



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**PARTICIPACION *in vivo* DEL 17 β -ESTRADIOL Y LA
DEFICIENCIA DE RAR β EN EL DESARROLLO DE LESIONES
PREMALIGNAS CERVICOUTERINAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTHA ESTELA ALBINO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JUAN PATRICIO GARIGLIO VIDAL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR (UNAM)

COMITÉ TUTORAL

DR. ROGELIO HERNADEZ PANDO

FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS (UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria:

A mis padres...

Micaela y Alfredo, por acompañarme en este camino, por enseñarme a luchar, por alimentar mis sueños y enseñarme a ser fuerte ante cualquier situación, por darme la vida y todo lo que tuvieron para que llegara hasta aquí... Los amo Papas, muchas Gracias.

A Ismael...

Porque llegaste a mi vida en el momento indicado, con tu filosofía y tu forma de ver la vida complementaste la mía y me diste la mano para vivirla a tu lado con amor... porque te encontré y me encontraste y juntos hacemos cosas grandes.

A Isaac...

Con tu llegada llenaste todo mi mundo y me hiciste conocer el amor más puro y sincero que uno puede tener, me diste el motivo más grande para sentirme invencible y luchar con más fuerza para hacer un mundo mejor para ti... te amo hijo.

A mis hermanos...

Alfredo, Charito, Erika, Victor, Miguel y Rircardo, gracias por trabajar duro por nuestra familia y hacerme el camino más fácil para que yo llegará hasta aquí sus esfuerzo y sacrificios están aquí y este logro también es suyo.

A mis sobrinos... Porque aún hay mucho que construir y ustedes inspiran

A mis familiares y amigos. Gracias por sus granitos de arena.

Agradecimientos

Al Dr. Patricio Gariglio por recibirme en su laboratorio; por el respaldo y paciencia mostrado siempre, Gracias.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por ese comentario oportuno y ese consejo práctico tanto académico como humano; gracias por enriquecer mi formación transmitiéndome sus conocimientos y abriéndome las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Leticia Rocha por sus asesorías y guía durante mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio.

A la Biol. Elizabeth Alvares, Al Biólogo Enrique García Villa y a Lauro Macías González por su apoyo técnico.

Agradecimientos Especiales:

Dr. Rodolfo Ocádiz Delgado, por todo tu apoyo académico y técnico. Fuiste un tutor para mí y más que eso mi Amigo... Gracias.

Índice	4
Lista de figuras	6
Listas de tablas	7
Abreviaturas	8
Abstract	9
Resumen	10

	Página
1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Cáncer Cervical.....	11
1.2 Vitamina A y Ácido Retinoico.....	13
1.3 Estructura de los retinoides	13
1.4 Metabolismo de la Vitamina A.....	14
1.5 Función de los retinoides.....	15
1.6 Receptores Nucleares.....	16
1.7 Estrógenos y Receptores a Estrógenos.....	17
1.8 Receptores para el Ácido Retinoico	20
1.9 Receptor β para el Ácido Retinoico (RAR β).....	21
1.10 Genes blanco de RAR β	21
1.11 RARs y la Respuesta Inmune.....	23
1.12 RAR β y p16 ^{ink4a}	24
1.13 Ratón Condicional NE75 RAR β L-/L- (RAR β ^{L-/L-}) como modelo de estudio	25
2 ANTECEDENTES.....	26
3 JUSTIFICACIÓN.....	28
4 HIPOTESIS.....	28
5 OBJETIVO.....	28
5.1 Objetivos Particulares.....	29
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
7 MATERIALES Y METODOS.....	31
7.1 Población de estudio.....	31
7.2 Tratamiento hormonal.....	31
7.3 Seguimiento del ciclo estral	31
7.4 Obtención de muestras	31
7.5 Genotipificación. Extracción de DNA.....	31
7.6 Detección de los genes RAR β y Cre recombinasa por PCR.....	32
7.7 Inclusión en parafina y cortes del tejido cervical	33
7.8 Análisis Histopatológico de Tejidos	33
7.9 Inmunohistoquímica.....	33
7.10 Inmunofluorescencia.....	34
7.11 Captura de imágenes	34
7.12 Extracción de RNA.....	34
7.13 Síntesis de cDNA.....	35
7.14 RT qPCR en tiempo Real de RAR β y de p16 ^{INK4a}	35

7.15	Extracción de Proteínas.....	36
7.16	Western Blot.....	36
7.17	Anticuerpos.....	37
7.18	Análisis Estadístico.....	37
8	RESULTADOS.....	38
8.1	Caracterización genotípica en el cérvix del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$ a los cuatro meses de edad.....	38
8.2	El tratamiento con 17 β -estradiol recupera los niveles de expresión de RAR β	38
8.3	El tratamiento con 17 β -estradiol revierte las lesiones histopatológicas causadas por la deficiencia de RAR β	40
8.4	La eliminación condicional del gen RAR β baja los niveles de expresión del mRNA y de la proteína en cérvix de ratón RAR $\beta^{L-/L-}$	41
8.5	Cambios Histológicos que hacen evidente la Displasia leve-moderada en cérvix de ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$	43
8.6	Incremento de infiltrado inflamatorio en el cérvix y la vagina de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$	45
8.7	La expresión de p16ink4a es disminuida en el cérvix del ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$	46
8.8	Incremento en los niveles de la proliferación celular (PCNA, Ki-67) en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$	48
8.9	Inhibición de la apoptosis en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$	50
9	DISCUSIÓN.....	51
10	CONCLUSIONES.....	56
11	PERSPECTIVAS.....	57
12	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	58
13	Artículo Publicado “Decreased RAR β expression induces abundant inflammation and cervical precancerous lesions”	68

Lista de Figuras

Figuras	Página
1 Procesos característicos del Cáncer y posibles blancos terapéuticos. Modificada de Hanahan et al. 2011.....	11
2 Factores de riesgo asociados a cáncer cervical.....	12
3 Estructuras de los retinoides (Tang XH et al., 2011).....	14
4 Esquema del metabolismo y transporte de los retinoides. (Poulain et al., 2009).....	15
5 Principales funciones biológicas de los retinoides en el organismo (Allende, 1997).....	15
6 Organización estructural de los receptores Nucleares. (Poulain et al., 2009).....	17
7 Vías de acción del Estrógeno (17 β -estradiol) en la célula.....	19
8 Regulación de la transcripción por los receptores nucleares.....	20
9 Participación del AR a través de RAR β en la regulación del ciclo celular y participación de algunos genes blanco del AR.....	22
10 Mecanismo de acción del AR a través del RAR β en la regulación de gen p16 ^{INK4a} y p21 ^{Cip1}	25
11 Alteración dirigida al alelo RAR β floxed en los ratones condicionales CMVCre(tg/0)/RAR β L2/L2 (RAR β L-/L-) de 4 meses de edad.	26
12 Genotipificación del cérvix de los ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-/L-} por PCR punto final.....	38
13 El tratamiento con E2 incrementa los niveles de expresión de RAR β	39
14 Efecto del 17 β - Estradiol sobre la expresión de RAR β en endocérnix, exocérnix y vagina de ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-/L-}	39
15 Histopatología de ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-/L-} tratados con 17 β -Estradiol. (Dosis 833ng/día).....	40
16 La eliminación condicional del gen RAR β baja los niveles de mRNA y proteína en cérvix de ratón RAR β ^{L-/L-}	41
17 Los niveles de proteína son disminuidos en la zona de transformación (TZ), ectocérnix (ECTO) y endocérnix (ENDO) en los ratones RAR β ^{L-/L-}	42
17 Desarrollo de Displasia en el epitelio cervical tras la ruptura del gen RAR β	44
19 Células inflamatorias (Gr-1+) detectadas por inmunofluorescencia en el ectocérnix y vagina de los ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-/L-}	45
20 Disminución en la expresión de RAR β induce baja en la expresión del mRNA y proteína de p16INK4a, en los ratones condicionales RAR β ^{L-/L-}	46-47
21 Incremento en la proliferación celular en el cérvix del ratón RAR β ^{L-/L-}	48-49
22 Decremento en los niveles de apoptosis en el cérvix del ratón RAR β ^{L-/L-} ...	50

Lista de tablas

Tablas

	Página
1 Secuencias de los primers usados para la genotipificación.....	32
2 Mezcla de reacción para la PCR.....	32
3 Secuencias de los primers usados para medir los niveles de expresión (mRNA) de RAR β , p16 ^{INK4a}	35
4 Listado de anticuerpos usados para realizar Inmunohistoquímicas, inmunofluorencias y Wester Blot.....	37

ABREVIATURAS

AR	Ácido Retinoico
AO	Anticonceptivos Orales
atRA	“all trans Retinoic Acid” (Siglas en inglés)
CC	Cáncer Cervical
CDK	Cinasas Dependientes de Ciclinas
CRBP	Proteína Celular de Unión a Retinol (Siglas en inglés)
N IC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
DBD	Dominio de Unión al DNA (Siglas en inglés)
DBL	Dominio de Unión a Ligando (Siglas en inglés)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Siglas en inglés)
E ₂	Estradiol
RE	Receptores a Estrógenos
ERs	Elementos de Respuesta
EREs	Elementos de Respuesta a Estrógeno
RG	Receptores a Glucocorticoides
HR-HPV	Papilomavirus Humano de Alto riesgo (Siglas en inglés)
HREs	Elementos de Respuesta a Hormonas (Siglas en inglés)
H&E	Hematoxilina y Eosina
Ip	Intraperitoneal
Kb	Kilobases
kDa	kiloDaltones
LBD	Dominio de Unión al Ligando (Siglas en inglés)
NRs	Receptores Nucleares
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (Siglas en inglés)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAR	Receptor(es) para el Ácido Retinoico
RAREs	Elementos de Respuesta en el ADN
RAR β	Receptor β para el Ácido Retinoico
RT-qPCR	RT-PCR Cuantitativo en Tiempo Real (Siglas en inglés)
RXR	Receptor X a Retinoides

PARTICIPATION *in vivo* OF 17 β -ESTRADIOL AND DECREASED RAR β EXPRESSION IN THE DEVELOPMENT OF CERVICAL PRECANCEROUS LESIONS

Abstract

Cervical Cancer (CC), a leading cause of cancer-related deaths in women worldwide, has been causally linked to genital high risk human papillomavirus (HR-HPV) infection. However, host factors are important in determining the outcome of persistent genital HR-HPV infection as most cervical precancerous lesions containing viral oncogenes do not progress to invasive carcinomas. This suggests that environmental cofactors as low dietary vitamin A, chronic estrogen intake or other epigenetic regulators participate in the development of CC. In this regard, several reports relate prolonged use of estrogen such as 17 β -estradiol (E₂) with the development of CC. Estrogens induce cell proliferation and increase the expression of HPV16 and 18 oncogenes, transgenic mice for the E7 HPV16 oncogene treated with E₂ develop CC. Also, most cases of CC have been described in the transformation zone of the cervix, a region highly responsive to E₂ and retinoic acid. It is well known that vitamin A and its receptors protect against cancer and that RAR β is the only retinoic acid receptor that is frequently deleted or epigenetically silenced at early stages of tumor progression suggesting that RAR β is a tumor suppressor. The aim of this study has been to investigate the effects of decreased RAR β expression and hormonal environment in the development of cervical premalignant lesions using a conditional mouse that partially ablates floxed RAR β gene (RAR $\beta^{L-/L-}$ mice). Results show that RAR $\beta^{L-/L-}$ conditional mice develop a premalignant phenotype in cervix (mild to moderate dysplasia), whereas those mice conditional RAR $\beta^{L-/L-}$ treated with E₂ revert premalignant phenotype.

Histopathological analyses of the cervix of 4 month-old RAR $\beta^{L-/L-}$ mice showed the development of spontaneous squamous metaplasia, Nabothian cysts, decreased keratinization, chronic inflammatory infiltrate, enhanced mitotic activity, loss of cell differentiation and decreased apoptosis. All these changes are hallmarks of moderate dysplasia. It was also observed that in the cervix of conditional mice the p16^{ink4a} protein level is decreased, suggesting that expression of both RAR β and p16^{ink4a} are probably involved in early cervical carcinogenesis. Therefore, the RAR $\beta^{L-/L-}$ conditional mouse could be a useful model for the study of cervical carcinogenesis and may help to reveal the molecular basis of the RAR β tumor suppressor action providing new preventive, diagnostic and therapeutic tools for this important disease.

PARTICIPACION *in vivo* DEL 17 β -ESTRADIOL Y LA DEFICIENCIA DE RAR β EN EL DESARROLLO DE LESIONES PREMALIGNAS CERVICOUTERINAS

Resumen

El Cáncer Cervical (CC) ha sido relacionado con la infección del Virus del Papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV), sin embargo los factores del huésped son importantes en el resultado de la infección persistente, ya que la mayoría de las lesiones precancerosas que contienen el virus no progresan a cáncer invasor. Diversos factores de riesgo han sido relacionados con el desarrollo de CC, entre los que podemos mencionar: HR-HPV como principal factor, tabaquismo, una alimentación deficiente en retinoides y el consumo de contraceptivos. Evidencia creciente sugiere que una dieta baja en vitamina A y la baja expresión de sus receptores, participan en el desarrollo de CC. Por un lado, es bien conocido que la vitamina A y sus receptores tienen actividad protectora en el desarrollo de cáncer y que el Receptor β para el Ácido Retinoico (RAR β) está silenciado epigenéticamente durante la progresión del CC. Por otro lado, existen reportes que relacionan el uso prolongado de estrógenos (tales como el E₂) con el desarrollo de CC. Los estrógenos inducen la proliferación celular y también incrementan la expresión de los oncogenes del HPV16 y 18. Ratones transgénicos para el oncogén E7 del HR-HPV16 tratados con E₂ desarrollan CC. Además, la mayor parte de los casos de CC inician en la zona de transformación del cérvix, siendo esta región epitelial blanco del E₂ y del Ácido Retinoico.

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la disminución de la expresión de RAR β y el entorno hormonal en el desarrollo de lesiones premalignas en ratones condicionales (RAR $\beta^{L-/L-}$). Nuestros resultados demuestran que por sí sola la disminución de RAR β a los 4 meses de edad, fue capaz de desarrollar espontáneamente metaplasia escamosa, infiltrado inflamatorio mixto, incremento en la actividad mitótica, pérdida de la diferenciación celular, así como disminución de la apoptosis y de la proteína p16^{INK4a} en el cérvix de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$. De gran interés ha sido observar que los ratones tratados con dosis de 833 ng/día de E₂ tienen un fenotipo normal, no generaron lesiones histopatológicas, además que los niveles de expresión de RAR β parecen recuperarse. Lo que sugiere que E₂ podría estar regulando positivamente la expresión RAR β generando una reversión del fenotipo premaligno observado por la deficiencia de RAR β .

En conclusión nuestros resultados sugieren que la baja expresión de RAR β , puede inducir la disminución en la expresión de p16^{INK4a}, inflamación crónica-aguda y un decremento de la apoptosis, aumento en la proliferación generando lesiones displásicas moderadas: lo que puede asociarse a la vulnerabilidad a la infección por HR-HPV y a estados tempranos de la carcinogénesis cervical.

Palabras claves: Cáncer Cervical, displasia moderada, RAR β , 17 β -Estradiol (E₂), p16^{INK4a}, metaplasia escamosa, infiltrado inflamatorio

PARTICIPACION *in vivo* DEL 17 β -ESTRADIOL Y LA DEFICIENCIA DE RAR β EN EL DESARROLLO DE LESIONES PREMALIGNAS CERVICOUTERINAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer Cervical

El cáncer es una enfermedad multifactorial en la cual se ha identificado que la célula mantiene cambios como: autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, metástasis e invasión de tejidos, evasión de señales antiproliferativas, angiogénesis sustentada, potencial replicativo ilimitado, además de mantener un estado inflamatorio crónico y una evasión a la respuesta inmune (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011). El estilo de vida actual de las personas aumenta el riesgo de contraer ciertos tipos de cánceres. Los cánceres por lo general no son hereditarios y son iniciados por agentes medio ambientales (compuestos químicos, radiaciones, virus, etc.), los cuales provocan una mutación en algún gen que permite a la célula ciertas ventajas en su crecimiento en divisiones sucesivas de las células mutadas; se puede introducir una segunda mutación y posteriormente otras mutaciones en los mencionados genes favoreciéndose cada vez más el crecimiento descontrolado de los nuevos tipos celulares. Después de varios años de la primera mutación se llega a una célula maligna capaz de dividirse rápidamente y ser muy resistente a quimioterapia o radioterapia (Gariglio, et al. 2003).

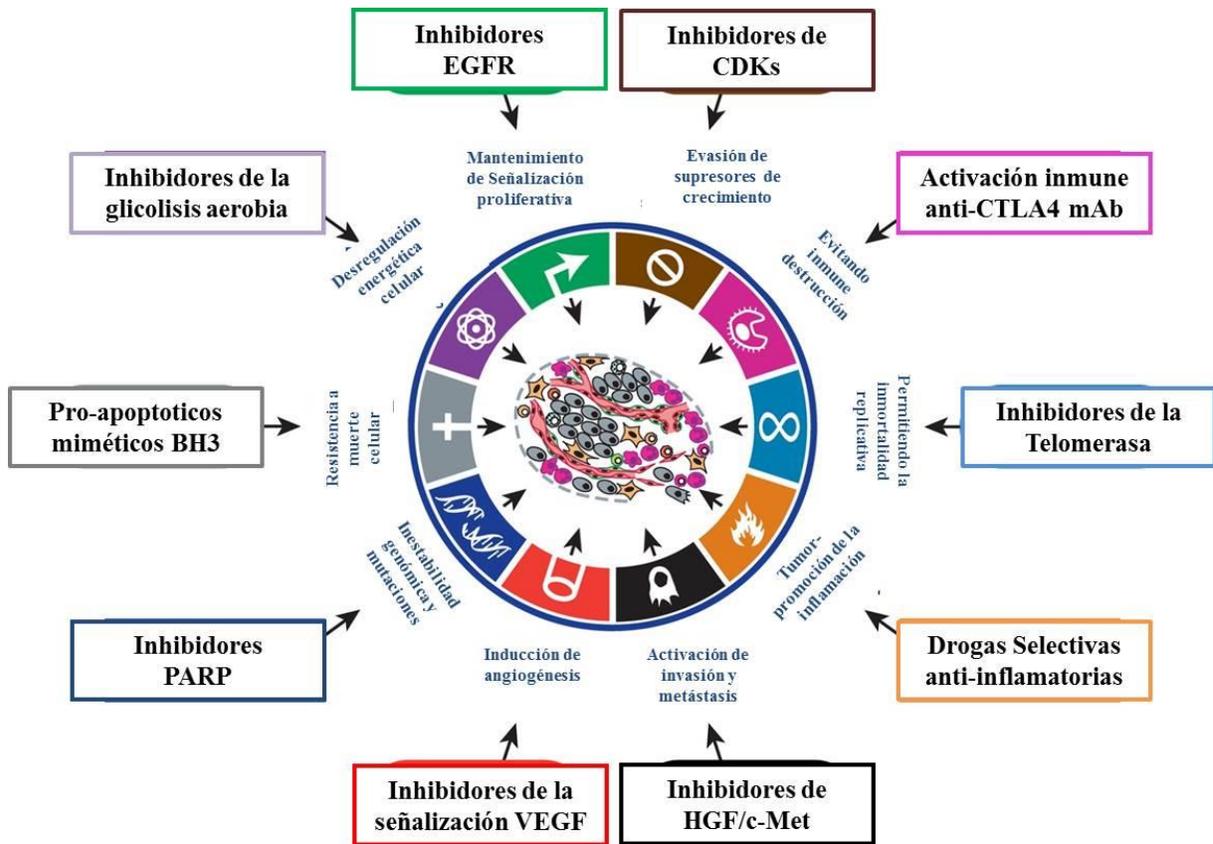


Imagen 1. Procesos característicos del Cáncer y posibles blancos terapéuticos. Modificada de Hanahan *et al.* 2011

El cáncer cervical (CC) ocupa uno de los primeros lugares en incidencia y constituye la segunda causa de mortalidad por cáncer de la mujer mexicana (Lazcano-Ponce., et al. 2006). Es bien conocido que la infección persistente por virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV siglas en inglés) es la causa principal del cáncer cervical. Sin embargo, largo período de latencia (varias décadas) entre la infección y el desarrollo de un carcinoma, el bajo porcentaje del total de individuos infectados que desarrolla cáncer, así como diversos datos experimentales, indican que la infección con HR-HPV es necesaria pero no suficiente y se necesitan otros factores como la alteración o desregulación de la expresión de oncogenes, antioncogenes y de otros genes celulares para que se desarrolle un CC francamente invasor (Zur Hausen, 2000). Entre las mujeres positivas a HR-HPV existen factores de riesgo consistentemente identificados para el desarrollo del CC, incluyendo una alimentación baja en retinoides y la administración por períodos largos (6 años) de anticonceptivos orales (AO), los cuales contienen en su mayoría estrógenos, tabaquismo, edad y multiparidad (Figura 2) (Moreno., *et al.* 2002). Estos factores cumplen diversas funciones en el organismo, lo que motiva a estudiar la relación que existe entre la exposición a éstos y la carcinogénesis.

