en el suero recolectado en la línea de base (visita de ingreso) del estudio ASCUS-COL bajo las mismas condiciones descritas en los capítulos dos y tres de esta tesis. Las concentraciones de folato total sérico y vitamina B12 se determinaron en sueros con el Kit SimulTRAC-SNB Vitamin B12 / Folate RIA utilizando protocolos previamente establecidos y validados en el Laboratorio de Ciencias de la Nutrición en la Universidad de Alabama en Birmingham. El fundamento de este radioinmunoensayo fue descrito con detalle en el capítulo tres de esta tesis.

Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra y el análisis del poder para probar esta hipótesis del estudio fue realizada con el software STATA 13 (StataCorp LLC, Texas, EE. UU.) Para los cálculos de análisis de potencia y tamaño de muestra, se asumieron las siguientes condiciones: alpha (α) se fijó 0.05 y los cálculos de tamaño de muestra se realizaron con *odds ratios* previstos desde 1.25 hasta 2 asumiendo una potencia de 80%. El número de mujeres VPH-AR positivo en el reclutamiento con lesiones cervicales de alto grado con resultado disponible de la metilación (n=155), asumiendo un poder mínimo de 80% cuando el *odd ratio* hipotético es igual o mayor a dos y la proporción de metilación alta entre los controles es del 26% o mayor, el tamaño de muestra obtenido de 155 casos y 155 controles, aseguraría un poder del 81.5%.

Operacionalización de las variables

De acuerdo a la historia natural de la enfermedad y por su relación con la posible desenlace (NIC2+), la exposición (niveles de metilación) o la variable de interacción (niveles del micronutriente) se consideraron la edad al ingreso al estudio, la edad de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales, el número de hijos nacidos vivos y el uso de anticonceptivos hormonales como posibles factores de confusión. La edad fue categorizada por décadas, la edad de la primera relación sexual se categorizó en tres grupos, las que tuvieron la primera relación sexual después de los veinte años (≥ 20 años), entre los 16-19 años y a los 15 años o antes (≤ 15). El número de parejas sexuales en toda la vida fue categorizada así: 1-2 parejas, 3-4 parejas y ≥ 5 parejas. El número de hijos nacidos vivos se categorizó en: sin hijos, 1-2 hijos y ≥ 3 hijos. Por último, el uso de anticonceptivos hormonales se categorizó de la siguiente manera: no uso durante la vida, menos de cinco años de uso y cinco años o más de uso de los anticonceptivos. Las concentraciones de micronutrientes se organizaron en dos categorías, y los individuos se clasificaron con concentraciones normales y deficientes/posiblemente deficientes según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS): 6-20 ng/mL, 3.0 -5.9 ng/mL y < 3 ng/mL para el folato y sus metabolitos y > 200 -996 pg/mL, 150-200 pg/mL y < 150 pg/mL para la vitamina B12. En los análisis se presenta la categoría como “Deficientes”. Los niveles de metilación, resultados del clasificador S5 se categorizaron como positivos y negativos tomando en cuenta el punto de corte 2.8; metilación alta los valores ≥ 2.8 y los valores del S5 < 2.8 se consideraron metilación baja.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables sociodemográficas y factores de riesgo incluyendo todos los casos NIC2+ (n=155) y sus respectivos controles de los cuales se obtuvo la concentración de los micronutrientes por el método radioinmunoensayo y el resultado del clasificador S5. Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U Mann-Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias y medianas respectivamente. Las medianas de las concentraciones de la metilación entre casos y controles fueron comparadas usando la prueba U Mann-Whitney o Kruskal Wallis. Para evaluar si las asociaciones entre el estado de metilación del ADN viral o del gen humano EPB41L3 y el riesgo de NIC2+ se modifica por los niveles de micronutrientes folato o vitamina B12, se realizaron comparaciones de las medianas del nivel de metilación de acuerdo a las concentraciones de los micronutrientes folato y vitamina B12 en dos categorías (deficientes/probablemente deficientes, presentada en los análisis como “deficientes” y normales) usando la prueba U Mann-Whitney o Kruskal Wallis. También se realizaron pruebas formales de interacción ingresando el producto de la variable de exposición (estado de metilación- clasificador S5) y el modificador del efecto (niveles de los micronutrientes) en el modelo. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software STATA 13 (StataCorp LLC, Texas, EE. UU.) y el paquete estadístico R (Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-projecto.org>).

Consideraciones éticas

El proyecto de investigación en el que está enmarcada esta tesis y el análisis de metilación cuenta con el aval del Comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la

Universidad de Antioquia (Resolución 08-036- 171) y la facultad de Medicina (Resolución 004/2008) de la Universidad de Antioquia. Todas las mujeres del ASCUS-COL incluidas en este análisis firmaron el consentimiento informado que incluía la autorización para la utilización de las muestras y datos personales en futuras investigaciones. Los resultados de las concentraciones de los micronutrientes y niveles de metilación no fueron entregados a las participantes ya que fueron realizados después de la finalización del estudio y no es información que se cambie la conducta o decisiones médicas que deban tomarse al respecto de cada participante.

Resultados

Participantes

En la figura 1 se indica cómo fueron seleccionadas las mujeres incluidas en este análisis. Tal como se mencionó en anteriores capítulos, debido a que la infección de VPH-AR es un paso necesario en el desarrollo de NIC2+, restringimos nuestra selección de participantes a las 1.122 VPH-AR positivo. Entre la mujeres VPH-AR positivas con resultado de patología la cual además fue releída por un panel de patólogos expertos, se seleccionaron 185 participantes con diagnóstico NIC2+ como casos y 185 participantes con diagnóstico <NIC2 como controles. Como se muestra en la figura 1, las concentraciones de los dos micronutrientes (folato y vitamina B12) fueron medidas en (n=169) casos y controles (n=169). Sin embargo, en los análisis de interacción se incluyeron los casos y controles que tenían tanto los resultados de la concentración de los micronutrientes n=155 casos y n=155 controles (117 Negativos, 38 NIC1, 113 NIC2, 38 NIC3 y 4 casos de cáncer) como los resultados de nivel de metilación de acuerdo al clasificador S5.

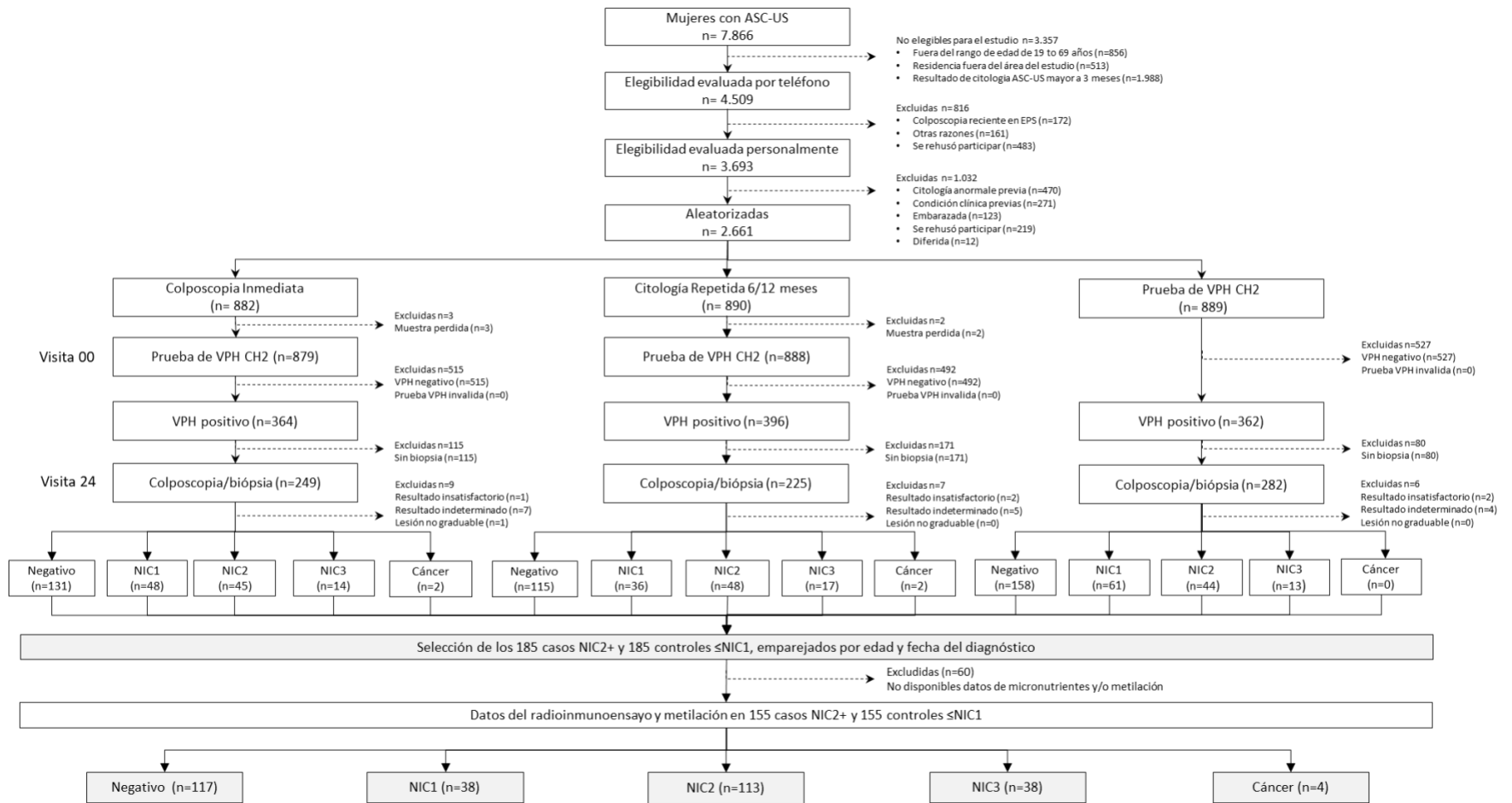


Figura 1. Flujograma del estudio.

ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado, **CH2:** Prueba captura de híbridos 2, **VPH:** Virus Papiloma Humano. Se indica el número de mujeres con citología ASC-US aleatorizadas en el ASCUS-COL, el número de mujeres VPH+ en la línea de base (visita 00) para estrategia de manejo así como el número de mujeres con alguna colposcopia biopsia recuperadas y el peor diagnóstico para cada una durante el estudio. Finalmente se indica el número de mujeres incluidas en este análisis.

Características de las participantes

En la tabla 1 se describen las características sociodemográficas y factores de riesgo conocidos para el desarrollo de lesiones NIC2+. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles para las variables sociodemográficas (edad, EPS, estado marital y nivel educativo). La media de la edad fue 32.2 años (DS 9.5). El 44.8% de las mujeres estaban aseguradas en la EPS 2 (EPS pública), el 51.6% estaban solteras. El 34% solo tenían educación primaria o no tenían educación. Observamos diferencias estadísticamente significativa en la edad de inicio de las relaciones sexuales, los casos iniciaron más tempranamente comparadas con los controles ($p=0.024$). Más de la mitad de las mujeres tuvieron su primera relación sexual entre los 16 y 19 años (54.8%); no hubo diferencias entre el número de compañeros sexuales durante toda la vida ($p=0.054$). El cincuenta y seis por ciento tenía entre 1 y 2 hijos, el 17.4% tres hijos o más. El uso de anticonceptivos hormonales fue estadísticamente diferente entre casos y controles; casi el 18% de los controles nunca los habían usado mientras que el 37.4% de los casos los habían usado durante 5 años o más $p=0.022$. La mayoría de las mujeres (74.5%) nunca habían fumado cigarrillos y en cuanto a la frecuencia en la realización de la citología, el 63.6% de las mujeres se la realizan una o más veces al año. Observamos una diferencia estadísticamente significativa entre los casos y los controles con respecto al genotipo de la infección y la metilación (≥ 2.8). Los casos tuvieron más infecciones por VPH16/18 y metilación alta comparados con los controles ($p<0.001$).

Tabla 1. Distribución de las características sociodemográficas y factores de riesgo para NIC2+ entre casos y controles

Características	Controles	Casos	Total	P
	N=155 n (%)	N=155 n (%)	N=310 n (%)	
Edad, años				
Media [DS]	32.1 [9.5]	32.2 [9.6]	32.2 [9.5]	0.848
20-30	81 (52.3)	81 (52.3)	162 (52.3)	0.179
31-40	41 (26.4)	47 (30.3)	88 (28.4)	
41-50	29 (18.7)	18 (11.6)	47 (15.1)	
51-64	4 (2.6)	9 (5.8)	13 (4.2)	
EPS				
1	37 (23.8)	45 (29.1)	82 (26.5)	0.588
2	72 (46.5)	67 (43.2)	139 (44.8)	
3	46 (29.7)	43 (27.7)	89 (28.7)	
Estado Marital				
Casada/unión libre	55 (35.5)	73 (47.1)	128 (41.3)	0.106
Divorciada/separada/viuda	13 (8.4)	9 (5.8)	22 (7.1)	
Soltera	87 (56.1)	73 (47.1)	160 (51.6)	
Nivel educativo				
Sin educación - Primaria completa o incompleta	52 (33.6)	52 (33.6)	104 (33.6)	0.855
Secundaria completa	54 (34.8)	58 (37.4)	112 (36.1)	
Técnico - tecnológico/ Universitario	49 (31.6)	45 (29.1)	94 (30.3)	
Edad de la primera relación sexual, años				
Media [DS]	17.7 [4.0]	16.8 [2.5]	17.3 [3.4]	0.004
≥20	35 (22.6)	21 (13.6)	56 (18.1)	0.024
16-19	87 (56.1)	83 (53.6)	170 (54.8)	
≤15	33 (21.3)	51 (32.9)	84 (27.1)	
Número de parejas sexuales				
Mediana [Rango]	4.0 [1-98]	3.0 [1-98]	3.5 [1-98]	0.276
1-2	53 (34.2)	37 (23.9)	90 (29.0)	0.054
3-4	40 (25.8)	57 (36.8)	97 (31.3)	
≥5	62 (40.0)	61 (39.4)	123 (39.7)	
Número de hijos				
Mediana [Rango]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	1.0 [0-5]	0.086
0	49 (31.6)	33 (21.3)	82 (26.5)	0.101
1-2	79 (51.0)	95 (61.3)	174 (56.1)	

≥3	27 (17.4)	27 (17.4)	54 (17.4)	
Años de consumo de anticonceptivos hormonales				
Mediana [Rango]	2.5 [0-26]	3.5 [0-23]	3.0 [0-26]	0.150
0	28 (18.1)	14 (9.0)	42 (13.6)	0.022
<5	86 (55.5)	83 (53.6)	169 (54.5)	
≥5	41 (26.4)	58 (37.4)	99 (31.9)	
Uso de cigarrillo				
Nunca	116 (74.8)	115 (74.2)	231 (74.5)	0.731
En el pasado	17 (11.0)	14 (9.0)	31 (10.0)	
Actualmente	22 (14.2)	26 (16.8)	48 (15.5)	
Frecuencia de realización de la citología				
Una o más veces cada año	100 (64.5)	97 (62.6)	197 (63.6)	0.082
Una vez cada 2- 3 años	35 (22.6)	37 (23.9)	72 (23.2)	
Menos de una vez cada 4-5 años	11 (7.1)	19 (12.3)	30 (9.7)	
No sabe/ No responde	9 (5.8)	2 (1.3)	11 (3.5)	
Infección por HPV16/18				
Negativo	104 (67.1)	73 (47.1)	177 (57.1)	< 0.001
Positivo	51 (32.9)	82 (52.9)	133 (42.9)	
Niveles de metilación (clasificador S5)				
Baja (punto de corte < 2.8)	116 (74.8)	60 (38.7)	176 (56.8)	< 0.001
Alta (punto de corte ≥2.8)	39 (25.8)	95 (61.3)	134 (43.2)	

Las pruebas Chi cuadrado de Pearson, T de Student y U de Mann Whitney fueron usadas para comparar las proporciones, medias, medianas entre casos y controles. El punto de corte de los niveles de metilación (clasificador S5) se establecieron de acuerdo al cuartil superior de los niveles de metilación de los controles (<NIC2).

Niveles de metilación

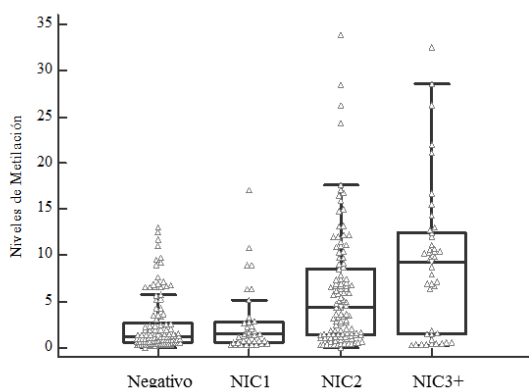


Tabla 2. Comparación de los niveles de metilación de los genes de VPH de alto riesgo L1-L2 y el gen humano *EPB41L3* entre mujeres negativas para lesión, NIC1, NIC2, NIC3+

	Negativos	NIC1	NIC2	NIC3+	P ^a
	N=117	N=38	N=113	N=42	

[Mediana/rango] [1.2/0.0 – 13.0] [1.5/0.3 – 17.1] [4.4/0.0 – 33.8] [9.2/0.3 – 32.5] < 0.001

^a Kruskal Wallis. Comparación de los niveles de metilación entre las mujeres sin lesiones (Negativo), con lesiones de bajo grado (NIC1) y con lesiones de alto grado del cérvix (NIC2) y NIC3+. $p = < 0.001$

Figura 2 y Tabla 2. Comparación de los niveles de metilación de acuerdo a la severidad de lesiones del cérvix.