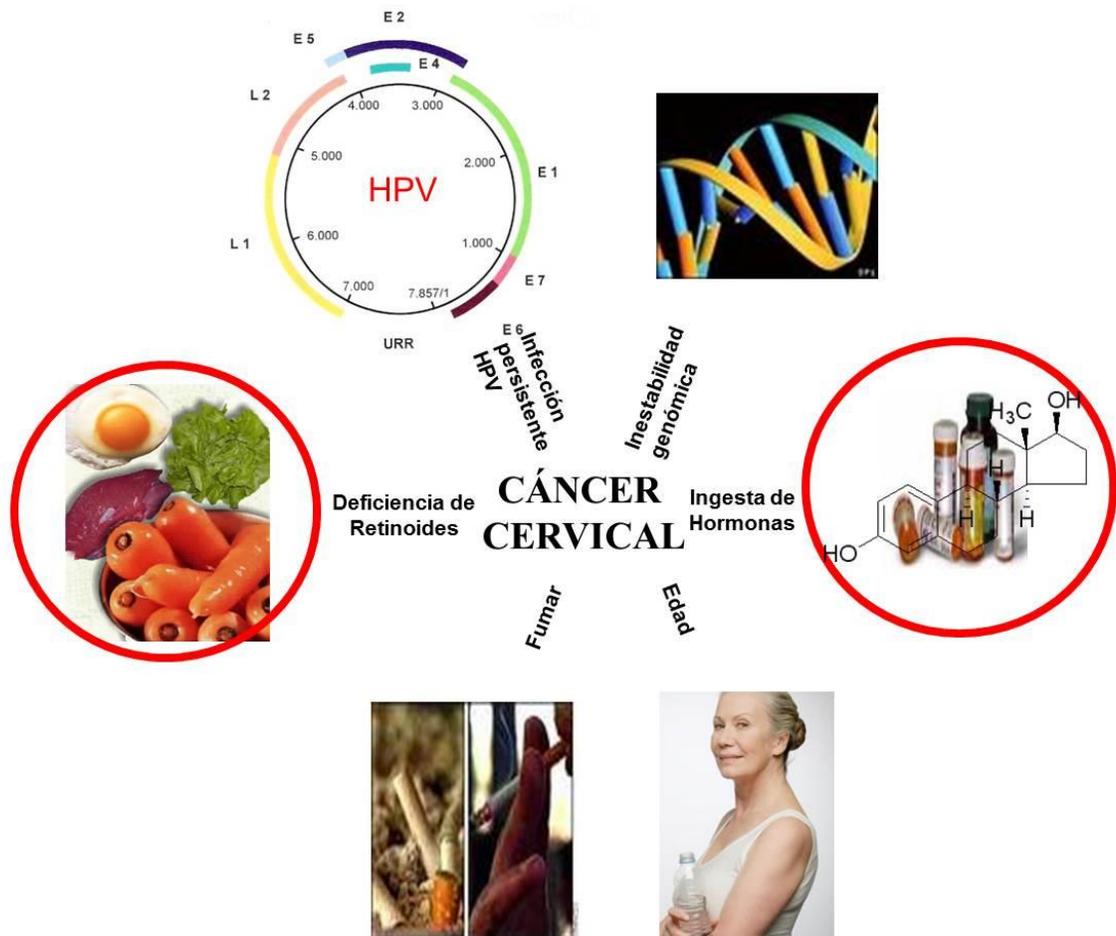


Figura 2. Factores de riesgo asociados a cáncer cervical. (Moreno., *et al.* 2002)

Diversos estudios han indicado que existe una relación entre la alteración de los receptores para el ácido retinoico (RARs) pertenecientes a la familia de receptores nucleares y el desarrollo de CC; las mujeres que exhiben disminuida la expresión del gen del receptor β para el ácido retinoico (RAR β) tienen 3 veces más probabilidades de desarrollar CC (Gariglio. *et al.* 2009). El gen RAR β es considerado como un supresor de tumores, las alteraciones en la expresión génica de RAR β tanto en los niveles de mRNA como en la pérdida de la inducibilidad de su ligando son una característica importante en mujeres con CC (Geisen C. *et al.* 1997). La Zona de Transformación (ZT) tiene altos niveles de expresión de RAR β y se ha demostrado la reducción de mRNA en los cánceres de cuello uterino a nivel de tejido (Abu J. *et al.* 2008) y en todas las lesiones conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NICs) incluyendo NIC1, NIC2 y NIC3. Se ha sugerido a la metilación de este gen supresor como un evento importante para su disminución de la expresión de este gen en la carcinogénesis cervical temprana (Ivanova., *et al.* 2002, Xu., *et al.* 2007). Un mecanismo importante por el cual RAR β ejercer la función inhibitoria del crecimiento se basa en su capacidad para reprimir al factor de transcripción AP-1 (Lin., *et al.* 2000), mediante la degradación selectiva de c-Jun en células de carcinoma cervical (De-Castro., *et al.* 2004). Por otro lado la exposición crónica con estrógenos, incrementa el riesgo a desarrollar CC en un coeficiente de 2-4 veces para mujeres con uso prolongado (6 años) de anticonceptivos orales (AO) (Moodley., *et al.*, 2003). Los estrógenos sintéticos que se encuentran en las fórmulas de los AO incrementan la actividad estrogénica en comparación con los estrógenos endógenos en algunos tejidos estrógeno-dependientes (órganos diana) que incluyen el útero, la mucosa vaginal, glándulas cervicales, ovario y glándulas mamarias así como una mayor biodisponibilidad (Aten., *et al.* 1982).

1.2 Vitamina A y Ácido Retinoico

El término retinoide incluye tanto a la vitamina A (retinol) como a metabolitos activos análogos sintéticos (Bogos., *et al.*, 2008). Los retinoides naturales, en particular el ácido retinoico, es el metabolito biológicamente más activo de la vitamina A, que se produce *in vivo* a partir de la oxidación de la vitamina A. Las plantas y los animales son las fuentes dietéticas de vitamina A para los seres humanos (Poulain., *et al.*, 2009). El cuerpo obtiene la vitamina A de dos fuentes: preformada (retinol, ésteres de retinilo y retinal), y los carotenoides provitamina A (beta-caroteno, alfa caroteno, beta-criptoxantina). La vitamina A preformada se encuentra en el aceite de hígado de bacalao, manteca, huevos, productos de origen animal y los cereales fortificados. La provitamina A se encuentra en verduras muy pigmentadas como las zanahorias, la calabaza, y vegetales de hoja verde. Una vez en el cuerpo, el retinol se convierte finalmente en ácido retinoico y sus isoformas, conocidos colectivamente como los retinoides (Fritz., *et al.*, 2011).

1.3 Estructura de los retinoides

Los retinoides son una familia de moléculas de señalización que están químicamente relacionados con la vitamina A (retinol). Un retinoide contiene un grupo terminal cíclico (un anillo de β -ionona), una cadena lateral de polieno, y un grupo extremo polar (Figura 3) (Tang., *et al.*, 2011).

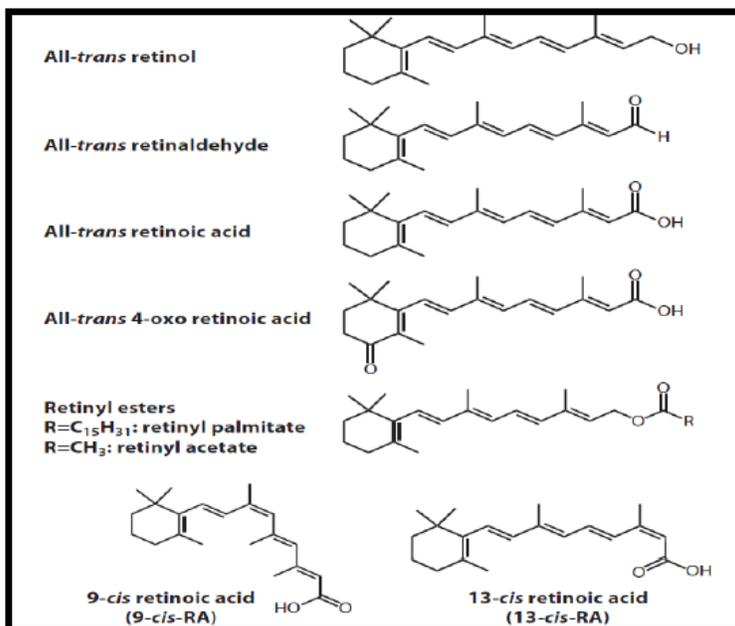


Figura 3. Estructuras de los retinoides (Tang., *et al.* 2011)

1.4 Metabolismo de la Vitamina A

La vitamina A se incorpora en el organismo por la ingesta tanto de productos de origen animal como de origen vegetal, en forma de retinol y de ésteres de retinol. Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen del intestino delgado a retinol, el cual junto con el retinol proveniente de la dieta es captado por los enterocitos. Por otro lado los carotenoides, entre los que destaca el β -caroteno como más activo, se absorben por difusión pasiva en el interior del enterocito donde son convertidos también en retinol (Masiá, 2006). Más tarde, el retinol total se une a la proteína fijadora de retinol (RBP) en el hepatocito del hígado para su distribución en los tejidos periféricos. Durante su transporte plasmático el complejo RBP- retinol está ligado a transtiretina (TTR) para evitar su eliminación por el riñón y asegurar así que el retinol sea suministrado a la célula blanco. La absorción de retinol por la célula blanco está mediada por una proteína transmembranal denominada "estimulador por el ácido retinoico 6" (STRA6), que es un receptor RBP.

Una vez que el retinol entra en las células blanco se une a proteínas celulares de unión (CRBPs) para su transporte citoplásmico. Consecutivamente el retinol es oxidado a "all-trans" ácido retinoico al unirse a los complejos de proteínas celulares para fijación de ácido retinoico (CRABPs) lo que le permite entrar al núcleo. Allí, el ácido retinoico actúa como ligando de los receptores a retinoides a través de elementos específicos de respuesta a retinoides ubicados en los promotores de los genes diana. Entonces, los dímeros de receptores a retinoides se unen a co-activadores y ponen en marcha la expresión de los genes blanco mediante la activación de la maquinaria transcripcional (Figura 4) (Poulain., *et al.*, 2009).

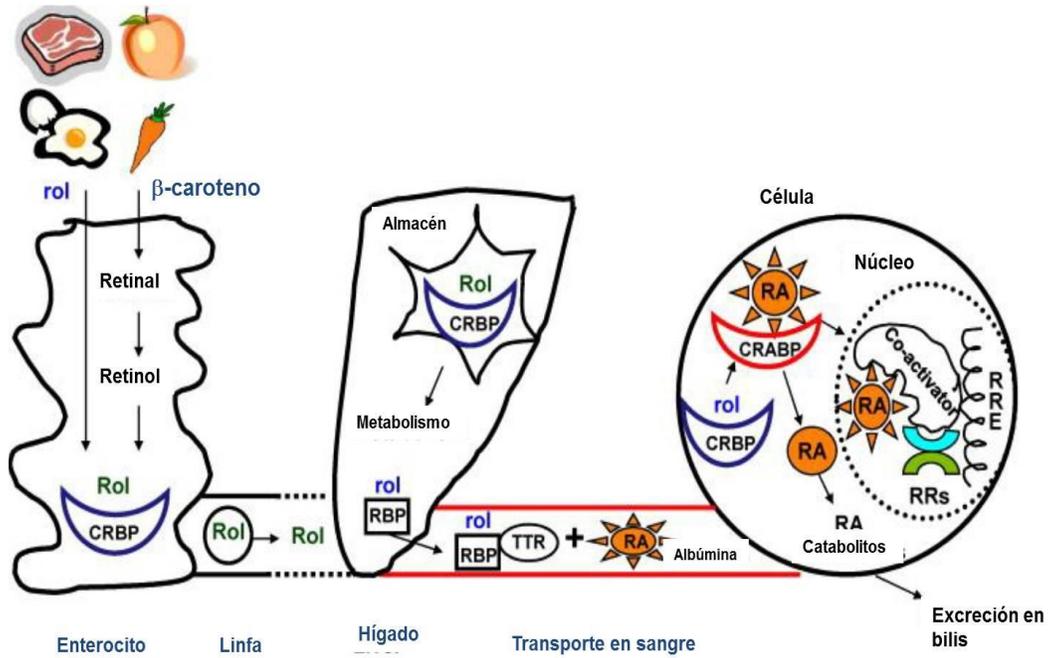


Figura 4. Esquema del metabolismo y transporte de los retinoides. (Poulain et al., 2009).

1.5 Función de los retinoides

Los retinoides ejercen importantes funciones fisiológicas, destacando la regulación de organogénesis, homeostasis, el crecimiento celular, la diferenciación y apoptosis (Populain., et al., 2009; Lee., et al., 2011), así como el mantenimiento de los epitelios y respuesta inmune (Figura 5). (Ahuja., et al., 2003; Chambon, 1996; Mangelsdorf., et al., 1995).

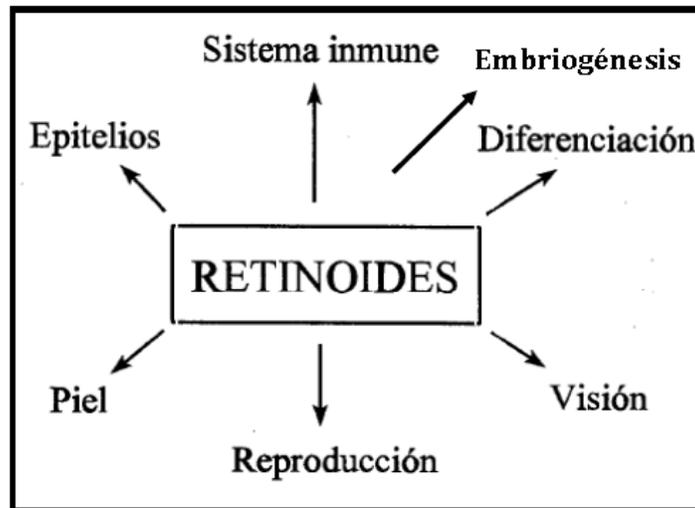


Figura 5. Principales funciones biológicas de los retinoides en el organismo.

1.6 Receptores Nucleares

Los receptores nucleares (NRs) son factores de transcripción regulados por ligando que desempeñan diversos papeles en el crecimiento celular, diferenciación, desarrollo, apoptosis y homeostasis de los epitelios (Mangelsdorf., *et al.* 1995; Chambon 1996). La elucidación de los mecanismos moleculares referentes a la acción de estos receptores es central en biomedicina molecular y puede tener implicaciones importantes en la prevención y terapia del cáncer. Los NRs activados interactúan con elementos de respuesta (REs) en la región promotora de genes blanco y modulan su transcripción (Mangelsdorf., *et al.* 1995). La superfamilia de receptores nucleares ha sido dividida en dos subfamilias: la de receptores a esteroides y la de receptores a retinoides y hormonas tiroideas (no esteroides) (Mangelsdorf., *et al.* 1995). La familia esteroidea incluye receptores a glucocorticoides (GR), mineralocorticoides, progestinas (PRs), andrógenos (AR) y estrógenos (ER) (Mangelsdorf., *et al.* 1995). La familia no esteroidea de NRs incluye receptores para el ácido retinoico (RARs), receptores X a retinoides (RXR), receptores a hormonas tiroideas (TRs), receptores de vitamina D (VDR) y prostanoides, receptores activados por compuestos inductores de la proliferación de peroxisomas (PPARs). Los integrantes de la superfamilia NRs tienen motivos funcionales y estructurales comunes aunque los miembros de la familia de receptores no esteroideos pueden unirse al DNA como monómeros y homodímeros, la forma activa más importante parece estar representada por heterodímeros (Mangelsdorf., *et al.* 1995; Chambon 1996).

Los miembros de la familia se caracterizan por presentar dos dominios funcionales conservados, en la porción N-terminal de la proteína se encuentra un dominio de unión al DNA (siglas en Inglés: DBD) el cual contiene dos dedos de zinc; en la porción C-terminal hay un dominio hidrofóbico denominado dominio de unión al ligando (siglas en Inglés: LBD), el cual es responsable de la interacción con el ligando, de la dimerización de la proteína y activación transcripcional. Recientemente, se descubrió que ciertos NRs interactúan de una forma dependiente de ligando con coactivadores (Altucci., *et al.* 2007). Existen también proteínas corepresoras que interactúan con los LBDs de los NRs y forman complejos con histonas deacetilasas, lo cual sugiere que la remodelación de la cromatina por desacetilación puede desempeñar un papel importante en la represión transcripcional mediada por receptores (Altucci L., *et al.* 2007; Noy N. 2010).

Los RARs y RXRs se dividen en cinco regiones designados con las letras A-F: el dominio A/B se encuentra en el extremo amino-terminal unido a una AF-1 independiente del ligando, pero dependiente de células; en el dominio C se encuentra la región de unión al DNA con dos dedos de zinc que participan en el reconocimiento de elementos de respuesta a retinoides en los promotores de genes blanco; el extremo C-terminal engloba al dominio D que actúa como enlazador y al dominio E de unión al ligando, este último unido a AF-2 y a un dominio de dimerización de receptores (Figura 6) (Poulain., *et al.* 2009).



Figura 6. Organización estructural de los receptores nucleares. (Poulain., *et al.*, 2009).

Las regiones AF-1 y AF-2 son conocidas como activadoras de la transcripción independientes de ligando debido a su capacidad para activar la transcripción sin necesidad de la unión de los retinoides a sus receptores. Esto se debe a la presencia de diversos sitios de fosforilación mediante diferentes cinasas, como las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las MAP cinasas (Altucci., *et al.* 2007).

En ausencia de ligando, los receptores de los retinoides se encuentran en el núcleo, unidos a secuencias específicas de DNA en forma de heterodímeros RAR/RXR (Altucci., *et al.* 2007). Un complejo co-represor permanece asociado al dímero; inhibiendo la transcripción de genes pero cuando un ligando se une al receptor, se induce un cambio conformacional que desplaza al co-represor, permitiendo la unión de un coactivador para que se inicie la transcripción (Poulain., *et al.*, 2009).

1.7 Estrógenos y Receptores a Estrógenos

Otro factor involucrado en la carcinogénesis que ha sido identificado, es la acción ejercida por las hormonas esteroides, principalmente los estrógenos. Las hormonas esteroideas son derivados del colesterol y por lo tanto formadas por el ciclopentanoperhidrofenantreno. El colesterol proviene de la captación por el ovario de las lipoproteínas circulantes ricas en colesterol o bien puede ser sintetizado *in situ* a partir del acetato; el AMP cíclico promueve la fosforilación de una proteína que transporta el colesterol desde sus depósitos intracelulares hacia la mitocondria, donde es convertido en pregnenolona por la enzima dependiente del citocromo P450 llamada desmolasa aromatasa o P450scc (Aten., *et al.* 1982). La pregnenolona formada en esta vía puede convertirse en progesterona, esta no puede convertirse como tal en andrógenos (los precursores de los estrógenos) sino que también debe hidroxilarse a 17 α -hidroxiprogesterona por la P45017 α OH, en forma similar a la pregnenolona. Así, a partir de la 17 α -hidroxiprogesterona se forma androstenediona, que puede convertirse en testosterona y a partir de esta se sintetiza el estradiol. La síntesis de andrógenos en el ovario ocurre en la *teca*, siendo la misma estimulada por la hormona luteinizante hipofisaria.

La acción reguladora primaria de los estrógenos está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen., *et al.* 2000). En el tracto reproductivo femenino los estrógenos actúan manteniendo la diferenciación del epitelio vaginal y exocervical (Dallenbach G. 1981); así como regulando el ciclo menstrual, existiendo un delicado balance en sus niveles circulantes durante el embarazo, las fases premenstrual, menstrual y postmenopáusica.

Este balance es influenciado de manera importante por la ingesta de hormonas esteroideas en forma de anticonceptivos orales (AO) con componentes que incluyen al E₂, en mujeres jóvenes o por terapia hormonal de remplazo en mujeres postmenopáusicas (Richard., *et al.* 2007).

El mecanismo de acción de este esteroide se lleva a cabo a través de los receptores de estrógeno (REs) los cuales son activados por estrógenos y por moléculas estructuralmente similares, para ejercer sus diversos efectos biológicos. Hay dos isoformas RE α y RE β ; ambas han sido purificadas y caracterizadas desde diferentes tejidos blanco y en diversas especies como rata, ratón, humano, bovino y pollo entre otros (Enmark E. 1999), el RE α está localizado en el brazo largo del cromosoma 6 en humanos, mientras que el RE β está ubicado en la banda q22-24 del cromosoma 14 y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido (Enmark E. *et al.* 1999). El RE α y RE β varían su expresión durante la proliferación y diferenciación celular, de forma tal que el RE α parece ser necesario para el desarrollo básico y crecimiento de tejidos sensibles a estrógeno y el RE β se considera el responsable de la maduración funcional y está involucrado en la inhibición de la proliferación celular (Kowalski., *et al.* 2002). De esta manera, los REs ejercen papeles determinantes en el mecanismo de acción de estrógeno.

Actualmente se conoce que la estructura del RE α está formada por 595 amino ácidos y tiene tres dominios, uno amino-terminal regulador, hipervariable, relacionado con la función de transactivación (Kowalski A. 2002), otro central de unión al DNA (DBD), altamente conservado, responsable de la dimerización, especificidad de unión y localización nuclear del receptor y uno carboxi-terminal de unión al ligando (LBD). En cambio, RE β contiene 530 amino ácidos y es más corto porque le falta una porción del dominio carboxi-terminal, que determina la unión de ciertos antiestrógenos.

Tanto el RE α como el RE β presentan dominios estructurales y funcionales comunes, la más alta homología entre ellos corresponde al DBD (97%), mientras que el LBD presenta una homología menor (55%). Ambos receptores se unen al estrógeno y a los elementos de respuesta a estrógeno (EREs) con alta afinidad; sin embargo algunas diferencias en su estructura y en la distribución en los tejidos los hacen comportarse en forma distinta con respecto a la función (Kuiper., *et al.* 1997).

El estrógeno y ligandos similares circulan en el plasma sanguíneo unidos a proteínas plasmáticas, éstos se disocian para entrar en la célula donde se unen a sus receptores en el citoplasma (Bukovsky., *et al.* 2003). En ausencia de ligando, los REs están secuestrados en el citosol de las células blanco y son mantenidos en forma inactiva. La unión del RE con estrógeno o moléculas similares le producen un cambio conformacional que promueve la homo ó heterodimerización del receptor, facilitando su traslado al núcleo y la unión del mismo con alta afinidad a regiones promotoras ubicadas en el DNA, llamadas elementos de respuesta a estrógeno (EREs) (Kuiper., *et al.* 1997).

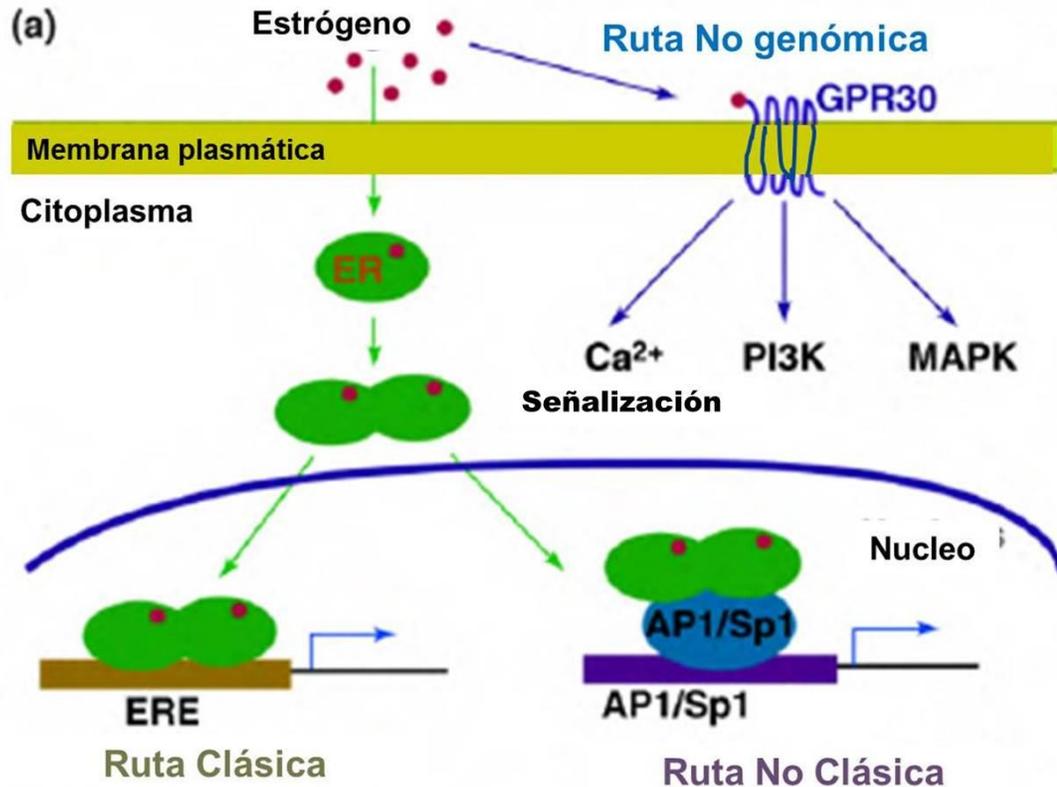


Figura 7. Vías de acción del Estrógeno (17 β -Estradiol) en la célula. Ruta Clásica a través de elementos de receptores a estrógeno en el núcleo y Ruta no Clásica a través de elementos de respuesta en genes responsivos a Estrógenos. La ruta No genómica a través de receptores de membranas como GPR30. (Richard., *et al*, 2007)

Es importante recordar que el RE no actúa solo en la transcripción genética, requiere de proteínas correguladoras que se encuentran en las células y juegan un papel importante como intermediarios de la señalización activando ó reprimiendo la expresión de genes. Generalmente los coactivadores tienen la actividad intrínseca de acetilación de la histona asociada con un aumento de la actividad transcripcional y los corepresores poseen actividad desacetilasa, la cual reprime la expresión genética almacenando la cromatina en un estado más condensado (Richard., *et al*, 2007) (Figura 7). Debido a que los REs responden a la hormona con la expresión de genes blanco, los REs son considerados como factores determinantes en el mecanismo de acción de estrógeno, y ejercen su acción tanto en la transcripción como en la traducción de la señal (Richard J. *et al*, 2007). Existe un tercer receptor de estrógenos intracelular transmembranal GPR30 (vía no canónica), que actúa de manera independiente al RE α y al RE β .