Comparación de los niveles de metilación entre los grupos de mujeres sin lesiones (Negativo) con lesiones de bajo grado (NIC1) y con lesiones de alto grado de cérvix (NIC2 y NIC3+). Prueba Kruskal Wallis $p = < 0.001$. NIC= Neoplasia Intraepitelial Cervical.

En la figura 2 se presenta la comparación de las medianas de los niveles de metilación entre las mujeres sin lesiones cervicales, con diagnóstico de NIC1, NIC2 y NIC3+, se observó que a medida que incrementa la severidad de las lesiones cervicales y esta diferencia fue significativa, $p = < 0.001$.

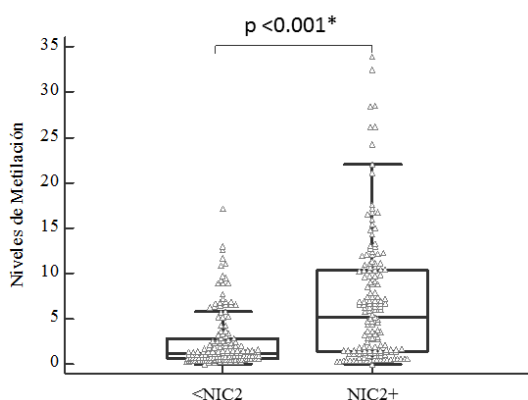


Tabla 3. Comparación de los niveles de metilación de los genes de VPH de alto riesgo L1-L2 y el gen humano *EPB41L3* entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2)

	Controles N= 155	Casos N= 155	p
[Mediana/rango]	[1.2/0.0 – 17.1]	[5.1/0.0 – 33.8]	< 0.001 ^a
OR (IC95%)	Ref	4.7 (2.9 – 7.7)	< 0.001
	Ref	4.6 (2.7 – 7.7) ^b	

^a U de Mann Whitney. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología

Figura 3 y tabla 3. Comparación de los niveles de metilación entre lesiones cervicales de bajo y alto grado. Comparación entre los casos (NIC2+) y controles (<NIC2). Prueba U Mann-Whitney $p < 0.001$.

En la figura 3 se muestra la comparación de los niveles de metilación entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2). El rango del nivel de metilación en los casos fue entre 0.0 – 33.8 y entre los controles 0.0 – 17.1 (155 pares). Se observaron diferencias significativas en las medianas de los niveles de metilación, (puntaje S5= 1.2 para los controles y 5.1 para los casos). En la tabla 3 se observa una clara asociación (OR 4.6, IC95% 2.7 - 7.7) entre un nivel de metilación alta (≥ 2.8) y el riesgo de lesiones NIC2+.

Niveles de metilación de acuerdo a la concentración sérica de folato total

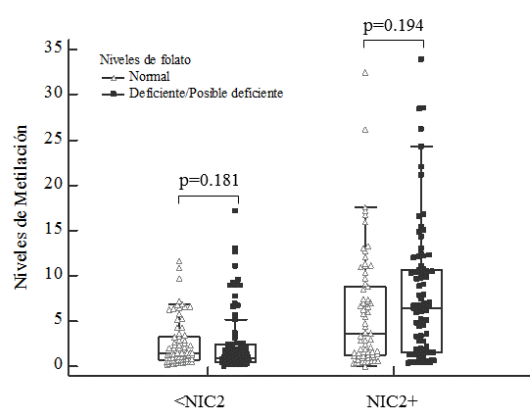


Tabla 4. Comparación de los niveles de metilación entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2) de acuerdo a las concentraciones de folato normal y deficiente

Folatos/Metilación	Controles (<NIC2)	Casos (NIC2+)	OR (IC95%) ^a	OR (IC95%) ^b	p ^c
	n	n			
Normal/Negativa	56	30	Ref	Ref	
Normal/Positiva	22	40	3.4 (1.7–6.7)	2.8 (1.3–6.2)	
Deficiente/Negativa	60	30			0.069
Deficiente/Positiva	17	55	6.5 (3.2–13.0)	9.0 (3.9–20.7)	

^a OR crudo. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología. ^c Prueba de interacción. Ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología. La categoría deficiente incluye los niveles deficientes y probablemente deficientes. Metilación negativa y positiva se considero como niveles de metilación < 2.8 y ≥ 2.8 respectivamente.

Figura 4 y tabla 4. Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de folato.

Comparación de la distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de folato entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2). Medida de asociación cruda y ajustada de la metilación y el riesgo de NIC2+ para niveles de folato normal y deficiente.

En figura 4 se muestra la distribución de los niveles de metilación entre casos y controles de acuerdo a la concentración de folato según la categorización de la OMS, normal y deficiente. La mediana y rango del nivel de metilación en los individuos con niveles de folato normal fue 1.4 (0.2 – 11.7) en los controles y 3.7 (0.0 – 32.5) en los casos y en los individuos con niveles de

folato deficientes, 1.0 (0.0 – 17.1) en los controles y 6.4 (0.3 – 33.8) en los casos. No se observaron diferencias en las medianas de los niveles de metilación entre los controles con niveles normales del folato (puntaje S5 1.4 y 1.0, $p=0.181$, figura 4). En los casos, la mediana de los niveles de metilación fue mayor entre las mujeres con niveles deficientes comparadas con las mujeres con niveles normales del folato, (puntaje S5 3.7 vs 6.4); sin embargo, esta diferencia no fue significativa $p=0.194$.

En la tabla 4 se observa mayor riesgo de NIC2+ asociado metilación alta en individuos con niveles normales de folatos (OR: 2.8, IC95% 1.3 - 6.2) pero la magnitud de esta asociación fue mayor en los individuos con niveles de folato deficiente, (OR: 9.0, IC95% 3.9 - 20.7), la prueba de interacción no alcanzo a ser significativa, ($p=0.069$).

Niveles de metilación de acuerdo a la concentración sérica de vitamina B12

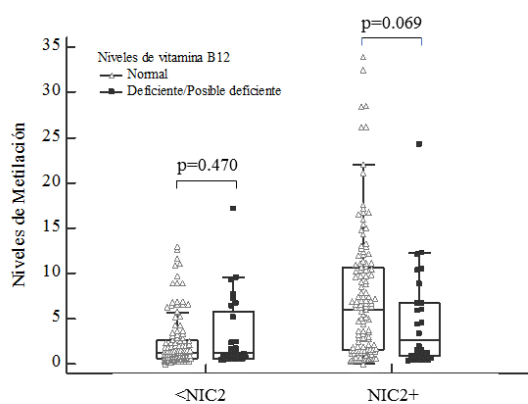


Tabla 5. Comparación de los niveles de metilación entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2) de acuerdo a las concentraciones de vitamina B12 normal y deficiente

B12/Metilación	Controles (<NIC2)	Casos (NIC2+)	OR (IC95%) ^a	OR (IC95%) ^b	p^c
Normal/Negativa	96	47	Ref	Ref	
Normal/Positiva	31	82	5.4 (3.1–9.3)	5.9 (3.3–10.8)	0.212
Deficiente/Negativa	20	13			
Deficiente/Positiva	8	13	2.5 (0.8–7.7)	2.2 (0.2–28.1)	

^a OR crudo. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología. ^c Prueba de interacción. Ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología. La categoría deficiente incluye los niveles deficientes y probablemente deficientes. Metilación negativa y positiva se considero como niveles de metilación <2.8 y ≥ 2.8 respectivamente.

Figura 5 y tabla 5. Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de vitamina B12.

Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de vitamina B12. Comparación de la distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de vitamina B12 entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2). Medida de asociación cruda y ajustada de la metilación y el riesgo de NIC2+ para niveles de B12 normal y deficiente.