1.8 Receptores para el Ácido Retinoico.

Los retinoides son metabolitos activos de la vitamina A, regulan múltiples procesos fisiológicos que van desde la embriogénesis hasta su uso como medicamentos en varios trastornos incluyendo el cáncer (Chambon P. 1996); La eficacia clínica de los retinoides depende principalmente en su capacidad para modular el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis de los epitelios en células premalignas y malignas. Los retinoides actualmente se utilizan como medicamentos preventivos y terapéuticos contra toda una variedad de tumores malignos humanos tales como mama, pulmón, ovario, hígado, leucemia, cáncer de próstata, neuroblastoma y cáncer cervicouterino (Altucci y Gronemeyer 2001). Los RARs incluyen tres diferentes isotipos (α , β , γ) que están codificadas por genes distintos (Chambon P. 1996; Altucci y Gronemeyer 2001), los diferentes tipos e isoformas de RAR y RXR están altamente conservados evolutivamente y exhiben distintos patrones de expresión espacio-temporales tanto en organismos en desarrollo como en adultos, lo cual sugiere que cada receptor ejerce alguna función fisiológica distinta (Kastner., *et al.* 1997).

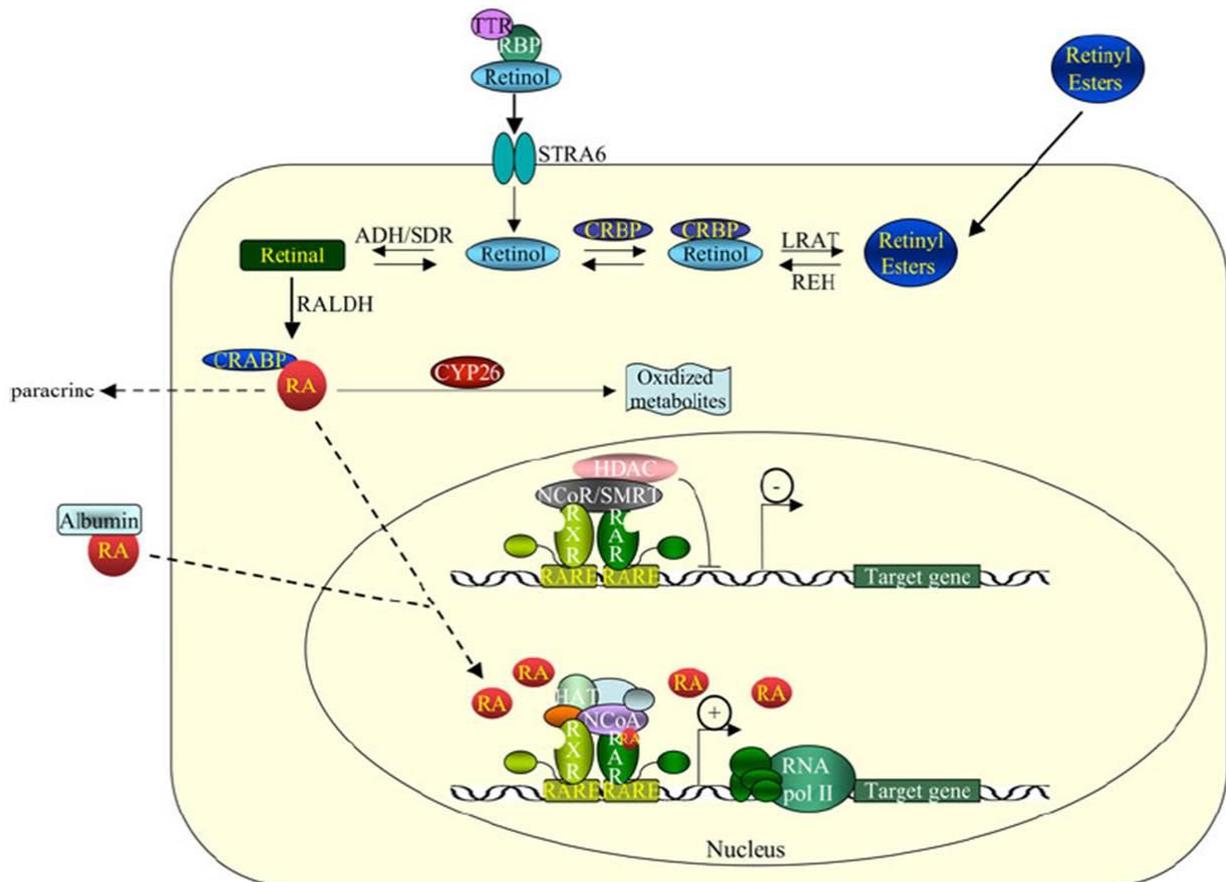


Figura 8. Regulación de la transcripción por los receptores nucleares. En ausencia de ligando, los RN pueden inhibir la transcripción de diversos genes. Cuando se activan por ligando, los RN pueden inducir la transcripción de cientos y hasta miles de genes por reclutamiento de acetilasas de histonas (Mangelsdorf., *et al.* 1995; Chambon.1996)

Los RARs se unen tanto al all-trans ácido retinoico (ATRA) como a su isómero 9-cis-ácido retinoico, mientras que los RXRs solo se unen a este último. En presencia del ligando, RXRs pueden formar homodímeros o heterodímeros con RARs, que a su vez interactúan con elementos de respuesta al ácido retinoico (RAREs) o (RXREs) (Zhang., *et al.* 1992). La existencia de distintos RAREs y RXREs dentro de las regiones promotoras, indica que RAR homodímeros y heterodímeros (RXR-RAR) transitan por distintas vías en adición de ácido retinoico (Roy., *et al.* 1995). La regulación de la expresión génica positiva de los RARs requiere de su interacción a proteínas con actividad acetiltransferasa (P300 o la proteína CREB vinculante), proporcionan un enlace funcional directo con el núcleo de la maquinaria de transcripción y la modulación del nucleosoma. Además de su función reguladora positiva, los RARs también afectan negativamente la expresión génica. En ausencia de ligando, RAR/RXR reclutan desacetilasas de histonas dando como resultado el silenciamiento genético mediante la condensación de la cromatina (Weston., *et al.* 2003) (Imagen 8).

1.9 Receptor β para el Ácido Retinoico (RAR β)

El receptor beta para el ácido retinoico (RAR β) es una molécula de señalización muy importante en la homeostasis epitelial, la diferenciación y la carcinogénesis (Vuilleminot., *et al.* 2004). Los efectos antitumorales de RAR β están mediados a través de la inhibición de la proliferación celular y metástasis, así como la inducción de la apoptosis (Treutin *et al.*, 2002). Se han descrito cinco isoformas principales de RAR β (β 1, β 2, β 3, β 4 y β 1') de las cuales RAR β 2 es la más abundante con actividad supresora de tumores (Álvarez *et al.*, 2007). La pérdida frecuente o disminución de la expresión del mRNA RAR β se ha descrito en diversos tipos de cánceres (Bogos., *et al.* 2008). El principal mecanismo de silenciamiento de RAR β en el pulmón de ratón y humano es la hipermetilación de su promotor en regiones ricas en C y G conocidas como islas CpG (Tang., *et al.* 2011; Vuilleminot., *et al.* 2004).

1.10 Genes blanco del RAR β

El ácido retinoico regula más de 532 genes; en algunos casos este control es directo, activado a través de un heterodímero de RARs unidos a RAREs en genes blanco, en otros casos es indirecto, lo que refleja las acciones de factores de transcripción intermediarios (no clásicos), asociaciones de receptores con otras proteínas, o incluso mecanismos más distantes. Veintisiete de estos genes son controlados a través de la vía clásica del RA en contexto celular. Ciento cinco pueden ser modulados a nivel transcripcional por regulación directa, pero en la mayoría de los casos, no tienen relación con RAREs o con la participación de RAR-RXR. Hay 124 genes que parecen ser regulados de manera indirecta. Los restantes 267 genes, están regulados por AR, de alguna manera, pero los datos disponibles en la actualidad no nos permiten predecir el control directo *versus* indirecto. La mayoría aún no han sido estudiados, salvo en contextos de largo plazo o con dosis elevadas, y para muchos, el interés último ha sido clínico, de desarrollo o de diagnóstico y no mecanicista (James E. *et al.* 2007).

En el caso del receptor RAR β , cuando se une a su ligando, activa la transcripción por unión a RAREs localizados en regiones promotoras de genes blanco. Los RAREs generalmente

consisten de dos secuencias motivo repetidas AGGTCA en la región central separada por dos o cinco pares de bases (pb) (elementos DR2 y DR5) (Hoffmann B. *et al.* 1990).

Los genes blanco codifican una amplia gama de proteínas que regulan una variedad de procesos biológicos. Se identificaron 27 genes que están regulados, directa o indirectamente, por RAR β en líneas celulares de tumor de pulmón que no expresan RAR β . Se han identificado genes blanco de RAR β como son: RAR α , c-Myc, FGF21, AP1, p28, glutamato deshidrogenasa (GLUD), Dab2, PDGF- α receptor y meis1a, entre otros. La mayoría de los genes diana se regulan por la unión de ligando, aunque algunos genes tales como Dab2, Hic5, Fox y p28, también son reguladas por RAR β en ausencia de AR añadido exógenamente. Algunos genes blanco de RAR β son específicos por lo que cada isoforma RAR tiene funciones distintas.

RAR β es necesario para la detención del ciclo celular, dado que este es capaz de bloquear a c-Myc. El proto-oncogén c-Myc, se activa en varios animales modelo y en tumores humanos (Dang., *et al.* 1999). c-Myc es un factor de transcripción que regula muchos procesos biológicos, incluyendo el ciclo celular y la diferenciación celular (Eisenman R. 2001). La proteína c-Myc puede regular algunas ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y los inhibidores de CDK, que son reguladores del ciclo celular (Figura 9) (Amati., *et al.* 1998). La expresión desregulado de c-Myc a menudo resulta en aumento de la expresión de ciclina E y ciclina A (Barrett., *et al.* 1995).

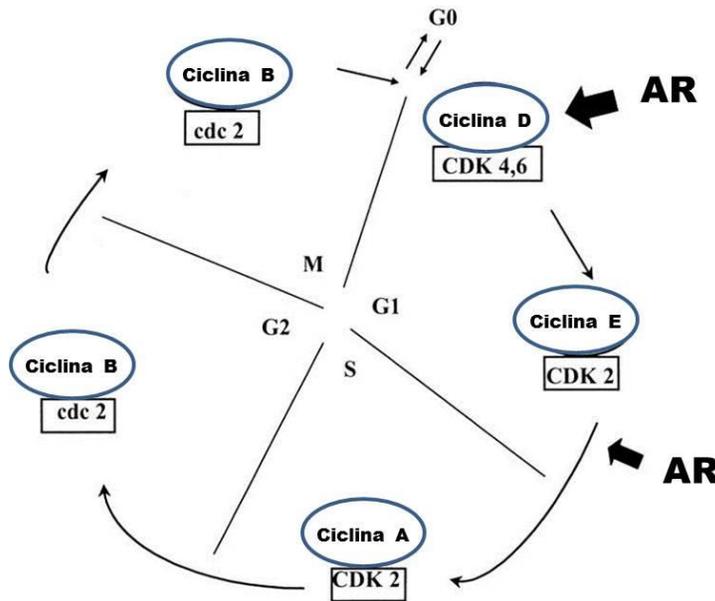


Figura 9. Participación del AR a través de RAR β en la regulación del ciclo celular y participación de algunos genes blanco de éste (James E. *et al.* 2007; Eisenman R. 2001)

El factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), es una hormona derivada del hepatocito que restaura la homeostasis de glucosa y lípidos en la obesidad inducida por diabetes. Se ha identificado a FGF21 como blanco directo de RAR β . La transcripción del gen de FGF21 se incrementa por la expresión de RAR α y RAR β , pero no se ve afectado por RAR γ en las células HepG2 (línea celular de hepatocarcinoma). *In vivo* la sobreexpresión de RAR β en el hígado mejora la producción y secreción de FGF21, que a su vez promueve la oxidación

hepática de ácidos grasos. Además, RAR β se une a sitios RARE putativos del promotor de FGF21, lo que contribuye a su inducción (Li Y., *et al.* 2013).

El factor de transcripción AP-1 es una proteína heterodimérica compuesta de proteínas pertenecientes a la c-Fos y c-Jun, controla una serie de procesos celulares, incluyendo la diferenciación, proliferación y apoptosis, juega un papel central en la regulación de la transcripción de determinados tipos de HPV16 y HPV18, es altamente expresado en el tumor cervical invasivo. RAR β invalida tanto la afinidad de unión de AP-1 y su actividad por una degradación selectiva de la proteína c-Jun como socio de dimerización importante, sin sustitución por otros miembros de la familia Jun (De-Castro., *et al.* 2004)

La expresión de Dab2 está regulada por GATA6 (Sheng., *et al.* 2000). Puesto que GATA6 es también un blanco específico de RAR β , Dab2 es un blanco indirecto de RAR β y es regulado por RAR β a través de GATA6. La expresión de mRNA de Dab2 se elimina en 85-95% de los tumores de mama y de ovario, siendo un gen supresor de tumor (Fazili., *et al.* 1999). La sobreexpresión de Dab2 reduce la tumorigenicidad de las células de carcinoma (Sheng., *et al.* 2000). A la inversa, la reducción de los niveles de RAR β en tumores humanos de mama (Widschwendter., *et al.* 1997) resulta en la regulación a la baja de Dab2, que a su vez puede alterar el control de la proliferación celular.

Estos datos implican a RAR β como un gen supresor de tumores, la expresión de este gen está directamente o indirectamente relacionada con una variedad de genes importantes en el desarrollo embrionario, diferenciación, homeostasis e indiferenciación celular, jugando un rol protector contra la progresión de neoplasias.

1.11 RARs y la Respuesta Inmune

El estado nutricional es uno de los determinantes más importantes de resistencia a las infecciones, es bien establecido que la deficiencia nutricional se asocia con alteraciones en las funciones de la respuesta inmune. Aunque los límites de desnutrición celular median la inmunidad y aumentan la susceptibilidad a infecciones, la infección en si puede inducir a un estrés nutricional y a la pérdida de peso, por lo tanto al debilitamiento de la respuesta inmune y el estado de nutrición. (Chandra RK. 1990). El All-trans Ácido retinoico (ATRA), tiene la capacidad para reducir la mortalidad humana a través de efectos que son mediados por el sistema inmune. La deficiencia en vitamina A resulta en múltiples anormalidades en la inmunidad innata y adaptativa que involucran anomalías en la diferenciación celular en órganos linfoides (Hiroyuki., *et al.* 2007).

Estudios en animales indican una relación entre el consumo deficiente de Vitamina A (DVA) o alteraciones en los receptores y una respuesta inmune deficiente ante patógenos. Esta deficiencia está asociada a un cambio de citocinas de tipo 2 (inmunidad humoral, producción de anticuerpos y maduración de inmunoglobulinas) a predominantemente citocinas de tipo 1 (necesarias para la inmunidad celular y toxicidad). El ácido retinoico (AR) disminuye la expresión de el gen interferón Gama (IFN γ), una citocina de tipo 1, en contraste con la DVA donde se asocia el incremento de éste, con lo que se produce una disminución de la generación de interleucina-5 (IL-5 una citocina tipo 2 activa en eosinófilos progenitores) y IL-10 (citocina tipo 2 que regula un cambio general al perfil tipo 2) (Cantorna., *et al.*, 1994; Cantorna., *et al.*, 1995; Carmen., *et al.*, 1991).

Informes recientes muestran que AR tiene una función central en la diferenciación de las Células Dendríticas (CD), estas células presentadoras de antígeno (APCs) son la clave para activar células T vírgenes. Las CD expresan los tres isotipos de RARs, especialmente RAR α y RAR β siendo capaces de responder directamente a AR (Manicassamy., *et al.*, 2009). Se sabe que el AR regula el desarrollo y la homeostasis de CD en bazo CD11b⁺CD8 α ⁻CD4-Esam^{high} y esta relacionados en el desarrollo de CD intestinales CD11b⁺CD103⁺ (Klebanoff., *et al.*, 2000) Estos dos subtipos de CD son especializados en el MHC de clase II, restringido la presentación antígenos para las células T CD4⁺ productoras de IL -17 (células Th17) tanto *in vitro* como *in vivo* (Persson. *et al.*, 2013; Mathilde. *et al.*, 2014; Beijer. *et al.*, 2013). El AR también mejora las propiedades migratorias de los CD, que es crucial para su función como presentadora de antígeno durante una infección. Recientemente, se describió el efecto de la disminución del receptor β para el ácido retinoico (RAR β) en un modelo murino, observándose que RAR β está implicada en la organización celular del bazo así como en el mantenimiento de población de CD, además se observó que la expresión del TLR-2 está reducida en el bazo de estos ratones. Sugiriendo que la expresión de RAR β es importante en la homeostasis de los componentes del sistema inmune (Serafin-Higuera. *et al.*, 2012). Lo que indica que el AR juega un papel en la homeostasis, pero activa las células T patógenas en condiciones de inflamación (Mathilde R. *et al.*, 2014).

1.12 RAR β y p16^{ink4a}

Varios grupos de investigación nombran a la proteína p16^{ink4a} como posible marcador de diagnóstico del cáncer cervical. (Vulgareva, *et al.*, 2004; Carozzi., *et al.* 2013). Como se mencionó anteriormente esta proteína es un inhibidor competente de las cinasas dependientes de ciclina (CDKS) y forma parte de la vía de señalización p16^{ink4a}-Cdk4-6/ciclina D- pRb. En células normales p16^{ink4a} funciona como regulador negativo de la progresión del ciclo celular controlando la actividad del supresor de tumores pRb. p16^{ink4a} inhibe la fosforilación de pRb por los complejos ciclina D-Cdk4/Cdk6. pRb hiperfosforilada se une al factor de transcripción E2F e inhibe la progresión del ciclo celular en G0. En células en proliferación, al fosforilarse pRb deja de interactuar con E2F el cual induce genes que median la entrada de la célula a la fase S (Vulgareva., *et al.* 2004). En células tumorales la interacción entre pRB/E2F puede perderse de diversas maneras, incluyendo las mutaciones o la fosforilación de pRb debido a la sobreexpresión de las cinasas Cdk4 y Cdk6 o la pérdida del inhibidor p16^{ink4a} (Ivanova, *et al.* 2007). La pérdida de función de p16^{ink4a} puede ser debida a las mutaciones o a la supresión de la transcripción por la hipermetilación del promotor, como se encuentra en diversos tumores.

La inactivación de la señalización p16^{ink4a}/pRb en tumores cervicales con HPV positivo, es diferente dado que la continua expresión de E6/E7 generan que la expresión de p16 se mantenga en un nivel relativamente alto lo que sugiere que es necesaria para la progresión y mantenimiento del fenotipo transformado de las células epiteliales (McLaughlin-Drubin. *et al.*, 2008). E7 a través de las KDM6B desmetilasa específica de H3K27, que es crítica para la supervivencia celular fomenta el mantenimiento de la expresión elevada de p16^{ink4a} (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2013). Sin embargo en el 25-57% de los carcinomas cervicales

asociados con HR-HPV se ha demostrado la hipermetilación del promotor de p16^{ink4a} cervicales (Ivanova, *et al.* 2007). RAR β al igual que p16^{ink4a} tiene un papel de expresión único en células epiteliales en cérvix normal. (Comerci *et al.*, 1997; Darwiche *et al.*, 1994; Ghyselinck *et al.*, 1997) La relación directa de la regulación de RAR β a p16^{INK4a} se explica mediante el bloqueo de la progresión del ciclo celular en la fase G1, disminuyendo la expresión de Cinasas dependientes de ciclina 2 (Cdk2), Cdk4/6 y Ciclina D1. También puede ocurrir por una regulación positiva de la expresión de inhibidores del ciclo celular como son p16^{INK4a}, p21^{WAF1} y p27 a través de la baja regulación de DNA metiltransferasas en los promotores de dichos inhibidores (Figura 10)(Lim *et al.*, 2011).

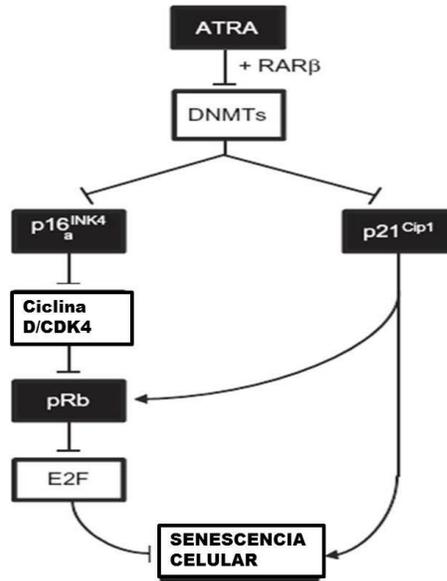


Figura 10. Mecanismo de acción del AR a través del RAR β en la regulación de gen p16^{INK4a} y p21^{Cip1} (Lim *et al.*, 2011)

1.13 Ratón Condicional NE75 RAR $\beta^{L-/L-}$ (RAR $\beta^{L-/L-}$) como modelo de estudio.

El ratón condicional NE75 RAR $\beta^{L-/L-}$ es utilizado como modelo para estudiar el efecto de la deficiencia de retinoides, tiene como característica que los alelos 9 y 10 del gen RAR β fueron flanqueados por sitios *loxP* en ambos alelos (ratones RAR β L2/L2). Estos ratones fueron cruzados con una cepa que expresa la Cre recombinasa en células germinales (CMV-Cretg/0) y los animales resultantes fueron heterocigotos para RAR $\beta^{+}/L-$. El alelo L- no contiene los exones 9 y 10 que codifican la mayoría de aminoácidos del dominio de unión al ligando, causando una mutación y corrimiento de marco de lectura. La cruce de los ratones RAR $\beta^{+}/L-$ generaron una cepa RAR $\beta^{L-/L-}$. Esta cepa presenta una pérdida de los exones 9 y 10 del gen RAR β , los cuales codifican para el dominio de unión a ligando (aminoácidos 263-386) y un corrimiento en el marco de lectura en función de la expresión de la Cre-recombinasa mediada por el promotor de Citomegalovirus. Este ratón posee un fondo genético resultado de la cruce entre ratones 129/Sv y C57BL/6J (Chapellier *et al.*, 2002) (Figura 11).

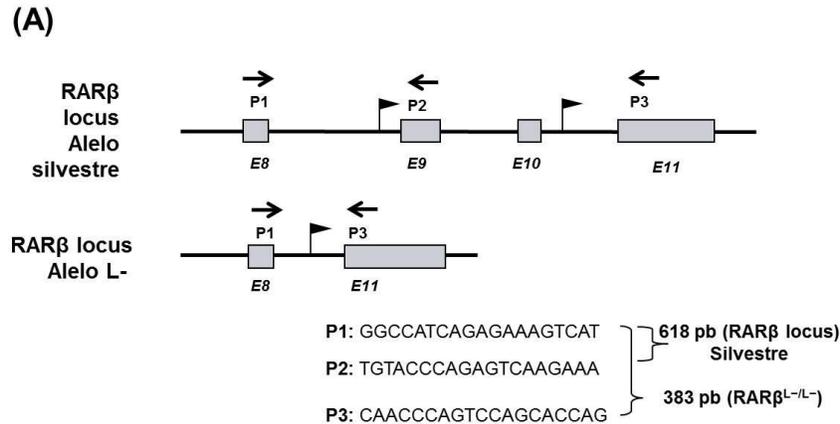


Figura 11. Alteración dirigida al alelo RAR β floxed en los ratones condicionales [CMVCre(tg/0)/RAR β L2/L2] (RAR $\beta^{L-/L-}$) de 4 meses de edad. (A) Esquema del alelo Silvestre y los elementos para construcción del alelo RAR β L-/L-, después el alelo cortado mediante la Cre- recombinasa el corte es en los exones 9 y10 (E9-E10) para generar los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$. Los rectángulos representan los exones 8-11 (E8-E11). Las banderas representan los sitios LoxP (P1, P2 y P3) e indican la localización de los primers utilizados para la genotificación.

Estos ratones son fértiles y homocigóticos para la mutación condicional, por lo que las cruza posteriores no generan ratones heterocigotos o silvestres. Se ha reportado que estos ratones presentan alteraciones a nivel de desarrollo pulmonar así como malformaciones vertebrales leves y la formación de una masa retrolenticular anormal a los 6 meses de edad que caracteriza a los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ (Chapellier *et al.*, 2002). Se ha observado que estos ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ condicionales presentan ciertas características asociadas al síndrome de deficiencia de vitamina A, como la queratinización, infiltración de polimorfonucleares, metaplasia epidermoide y disminución de células dendríticas en bazo (Serafín., *et al.* 2012).

2. ANTECEDENTES.

Existe una relación entre el consumo deficiente de retinoides o alteración de los receptores a retinoides (pertenecientes a la familia de receptores nucleares) y desarrollo de ciertos cánceres epiteliales, incluyendo el cáncer de piel, pulmón, mama, colon, próstata y el CC. Corroborando estas observaciones; se ha determinado que dietas bajas en retinoides inducen lesiones cervicales en ratones. Los retinoides pueden inhibir el crecimiento de células cervicales malignas *in vitro* e *in vivo*, así como también pueden ser capaces de revertir lesiones tipo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) nivel I y II (Meyskens. *et al.*, 1994). De gran interés ha sido encontrar que en humanos las lesiones cervicales premalignas exhiben baja expresión de receptores al ácido retinoico (RARs) y que el gen RAR β es un regulador negativo de las células cervicales cancerosas, lo cual ha sugerido que puede ser un gen supresor de tumores (Sun, *et al.* 2000). RAR β es abundante en el epitelio columnar simple del cérvix y al parecer es el RAR más importante de los que intervienen en la supresión del fenotipo malign. Se ha encontrado que la expresión de

RAR β está disminuida tanto en lesiones cervicales (Ivanova, *et al.* 2002) como en diversas líneas celulares cervicales (Geisen, *et al.* 1997), condición que se ha podido revertir por transfección con el gen RAR β y por dosis farmacológicas de ácido retinoico.

Por ejemplo, se ha encontrado una asociación inversa significativa entre la concentración de retinol (vitamina A) en el suero y el desarrollo neoplasias intracervicales (NIC) (French, *et al.* 2000). La ausencia de retinoides en la dieta de ratones induce lesiones premalignas equivalentes a NIC. Se ha observado que los retinoides son efectivos suprimiendo el desarrollo de tumores en varios modelos de carcinogénesis, incluyendo los de piel y cérvix. También parecen ser efectivos en el tratamiento del cáncer cervical invasor, en particular cuando los retinoides se asocian con interferones (IFNs). Observaciones posteriores han demostrado que la combinación de retinoides e IFNs resulta en un efecto sinérgico que induce la apoptosis (Giandomenico, *et al.* 1997).

Varios reportes han llegado a la conclusión de que RAR β es el RAR más importante involucrado en la supresión del fenotipo maligno y cuando deja de expresarse puede favorecer dicho fenotipo. Así, RAR β no se expresa en muchas células malignas ya sea debido a modificaciones epigenéticas, tales como la hipermetilación de la región promotora y la condensación de la cromatina, o por pérdida y rearrreglos estructurales del locus RAR β en el cromosoma 3, interesantemente las células derivadas de carcinomas cervicales humanos no expresan RAR β (Bartsch, *et al.* 1992). En cuanto al mecanismo involucrado en la actividad antitumoral de los retinoides, se ha propuesto ya sea la activación del elemento de respuesta al ácido retinoico (RAR β) en algunos genes blanco o el bloqueo de la función de AP1, factor transcripcional importante en la progresión preneoplásica-neoplásica en modelos de cultivo celular (Dong, *et al.* 1995). Favoreciendo esta segunda posibilidad, en 1997 se demostró *in vivo* que el bloqueo de la actividad de AP1, pero no la activación de RAR β , es necesario para el efecto antitumoral de los retinoides (Huang, *et al.* 1997). Por otro lado, se sabe que los retinoides y las hormonas esteroideas (como los estrógenos) son reguladores de la diferenciación y función epitelial normal del tracto reproductivo. Los estrógenos inducen la expresión de RXR y la expresión de RAR β y RAR α en el epitelio cervical del ratón (Celli, *et al.* 1996).

Entre la evidencia que sugiere que existe una relación importante entre hormonas y cáncer cervical se tiene que: 1) la progesterona y la progestina pueden actuar como cofactores en la transformación de células en cultivo infectadas con HPV16 y co-transfectadas con ras (Khare, *et al.* 1997); 2) los estrógenos y la progesterona tienen la capacidad de incrementar la expresión de las oncoproteínas del HPV16 y 18 a nivel transcripcional (Chen, *et al.* 1996 y Yuan, *et al.* 1999); 3) la mayor parte de los casos de CC han sido descritos en la región del cérvix más sensible a estrógenos: la zona de transformación (Autier, *et al.* 1996); 4) la incidencia de DNA de HR-HPV en muestras cervicales se incrementa durante el embarazo precisamente cuando existen niveles elevados de progesterona (Schneider, *et al.* 1987).

La evidencia directa de la participación del HPV y el entorno hormonal se ha obtenido gracias a modelos murinos, los cuales poseen los transgenes que codifican para las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16 que, como vimos anteriormente, inactivan a p53 y pRb respectivamente. La expresión continua de E6 y E7 puede conducir a una desregulación del crecimiento celular persistente facilitando la inestabilidad genómica (Galloway, *et al.*

1994). Estos ratones desarrollan cáncer cervical cuando son tratados crónicamente con 17 β -Estradiol (E₂) (Riley, *et al.* 2003).

La infección con HR-HPV incrementa la 16 β -hidroxilación del estradiol, aumentando los niveles de 16 β -hidroxiestrone, un metabolito carcinogénico (Birkhauser. 1994), la cual incrementa dramáticamente el crecimiento independiente y la pérdida del anclaje de células epiteliales inmortalizadas con HR-HPV (Newfield, *et al.* 1998). Posteriormente, el grupo de Riley y Cols. (2003), logran disectar la actividad que ejercen los oncogenes E6 y E7. Estos investigadores encuentran una potente actividad sinérgica de E7 en presencia de estrógenos administrados en forma crónica para el desarrollo de CC; la proteína oncogénica E6 actuó como modulador de la cocarcinogénesis cervical mediada por E7 en presencia de E₂ (Riley, *et al.* 2003). E7 por sí solo fue capaz de producir displasia cervical de alto grado y progresión a cáncer cervical microinvasor en ratones transgénicos para E6 y E7 tratados con estrógenos. A pesar de que se ha podido inducir CaCu en estos modelos, han sido necesarios niveles relativamente altos de hormonas (Riley, *et al.* 2003).

Todo lo anterior motiva al estudio de estos factores de riesgo, dada la importancia del RAR β y el entorno hormonal en la homeóstasis epitelial y la infección por HR-HV en el desarrollo de CC.

3. JUSTIFICACIÓN

Existe un porcentaje elevado de muertes en la población de mujeres mexicanas a causa del cáncer cervical; esto representa un problema grave de salud y un serio problema socioeconómico pues afecta principalmente a personas en edad productiva y su tratamiento tiene un costo elevado; dado que el desarrollo del cáncer no se determina por un solo factor, es importante identificar aquellos factores que cooperan con el HR-HPV para causar CC.

Entre los cofactores más importantes para el desarrollo de una neoplasia cervical, sugeridos por diversos estudios epidemiológicos y experimentales, encontramos a los estrógenos y a los retinoides; por lo anterior, se considera crucial determinar el posible efecto cooperador entre alteraciones de los receptores para el Ácido Retinoico (en particular RAR β) y el entorno hormonal en el desarrollo temprano de lesiones cervicales.

4. HIPÓTESIS

La deficiencia de RAR β y la administración de 17 β -Estradiol, generará lesiones cervicales premalignas que favorecerán la carcinogénesis e incrementarán los niveles de expresión de p16^{INK4a} en muestras cervicales de ratones RAR β ^{L-/L-} condicionales.

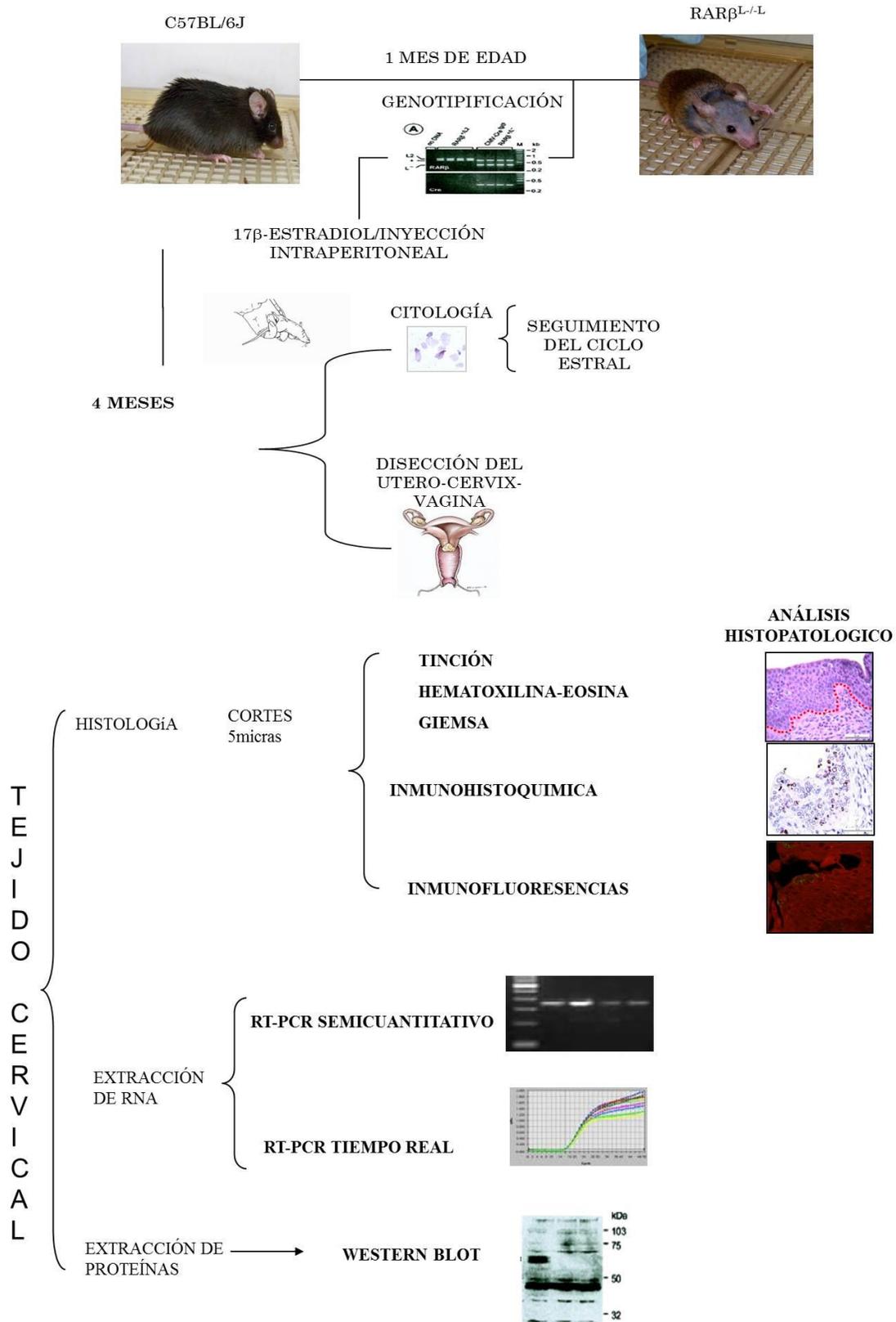
5. OBJETIVO

Establecer el papel de la deficiencia de RAR β y la presencia del 17 β -Estradiol en el desarrollo de lesiones premalignas, en muestras cervicales de ratones RAR β ^{L-/L-} condicionales.

5.1 Objetivos Particulares

1. Evaluar el grado de alteración histopatológica (fenotipo) en todos los tejidos cervicales obtenidos a partir de las cepas de ratones RAR β ^{L-/L-} condicionales con o sin tratamiento hormonal.
2. Determinar los cambios por el efecto del tratamiento hormonal y expresión disminuida de RAR β en la expresión de genes involucrados en proliferación celular, apoptosis y genes blanco de estrógenos y RAR β en muestras del cérvix-útero-vagina.
3. Determinar los niveles de expresión de p16^{INK4a} en citología cervical durante el tratamiento hormonal y en tejido cervical al finalizar el tratamiento como marcador temprano de carcinogénesis cervical
4. Determinar si existe una correlación entre la baja expresión de RAR β , los cambios histopatológicos y los cambios de expresión de p16^{INK4a}.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Población de estudio

Se utilizaron ratones condicionales hembra NE75 RAR $\beta^{L-/L-}$ (Chapellier *et al.*, 2002) de 4 meses de edad y ratones hembra C57BL/6J utilizados como control, generados en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorios (UPEAL; protocolo 212/04) del CINVESTAV-Zacatenco (NOM-062-200-1999).

7.2 Tratamiento hormonal.

Se formaron seis grupos de 12 ratones hembra vírgenes de un mes de edad cada uno, un grupo de ratones C57BL/6J y un grupo de ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ fueron tratados con vehículo (100 μ l de aceite de ajonjolí 3 veces por semana); un grupo de C57BL/6J y un grupo de RAR $\beta^{L-/L-}$ se trataron con E₂ a dosis de 833ng/día; mediante inyección intraperitoneal (ip). Este tratamiento se continuó hasta completar 3 meses; después de este tiempo los ratones hembras fueron sacrificados a los 4 meses de edad (Elson, *et al.* 2000).

7.3 Seguimiento del ciclo estral.

Se determinaron las fluctuaciones del ciclo estral de cada ratón hembra mediante la toma de muestras obtenidas a través de lavados vaginales, realizados con PBS (Buffer Salino de Fosfatos) al 1%, fijándose en portaobjetos y posteriormente teñidos con Hematoxilina-Eosina. Se observó al microscopio óptico y se registró la fase del ciclo estral en el que se encontró a cada ratón.

7.4 Obtención de muestras

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se procedió a la disección del aparato reproductor (úteros, cérvix y vagina), las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% para posterior inclusión en parafina. Otras muestras fueron inmersas en RNA later (Ambion company) y congeladas para la extracción de RNA total y proteína.

7.5 Genotipificación. Extracción de DNA

Todos los ratones fueron genotipificados por PCR punto final. La muestra para la extracción de DNA se obtuvo a partir de la porción terminal de la oreja de los ratones hembras, posteriormente fue confirmado en cérvix de los ratones de 4 meses de edad, los tejidos fueron cortados y posteriormente incubados con buffer de lisis (H₂O, NaCl 4M, Tris 1M, SDS 10%) y proteínasa K (PK).

1. Una vez lisado el tejido se agregaron 300 μ l de DNAZOL® Reagent (*Invitrogen, USA*) con agitación ocasional durante 7 minutos, se agregaron 0.3 ml de cloroformo seguido de una centrifugación a 11500 rpm por 10 minutos.
2. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo agregando 500 μ l de etanol frío, se mezcló y se dejó reposar 5 minutos para su posterior centrifugación a 8000 rpm por 15 minutos.
3. Se decantó el sobrenadante, el DNA se lavó con 150 μ l de la mezcla de 600 μ l de DNAZOL® Reagent + 450 μ l de etanol absoluto, esta mezcla se agitó y se dejó reposar 5 minutos para su posterior centrifugación a 8000 rpm por 15 minutos.
4. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla de DNA se lavó con 150 μ l etanol al 80 % con agua de PCR y se centrifugó a 7500 rpm por 7 minutos y la pastilla se dejó secar.
5. Finalmente las muestras se resuspendieron con 30 μ l de agua ultrapura.
6. Para cuantificar el DNA se realizó una dilución 1:50 con agua grado PCR y la integridad se corroboró en un gel de agarosa al 1.5% a 85 volts/30 minutos.

7.6 Detección de los genes RAR β y *Cre* recombinasa por PCR

1. Se determinó presencia de los genes RAR β y *Cre* recombinasa mediante PCR para cada una de las muestras. Usando los siguientes primers.

primers	Secuencia	
P1	5'-CAACCCAGTCCAGCACCAG-3'	RAR β
P2	5'-GGCCATCAGAGAAAGTCAT-3'	RAR β L-
P3	5'-CAACCCAGTCCAGCACCAG-3'	RAR β Silvestre
Forward	5'ATTTGCCTGCATTACCGGTC 3'	Cre-Recombinasa
Reverse	5'ATCAACGTTTTCTTTTCGG 3'	Cre-Recombinasa

Tabla 1. Secuencias de los primers usados para la genotipificación de ratones RAR β ^{L-/L-}.

2. La mezcla de reacción de PCR se llevó a cabo como se muestra en la tabla 2.
3. El producto de amplificación se observó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, separado por electroforesis con buffer TAE 1X a 90 Volts durante 40 minutos y visualizado bajo luz UV.

Mezcla de reacción	
Reactivos	Concentración
H2O ultrapura	Variable
MgCl ₂	50 mM
Primer Fw	100 mM
Primer Rev	100 Mm
Buffer 5X	1 X
dNTP	100 Mm
<i>Taq</i> polimerasa	0.2 U
DNA	1 μ g/ μ l

Tabla 2. Mezcla de reacción para la PCR.

7.7 Inclusión en parafina y cortes del tejido cervical

1. Los tejidos cervicales se fijaron en paraformaldehído al 4%, durante un día, posteriormente se colocaron en etanol al 70% ,80%, 96% 2 cambios, etanol absoluto 2 cambios, etanol-Xilol y Xilol al 100%; 1 hora para cada cambio.
2. Posteriormente fueron incluidos en parafina (Paraplast, McCormick Scientific, USA) 1, 2 y 3 con una hora respectivamente.
3. Una vez incluidos los tejidos se colocaron en moldes que fueron rellenos con parafina líquida. Se dejaron solidificar y enfriar a 4°C.
4. Se realizaron cortes de tejido cervical de 5 μ m para las distintas muestras y se fijaron a 45 °C en portaobjetos electrocargados y sin carga (Fisherbrand, USA) por 1 hora.

7.8 Análisis Histopatológico de Tejidos

Todos los tejidos de pulmón se tiñeron con hematoxilina-eosina y se realizó también la tinción especial Giemsa, posteriormente se analizaron por el Dr. Rogelio Hernández Pando (INNCMSZ), patólogo experto en el área quien determinó la existencia de displasias (grados), condiciones preneoplásicas y características histopatológicas del desarrollo tumoral (apoptosis, displasia, inflamación, etc.).

7.9 Inmunohistoquímica .

El procedimiento fue realizado de acuerdo a lo descrito por (Ocadiz-Delgado *et al.*, 2012)

1. Los cortes se desparafinaron a 65 °C por 15 minutos colocándolos consecutivamente en Xilol 1 y Xilol 2 por 15 minutos cada uno, etanol 1 y 2 por 5 minutos respectivamente y se rehidrató con PBS 1X.
2. Para el ensayo de Inmunohistoquímica se utilizó el kit (Bio SB, USA). Para la recuperación de antígeno los cortes se colocaron en buffer de citratos y se mantuvieron a ebullición durante 6 minutos en una olla digital de presión (Mantrra).
3. Se bloqueó la peroxidasa endógena (Bio SB, U.S.A) por 40 minutos en una cámara húmeda y se lavó con PBS 1X.
4. Para bloquear se utilizó solución de albúmina durante 45 minutos en cámara húmeda
5. El anticuerpo primario se dejaron incubando toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
6. Se lavó con PBS 1X y posteriormente a esto se incubó con un anticuerpo secundario por 30 minutos.
7. Se realizó el revelado usando el substrato cromógeno Diaminobenzidina (DAB) con una dilución 1:100.
8. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y se agregó una solución de premontaje y posteriormente se montaron con resina cubriendo con cubreobjetos y se dejaron secar.

7.10 Inmunofluorescencia. El procedimiento fue realizado de acuerdo a lo descrito por (Cortes-Malangón *et al.*, 2013)

1. Los tejidos fueron hidratados con PBS 1x
2. Luego fueron bloqueadas con PBS 1X 0.3% Tritón X-100 y Albúmina Sérica Bovina, 2 horas a 4°C.
3. Fueron lavadas 3 veces con PBS.
4. Se incubó el anticuerpo primario por 1 hora a 37°C. Los anticuerpos fueron anti-RAR β , anti-p16^{INK4a}, anti-Gr-1 o anti-Caspasa 3 Activada.
5. Fueron lavadas 3 veces con PBS.
6. Se incubaron con el anticuerpo secundario: fluorescein isothiocyanate (FITC) o Tetramethylrhodamine (TRITC) por 30 min a temperatura ambiente.
8. Fueron lavadas 3 veces con PBS.
9. Se contrastó con Faloidina-Rodamina (20 min) o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (40 min)
10. Se realizó el montaje con medio de montaje especial Vectashield (Vector, U.S.A.).