En la figura 5 se muestra la distribución de los niveles de metilación entre casos y controles y de acuerdo a la concentración de vitamina B12 según la categorización de la OMS, normal y deficiente... La mediana y el rango del nivel de metilación fue 1.2 (0.0 – 13.0) en los controles y 6.0 (0.0 – 33.8) en los casos de los individuos con niveles de B12 normal mientras que en los individuos con niveles de vitamina B12 deficiente, la mediana fue 1.2 (0.4 – 17.1) en los controles y 2.3 (0.3 – 24.3) en los casos. No se observaron diferencias en los niveles de metilación entre controles de los individuos con niveles normales o deficientes de la vitamina B12 (1.2 y 1.2), $p= 0.470$. La mediana del nivel de metilación en los casos fue mayor entre las mujeres con niveles normales comparadas con las mujeres con niveles deficientes del micronutriente, 6.0 vs 2.6 respectivamente; sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p= 0.069$). En la tabla 5 se observa una asociación de metilación alta con el riesgo de NIC2+ en los individuos con niveles de vitamina B12 normales (OR: 5.9,, IC95% 3.3 - 10.8), pero esta asociación no se observó en individuos con niveles deficientes de este micronutriente (OR: 2.2 (IC95% 0.2 - 28.1).

Niveles de metilación de acuerdo a la concentración sérica de folato y asociación con lesiones NIC2+ en mujeres VPH16/18 positivo

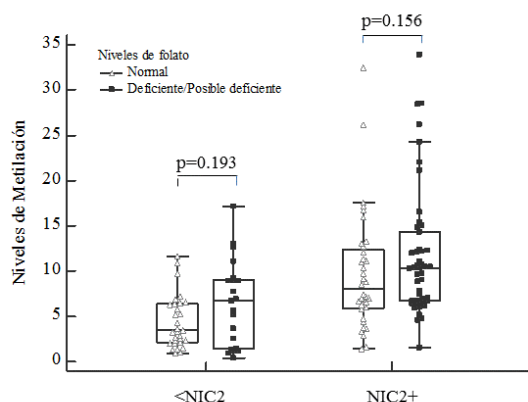


Tabla 6. Comparación de los niveles de metilación entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2) de acuerdo a las concentraciones de folato normal y deficiente en mujeres VPH16/18 positivo

Folatos/Metilación	Controles	Casos	OR (IC95%) ^a	OR (IC95%) ^b	p ^c
	(<NIC2)	(NIC2+)			
Normal/Negativa	n = 12	n = 2	Ref	Ref	
Normal/Positiva	18	34	11.3 (2.3–56.3)	21.5 (2.2–211.7)	0.466
Deficiente/Negativa	7	1			
Deficiente/Positiva	14	45	22.5 (2.5–198.9)	107.3 (3.8–3053.7)	

^a OR crudo. ^b Modelo ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología. ^c Prueba de interacción. Ajustado por edad, estado marital, nivel educativo, edad de primera relación sexual, número de compañeros sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos y frecuencia de citología. La categoría deficiente incluye los niveles deficientes y probablemente deficientes. Metilación negativa y positiva se considero como niveles de metilación < 2.8 y ≥ 2.8 respectivamente.

Figura 6 y tabla 6. Distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de folato entre individuos VPH16/18 positivos.

Comparación de la distribución de los niveles de metilación de acuerdo a las concentraciones de folato entre casos (NIC2+) y controles (<NIC2). Medida de asociación cruda y ajustada de la metilación y el riesgo de NIC2+ para niveles de folato normal y deficiente.

En la figura 6 se muestra la distribución de los niveles de metilación entre casos y controles y de acuerdo a la concentración de folato según la categorización de la OMS normal y deficiente restringiendo el análisis a mujeres VPH16/18 positivo en el momento del reclutamiento en el ASCUS-COL. La mediana y el rango del nivel de metilación fue 3.4 (0.9 – 17.7) en los controles y 8.0 (1.4 – 32.5) en los casos de los individuos con niveles de folato normal mientras que en los individuos con niveles de folato deficiente, la mediana fue 6.7 (0.4 – 17.1) en los controles y 10.3 (1.5 – 33.8) en los casos. No se observaron diferencias en las medianas de los niveles de metilación entre los controles y casos con niveles normales del folato (puntuaje S5 6.7 y 3.4, p= 0.193, figura 6). En los casos, la mediana de los niveles de metilación fue similar entre las

mujeres con niveles deficientes comparadas con las mujeres con niveles normales del folato, (puntaje S5 10.3 y 8.0) $p= 0.156$. En la tabla 6 se observa mayor riesgo de NIC2+ asociado a metilación alta en individuos con niveles normales de folatos (OR: 21.5, IC95% 2.2 – 211.7) y la magnitud de esta asociación fue mayor en los individuos con niveles de folato deficiente (OR: 107.3, IC95% 3.8 – 3056.7). La prueba de interacción no fue significativa, ($p=0.466$).

Discusión

En este capítulo evaluamos si la asociación entre el estado de metilación del ADN y el riesgo de NIC2+ se modifica por los niveles de los micronutrientes folato o vitamina B12. Usando el mismo diseño de casos y controles anidado en una cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín- Colombia descrito en esta tesis, presentamos un análisis que incluyó un conjunto de 310 muestras (155 casos NIC2+ y 155 controles <NIC2) de mujeres VPH positivo. Los niveles séricos de folato y vitamina B12 fueron determinados mediante radioinmunoensayo y la metilación fue evaluada mediante el clasificador S5 que en población de tamización ha demostrado tener una sensibilidad del 90% para la detección de lesiones NIC2+ (Brentnall et al., 2014; Lorincz et al., 2016). En las de mujeres del ASCUS-COL se demostró que la mediana de la metilación aumentaba significativamente con la severidad del diagnóstico histopatológico usando este mismo clasificador.

En este análisis observamos diferencias significativas en la edad de inicio de relaciones sexuales entre los casos y controles; las relaciones sexuales se iniciaron a edad más temprana en los casos comparadas con los controles. Estas diferencias también se encontraron en el uso de anticonceptivos hormonales. Estos dos factores de riesgo han sido claramente asociados con la adquisición de la infección por VPH y el desarrollo de lesiones de alto grado respectivamente (Bosch et al., 2008; Moscicki et al., 2006; Moscicki AB, 2020; Muñoz et al., 2006; Muñoz et al., 2009; Schiffman et al., 2016). Se observaron diferencias entre los casos y los controles con respecto al genotipo de la infección y la metilación (≥ 2.8), los casos tuvieron más infecciones por VPH16/18 y metilación alta comparados con los controles. Hubo mayor prevalencia de infecciones por los genotipos de VPH-AR 16/18 entre los casos, hallazgo que coincide con lo descrito en la literatura (Muñoz et al., 2003; Walboomers et al., 1999).

Las diferencias observadas entre casos y controles referentes a los niveles de metilación y el aumento de estos niveles conforme aumenta la severidad de la lesión cervical han sido previamente reportados por varios autores en la última década (Brandsma et al., 2009; Lorincz, 2014; Lorincz et al., 2016; Mirabello et al., 2012; C. Sun et al., 2011). Se ha demostrado que la metilación del ADN del VPH y de genes humanos ocurre durante la infección por VPH-AR y progresión preneoplásica del tejido del tejido cervical y conduce a alteraciones de las funciones de productos genéticos que regulan la supresión tumoral (Lorincz, 2016; Steenbergen et al., 2014). Puntualmente, se ha observado metilación de regiones específicas del virus como son los genes L1 y L2 que codifican las proteínas de la cápside y de los genes humanos como el gen supresor de tumores EPB41L3. El nivel de metilación se ha correlacionado positivamente con la severidad de las lesiones cervicales.

Así como la metilación se ha asociado de manera independiente con el riesgo de NIC2+ en muchos estudios, otros han informado que los niveles de folato y vitamina B12 se asocian con la historia natural de la infección por VPH y el cáncer cervical (Piyathilake et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2014; Tomita et al., 2013; Tong et al., 2011). Es más, algunos estudios como el realizado por Piyathilake CJ y col en 2007 reveló que las mujeres con una infección por VPH-16 presentando niveles bajos de folato eritrocitario, tenían un riesgo significativamente mayor de tener lesiones preneoplásicas del cuello uterino comparadas con las mujeres VPH negativo y con un mayores niveles de folato (Piyathilake et al., 2007). Sin embargo, a pesar del papel del folato y la vitamina B12 en el metabolismo de un solo carbono y por ende en la metilación del ADN, pocos trabajos epidemiológicos han evaluado si la asociación entre los niveles de metilación del ADN y el riesgo de NIC2+ se modifica por los niveles de estos dos micronutrientes. En nuestro estudio, cuando se compararon los niveles de

metilación entre casos y controles teniendo en cuenta las concentraciones de folato presentadas en las categorías establecidas por la OMS, observamos que éstos eran mayores entre las mujeres con lesiones NIC2+ (casos) con niveles deficientes de folato comparados con las mujeres con niveles normales, aunque esta diferencia no fue significativa, $p=0.194$. En cuanto a las concentraciones de vitamina B12 observamos que los niveles de metilación fueron mayores entre los casos con niveles normales de esta vitamina comparados con los casos deficientes, $p=0.069$. Sin embargo, la proporción de individuos con niveles deficientes/posiblemente deficientes de vitamina B12 fue muy bajo entre la población de estudio ocasionado resultados imprecisos. Flatley y col en 2009 en un estudio transversal realizado en UK que incluyó muestras de mujeres con diagnósticos histológicos normales del cérvix ($n = 58$), NIC1 ($n = 68$), NIC2 ($n = 56$), NIC3 ($n = 76$), y cáncer cervical ($n = 50$) observaron que la concentración baja de folato eritrocitario se asociaba de manera significativa con resultados positivos para VPH-AR y citología cervical anormal; reportaron además que tres genes supresores de tumores (DAPK, CDH1 y HIC1) tenían mayores niveles de metilación del promotor y que esos niveles de metilación incrementaron con el aumento de la severidad de la enfermedad. También reportaron hipometilación global del ADN en las células cervicales de pacientes con cáncer en comparación con todos los demás diagnósticos histológicos; no reportaron asociación entre los niveles de hipometilación y la concentración de folato eritrocitario (Flatley et al., 2009).