Las preparaciones fueron examinadas en microscopio confocal usando escaneo laser (SP2; Leica Microsystems, Germany). Las imágenes capturadas fueron exportadas a Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, U.S.A.).

7.11 Captura de imágenes

Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara digital DFC 290 HD (*Leica Microsystems, USA*) a una amplificación 40 x, 20x y 63 x.

7.12 Extracción de RNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el método de TRIZOL® Reagent (*Invitrogen, USA*) de la siguiente manera:

1. Los tejidos de pulmón congelados se pulverizaron y se les adicionó 1 ml de trizol incubando 5 minutos a 4 ° C
2. Posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIZOL® Reagent se agitó hasta obtener una mezcla homogénea y se incubó durante 15 minutos a 4 ° C seguido de una centrifugación 15 minutos a 1000 rpm.
3. La fase acuosa se pasó a un tubo estéril, añadiendo 0.7 ml de isopropanol mezclando por inversión suave, y se dejó incubar 30 minutos a -20°C seguido de una centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C.
4. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol al 80 %, se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante.

5. La pastilla se dejó secar y se resuspendió con H₂O tratada con DEPC (30 μ l) y se colocó en hielo inmediatamente.

6. La calidad del RNA se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Las bandas del mRNA 5S, 18S y 28S se observaron bajo luz ultravioleta y la cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260 nm.

7.13 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA, se realizó conforme al protocolo First Strand cDNA Synthesis Kit (*Fermentas, USA*) de la siguiente manera:

1. Se agregaron los reactivos en un tubo estéril, libre de nucleasas, todo a 4 ° C.
2. Se incubaron 5 μ l de las muestras de RNA con 5 μ l de H₂O DEPC durante 10 min a una temperatura de 65-70°C para separar las cadenas y se transfirieron inmediatamente a 4°C.
3. La reacción de retrotranscripción se realizó a 37°C durante 2 horas en presencia de 4 μ l buffer de reacción 5X (Tris-HCl pH 8.3 50mM; KCl 75mM; MgCl₂ 3mM), 1 μ l DNTPs, 1 μ l de inhibidor de ribonucleasas, 1 μ l Transcriptasa reversa SuperScript RT. Esta reacción se detuvo incubando las muestras a 70°C durante 15 minutos. El cDNA se conservó a -20 °C.

Con la finalidad de verificar la integridad de los productos de cDNA obtenidos se llevó a cabo una reacción de PCR punto final y se determinó presencia del gen HPRT en cada una de las muestras. El amplificado del gen se visualizó en un gel de agarosa al 2 %, con TAE 1X durante 30 minutos.

7.14 RT qPCR en tiempo Real de RAR β y de p16^{ink4a}.

1. Para medir la expresión de los mRNA de interés se llevó a cabo una RT-qPCR en tiempo real utilizando SYBR Green como agente intercalante. Las secuencias de los primers son las siguientes:

Primers		Secuencias
HPRT	Fw:	5'-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-
	Rev:	3' 5'- CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA-3'
RAR β	Fw:	5'- TTTGACTGTATGGATGTTCTG-3'
	Rev:	5'-TACTCTGTGTCTCGATGGATT-3'
P16 ^{INK4a}	Fw:	5'-AAGCCATTGCGAGAACTT-3'
	Rev:	5'-CAGAGGGCAGAAAGAAA-3'

Tabla 3. Secuencias de los primers usados para medir los niveles de expresión (mRNA) de RAR β y p16^{ink4a}.

2. La RT-qPCR en tiempo real se realizó utilizando el programa 7300 System con las condiciones mostradas en la tabla 4.

3. Una vez finalizado el programa se extrajeron los datos a excel y se realizó el cálculo de acuerdo al método de $2-\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001).

7.15 Extracción de Proteínas

El tejido fue pulverizado por congelación con nitrógeno líquido y les adiciono RIPA con inhibidores de proteinasa (10 μ l de inhibidores por 1 ml de RIPA) se homogenizo la muestra y se incubo por 30 min en hielo con agitación cada 10 min, trascurridos los 30 min se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 10 min y se eliminó el botón ya que es DNA presente en la muestra.

7.16 Western Blot

Se realizó el ensayo de acuerdo a lo reportado (Hernandez-Monge. *et al.*, 2013) . Primero se procedió a realizar un gel de poliacrilamida al 10% en el cuál se cargaron 10 μ g de proteína que fue corrido a 100 V aproximadamente 2h. Posteriormente se equilibró el gel en buffer de corrida 1X, se activó la membrana (PVDF Millipore 9x6cm) 15 segundos en metanol y 2 minutos en H₂O MilliQ. Se recortaron 4 pedazos de papel filtro (9x10 cm) para cada membrana. Se formó el sándwich en la cámara húmeda, colocando 2 pedazos de papel filtro, el gel, la membrana y por último 2 pedazos de papel filtro, todos húmedos con buffer de transferencia (Tris Base 25 Mm, Glicina 190 Mm, Metanol 10%).

Se realizó la transferencia toda la noche a 4°C en agitación constante a voltaje y corriente máxima. Se bloqueó la membrana con leche Svelty 5% en PBS-Tween 20 al 0.1% (1.25 g/25 mL de TBS-Tween 20 al 0.1%) durante 1h a Temperatura Ambiente. Se lavó con PBS-Tween 20 al 0.1% durante 5 minutos y se incubo con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C.

Después de la incubación con el anticuerpo primario (todos los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron incubados en las mismas condiciones descritas anteriormente), posteriormente se retiró y se dieron 3 lavados de 10 minutos y 4 de 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1%.

Posteriormente se incubo la membrana con el anticuerpo secundario (antiratón 1: 10000 en 5% leche Svelty diluida en PBS-Tween 20 al 0.1% y anticonejo 1:15000 en 5% leche Svelty diluida en PBS-Tween 20 al 0.1%) durante 45 minutos-1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 2 lavados de 10 minutos y 4 de 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0.1% y un último lavado de 5 minutos con PBS (los anticuerpos dirigidos contra p53 y α -Actina son anticuerpos conjugados a HRP). Finalmente se preparó una mezcla de luminol: peróxido (1:1) (Super Signal ® West Pico Chemiluminescent Substrate de Thermo) se incubo de 5-7 minutos y se reveló.

7.17 Anticuerpos

ANTICUERPOS	
RARβ (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A
p16^{INK4a}	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A
Cleaved Caspase-3	Cell Signaling, U.S.A
α-actin	Sigma-Aldrich U.S.A
Ki-67	BioSB, U.S.A.
Gr-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A

Tabla 4. Listado de anticuerpos usados para realizar Inmunohistoquímicas, inmunofluorencias y Western Blot.

7.18 Análisis Estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba pareada “t de Student” un valor de $p=0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

8.1 Caracterización genotípica en el cérvix del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$ a los cuatro meses de edad.

La caracterización genotípica de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ se hizo por medio de PCR, (Figura 12A) el gen RAR β silvestre (618pb) se observa tanto en los ratones silvestres C57BL/6J como en los RAR $\beta^{L-/L-}$, mientras que la región del gen recombinado (383pb), sólo se observó en los ratones transgénicos, en los que la pérdida es parcial dado que esta mediada por la expresión del gen de la Cre-recombinasa (300pb) (Figura 12B), dirigida por el promotor de Citomegalovirus, esto para atenuar el efecto letal de la pérdida total del receptor.

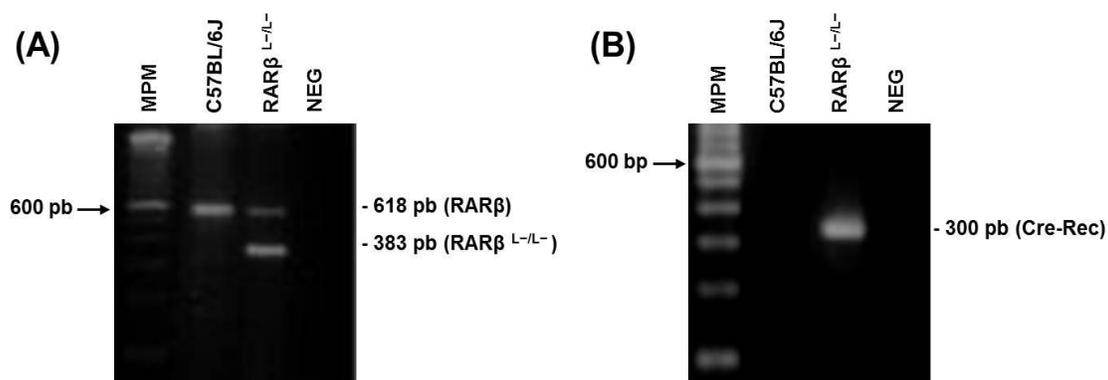


Figura 12. Genotipificación del DNA proveniente de cérvix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ por PCR punto final. A) Los ratones C57BL/6J contienen la forma silvestre de RAR β (618 pb), mientras que los ratones transgénicos Condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ tienen las formas silvestre y recombinante (318 pb) del gen RAR β . B) presencia del gen para la enzima Cre recombinasa en ratones RAR $\beta^{L-/L-}$. Neg: negativo, MPM: Marcador de peso molecular.

8.2 El tratamiento con 17 β -estradiol recupera los niveles de expresión de RAR β .

Se analizó el efecto que tienen los estrógenos sobre la expresión de RAR β por las técnicas de RT-qPCR en tiempo real, las dosis de estrógenos de 833ng/día durante tres meses, incrementan la expresión a nivel de mensajero del RAR β en ratones silvestres como en ratones transgénicos. Se realizó Western Blot para analizar la correlación entre la expresión del mensajero y la proteína, encontrando el mismo efecto del E₂ al incrementar los niveles de expresión a dosis de 833ng/día durante tres meses de estrógenos en ratones C57BL/6 y en los ratones transgénicos (Figura 13).

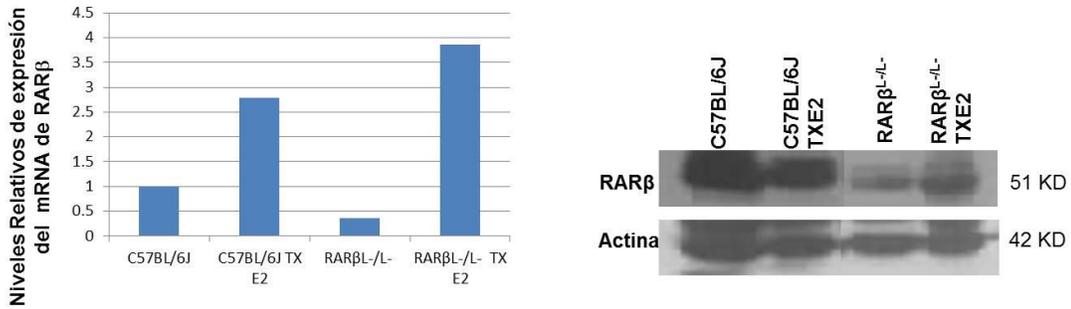


Figura 13. El tratamiento con E₂ incrementa los niveles de expresión de RAR β . Efecto del 17 β -estradiol sobre los niveles expresión del mRNA y de la proteína de RAR β medidos por RTqPCR y Western Blot en cervix de ratones C57BL/6 y RAR β ^{L-/L-}.

Al ser tratados con E₂ observamos un incremento de RAR β en todas las zonas anatómicas analizadas: exocervix, endocervix y vagina. Por medio de inmunohistoquímica (Figura 14), podemos ver que los ratones silvestres presentan alta expresión basal del receptor, al ser tratados con E₂ observamos un incremento en todas las zonas. Como era de esperar en los ratones RAR β ^{L-/L-} la expresión se corrobora baja aproximadamente en un 50%. Al ser tratados con E₂, la expresión se observa recuperada en todas las zonas y presenta expresión alta comparable a la normal.

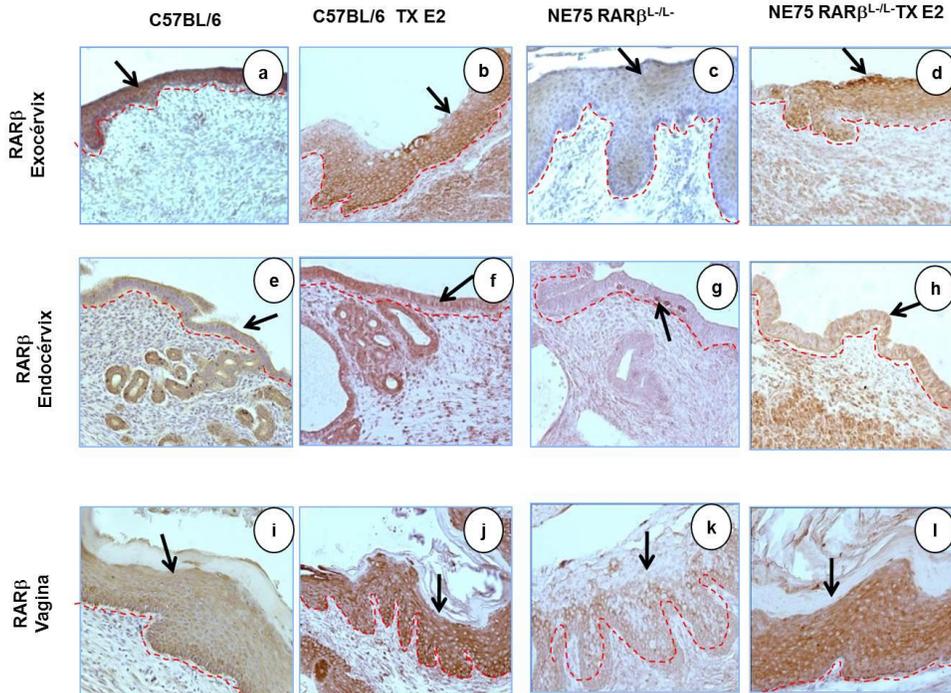


Figura 14. E₂ incrementa los niveles de expresión de la proteína RAR β en el cervix de ratones deficientes de RAR β . Efecto del 17 β -Estradiol sobre la expresión de RAR β en endocervix, exocervix y vagina de ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-/L-}. Inmunohistoquímica: ANTI-RAR β .

8.3 El tratamiento con 17 β -Estradiol revierte las lesiones histopatológicas causadas por la deficiencia de RAR β

Los hallazgos en la histopatología de ratones C57BL/6J y Condicionales RAR $\beta^{L/L-}$ tratados y sin tratar con (E₂) (Figura 15):

C57BL/6J: a) zona de transformación: normal con epitelio bien diferenciado entre epitelio escamoso estratificado y epitelio columnar del canal endocervical; b) glándulas: estrato único de células cilíndricas; c) ectocérvix: epitelio escamoso estratificado, diferenciado, maduro y sin alteraciones y d) vagina: epitelio escamoso estratificado, queratinización normal y sin alteraciones.

C57BL/6J TX E₂ (833ng/día): (e, f, g, h) No hubo cambios histológicos en comparación con los C56BL/6J sin tratamiento. Solo un incremento no significativo en la actividad proliferativa del exocérvix.

RAR $\beta^{L/L-}$: i) zona de transformación: metaplasia epidermoide e hiperproliferación; j) glandulas: hiperproliferación, indiferenciación de células cilíndricas y metaplasia epidermoide; k) ectocérvix: hiperproliferación, indiferenciación, inmaduración de células escamosas y zonas de atrofia; l) vagina: hiperproliferación, papilomatosis, ausencia de queratinización e inmaduración. Presencia de infiltrado inflamatorio agudo y crónico abundante en ectocérvix, endocérvix y vagina.

RAR $\beta^{L/L-}$ TX E₂ (833ng/día): (m, n, o, p) No hubo cambios histopatológicos en comparación con los C57BL/6J, no hay alteraciones patológicas en comparación con los RAR $\beta^{L/L-}$.

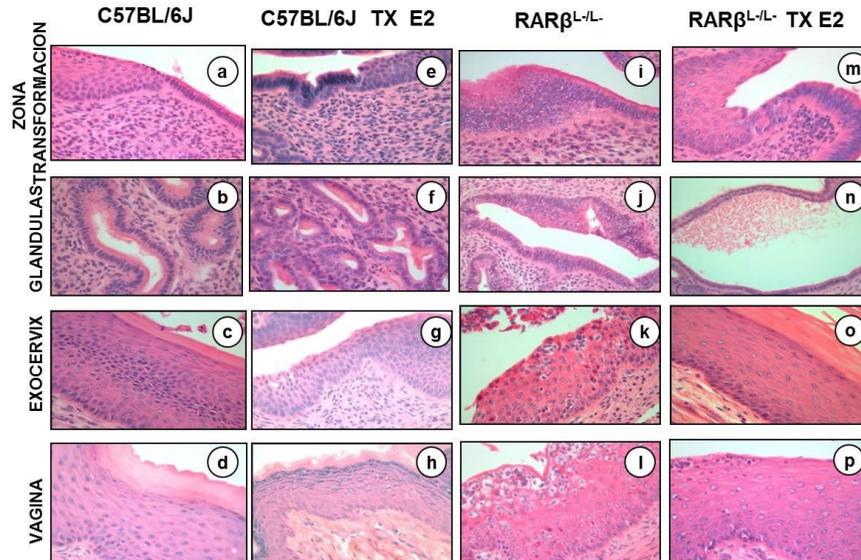


Figura 15: El tratamiento con E2 incrementa los niveles de expresión de RAR β y revierte lesiones premalignas. Histopatología de ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L/L-}$ tratados con 17 β -Estradiol. (Dosis 833ng/día). Tinción Hematoxilina-Eosina. Aumento 40x.

Dado que el efecto que tuvo el E₂ sobre la expresión de RAR β resultó ser positivo al incrementar su expresión y revertir las lesiones causadas por la deficiencia de este receptor, se decidió analizar con mayor detalle los efectos que produce por si solo la disminución del RAR β en ratones de cuatro meses de edad en fase de estro del ciclo estral.

8.4 La eliminación condicional del gen RAR β baja los niveles de expresión del mRNA y de la proteína en cérvix de ratón RAR $\beta^{L/L-}$

La recombinación del gen RAR β mediada por la Cre-recombinasa en los ratones RAR $\beta^{L/L-}$, donde se da la pérdida del dominio de unión a ligando, también fomenta la disminución de la expresión de su mRNA, esto corroborado por RT-PCR punto final, RT-qPCR en Tiempo Real y también la disminución de la proteína analizada por Western Blot en un 50% aproximadamente (figura 16) (n=6, p \leq 0.05).

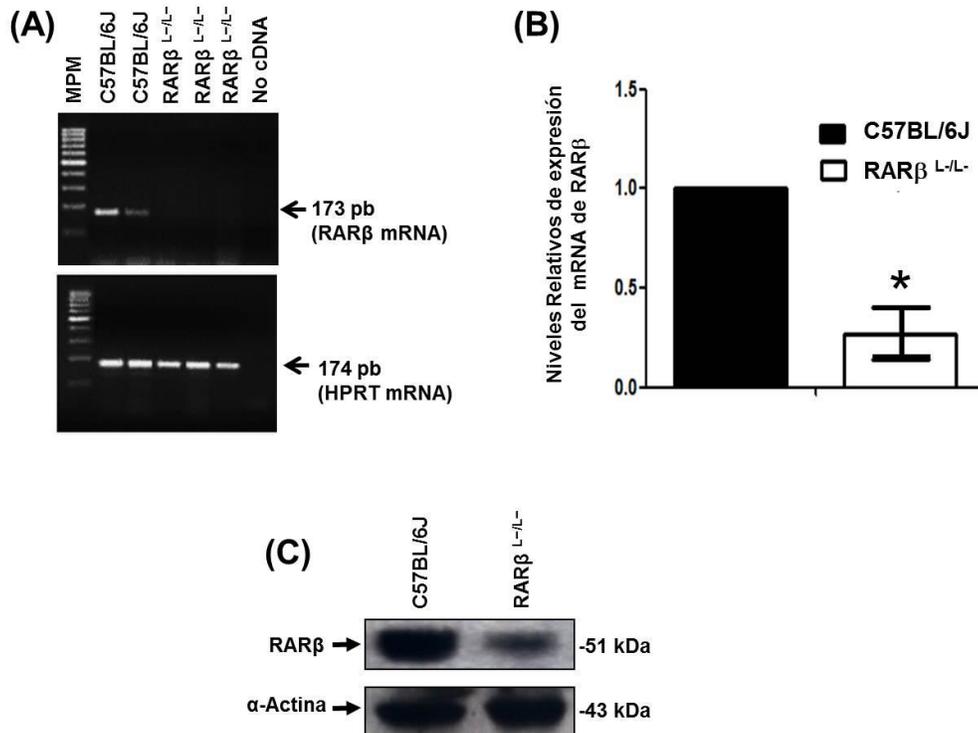


Figura 16. La eliminación condicional del gen RAR β baja los niveles de mRNA y proteína RAR β en cérvix de ratón RAR $\beta^{L/L-}$. A) RT PCR Semi-cuantitativo para la detección del transcrito de RAR β (173 pb) en tejido cervical obtenido de ratones RAR $\beta^{L/L-}$ en fase de Estro del ciclo Estral a los 4 meses de edad. B) Validación de los resultados obtenidos en A por RT q PCR en tiempo Real. Ambos fueron normalizados con HPRT (174 pb) que fue usado como gen control. C) Detección por Western Blot de las proteínas RAR β (51 kDa) y α -Actina (43 kDa) Los datos representan el triplicado de muestras y experimentos independientes. Significancia estadística (p \leq 0.05).