En el análisis restringido a los casos y controles VPH16/18 positivo ($n= 133$) encontramos que los niveles de metilación fueron mayores en los casos con niveles deficientes/ posiblemente deficientes comparadas con los casos con niveles normales del folato; sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Observamos una asociación positiva de la metilación con el riesgo de NIC2+; esta asociación fue mayor entre los individuos con niveles de folato deficientes

comparados con los individuos con niveles del micronutriente normales. Sin embargo, reconocemos que la cantidad de individuos con metilación baja fue muy baja y la interacción no fue significativa. Los niveles de metilación se asociaron con el riesgo de NIC2+ independientemente de las concentraciones de folato o de vitamina B12. Sin embargo en el análisis de interacción no se observaron diferencias significativas. Estos hallazgos sugieren que los niveles de metilación son los que realmente se relacionan y confieren el riesgo de NIC2+ y que este riesgo no es modificado por los niveles de folato o vitamina B12. Nuestros resultados son opuestos a los publicados por Chandrika y col en 2014 y esto se debe en parte a que la metilación fue determinada en genes diferentes. Estos investigadores observaron que las mujeres con concentraciones plasmáticas más altas de folato (≥ 14.29 ng/mL) y un mayor nivel de metilación de VPH 16 ($\geq 11\%$) tenían un 75% menos de probabilidades de ser diagnosticadas con NIC2+, lo que les hizo proponer que los niveles altos de folato pueden permitir mantener la expresión de la oncoproteína E6 en un nivel inferior. Además del folato, también observaron que las mujeres con mayores concentraciones plasmáticas de vitamina B12 y un mayor grado de metilación de VPH 16 tenían un 60% menos de probabilidades de ser diagnosticados con NIC2+, lo que sugiere la importancia de este micronutriente para reducir el riesgo de lesiones preneoplásicas a través de la metilación del VPH (Piyathilake et al., 2014). Mujeres en muchos países de bajos ingresos experimentan dietas muy bajas en folato y vitamina B12; esto, en combinación con la falta de programas y estrategias de tamización organizados para la detección de neoplasia intraepitelial cervical, pueden exacerbar el riesgo de cáncer cervical (Flatley et al., 2009). Sin embargo, en este análisis observamos niveles deficientes de folato y vitamina B12 solo en el 16% y 9% de los individuos incluidos. El poder *Post-hoc* para los análisis presentados en este capítulo de acuerdo a la proporción real de controles expuestos a niveles deficientes de

folato y el usando el *odd ratio* obtenido para determinar la asociación entre la metilación y el riesgo de NIC2+ fue de 99.4%, lo cual nos hace descartar que la razón por la cual no hayamos encontrado diferencias se deba al tamaño de muestra. Con respecto a los datos publicados por Flatey 2009, nosotros no evaluamos hipometilación global del ADN y tampoco incluimos una gran cantidad de muestras de pacientes con cáncer (n=4); la hipometilación asociada a bajos niveles de folato puede ser un hallazgo de las etapas tardías de la enfermedad. Otros aspectos a tener en cuenta que explican las diferencias entre nuestros hallazgos y los de la investigadora Piyathilake CJ podría ser el tipo de muestras en las que se determinaron las concentraciones de los micronutrientes; a diferencia de nuestro estudio que determinó las contracciones de los micronutrientes en suero, Piyathilake CJ y col usaron el folato eritrocitario el cual es útil como indicador del estado de folato a largo plazo. El suero en cambio es un indicador de la ingesta reciente de folato. Una diferencia importante a tener en cuenta, es que en nuestro estudio, nosotros elegimos casos y controles VPH positivos; mientras que en la mayoría de estudios publicados hasta la fecha referentes a los niveles de micronutrientes y el riesgo de NIC2+, los controles usados son VPH negativos lo que no permite determinar verdaderamente la fracción atribuible de los niveles de estos micronutrientes en el modelo de la enfermedad. Probablemente los niveles bajos de micronutrientes sean un factor de riesgo para la adquisición de la infección mas no para la persistencia. Se ha postulado además que el crecimiento desregulado de las células cancerosas ocurre más rápido de lo que lo haría una célula normal y por lo tanto demanda una mayor cantidad de folato para la síntesis de ADN. El crecimiento neoplásico puede causar una escasez de folato para procesos como la metilación del ADN y causar una pérdida global de la metilación. Por otro lado, las oncoproteínas del VPH influyen en la maquinaria de metilación

del ADN y, por lo tanto, alteran la expresión de genes del huésped y virales ya sea para ocultarse o como parte de su ciclo viral (Kalantari et al., 2004; Leonard et al., 2012).

Concluimos que aunque las pruebas de interacción no fueron significativas, claramente observamos una asociación entre la metilación y el riesgo de NIC2+ en los individuos con deficiencia de folato. Los niveles de folato podrían estar agotándose para mantener la metilación de los genes virales L1-L2 y del gen humano supresor de tumores EPB41L3 y de esta manera asegurar la evasión de la respuesta inmune e instauración de una lesión cervical de alto grado. El presente análisis no proporciona evidencia suficiente de que dos de los micronutrientes donantes de metilo más importantes, el folato y la vitamina B12, desempeñen un papel fundamental en la modificación del riesgo asociado entre los niveles de metilación del ADN y el riesgo de NIC2+ pero sí sugiere que podrían serlo. Se requeriría otro tipo de diseño de estudio y ampliar el número de casos y controles VPH16/18 positivo para poder obtener evidencia más precisa.

Bibliografía

- Bonde, J., Ejegod, D. M., Cuschieri, K., Dillner, J., Heideman, D. A. M., Quint, W., . . . Arbyn, M. (2018). The Valgent4 protocol: Robust analytical and clinical validation of 11 HPV assays with genotyping on cervical samples collected in SurePath medium. *J Clin Virol*, *108*, 64-71. doi:10.1016/j.jcv.2018.09.012
- Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., . . . Muñoz, N. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, *26 Suppl 10*, K1-16. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.064
- Brandsma, J. L., Sun, Y., Lizardi, P. M., Tuck, D. P., Zelterman, D., Haines, G. K., . . . Neapolitano, M. (2009). Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology*, *389*(1-2), 100-107. doi:10.1016/j.virol.2009.03.029
- Brentnall, A. R., Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Cadman, L., Austin, J., Szarewski, A., . . . Lorincz, A. T. (2014). A DNA methylation classifier of cervical precancer based on human papillomavirus and human genes. *Int J Cancer*, *135*(6), 1425-1432. doi:10.1002/ijc.28790
- Crider, K. S., Yang, T. P., Berry, R. J., & Bailey, L. B. (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr*, *3*(1), 21-38. doi:10.3945/an.111.000992
- Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A., & Powers, H. J. (2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *18*(10), 2782-2789. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0493
- Ghoshal, K., Li, X., Datta, J., Bai, S., Pogribny, I., Pogribny, M., . . . Jacob, S. T. (2006). A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr*, *136*(6), 1522-1527. doi:10.1093/jn/136.6.1522
- Gravitt, P. E., Peyton, C. L., Alessi, T. Q., Wheeler, C. M., Coutlée, F., Hildesheim, A., . . . Apple, R. J. (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, *38*(1), 357-361.
- Henken, F. E., Wilting, S. M., Overmeer, R. M., van Rietschoten, J. G., Nygren, A. O., Errami, A., . . . Steenbergen, R. D. (2007). Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer*, *97*(10), 1457-1464. doi:10.1038/sj.bjc.6604055
- Herrera M, J. (2016). Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). In A. M. Muñoz (Ed.), (Vol. 43 (4), pp. 336-345): *Revista chilena de nutrición*.
- Kalantari, M., Calleja-Macias, I. E., Tewari, D., Hagmar, B., Lie, K., Barrera-Saldana, H. A., . . . Bernard, H. U. (2004). Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol*, *78*(23), 12762-12772. doi:10.1128/JVI.78.23.12762-12772.2004
- Kanai, Y., & Hirohashi, S. (2007). Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a

- precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis*, 28(12), 2434-2442.
doi:10.1093/carcin/bgm206
- Kim, K. C., Friso, S., & Choi, S. W. (2009). DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem*, 20(12), 917-926. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.06.008
- Leonard, S. M., Wei, W., Collins, S. I., Pereira, M., Diyaf, A., Constandinou-Williams, C., . . . Woodman, C. B. (2012). Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, 33(7), 1286-1293. doi:10.1093/carcin/bgs157
- Lorincz, A. T. (2014). Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. *Expert Rev Mol Diagn*, 14(3), 293-305. doi:10.1586/14737159.2014.897610
- Lorincz, A. T. (2016). Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. *Acta Cytol*, 60(6), 501-512. doi:10.1159/000450595
- Lorincz, A. T., Brentnall, A. R., Scibior-Bentkowska, D., Reuter, C., Banwait, R., Cadman, L., . . . Vasiljević, N. (2016). Validation of a DNA methylation HPV triage classifier in a screening sample. *Int J Cancer*, 138(11), 2745-2751. doi:10.1002/ijc.30008
- Mahajan, A., Sapehia, D., Thakur, S., Mohanraj, P. S., Bagga, R., & Kaur, J. (2019). Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs. *Sci Rep*, 9(1), 17602. doi:10.1038/s41598-019-54070-9
- Mahmoud, A. M., & Ali, M. M. (2019). Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients*, 11(3). doi:10.3390/nu11030608
- McKay, J. A., Waltham, K. J., Williams, E. A., & Mathers, J. C. (2011). Folate depletion during pregnancy and lactation reduces genomic DNA methylation in murine adult offspring. *Genes Nutr*, 6(2), 189-196. doi:10.1007/s12263-010-0199-1
- Mikeska, T., & Craig, J. M. (2014). DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel)*, 5(3), 821-864. doi:10.3390/genes5030821
- Mirabello, L., Sun, C., Ghosh, A., Rodriguez, A. C., Schiffman, M., Wentzensen, N., . . . Burk, R. D. (2012). Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J Natl Cancer Inst*, 104(7), 556-565. doi:10.1093/jnci/djs135
- Morey Kinney, S. R., Smiraglia, D. J., James, S. R., Moser, M. T., Foster, B. A., & Karpf, A. R. (2008). Stage-specific alterations of DNA methyltransferase expression, DNA hypermethylation, and DNA hypomethylation during prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Mol Cancer Res*, 6(8), 1365-1374. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0040
- Mori, Y., Yin, J., Sato, F., Sterian, A., Simms, L. A., Selaru, F. M., . . . Meltzer, S. J. (2004). Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res*, 64(7), 2434-2438. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3508
- Moscicki, A. B., Schiffman, M., Kjaer, S., & Villa, L. L. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/42-51. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.018
- Moscicki AB, S. M., Franceschi Silvia. (2020). Chapter 9 -The Natural History of Human Papillomavirus Infection in Relation to Cervical Cancer. In.
- Motiwala, T., Kutay, H., Ghoshal, K., Bai, S., Seimiya, H., Tsuruo, T., . . . Jacob, S. T. (2004). Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a

- candidate tumor suppressor in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(38), 13844-13849. doi:10.1073/pnas.0405451101
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., . . . Group, I. A. f. R. o. C. M. C. C. S. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527. doi:10.1056/NEJMoa021641
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1-10. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Muñoz, N., Hernandez-Suarez, G., Méndez, F., Molano, M., Posso, H., Moreno, V., . . . Group, I. N. d. C. H. S. (2009). Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer*, 100(7), 1184-1190. doi:10.1038/sj.bjc.6604972
- Piyathilake, C. J., Badiga, S., Paul, P., Vijayaraghavan, K., Vedantham, H., Sudula, M., . . . Gravitt, P. E. (2010). Indian women with higher serum concentrations of folate and vitamin B12 are significantly less likely to be infected with carcinogenic or high-risk (HR) types of human papillomaviruses (HPVs). *Int J Womens Health*, 2, 7-12. doi:10.2147/ijwh.s6522
- Piyathilake, C. J., Henao, O. L., Macaluso, M., Cornwell, P. E., Meleth, S., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2004). Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res*, 64(23), 8788-8793. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2402
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Brill, I., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2007). Lower red blood cell folate enhances the HPV-16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*, 23(3), 203-210. doi:10.1016/j.nut.2006.12.002
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Chambers, M. M., Badiga, S., Siddiqui, N. R., Bell, W. C., . . . Johanning, G. L. (2014). Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation-associated risk of developing higher grades of CIN. *Cancer Prev Res (Phila)*, 7(11), 1128-1137. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0143
- Robert, M. F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I. C., Barsalou, A., & MacLeod, A. R. (2003). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*, 33(1), 61-65. doi:10.1038/ng1068
- Santos, N. P., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Ribeiro-Dos-Santos, A. K., Pereira, R., Gusmão, L., Amorim, A., . . . Santos, S. E. (2010). Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*, 31(2), 184-190. doi:10.1002/humu.21159
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., . . . Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16086. doi:10.1038/nrdp.2016.86
- Steenbergen, R. D., Snijders, P. J., Heideman, D. A., & Meijer, C. J. (2014). Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer*, 14(6), 395-405. doi:10.1038/nrc3728
- Sun, C., Reimers, L. L., & Burk, R. D. (2011). Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol*, 121(1), 59-63. doi:10.1016/j.ygyno.2011.01.013
- Tomita, L. Y., D'Almeida, V., Villa, L. L., Franco, E. L., Cardoso, M. A., & Group, B. S. (2013). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism modify the association of dietary

- and circulating folate and vitamin B-6 with cervical neoplasia. *J Nutr*, 143(12), 2007-2014. doi:10.3945/jn.113.182212
- Tong, S. Y., Kim, M. K., Lee, J. K., Lee, J. M., Choi, S. W., Friso, S., . . . Lee, J. P. (2011). Common polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in women with low serum folate and vitamin B12. *Cancer Causes Control*, 22(1), 63-72. doi:10.1007/s10552-010-9675-6
- Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Brentnall, A. R., Cuzick, J., & Lorincz, A. T. (2014). Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecol Oncol*, 132(3), 709-714. doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.001
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., . . . Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F
- Wentzensen, N., Sun, C., Ghosh, A., Kinney, W., Mirabello, L., Wacholder, S., . . . Burk, R. D. (2012). Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *J Natl Cancer Inst*, 104(22), 1738-1749. doi:10.1093/jnci/djs425

Discusión general

En resumen, encontramos que usando las técnicas de HPLC y radioinmunoensayo, los niveles de 5MTHF, ácido fólico, folato total y vitamina B12 no se asociaron con el riesgo de NIC2+ ni con la persistencia de la infección por VPH, aun después de controlar por variables potencialmente confusoras. Sin embargo, en los análisis restringidos a la comparación de la concentración de folato total entre las participantes sin lesiones (n=130) y las participantes diagnosticadas con NIC3+ (n=44), observamos diferencias significativas. Observamos también que los casos (NIC2+) tuvieron más metilación alta comparados con los controles. Cuando se compararon los niveles de metilación entre casos y controles teniendo en cuenta las concentraciones de los micronutrientes folato y vitamina B12 presentadas en las categorías establecidas por la OMS, observamos que éstos eran mayores entre las mujeres con lesiones NIC2+ (casos) con niveles deficientes de folato comparados con las mujeres con niveles normales, aunque esta diferencia no fue significativa.

Los niveles altos circulantes o dietarios de folato y vitamina B12 han tenido una asociación protectora con el riesgo de persistencia de la infección por VPH (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2004; Sedjo et al., 2002). En nuestro estudio se estimó el riesgo de infecciones por VPH persistentes asociadas con bajos niveles de folato y vitamina B12 en mujeres VPH positivo usando un diseño de casos y controles anidado en una cohorte. Comparamos las concentraciones de los micronutrientes en mujeres persistentemente positivas para la prueba de VPH-AR CH2 (al tiempo cero y a los 24 meses de seguimiento) con mujeres que aclararon la infección por VPH.

Usando la técnica HPLC identificamos que el más de la mitad y cerca de un tercio de los casos y los controles, tenían niveles deficientes de 5MTHF, ácido fólico y vitamina B12 respectivamente. Después de ajustar por las variables potencialmente confusoras, los metabolitos

circulantes del folato (5MTHF y ácido fólico) no se asociaron significativamente con el riesgo de persistencia de la infección por VPH).