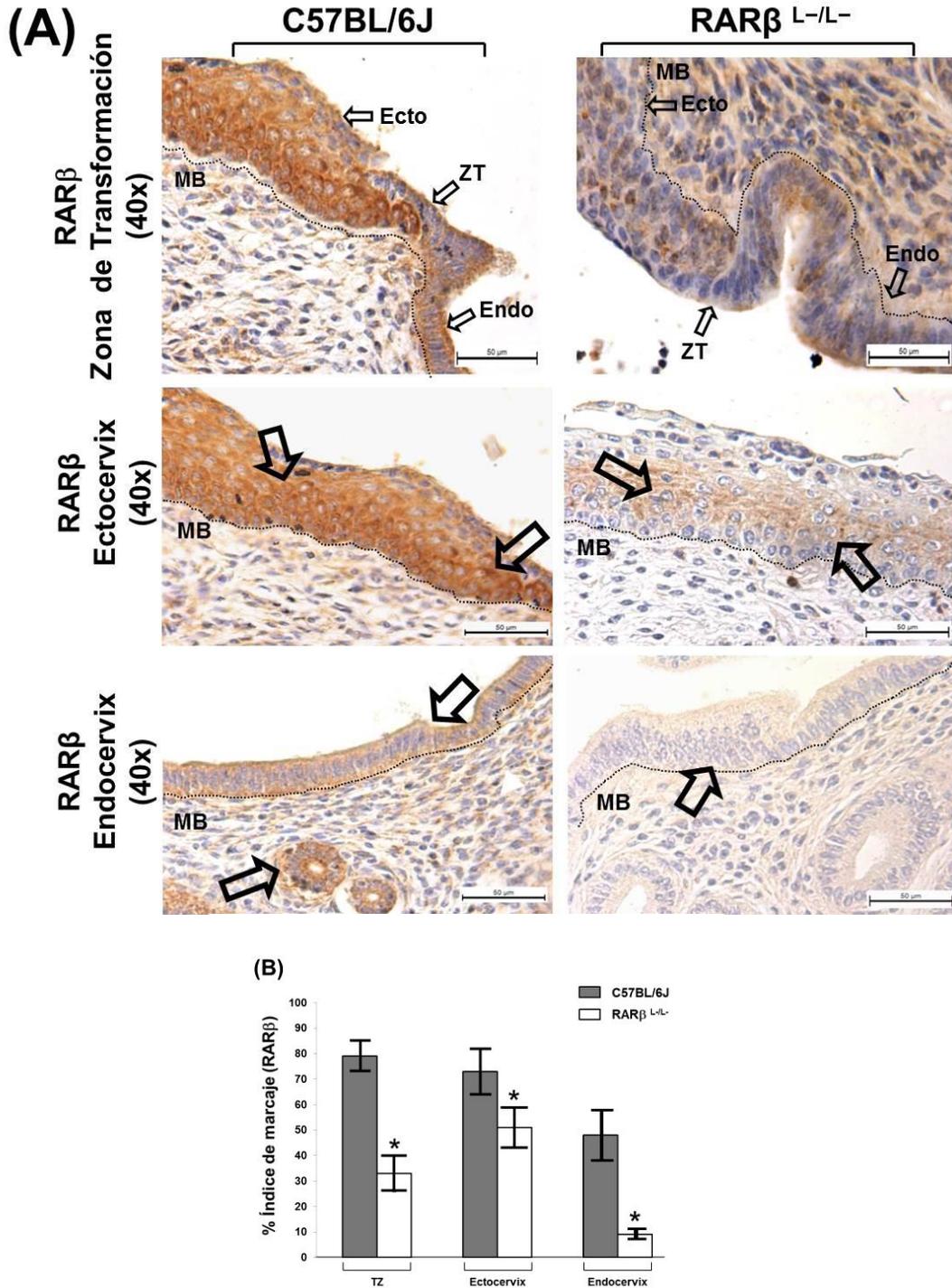


Figura 17. Los niveles de proteína RAR β son disminuidos en la zona de transformación (TZ), ectocérnix (ECTO) y endocérnix (ENDO) en los ratones RAR β ^{L-/L-}. Detección por Inmunohistoquímica de RAR β en ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-/L-} (flechas huecas) B) Análisis digital de los niveles de RAR β (porcentaje del índice de marcaje detectado de RAR β) en cérvix de ratón. Línea punteada separa el tejido epitelial del estroma. MB: Membrana Basal. * Significancia Estadística (p \leq 0.05).

Similares resultados fueron obtenidos por medio de inmunohistoquímica para la proteína RAR β en el epitelio de los ratones C57BL/6J o los deficientes del receptor, durante la fase de estro del ciclo estral (Figura 17A). Los niveles de expresión en cada una de las zonas anatómicas de importancia para su estudio como son la Zona de transformación, endocérnix, ectocérnix y glándulas endocervicales, en el cérnix del ratón C57BL/6J fueron basales. Es remarcable que la proteína RAR β es más abundante en algunas áreas que en otras, observándose un efecto de expresión en mosaico. Interessantemente en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ la proteína RAR β fue expresada en bajos niveles en el epitelio escamoso estratificado y en los focos de metaplasia escamosa y no estuvo presente en el epitelio simple columnar (Figura 17B).

8.5 Cambios Histológicos que hacen evidente la Displasia moderada en cérnix de ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$

Con el fin de determinar los posibles cambios histopatológicos asociados con la expresión deficiente de RAR β , analizamos tejidos obtenidos de ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ hembras jóvenes (4 meses de edad) en fase estro del ciclo estral. Tinción de H&E seguida de un examen histológico de las secciones cervicales del ratón C57BL/6J mostró un cambio brusco del epitelio simple columnar a epitelio escamoso estratificado que es denominado Zona de Transformación (Figura 18A). El epitelio ectocervical del ratón C57BL/6J (Figura 18B) es normalmente escamoso estratificado y presenta queratinización en la fase de estro del ciclo estral.

De manera interasante, todos los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ muestran un leve a moderado desorden en el crecimiento, la orientación arquitectónica, con células grandes pleiomórficas que muestran un aumento de la relación núcleo-citoplasma, con algunas figuras de mitosis, situados en las capas basales del epitelio y medianas que se corresponden con displasia leve (12/12 ratones muestran estas alteraciones, Figuras 18C-I). En la figura 18C y 18D se observan áreas de epitelio escamoso inmaduro ligado al endocérnix y que corresponde a metaplasia escamosa temprana.

Vacuolas intraepiteliales, constituida esencialmente de infiltrado inflamatorio mixto (crónico-agudo) con presencia principalmente de neutrófilos y algunos linfocitos, además de figuras de cromatina extendida en las capas basales y suprabasales del epitelio escamoso ectocervical (Figuras 18E y F). Infiltrado inflamatorio leve, esencialmente constituido por neutrófilos, fue visto en la superficie del epitelio y en el interior de él, en el tejido conectivo subepitelial y en el lumen de las glándulas endocervicales, estas con ductos revestidos de epitelio metaplásico escamoso (Figuras 18G, H e I).

Estas alteraciones histológicas sugieren que la deficiencia de RAR β está asociada a la generación temprana de lesiones cervicales precancerosas.

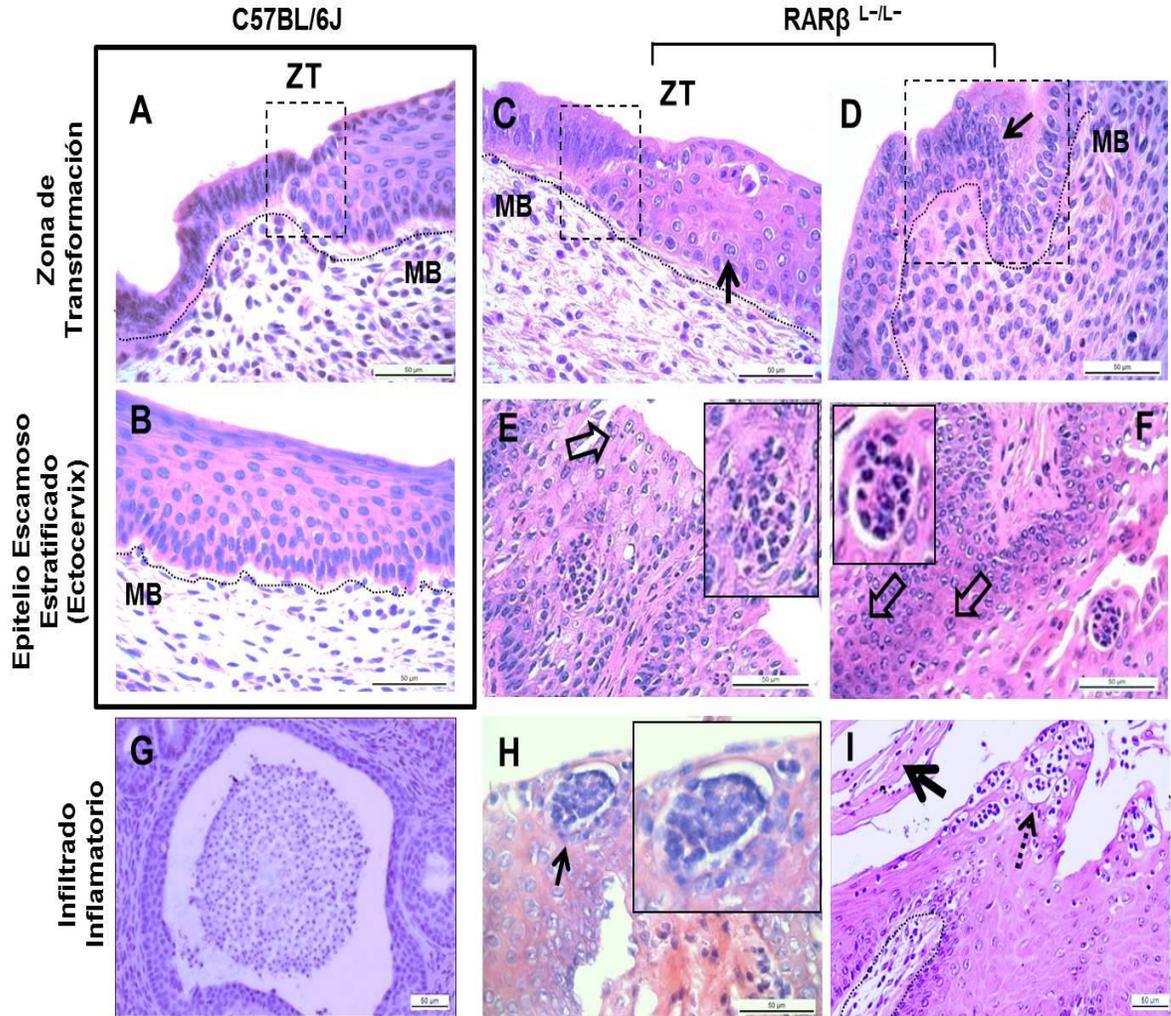


Figura 18. Desarrollo de Displasia en el epitelio cervical tras la ruptura del gen RAR β . Tejido cervical obtenido de ratones a los 4 meses de edad, en fase de estro. A) Zona de Transformación normal del ratón C57BL/6J, incluye epitelio simple columnar y la transición al epitelio escamoso señalado por el rectángulo punteado. B) Ectocervix del ratón C57BL/6J, presenta epitelio escamoso estratificado normal. C) Zona de transformación del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$ se observa en el rectángulo punteado metaplasia epidermoide D) Endocervix con metaplasia epidermoide temprana (flecha y recuadro punteado). E) y F) muestran ectocervix con células epiteliales con núcleos de cromatina extendida (flechas) en el estrato superficial y en la parte intermedia (flechas huecas) esto corresponde a cambios displásicos. Adicionalmente podemos observar infiltrado inflamatorio mixto (neutrófilos y linfocitos: insets). E) el epitelio escamoso presenta ensanchamiento de sus estratos. F) Células inmaduras en el estrato superficial e intermedio del epitelio ectocervical (flechas). G) Ducto distendidos de las glándulas endocervicales (quiste de Naboth), delineado por epitelio metaplásico y numerosos neutrófilos y macrófagos en el lumen (flecha). H) Ectocervix con vacuolas largas intraepiteliales ocupadas por células inflamatorias (tinción de Giemsa, inset: aumento 100x). I) Vagina del ratón condicional, presenta desprendimiento de queratina (flechas) y numerosas vacuolas o quistes ocupados por células inflamatorias (flecha punteada). Magnificación: A-D 63 x; E, F y H 40x; G e I 20x. BM: Membrana Basal. Tinción Hematoxilina-Eosina (excepto H, tinción de Giemsa).

8.6 Incremento de infiltrado inflamatorio en el cérvix y la vagina de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$

Con el fin de saber si los cambios displásicos observados implican la respuesta inmune en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ realizamos ensayo de Inmunofluorescencia (IF) para Gr-1 con el fin de caracterizar el infiltrado inflamatorio. El antígeno Gr-1 de ratón es un marcador de diferenciación mieloide también conocido como Ly-6G; su expresión es restringida a los monocitos dentro de la médula ósea y a los neutrófilos en los órganos periféricos (Egan *et al.*, 2008). Primero inferimos la presencia de estas células mediante la tinción con Giemsa Figura 18H y la figura 19B y 19C muestra inmunotinción positiva para Gr-1 que demuestra la presencia de neutrófilos ubicados en grandes vacuolas dentro del epitelio escamoso del ectocérvix y vagina del ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$, mientras que en los ratones C57BL/6J es completamente negativo (Figura 19A). Además de los neutrófilos que eran las células predominantes, algunos linfocitos también se observaron en este infiltrado observado en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$. Estas observaciones sugieren que la deficiencia del receptor RAR β podría estar asociada con la inflamación aguda y crónica.

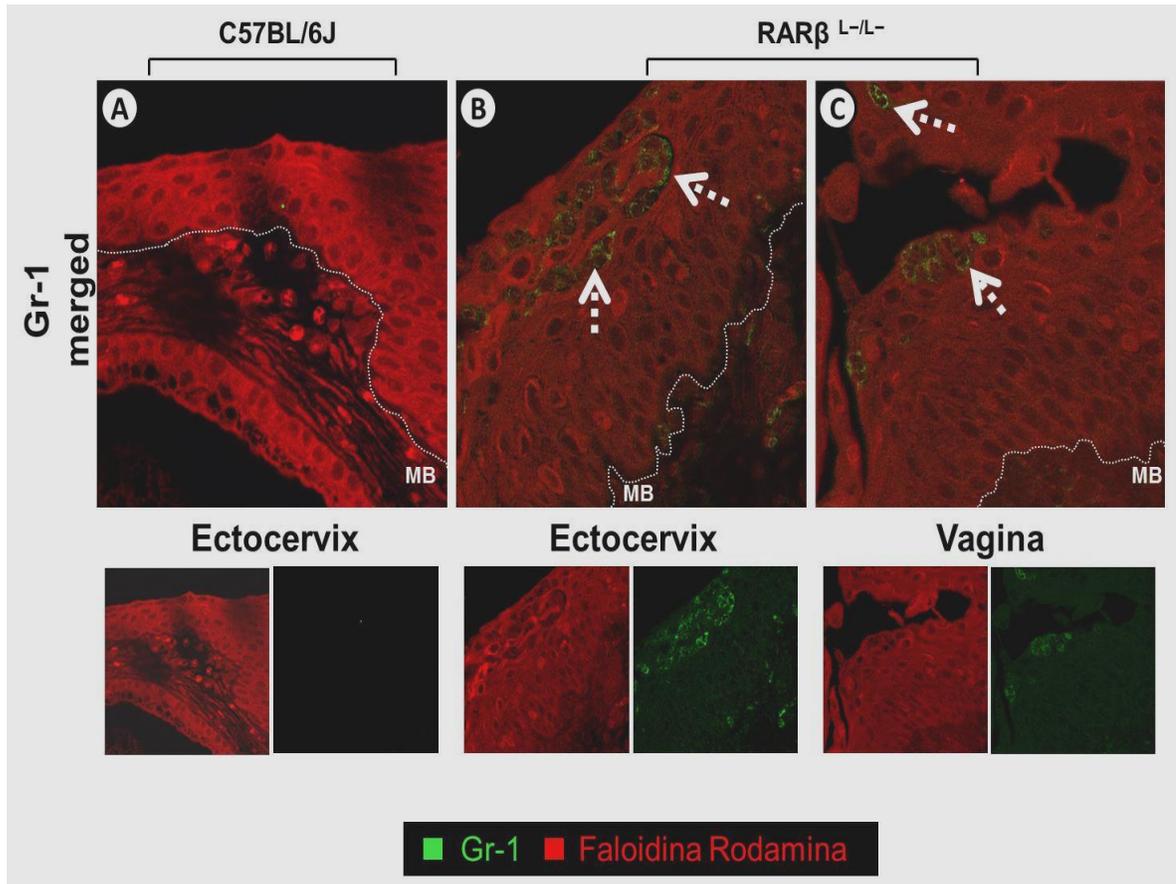


Figura 19. Células inflamatorias (Gr-1+) detectadas por Inmunofluorescencia en el ectocérvix y vagina de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$. A) No se observan células inflamatorias en el ratón silvestre. En contraste, Gr-1 positivo para neutrófilos localizados en el epitelio escamoso estratificado del Ectocérvix B) y la Vagina C) del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$. Faloidina Rodamina fue usada para contra-tinción. Magnificación 60X. Línea punteada: Membrana basal (BM). Flechas punteadas: señal Gr-1.

8.7. La expresión de p16^{ink4a} es disminuida en el cérvix del ratón condicional RAR $\beta^{L/L-}$

Se utilizó RT-qPCR para determinar los niveles de expresión del mRNA de p16^{ink4a}, el cual codifica para una proteína supresora de tumores considerada actualmente como un biomarcador de CC (Bergeron *et al*, 2010; Juric *et al.*, 2010). Se realizó por triplicado cada muestra (n=6). Los niveles de mRNA de p16^{ink4a} fueron inferiores en los ratones RAR $\beta^{L/L-}$ de cuatro meses de edad en comparación con los ratones silvestres C57BL/6J (Figura 20A). El análisis de la proteína se realizó por Western Blot y mostró una reducción del 50% de la proteína p16^{ink4a}, en los ratones RAR $\beta^{L/L-}$ en comparación con los C57BL/6J (Figura 20B).

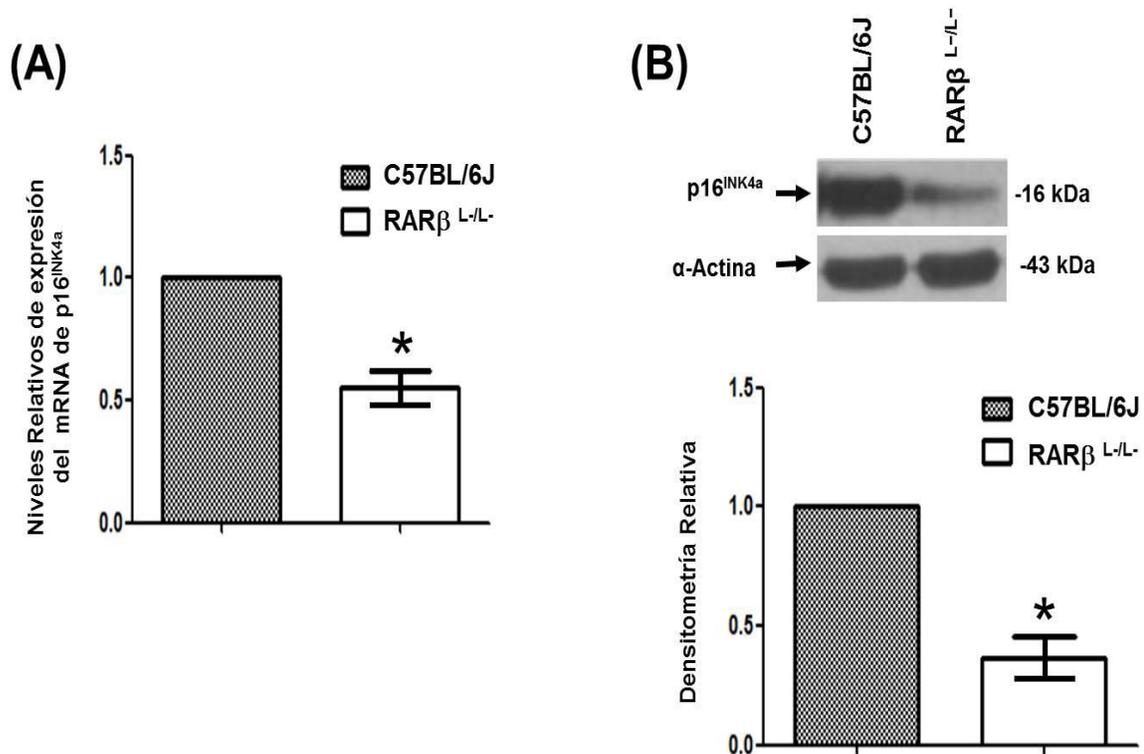


Figura 20. Disminución en la expresión de RAR β induce baja en la expresión del mRNA y proteína de p16^{INK4a} en los ratones condicionales RAR $\beta^{L/L-}$. A) Niveles relativos de expresión del mRNA de p16^{INK4a}, el control usado para la normalización fue HPRT. B) Western Blot y densitometría de p16^{INK4a} (16 kDa).

Por lo tanto para comprobar la co-expresión de RAR β y p16^{INK4a}, utilizamos microscopia confocal usando doble marcaje por medio de Inmunofluorescencia. Observamos la TZ (Figura 20C), el ectocérvix (Figura 20D) y vagina (Figura 20E) del ratón C57BL/6J donde podemos comparar los niveles basales tanto de la proteína RAR β y la proteína p16^{INK4a}.

Como se mostró anteriormente en la Figura 16, se detectó la disminución en la expresión de la proteína RAR β en el ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$ por lo tanto muestras similares fueron ocupadas para la detección de la proteína p16^{INK4a}. Lo que se observó es que de la misma manera que disminuyo RAR β en ectocérvix y vagina, p16^{INK4a} fue altamente disminuida (Figuras 20G y 20H). Curiosamente, no observamos cambios significativos en la zona de transformación (TZ, Figura 20H).

Se puede destacar que la disminución en la expresión de p16^{INK4a} fue similar a la observada para la expresión de RAR β . Estos resultados sugieren que RAR β podría ser un importante regulador positivo de la expresión génica de p16^{INK4a} en el epitelio de los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$.

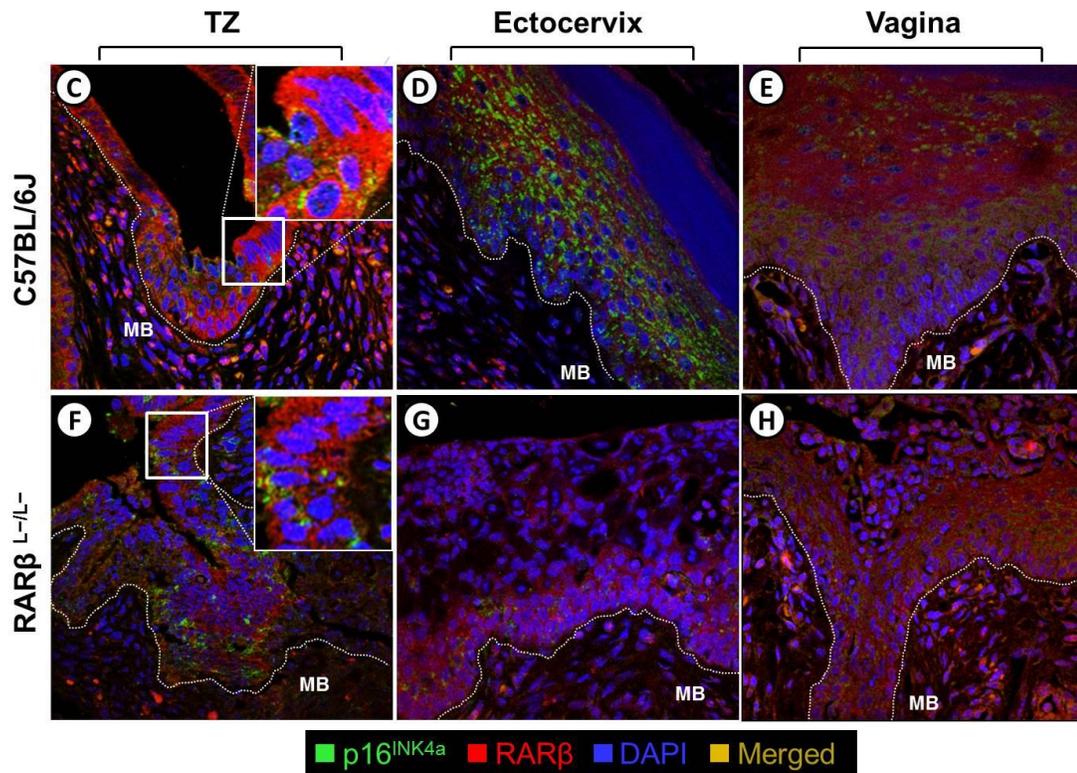


Figura 20C-H. Disminución en la expresión de RAR β induce baja en la expresión del mRNA y proteína de p16^{INK4a}, en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$. C-H) Inmunofluorescencia de p16^{INK4a} y RAR β proteína supresoras de tumor en el cérvix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ de 4 meses de edad. Señal verde: p16^{INK4a}, señal roja RAR β , contra-tinción con DAPI en azul. Señal amarillo-naranja: Merged. Magnificación 60x; insets 200x; línea punteada: membrana basal. * Significancia Estadística ($p \leq 0.05$)

8.8 Incremento en los niveles de la proliferación celular (PCNA, Ki-67) en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$.