Piyathilake y col en 2004 reportaron que las mujeres con altos niveles de folato tenían mayor probabilidad de que siendo VPH positivas, aclararan la infección (OR 2.50, IC95% 1.8- 5.30) y Sedjo y col en 2002 observaron que las mujeres con niveles circulantes de vitamina B12 en el tercil superior (>493.2 pg/ml) tuvieron menor probabilidad de tener una infección persistente (OR ajustado 0.4; IC95% 0.17-0.96) (Piyathilake et al., 2004; Sedjo et al., 2002). Por otro lado, Abike y col en 2011 compararon los niveles de folato y vitamina B12 en mujeres con diferentes resultados de citología cervicouterina (negativa para malignidad n=32, ASC-US n=30, LIE-BG n=30 y LIE-AG=30). Este estudio concluyó que en la deficiencia de folato incrementa el riesgo de infecciones persistentes y que las concentraciones del mismo micronutriente disminuyen a medida que aumenta la anormalidad citológica (Abike et al., 2011). Posibles explicaciones a la diferencia con nuestros hallazgos podrían ser 1) La definición de persistencia establecida en este estudio. 2) Nuestros resultados también podrían verse afectados por la medición de los micronutrientes que no pudo hacerse en la totalidad de las muestras especialmente para la vitamina B12. Sin embargo, en los análisis que realizamos comparando las características sociodemográficas y factores de riesgo de las mujeres con y sin resultado para cada uno de los micronutrientes de manera independiente y no encontramos diferencias significativas, lo que haría pensar que la falta de resultados en la totalidad de muestras no afectó los resultados obtenidos y 3) No tuvimos información sobre la ingesta dietética, consumo de suplementos, medicamentos o alcohol en estas mujeres. No obstante entre los criterios de exclusión para el estudio ASCUS- COL se encontraba tener una enfermedad crónica como las de tipo autoinmune o cáncer. Este criterio de alguna manera excluye la posibilidad de que las participantes estén

consumiendo anticonvulsivantes, barbitúricos, metotrexato o pirimetamina que son los medicamentos que comúnmente disminuyen las concentraciones de los folatos. Con respecto a los suplementos, del estudio se excluyeron las mujeres embarazadas quienes son a las que se les formula este medicamento.

En el análisis diseñado para evaluar si los bajos niveles de folato y vitamina B12 estaban asociados con las lesiones cervicales grado dos o más (NIC2+), observamos una asociación significativa cuando los análisis fueron restringidos a la comparación de la concentración de folato total entre las participantes sin lesiones (n=130) y las participantes diagnosticadas con NIC3+ (n=44). Varios estudios han investigado o reportado la influencia de los niveles séricos del folato y la vitamina B12 y el riesgo desarrollar neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 o más severo (NIC2+) (Abike et al., 2011; Chih et al., 2013; Flatley et al., 2009; García-Closas et al., 2005; Piyathilake et al., 2010; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake et al., 2007; Sedjo et al., 2003; Sedjo et al., 2002; Siegel et al., 2010). Algunos han informado una asociación protectora entre los niveles circulantes o dietarios de folato y la vitamina B12 y la displasia cervical (Flatley et al., 2009; Piyathilake et al., 2004; Piyathilake et al., 2009; Piyathilake et al., 2007; Sedjo et al., 2002) y una revisión más reciente sobre la prevención de la infección por VPH y el cáncer cervical a través del consumo de minerales y vitaminas, también reportó que los niveles circulantes de folato o vitamina B12 no se asociaron significativamente con la persistencia de infección por VPH pero sí con el desarrollo de lesiones preneoplásicas (Chih et al., 2013). La asociación observada entre los bajos niveles de folato total y el riesgo de NIC3+ y no con el riesgo de NIC2+ en nuestro estudio, pueden ser explicados por varias razones: 1) En nuestro estudio incluimos casos y controles VPH positivo, lo que nos da la ventaja de determinar el papel del folato y la vitamina B12 en el

desarrollo de lesiones cervicales de alto grado una vez se ha adquirido la infección de VPH. De esta manera eliminamos la posibilidad de haber encontrado asociaciones que están realmente relacionadas con la adquisición de la infección más que con el desarrollo de lesiones NIC2+, si hubiéramos usado controles VPH negativo. 2) Los niveles de folato pueden verse afectados en las etapas más tardías de la patología cervical. 3) A pesar de que los diagnósticos histológicos fueron releídos por un panel de patólogos expertos, los diagnósticos NIC2 son difíciles de reproducir (Castle et al., 2007; Stoler et al., 2001); de hecho aunque este diagnóstico es el umbral para la realización de tratamiento, sabemos que el 40% de estas lesiones pueden desaparecer espontáneamente. Las lesiones NIC3, son verdaderas predecesoras del cáncer invasivo. 4) Este análisis también pudo verse afectado por la medición de los micronutrientes que no pudo hacerse en la totalidad de las muestras especialmente para la vitamina B12 con la técnica de HPLC o con problemas en las técnicas usadas para la cuantificación de las vitaminas. Sin embargo, nosotros pudimos hacer las determinaciones de las concentraciones casi en las mismas muestras con el radioinmunoensayo y los resultados que obtuvimos, aunque técnicamente no son comparables, son absolutamente consistentes en cuanto a la determinación de la asociación con el riesgo de NIC2+.

Finalmente, evaluamos si la asociación entre el estado de metilación del ADN y el riesgo de NIC2+ se modifica por los niveles de folato o vitamina B12. En la misma cohorte de mujeres con citología ASC-US de Medellín- Colombia también usando el diseño de casos y controles, se analizaron 310 muestras (155 casos NIC2+ y 155 controles <NIC2) de mujeres VPH positivo. Los niveles séricos de folato y vitamina B12 fueron determinados mediante radioinmunoensayo y la metilación fue evaluada mediante el clasificador S5. Las diferencias observadas entre casos y controles referentes a los niveles de metilación y el aumento de estos

niveles conforme aumenta la severidad de la lesión cervical han sido previamente reportados por varios autores en la última década (Brandsma et al., 2009; Lorincz, 2014; Lorincz et al., 2016; Mirabello et al., 2012; C. Sun et al., 2011). En nuestro estudio, cuando se compararon los niveles de metilación entre casos y controles teniendo en cuenta las concentraciones de folato presentadas en las categorías establecidas por la OMS, observamos que éstos eran mayores entre las mujeres con lesiones NIC2+ (casos) con niveles deficientes/posiblemente deficientes comparados con las mujeres con niveles normales; Sin embargo, esta diferencia no fue significativa. En cuanto a las concentraciones de vitamina B12 observamos que los niveles de metilación fueron mayores entre los casos con niveles normales de esta vitamina comparados con los individuos con niveles deficientes/posiblemente deficientes. Sin embargo la proporción de individuos con niveles deficientes/posiblemente deficientes de vitamina B12 fue bajo entre la población de estudio.

En el análisis restringido a los casos y controles VPH16/18 positivo (n= 133) nosotros encontramos resultados similares a los realizados en todos los individuos. Observamos que los individuos con metilación baja incluidos en este análisis fueron muy pocos lo que conlleva a estimaciones imprecisas. Estos hallazgos sugieren que los niveles de metilación son los que realmente se relacionan y confieren el riesgo de NIC2+ y que este riesgo no es modificado por los niveles de folato o vitamina B12 aunque observamos una clara tendencia de que la asociación de los niveles de metilación con las lesiones NIC2+ es mayor entre los individuos con niveles de folato deficiente/posiblemente deficiente. Nuestros resultados son opuestos a los publicados por Chandrika y col en 2014 y esto se debe en parte a que la metilación fue determinada en el gen E6 en nuestro estudio se evaluó la metilación de los genes L1-L2 y un gen humano. Las muestras biológicas en las cuales se hizo la determinación de los micronutrientes también son

diferentes y lo más importante, las características de los individuos controles también lo fueron. En el estudio de la Dra. Chandrika se usó un tamaño de muestra mayor de individuos VPH16 positivo (n=315) (Piyathilake et al., 2014).

Bibliografía

- Abike, F., Engin, A. B., Dunder, I., Tapisiz, O. L., Aslan, C., & Kutluay, L. (2011). Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias. *Arch Gynecol Obstet*, *284*(1), 209-214. doi:10.1007/s00404-010-1650-7
- Brandsma, J. L., Sun, Y., Lizardi, P. M., Tuck, D. P., Zelterman, D., Haines, G. K., . . . Neapolitano, M. (2009). Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology*, *389*(1-2), 100-107. doi:10.1016/j.virol.2009.03.029
- Castle, P. E., Stoler, M. H., Solomon, D., & Schiffman, M. (2007). The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses: an ALTS report. *Am J Clin Pathol*, *127*(5), 805-815. doi:10.1309/PT3PNC1QL2F4D2VL
- Chih, H. J., Lee, A. H., Colville, L., Binns, C. W., & Xu, D. (2013). A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *Nutr Cancer*, *65*(3), 317-328. doi:10.1080/01635581.2013.757630
- Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A., & Powers, H. J. (2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *18*(10), 2782-2789. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0493
- García-Closas, R., Castellsagué, X., Bosch, X., & González, C. A. (2005). The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*, *117*(4), 629-637. doi:10.1002/ijc.21193
- Lorincz, A. T. (2014). Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. *Expert Rev Mol Diagn*, *14*(3), 293-305. doi:10.1586/14737159.2014.897610
- Lorincz, A. T., Brentnall, A. R., Scibior-Bentkowska, D., Reuter, C., Banwait, R., Cadman, L., . . . Vasiljević, N. (2016). Validation of a DNA methylation HPV triage classifier in a screening sample. *Int J Cancer*, *138*(11), 2745-2751. doi:10.1002/ijc.30008
- Mirabello, L., Sun, C., Ghosh, A., Rodriguez, A. C., Schiffman, M., Wentzensen, N., . . . Burk, R. D. (2012). Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J Natl Cancer Inst*, *104*(7), 556-565. doi:10.1093/jnci/djs135
- Piyathilake, C. J., Badiga, S., Paul, P., Vijayaraghavan, K., Vedantham, H., Sudula, M., . . . Gravitt, P. E. (2010). Indian women with higher serum concentrations of folate and vitamin B12 are significantly less likely to be infected with carcinogenic or high-risk (HR) types of human papillomaviruses (HPVs). *Int J Womens Health*, *2*, 7-12. doi:10.2147/ijwh.s6522
- Piyathilake, C. J., Henao, O. L., Macaluso, M., Cornwell, P. E., Meleth, S., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2004). Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res*, *64*(23), 8788-8793. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2402
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Alvarez, R. D., Bell, W. C., Heimbürger, D. C., & Partridge, E. E. (2009). Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prev Res (Phila)*, *2*(7), 658-664. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0175

- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Brill, I., Heimburger, D. C., & Partridge, E. E. (2007). Lower red blood cell folate enhances the HPV-16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*, *23*(3), 203-210. doi:10.1016/j.nut.2006.12.002
- Piyathilake, C. J., Macaluso, M., Chambers, M. M., Badiga, S., Siddiqui, N. R., Bell, W. C., . . . Johannig, G. L. (2014). Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation-associated risk of developing higher grades of CIN. *Cancer Prev Res (Phila)*, *7*(11), 1128-1137. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0143
- Sedjo, R. L., Fowler, B. M., Schneider, A., Henning, S. M., Hatch, K., & Giuliano, A. R. (2003). Folate, vitamin B12, and homocysteine status. findings of no relation between human papillomavirus persistence and cervical dysplasia. *Nutrition*, *19*(6), 497-502. doi:10.1016/s0899-9007(02)01096-1
- Sedjo, R. L., Inserra, P., Abrahamsen, M., Harris, R. B., Roe, D. J., Baldwin, S., & Giuliano, A. R. (2002). Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *11*(4), 353-359.
- Siegel, E. M., Salemi, J. L., Villa, L. L., Ferenczy, A., Franco, E. L., & Giuliano, A. R. (2010). Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, *118*(3), 289-294. doi:10.1016/j.ygyno.2010.05.022
- Stoler, M. H., Schiffman, M., & Group, A. S. C. o. U. S.-L.-g. S. I. L. T. S. A. (2001). Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*, *285*(11), 1500-1505. doi:10.1001/jama.285.11.1500
- Sun, C., Reimers, L. L., & Burk, R. D. (2011). Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol*, *121*(1), 59-63. doi:10.1016/j.ygyno.2011.01.013

Conclusiones y perspectivas

Los análisis presentados en esta tesis no proporcionaron evidencia de que los dos más importantes micronutrientes donantes de metilo, el folato y la vitamina B12, desempeñan un papel en la persistencia de la infección por VPH. Sin embargo, reconocemos que esto pudo deberse a la manera como se determinó la persistencia y al bajo poder estadístico que se alcanzó por el número de mujeres a las cuales se les pudo determinar los valores séricos de los micronutrientes, especialmente en el caso de la vitamina B12.

Nuestros hallazgos sugieren que el folato podría tener una participación importante en las etapas tardías de la transformación del epitelio cervical. En los análisis referentes a la asociación de los niveles de micronutrientes y el riesgo de NIC2+, encontramos una diferencia significativa cuando se compararon las medianas de la concentración de folato entre mujeres con diagnóstico de NIC3+ y mujeres sin lesiones. Este hallazgo podría ser explicado por la sobreexpresión de las ADN metiltransferasas, específicamente de la DNMT1 como efecto en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 que en este tipo de lesiones se produce en todo el espesor del epitelio. Es importante anotar a su vez, que la sobreexpresión de la DNMT1 podría conllevar al agotamiento del folato.

Hay una clara tendencia que en las mujeres con niveles deficientes y posiblemente deficientes de folato y metilación alta, tengan más riesgo de tener lesiones preneoplásicas; sin embargo, los análisis de interacción no fueron significativos. Nuestros hallazgos sugieren además que los niveles de metilación de manera independiente se relacionan y confieren el riesgo de NIC2+ y que este riesgo no es modificado por los niveles de folato o vitamina B12.

Colombia tiene una política para la fortificación que consiste de harina de trigo con ácido fólico desde hace más de 20 años. Sin embargo, los niveles de este micronutriente contrario a lo

esperado, son más bajos en la población donde hay un esquema alimenticio de fortificación. No podemos tener una explicación única para este hallazgo; para ello sería necesario tener en cuenta aspectos como la frecuencia de consumo de los alimentos fortificados y los factores que afectan la estabilidad y vida útil del folato.

Algunas de las principales perspectivas que surgen de manera posterior al desarrollo de esta tesis y que permitirían mejorar nuestras observaciones son: 1) Replicar los análisis estableciendo la persistencia de la infección mediante la genotipificación de las muestras de exudado cervical tanto en la línea de base como a los 24 meses de seguimiento. De esta manera no habrían dudas con respecto a la probabilidad mínima pero existente de que se trate de una infección por genotipos diferentes en los dos tiempos de medición y que por ende no sea una verdadera persistencia. Con la genotipificación también se podrían hacer análisis estratificados y así determinar el papel del nivel de los micronutrientes en las infecciones por genotipos de más alto riesgo, por ejemplo VPH16 y VPH18. 2) Replicar los análisis de asociación de los niveles de vitaminas y su asociación con las lesiones NIC3+ en una muestra más grande usando además la genotipificación y restringiendo los análisis a las mujeres VPH16/18 positivo para confirmar los hallazgos sugeridos en esta tesis. El aumento del tamaño de muestra, enfocado especialmente el aumento de casos NIC3+ aumentaría el poder estadístico y se podrían tener resultados más precisos que permitan determinar la fracción atribuible de la deficiencia de folato y vitamina B12 en el modelo de cáncer de cuello uterino. 3) Mejorar la precisión de los resultados y determinar la verdadera fracción atribuible de estas vitaminas en el modelo de cáncer cervical. Este conocimiento no solo es importante para el conocimiento en ciencias básicas, también lo es para la salud pública. Se ha demostrado que los bajos niveles de folato y vitamina B12 se asocian con el incremento del riesgo de NIC3+, por lo tanto con el hallazgo de que los niveles de

folatos a nivel nacional son más bajos de lo esperado, una buena estrategia sería el promover el consumo y la fortificación de ácido fólico no solo en la edad reproductiva como se hace actualmente. 4) Finalmente, el haber encontrado en un alto porcentaje mujeres con niveles deficientes de folato es bastante llamativo e interesante. Si viven en un país que fortifica con el consumo de la harina de trigo desde hace 20 años, la pregunta es obvia: ¿cuál es la razón para tener niveles deficientes, ¿acaso será que hay un bajo consumo de los productos producidos a partir de esta harina?, ¿será el proceso de cocción y las altas temperaturas a la que es sometida la harina para la fabricación de los productos que finalmente consume la población? Este hallazgo provee las bases para visibilizar la necesidad de realizar estudios donde se determinen los niveles de folato que incluyan la totalidad de la población y no solo los grupos especiales como las mujeres en gestación y los niños menores de 5 años. Sería ideal tener una medición directa sérica y no solo hacer mediciones basadas en las encuestas de frecuencia de consumo de alimentos donde el sesgo de memoria podría influir de manera importante. Es válido y útil poder contar con valores de referencia que nos permitan hacer comparaciones más puntuales para entender el problema desde nuestro contexto.