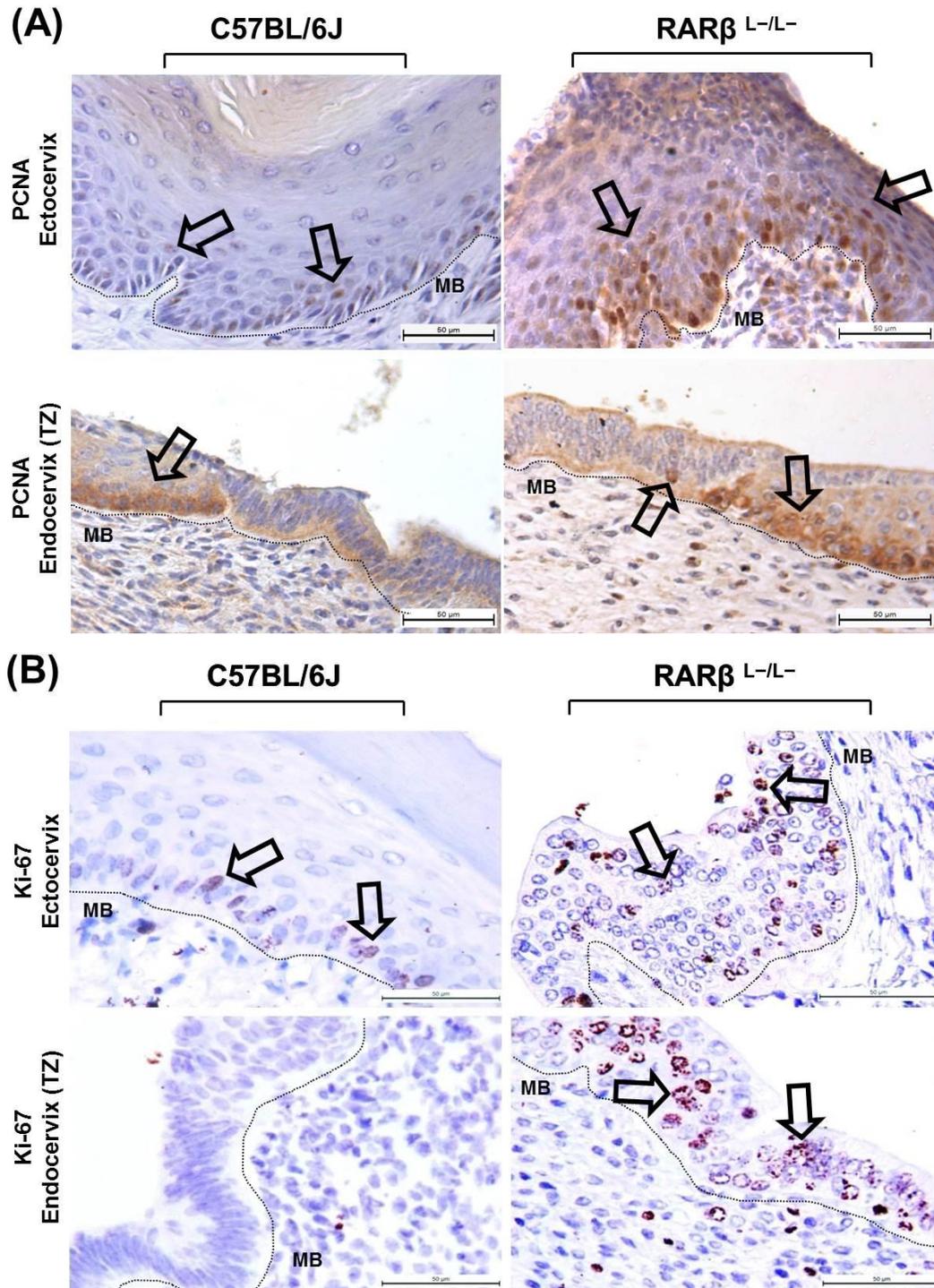


Figura 21. Incremento en la proliferación celular en el cérvix del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$. A) Detección por inmunohistoquímica de PCNA y B) Ki-67 en el epitelio cervical de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ (flechas). Contraste: Hematoxilina-Eosina. Línea punteada: membrana basal. Magnificación 40x.

La expresión tanto del Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (PCNA) y de Ki-67, indican los niveles de proliferación celular. El estudio inmunohistoquímico del cérvix mostró que los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ presentan una mayor expresión de PCNA y Ki-67 y además distribuida en la capa basal y suprabasal del epitelio cervical en comparación con los ratones C57BL/6J, confirmando la displasia (Figura 21A y 21B). Estos resultados fueron confirmados por Western Blot, usando el mismo anticuerpo para PCNA. En ambos ensayos se determinó que la proliferación fue significativamente mayor en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 21C-D).

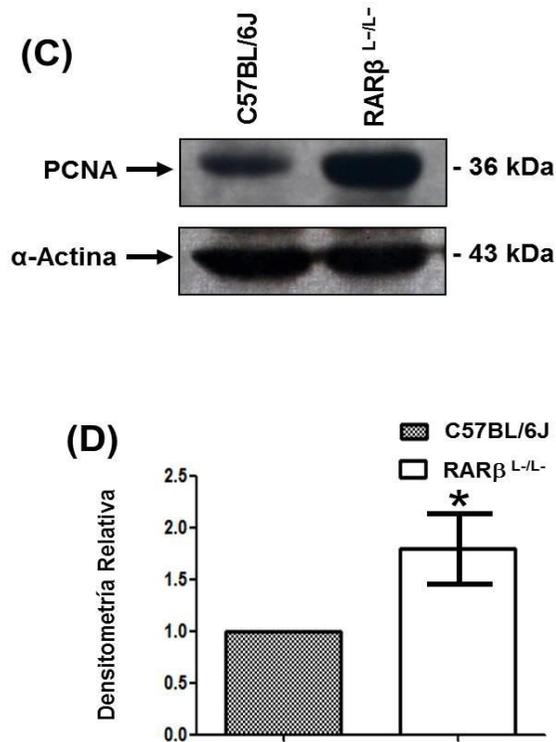


Figura 21. Incremento en la proliferación celular en el cérvix del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$. C) Proteína PCNA detectada mediante Western Blot en tejido cervical. D) Densitometría de la expresión de la proteína RAR β . Banda de 36 kDa corresponde a PCNA. Como gen normalizador se uso α -Actina 43 kDa. Significancia Estadística ($p \leq 0.05$).

8.9 Inhibición de la apoptosis en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$

Con el fin de determinar si la deficiencia de RAR β impacta sobre la apoptosis en tejido cervical, se realizó la detección de Caspasa 3 Activada usando el ensayo de Inmunofluorescencia (Figura 22A y 22B) y esto se corroboró por Western Blot (Figura 22C y D), mostrando una disminución en Caspasa 3 Activada en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ (aproximadamente un 50%). Lo que sugiere una reducción en los niveles de apoptosis. Por lo tanto la disminución de la expresión de RAR β en el epitelio cervical a los 4 meses de edad en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ se asocia con la proliferación celular alta y en coexistencia de disminución de la apoptosis.

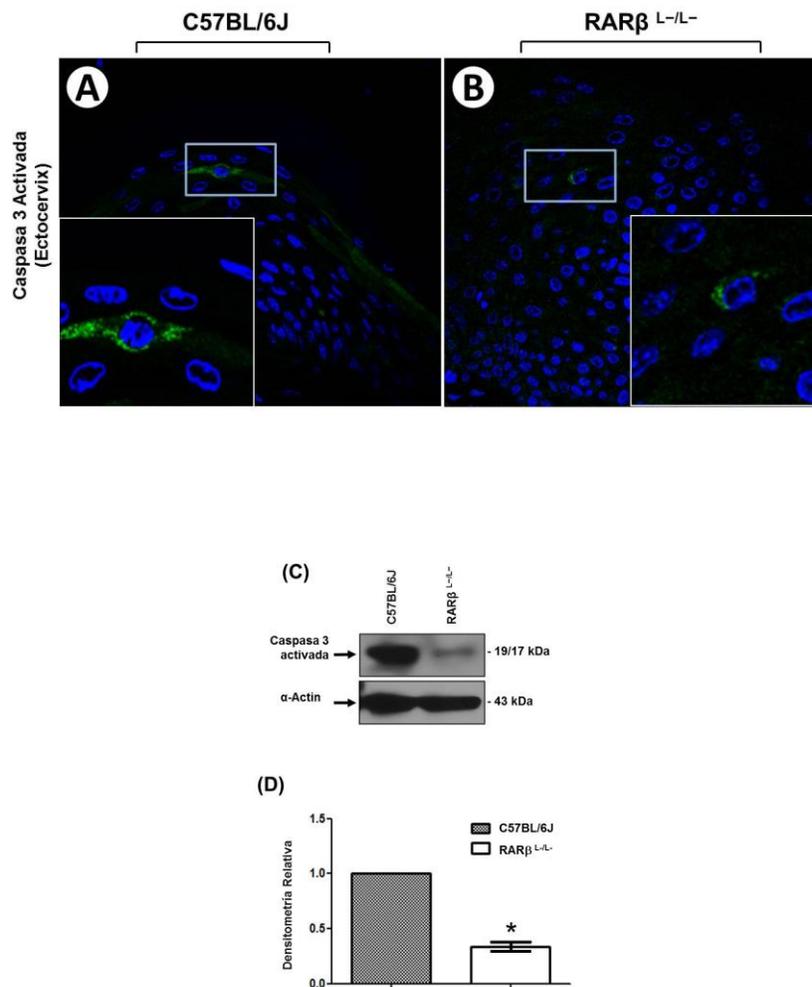


Figura 22. Decremento en los niveles de apoptosis en el cérvix del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$. En tejido Cervical obtenido de ratones A) C57BL/6J y B) RAR $\beta^{L-/L-}$ de 4 meses de edad se realizó Inmunofluorescencia usando el anticuerpo para Caspasa 3 Activada (verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). C) Western Blot de extractos totales del tejido cervical detectando Caspasa 3 Activada (17 kDa). Significancia estadística (p \leq 0.05)

9. DISCUSIÓN

La infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) es el principal factor etiológico en cáncer cervical (CC), ya que está presente en más del 95% de los tumores (Li., *et al.* 2011; Zur H 2009). Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de las mujeres infectadas con HR-HPV desarrollan CC. Lo que indica que otros cofactores están implicados en la carcinogénesis cervical. (Gariglio., *et al.*, 2009).

El sistema inmune, los factores ambientales y dietéticos también están relacionados con el desarrollo de neoplasia cervical; factores biológicos como la deficiencia de vitamina A y la disminución de sus receptores como el RAR β y el uso prolongado hormonas esteroideas como E₂ (Ivanova., *et al.* 2002; Riley., *et al.* 2003) también pueden representar mayor riesgo de carcinoma cervical.

Hemos determinado que la disminución en la expresión de todas las isoformas de RAR β , lleva al aumento de infiltrado inflamatorio mixto (agudo-crónico) y a la disminución en los niveles de mensajero y proteína de p16^{INK4a}, lo que sugiere que la baja expresión de ambos (RAR β y de p16^{INK4a}) puede estar implicada en las etapas tempranas del desarrollo de cáncer cervical.

Sin embargo aunque el bajo nivel de expresión de RAR β juega un papel de gran importancia en el desarrollo de lesiones premalignas por sí solo no desarrolla cáncer como tal, por lo cual nosotros decidimos analizar otro factor de riesgo de gran importancia como son los estrógenos; dado que estos son un regulador principal de la fisiología vaginal y cervical, la administración del 17 β -Estradiol (E₂) mantiene a ratones en la fase del ciclo estral conocida como estró (Lacey., *et al.* 2000). Las evidencias indican que la división celular estimulada por E₂ está asociada con la inducción de una variedad de factores de crecimiento, E₂ a dosis bajas de 1 mg por día se utiliza como terapia hormonal en mujeres con problemas de privación hormonal ovárica: síndrome climatérico y atrofia vaginal (Peeyananjarassi K y Baber R. 2005). En este trabajo los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ fueron tratados durante tres meses con E₂ a dosis de 833ng/día, siendo sincronizados en las fases del ciclo estral estró y proestro, esto para conocer el efecto de los estrógenos en el tracto reproductor femenino y su asociación con la deficiencia de RAR β .

Se sabe que en ratones transgénicos (K14-HPV 16) que expresan los oncogenes virales en las células epiteliales escamosas basales, el tratamiento crónico con E₂ (0.1 mg/kg de peso 833ng/día) favorece la aparición de cáncer escamoso, principalmente en la vagina y el ectocérvix. El efecto depende de la dosis de hormona administrada. Las dosis menores (0.05 mg por kg-833ng/día) favorecen la aparición de células neoplásicas en el sitio, que se restringe a la “zona de transformación” cervical (Arbeit., *et al.* 1996; Riley., *et al.* 2003; Brake T. y Lambert P. 2005).

Los resultados muestran que el epitelio cervical y vaginal de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ tratados con E₂ no presenta alteraciones ni cambios histológicos en comparación con los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ que no fueron tratados (Figura 15) el fenotipo histológico es parecido a los observado en los ratones C57BL/6J, los cuales presentan histología normal.

Nuestros resultados indican que la dosis de estrógeno (833 ng/día) también incrementa la expresión tanto de mensajero del RAR β como de proteína en ratones silvestres y en ratones transgénicos (Figura 13). Se realizó inmunohistoquímica para analizar la correlación entre la expresión del mensajero y la proteína de RAR β en las zonas anatómica de interés, encontrando el mismo efecto al incrementar los niveles de expresión a dosis de 833 ng/día estrógenos en ratones C57BL/6 y en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 14). Esto sugiere que la reversión del fenotipo premaligno que se observó en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ está siendo generada por la sobreexpresión de RAR β inducido por el tratamiento con estrógenos.

La exposición crónica a estrógeno es un factor clave en el desarrollo de esta enfermedad principalmente en la presencia de HR-HPV; mientras que la deficiencia de retinoides y de sus receptores (RAR β) genera lesiones consideradas como premalignas en el cérvix de ratones RAR $\beta^{L-/L-}$. La actividad sinérgica de los estrógenos y la inhibición en la expresión de RAR β (o el bajo consumo de retinoides) podría ser dosis-dependiente, ya que el aumento en los niveles de estrógeno revierte estas lesiones.

Vale la pena señalar que incluso en ausencia de la infección de HR-HPV, la pérdida parcial de RAR β fue suficiente para generar varios componentes característicos del proceso carcinogénico en etapas tempranas, incluyendo la inducción de las células de reserva, metaplasia escamosa temprana, hiperproliferación, la inhibición de la diferenciación epitelial, así como la inducción insuficiente de la apoptosis y un incremento en el infiltrado inflamatorio. Además, se observó un aumento en el número de quistes de Naboth como resultado de la inflamación y la formación de epitelio metaplásico que podría estar asociado con una amplia inflamación aguda y crónica. Todas estas características son componentes del proceso carcinogénico que conduce a la displasia moderada (Hanahan y Weinberg, 2011).

Esto concuerda con estudios anteriores que han demostrado en líneas celulares derivadas de diversos carcinomas que el nivel de mRNA de RAR β 2 (una de las cuatro isoformas conocidas de este gen) es reducido o indetectable (Caliaro *et al.*, 1994; Narayan *et al.*, 2003; Swisshelm *et al.*, 1994). La reducción de RAR β 2 también se ha observado en células escamosas de CC (Comerci *et al.*, 1997), así como en una dieta deficiente de vitamina A (Darwiche *et al.*, 1994). Informes posteriores concluyeron que metilación de la región 5' del gen RAR β 2 puede contribuir con el silenciamientos del gen y esto podría ser un evento temprano e importante en la CC (Ivanova *et al.*, 2002; Narayan *et al.*, 2003). De acuerdo con reportes anteriores que indican que el promotor de Citomegalovirus (CMV) es activo en el útero (Furth *et al.*, 1991; Baskar *et al.*, 1996), se observó la recombinación dependiente de la Cre eficiente pero no total del gen RAR β en el cérvix del ratón (Figura 1). Afortunadamente la variabilidad en la actividad del promotor de CMV y la pérdida parcial del gen RAR β en diferentes órganos no es letal (Ghyselinck *et al.*, 1997). Consistente con la recombinación parcial del gen RAR β , los niveles de mRNA y proteína de RAR β se redujeron hasta un 60% en el cérvix del ratón RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 16). Por lo tanto, los niveles de expresión de RAR β fueron disminuidos en el endocérvix (endo), ectocérvix (ecto) y zona de transformación (TZ) de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 17). Estas observaciones pueden estar relacionadas con lo reportado previamente en epitelio escamoso estratificado, la zona de transformación y el epitelio simple columnar que

expresan bajos niveles de transcripción de RAR β cuando son sometidos a una dieta deficiente de vitamina A (Darwiche *et al.*, 1994), lo que sugiere una alta dependencia de la expresión de RAR β para la homeostasis del tejido cervical.

La metaplasia escamosa marca la sustitución de epitelio simple cilíndrico por epitelio escamoso estratificado. La metaplasia es el blanco común para la enfermedad neoplásica (Ferency 1982; Ferency and Riehen, 1982); el cérvix ofrece características únicas que favorecen el desarrollo de lesiones neoplásicas, porque en condiciones normales presenta epitelio escamoso estratificado (ectocérvix) y epitelio simple columnar incluyendo glándulas endocervicales (endocérvix) (Darwiche *et al.*, 1994), que al unirse forma la denominada zona de transformación. En esta unión por lo general es donde se lleva a cabo el proceso neoplásico, desde la formación de metaplasia escamosa hasta lesiones pre-neoplásicas (Fluhmann *et al.*, 1992). La aparición de células sub-cilíndricas basales (células de reserva) bajo una dieta deficiente de vitamina A, que normalmente no están presentes en la unión epitelial o zona de transformación, precede a la metaplasia escamosa y el desarrollo de neoplasia. Por lo tanto estas células se han implicado en la transformación maligna en etapas tempranas (Darwiche *et al.*, 1993). En concordancia con estas observaciones (inducción de células de reserva), se ha descrito un modelo de ratón que induce ambos tipos celulares, células de reserva y metaplasia escamosa del cérvix bajo una dieta libre de retinoides (Darwiche *et al.*, 1994).

Nuestros datos sugieren que durante el proceso fisiológico normal de la maduración cervical, la deficiencia en la expresión de RAR β acelera la formación de metaplasia escamosa cervical y la aparición de células de reserva focal y discontinua en la zona de transformación, así como en el epitelio endocervical y las glándulas endocervicales de los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 18). Por lo tanto, los niveles reducidos de RAR β en el tejido cervical podrían promover el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas, bloqueando la diferenciación de las células epiteliales. La infección por HR-HPV ocurre principalmente en la zona de transformación y esta zona también es la región del cérvix más sensible a estrógenos y retinoides (Riley *et al.*, 2003) y precisamente donde RAR β se redujo su transcripción por deficiencia de vitamina A. Nuestros resultados sustentan la hipótesis de que la disminución de la expresión de RAR β en esta zona es un primer paso importante para el desarrollo de CC, ya que puede causar aumento en los niveles de proliferación celular, aumentando la vulnerabilidad de las células a ser infectadas y posterior desarrollo de neoplasia.

Las células inflamatorias se observan con frecuencia en los tumores sólidos y los procesos de inflamación están bien establecidos como factor de riesgo importante en la patogénesis del cáncer (Egan *et al.*, 2008). Las investigaciones sobre la infiltración tanto intra y peritumoral de las células inmunes han dado lugar a una mejor comprensión y manejo del CC, sobre todo en el reconocimiento de nuevos marcadores predictivos. Como ejemplo, el marcador de superficie celular Gr-1 es un epítipo expresado en neutrófilos, monocitos inflamatorios y células dendríticas plasmacitoides (Egan *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2001).

A pesar de que ignoramos el mecanismo relacionado con la infiltración de células inmunes en el epitelio del cérvix del ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$, este fue confirmado por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo contra Gr-1 (Figura 19). En este sentido,

varias observaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que bajo condiciones deficientes de vitamina A el número de neutrófilos aumenta, mientras que la diferenciación de las células mieloides disminuye (Duriancik *et al.* 2010; Hengesbach and Hoag, 2004; Kim, 2011). La elevación de la población de neutrófilos que se reporta, puede ser importante, ya que el reclutamiento de estas células se asocia comúnmente con el desarrollo de inflamación en mucosas (Farooq *et al.*, 2009; Godínez *et al.*, 2009); además, los neutrófilos son una fuente bien documentada de citosinas inflamatorias, tal como IL-6 (Wright. *et al.*, 2010).

Por otra parte, la deficiencia de vitamina A puede inducir el reemplazamiento de células epiteliales productoras de moco por células epiteliales atípicas no funcionales, disminuyendo la secreción de moco y la integridad de las células epiteliales, incluyendo la pérdida de la barrera de la mucosa y la disminución de células “Natural Killer” (Stephensen, 2001). Al respecto un estudio previo realizado en nuestro grupo reportó la reducción del número de CD en el bazo del ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$, así como la disminución de la expresión del receptor 2 Toll-like (TLR-2) (Serafin., *et al.* 2012). Nuestros resultados plantean la posibilidad de que la baja en la expresión de RAR β en estos animales podría aumentar el infiltrado inflamatorio mixto (agudo-crónico) y afectar la diferenciación de las células mieloides que a su vez, pueden jugar un papel importante en la transformación celular.

En cuanto a la disminución en la expresión de p16^{INK4a} que observamos en el tejido cervical de los ratones condicionales (Figura 20) a los cuatro meses de edad, es posible que la disminución de RAR β pudiera inducir reprogramación epigenética del promotor de p16^{INK4a} (McLaughlin- Drubin *et al.*, 2008). Reportes previos mostraron que el Ácido Retinoico All-trans (ATRA) induce hipometilación del promotor de p16^{INK4a} y de p21^{WAF1} a través de la regulación a la baja de DNA metil-transferasas como la 1, 3a y 3b, lo que facilita la unión de Ets 1/ 2 al promotor de p16^{INK4a} y p53 vinculada a p21^{WAF1}, lo que resulta en su sobreexpresión y la posterior inducción de la senescencia celular en la línea celular HepG2 (Lim *et al.*, 2011). Estos efectos fueron mediados por RAR β 2 cuyo promotor fue hipometilado en presencia de ATRA (Lim *et al.*, 2011). La inactivación de la expresión del gen p16^{INK4a} por mecanismos epigenéticos o por alteraciones genéticas es uno de los primeros pasos en distintos tipos de cáncer (Belinsky *et al.*, 1998;.. Holst *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 1997).

Estudios previos han reportado un intervalo de frecuencia de 19-61% de metilación del promotor de p16^{INK4a} en CC (Nehls *et al.*, 2008;.. Samarawardana *et al.*, 2010). Sin embargo, p16^{INK4a} se expresa fuertemente en más del 90% de los CC y lesiones precancerosas; esto es parcialmente mediado por la desrepresión epigenética inducida por la oncoproteína E7 a través de la KDM6B desmetilasa específica de H3K27, que es crítica para la supervivencia celular (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se encontró que la disminución de la expresión de RAR β inhibe los niveles de apoptosis en el cérvix de los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 22); esto podría cooperar con un aumento de la proliferación celular (Figura 21), infiltrado inflamatorio mixto y la disminución de los niveles de la proteína p16^{INK4a}, en el desarrollo de CC.

Numerosos reportes sugieren que el AR puede inducir apoptosis mediante el ligando de muerte y sus receptores. Por ejemplo, se sabe que el AR incrementa la expresión de las caspasas 3, 6, 7 y 9 en queratinocitos (Mrass *et al.*, 2004). Del mismo modo, la apoptosis inducida por AR está acompañada por la disminución de Bcl-2, la activación de caspasa 9 y caspasa 3, así como la liberación citoplasmática del citocromo C en neuroblastoma, melanoma metastásico y leucemia mieloblástica (Niizuma *et al.*, 2006; Zhang y Rosdahl, 2004; Zheng *et al.*, 2000). Vale la pena mencionar que hemos detectado Caspasa 3 activada, principalmente en el citoplasma de las células del cérvix de ambos ratones y disminución en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ (Figura 22A y 22B). Se han descrito varias actividades de caspasa 3 activada en citoplasma relacionadas con apoptosis. Estas actividades incluyen la disociación de proteínas cuya forma escindida mejora su función apoptótica. Por ejemplo: Bim es una proteína que participa en la apoptosis mediante la interacción y la inhibición de la proteína Bcl-2 (O'Connor *et al.*, 1998). Una de las tres isoformas de Bim (BimEL), es escindida por caspasa 3 aumentando la afinidad por Bcl-2 y mejorando la actividad apoptótica (Chen D. *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la actina y la gelsolina escindida por caspasa, incluyendo caspasa 3, podrían inducir la apoptosis morfológica al afectar el citoesqueleto de actina (Mashima *et al.* 1999; Boccellino *et al.*, 2004). Además, la caspasa 3 escinde a la proteína Hur en el citoplasma mejorando su actividad apoptótica (Mazroui *et al.* 2008). En cuanto a los resultados, el hallazgo de Caspasa 3 activada en el citoplasma podría corresponder a una etapa temprana o inicial de la apoptosis, un evento que se ve disminuido en el ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$.

10. CONCLUSIONES

Se observaron cambios histopatológicos relevantes de carácter preneoplásico en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ de 4 meses de edad:

- ✓ Metaplasia epidermoide
- ✓ Cambios en la relación núcleo citoplasma
- ✓ Figuras nucleares de cromatina extendida.
- ✓ Quistes de Naboth
- ✓ Hiperproliferación
- ✓ Indiferenciación celular

La deficiencia de RAR β logró generar por sí solo, lesiones displásicas leves-moderadas en epitelio cervical.

El incremento en infiltrado mixto (agudo-crónico) es causado por la baja expresión del receptor RAR β , formando vacuolas intraepiteliales con abundantes neutrófilos, monocitos y linfocitos.

Se estableció una relación positiva *in vivo*, entre RAR β y p16^{INK4a} y su posible participación en la homeostasis epitelial.

Disminución de la apoptosis asociada a la deficiencia de RAR β .

Por lo tanto, la inhibición de la apoptosis puede cooperar con el aumento en la proliferación celular y con los procesos celulares mencionados anteriormente, que fueron observados en el cérvix de los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ a los 4 meses de edad para la generación de lesiones preneoplásicas.

Es importante destacar que nuestros resultados indican que la baja expresión de p16^{INK4a}, la inflamación mixta y la disminución en la apoptosis inducida por la baja expresión de RAR β podrían estar involucradas en la vulnerabilidad del epitelio cervical a la infección por HR-HPV y en la inducción temprana de CC.

El E₂ indujo la recuperación de la expresión de RAR β ; esta re-expresión fue suficiente para reparar los cambios histopatológicos que se presentan por la deficiencia en RAR β .

11. PERSPECTIVAS

Dilucidar el mecanismo relacionado con la infiltración de células inmunes en el epitelio del cérvix del ratón condicional RAR $\beta^{L-/L-}$.

Realizar una caracterización más amplia de las células que constituyen el infiltrado inflamatorio, además de evaluar su grado de diferenciación y activación de las células de la respuesta inmune en epitelio cervical.

Estudiar el mecanismo por el cual está siendo regulada la expresión del gen p16^{INK4a} por RAR β ; una hipótesis sugerida es que esta regulación es a través de un mecanismo epigenético.

Realizar el tratamiento con E₂ a través de un método más eficiente, como lo es la implantación de pastillas de liberación prolongada.

Estudiar genes blanco del E₂ y RAR β para describir mejor el mecanismo por el cual se da la reversión del fenotipo pre-maligno.

Analizar el efecto del tratamiento del E₂ y la deficiencia de RAR β en ratones de edad avanzada (9 meses de edad).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abu J, Batuwangala M, Symonds P. (2008) Expression of RAR beta2 gene by real-time RT-PCR: differential expression in normal subjects compared to cervical cancer patients normalised against GAPDH as a housekeeping gene. *Obstet Gynecol Reprod Biol.* 140:295.

Ahuja HS, Szanto A, Nagy L, Davies PJ. (2003). The retinoid X receptor and its ligands: Versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. *Biol Reg Hom Agent.* 17:29-45.

Altucci L., Gronemeyer H. (2001) International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors *Nat. Rev. Cancer* 1:193

Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegnee AR (1996) Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *British J Can* 74:488

Alvarez S, Germain P, Alvarez R, Rodriguez-Barrios F, Gronemeyer H, de Lera AR. (2007). Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1406-1415. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.02.010

Amati B., Alevizopoulos K. y Vlach J. (1998) Myc and the cell cycle. *Front. Biosci.*, 3: D250–D268.

Aten, R. F. & Eisenfeld, A. J. (1982) Estradiol Is Less Potent than Ethinyl Estradiol for *in Vivo* Translocation of the Mammalian Liver Estrogen Receptor to the Nucleus. *Endocrinology* 111 , 1292-1298

Barrett J., Lewis B., Hoang A., Alvarez R., y Dang C. (1995) Cyclin A links c-Myc to adhesion-independent cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 270: 15923–15925.

Bartsch D, Boye B, Baust C, zur Hausen H, Schwarz E. (1992) Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor beta gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. *EMBO J* 11:2283

Baskar JF, Smith PP, Nilaver G, Jupp RA, Hoffmann S, Peffer NJ, Tenney DJ, Colberg-Poley AM, Ghazal P, Nelson JA. (1996). The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice. *J Virol* 70:3207-3214.

Brake T, Lambert P. (2005). Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus- transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2495.

Beijer, M. R., R. Molenaar, G. Goverse, R. E. Mebius, G. Kraal, and J. M. den Haan. 2013. A crucial role for retinoic acid in the development of Notch-dependent murine splenic CD82 CD42 and CD4+ dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 43:1608–1616.

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11891-11896. DOI: 10.1073/pnas.95.20.11891

Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R ; European CIN tec Histology Study Group. (2010). Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 133:395-406. DOI: <http://dx.doi.org/10.1309/AJCPXSVCDZ3D5MZM>

Boccellino M, Giuberti G, Quagliuolo L, Marra M, D'Alessandro AM, Fujita H, Giovane A, Abbruzzese A, Caraglia M. (2004). Apoptosis induced by interferon-alpha and antagonized by EGF is regulated by caspase-3-mediated cleavage of gelsolin in human epidermoid cancer cells. *J Cell Physiol.* 201:71-83. DOI: 10.1002/jcp.20058

Bogos K, Vamos RF, Kovacs G, Tovari J, Dome B. (2008). Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 27(18).

Bukovsky A., Caudle M., Cekanova M., Fernando R., Wimalasena J., Foster J., Henley D., Elder R. (2003). "Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant –comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells". *Reproductive Biology and Endocrinology.* 1,1 – 21.

Caliaro MJ, Marmouget C, Guichard S, Mazars P, Valette A, Moisand A, Bugat R, Jozan S. 1994. Response of four human ovarian carcinoma cell lines to all-trans retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression. *Int J Cancer* 56:743-748.

Cantorna, M. T., F. E. Nashold, and C. E. Hayes. (1994). In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J. Immunol.* 152:1515–1522.

Cantorna, M. T., F. E. Nashold, and C. E. Hayes. (1995). Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur. J. Immunol.* 25:1673–1679.

Carmen, J. A., and C. E. Hayes. (1991). Abnormal regulation of IFN γ secretion in vitamin A deficiency. *J. Immunol.* 147:1247–1252.

Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, Girlando S, Rosso S, Naldoni C, Dalla Palma P, Zorzi M, Giorgi-Rossi P, Segnan N, Cuzick J, Ronco G; NTCC working group. 2013. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70529-6

Celli G, Darwiche N, De Luca LM (1996) Estrogen induces retinoid receptor expression in mouse cervical epithelia. *Exp Cell Res* 226:273

Comerci J, Hallam S, Goldberg G, Runowicz C, Fields A, Wadler S, Gallagher R. (1997). Expression of retinoic acid receptor-beta 2 mRNA in normal cervical epithelium and cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 11:983-988. DOI: 10.3892/ijco.11.5.983

Cortés-Malagón EM, Bonilla-Delgado J, Díaz-Chávez J, Hidalgo-Miranda A, Romero-Cordoba S, Uren A, Celik H, McCormick M, Munguía-Moreno JA, Ibarra-Sierra E, Escobar-Herrera J, Lambert PF, Mendoza-Villanueva D, Bermudez-Cruz RM, Gariglio P. (2013). Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology* 447:155-165. DOI: 10.1016/j.virol.2013.08.036

Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.

Chandra RK. (1990). McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: Lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1087-101

Chapellier B, Mark M, Bastien J, Dierich A, LeMeur M, Chambon P, Ghyselinck NB. (2002). A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor beta (RARbeta) gene. *Genesis* 32:91-94. DOI: 10.1002/gene.10073

Chen D, Zhou Q. (2004). Caspase cleavage of BimEL triggers a positive feedback amplification of apoptotic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:1235-1240. DOI: 10.1073/pnas.0308050100

Chen Y, Huang L, Chen T. (1996). Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 224:651.

Dallenbach-Hellweg G. (1981), Structural variations of cervical cancer and its precursors under the influence of exogenous hormones, *Curr Top Pathol* 70:170

Dang C., Resar L., Emison E., Kim S., Li Q., Prescott J. (1999) Wonsey, D., and Zeller, K. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp. Cell Res.*, 253: 63–77.

Darwiche N, Celli G, De Luca LM. (1994). Specificity of retinoid receptor gene expression in mouse cervical epithelia. *Endocrinology* 134:2018-2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.134.5.8156902>

Darwiche N, Celli G, Sly L, Lancillotti F, De Luca LM. (1993). Retinoid status controls the appearance of reserve cells and keratin expression in mouse cervical epithelium. *Cancer Res* 53:2287-2299.

De-Castro Arce Johanna, Ubaldo Sot, Jan van Riggelen, Elisabeth Schwarz, Harald zur Hausen, and Frank Ro. (2004). Ectopic Expression of Nonliganded Retinoic Acid Receptor Abrogates AP-1 Activity by Selective Degradation of c-Jun in Cervical Carcinoma Cells *The journal of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 44, pp. 45408–45416,

Dong ZG, Lavrovsky V, Colburn NH (1995) Transformation reversion induced in JB6 cells by AP-1 inhibitors. *Carcinogenesis* 16:749

Duriancik DM, Lackey DE, Hoag KA. (2010). Vitamin A as a regulator of antigen presenting cells. *J Nutr* 140:1395-1399. DOI: 10.3945/jn.110.124461

Egan CE, Sukhumavasi W, Bierly AL, Denkers EY. (2008). Understanding the multiple functions of Gr-1(+) cell subpopulations during microbial infection. *Immunol Res* 40:35-48. DOI: 10.1007/s12026-007-0061-8

Eisenman R. (2001) Deconstructing myc. *Genes Dev.*, 15: 2023–2030.

Elson D., Riley R., Lacey A, Thordarson G, Talamantes F., Arbeit J. (2000) Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 60:1267

Enmark E., Gustafsson J. (1999). Oestrogen receptors - an overview. *J. Intern Med.* Aug; 246(2): 133 – 8. Review

Farooq SM, Stillie R, Svensson M, Svanborg C, Strieter RM, Stadnyk AW. (2009). Therapeutic effect of blocking CXCR2 on neutrophil recruitment and dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 329:123-129. DOI: 10.1124/jpet.108.145862

Fazili Z., Sun W., Mittelstaedt S., Cohen C., and Xu X. X. (1999) Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene*, 18: 3104–3113.

Ferenczy A. (1982). Anatomy and histology of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. In: A. Blaustein (ed.). *Pathology of the Female Genital Tract*. Ed. 2. pp. 126-132. New York: Springer Publishers.

Ferenczy A, Riehen RM. (1982). Female reproductive system. In: Dynamics of Scan and Transmission Electron Microscopy, pp. 66-68. New York: John Wiley and Sons.

French AL, Kirstein LM, Massad LS, Semba RD, Minkoff H, Landesman S, Palefsky J, Young M, Anastos K, Cohen MH. (2000) Association of vitamin A deficiency with cervical squamous intraepithelial lesions in HIV infected women. *J Infectious Diseases* 182:1084

Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandez R, Doucette S, Cooley K, Seely A, Sagar S, Wong R, Seely D. (2011). Vitamin A and Retinoid Derivatives for Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS ONE*. 6(6).

Fluhmann CF. (1954). Comparative studies of squamous metaplasia of the cervix uteri and endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 68:1447-1463.

Furth PA, Hennighausen L, Baker C, Beatty B, Woychick R. (1991). The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 19:6205–6208. DOI: 10.1093/nar/19.22.6205

Galloway DA, Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Russell K. (1994) Cell cycle checkpoint control is bypasses by human papillomavirus oncogenes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 59:297.

Gariglio P, Orozco E, et al. (2003). *Genética y Biomedicina Molecular*. Edt. LIMUSA, México. Cap.12, Bases Moleculares del Cáncer. Pág.181-198.

Gariglio P, Gutierrez J, Cortes E, Vazquez J. (2009). The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 40:449-465. DOI: 10.1016/j.arcmed.2009.08.002

Geisen C, Denk C, Gremm B, Baust C, Karger A, Bollag W, Schwarz E. (1997) High-level expression of the retinoic acid receptor beta gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor alpha and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 15:1460

Giandomenico V, Lancillotti F, Fiorucci G, Percario ZA, Rivabene R, Malorni W, Affabris E, Romeo G, (1997) Retinoic acid and IFN inhibition of cell proliferation is associated with apoptosis in squamous carcinoma cell lines. *Cell Growth Differ* 8:91

Ghyselinck NB, Dupe V, Dierich A, Messaddeq N, Garnier JM, Rochette-Egly C, Chambon P, Mark M. (1997). Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol* 41:425-447.

Godinez I, Raffatellu M, Chu H, Paixao TA, Haneda T, Santos RL, Bevins CL, Tsois RM, Baumler AJ. (2009). Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestine. *Infect Immun* 77:387-398. DOI: 10.1128/IAI.00933-08

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674. DOI: 10.1002/jcp.22417

Hengesbach LM, Hoag KA. (2004). Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *J Nutr* 134:2653-2659.

Hernandez-Monge J, Garay E, Raya-Sandino A, Vargas-Sierra O, Diaz-Chavez J, Popoca-Cuaya M, Lambert PF, Gonzalez-Mariscal L, Gariglio P. (2013). Papillomavirus E6 oncoprotein up-regulates occludin and ZO-2

expression in ovariectomized mice epidermis. *Exp Cell Res* 319:2588-2603. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.028

Hiroyuki Yamada, Satoru Mizuno, A. Catharine Ross, and Isamu Sugawara. (2007). Retinoic Acid Therapy Attenuates the Severity of Tuberculosis While Altering Lymphocyte and Macrophage Numbers and Cytokine Expression in Rats Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Nutr. American Society for Nutrition* 137: 2696–2700.

Hoffmann B., Lehmann, J., Zhang, X., Hermann T., Graupner G. and Pfahl M. (1990) retinoic acid receptor specific element controls the retinoic acid receptor- β promoter. *Mol. Endocrinol.*, 4: 1727–1736.

Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, Chew K, Baylin SB, Herman JG, Tlsty TD. (2003). Methylation of p16(INK4a) promoters occurs *in vivo* in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res* 63:1596-1601.

Huang C, et al. (1997) Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5826

Ivanova T, Petrenko A, Gritsko T, Vinokourova S, Eshilev E, Kobzeva V, Kisseljov F, Kisseljova N. (2002). Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer* 2:4. DOI: 10.1186/1471-2407-2-4

Ivanova TA, Golovina DA, Zavalishina LE, Volgareva GM, Katargin AN, Andreeva YY, Frank GA, Kisseljov FL, Kisseljova NP. (2007) Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16INK4a in HPV-positive cervical carcinomas *BMC Cancer*, 7:47

James E., Balmer y Rune Blomhoff (2007). Gene expression regulation by retinoic acid Institute for Nutrition Research, School of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway, *Journal of Lipid Research* Volume 43.

Juric D, Mahovlic V, Rajhvajn S, Ovanin-Rakic A, Skopljanac-Macina L, Barisic A, Projic IS, Babic D, Susa M, Corusic A, Oreskovic S. (2010). Liquid-based cytology--new possibilities in the diagnosis of cervical lesions. *Coll Antropol* 34:19-24.

Khare S, Pater MM, Tang SC, Pater A. (1997) Effect of glucocorticoid hormones on viral gene expression, growth, and dysplastic differentiation in HPV16-immortalized ectocervical cells. *Exp Cell Res* 1; 232(2):353

Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Chambon P (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development 124:313

Katzenellenbogen B., Choi I, Delage-mourroux R, Ediger T., Martini P., Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen J. (2000) Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:285.

Klebanoff, C. A., S. P. Spencer, P. Torabi-Parizi, J. R. Grainger, R. Roychoudhuri, Y. Ji, M. Sukumar, P. Muranski, C. D. Scott, J. A. Hall, et al. (2013). Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210: 1961–1976.

Kim CH. (2011). Retinoic acid, immunity, and inflammation. *Vitam Horm* 86:83-101. DOI: 10.1016/B978-0-12-386960-9.00004-6

Kowalski A., Graddy L., Valecruz D., Choi I., Katzenellenbogen B., Simmen F., Simmen R. (2002). Molecular cloning of porcine estrogen receptor- β complementary DNAs and developmental expression in periimplantation embryos. *Biology of Reproduction*. 66, 760 – 769

Kuiper G., Carlsson B., Gradien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*. 138(3): 863 – 870.

Lacey JV, Brinton LA, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. (2000) Use of hormone replacement therapy and adenocarcinomas and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 77:149.

Lackey, D. E., S. L. Ashley, A. L. Davis, and K. A. Hoag. (2008). Retinoic acid decreases adherence of murine myeloid dendritic cells and increases production of matrix metalloproteinase-9. *J. Nutr.* 138: 1512–1519.

Lambert PF, Pan H, Pitot HC, Liem A, Jackson M, Griep AE. (1993) Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5583

Lazcano-Ponce E, Allen B, Palacio-Mejía LS, Hernández-Avila M. (2006). Challenges to implement strategies for the primary and secondary prevention of cervical cancer in Mexico. *Gac Med Mex. Sep-Oct;142 Suppl* 2:43-9. PMID: 19031678.

Lee JJ., Wu X, Hildebrandt AT, Yang H, Khuri RF, Kim E, Gu J, Ye Y, Lotan R, Spitz RM, Hong KW. (2011). Global Assessment of Genetic Variation Influencing Response to Retinoid Chemoprevention in Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Res.* 4 (2):185-193.

Lin F, Xiao D, Kolluri SK, Zhang X (2000) Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res* 15:60(12):3271

Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 128:927-935. DOI: 10.1002/ijc.25396

Li Y., Wong K., Walsh K., Gao B., Zang M., (2013) Retinoic Acid Receptor beta Stimulates Hepatic Induction of Fibroblast growth factor 21 to Promote Fatty Acid Oxidation and Control Whole-body Energy Homeostasis in Mice *Biol Chem*.

Lim JS, Park SH, Jang KL. (2011). All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 412:500-505. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.130

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 4:402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262

Manicassamy S, Pulendran B. (2009). Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol* 21:22-27. DOI: 10.1016/j.smim.2008.07.007

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *J Cell.*83:835–839.

Manicassamy, S., R. Ravindran, J. Deng, H. Oluoch, T. L. Denning, S. P. Kasturi, K. M. Rosenthal, B. D. Evavold, and B. Pulendran. (2009). Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat. Med.* 15: 401–409.

Masiá AS. (2006). Acciones del Ácido Retinoico en la Diferenciación de Células de Neuroblastoma Humano. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Mashima T, Naito M, Tsuruo T. (1999). Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene.* 18:2423-2430.

Mathilde Raverdeau and Kingston H. G. Mills. Modulation of T Cell and Innate Immune Responses by Retinoic Acid. (2014). *The Journal of Immunology,* , 192:2953–2958.

Mazroui R, Di Marco S, Clair E, von Roretz C, Tenenbaum SA, Keene JD, Saleh M, Gallouzi IE. (2008). Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol* 180:113-127. DOI: 10.1083/jcb.200709030.

McLaughlin-Drubin ME, Huh KW, Munger K. (2008). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J Virol* 82:8695-8705. DOI: 10.1128/JVI.00579-08

McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K. (2013). Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:16175-80. DOI: 10.1073/pnas.1310432110

Meyskens FL, Surwit E, Moon TE, Childers JM, Davis JR, Dorr RT, Johnson CS, Alberts DS. (1994) Enhancement of regression of cervical intraepithelial neoplasia II (moderate dysplasia) with topically applied all-trans-retinoic acid: a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 86:539

Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E. (2004). Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 64:6542-6548. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1129

Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1085

Moodley M, Sewart S, Herrington CS, Chetty R, Pegoraro R, Moodley J. (2003) The interaction between steroid hormones, human papillomavirus type 16, E6 oncogene expression, and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 13:842. [PubMed: 14675321]

Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194: 1171-1178.

Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Vilella J, Schneider A, Terry MB, Mansukhani M, Murty VV. (2003). Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer* 2:24. DOI: 10.1186/1476-4598-2-24

Nehls K, Vinokurova S, Schmidt D, Kommos F, Reuschenbach M, Kisseljov F, Einkenkel J, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N. (2008). p16 methylation does not affect protein expression in cervical carcinogenesis. *Eur J Cancer* 44:2496-2505. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.07.014

Newfield L, Bradlow HL, Sepkovic DW, Auburn K (1998) Estrogen metabolism and the malignant potential of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:322

Ng MH, Chung YF, Lo KW, Wickham NW, Lee JC, Huang DP. (1997). Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* 89:2500-2506.

Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Nakanishi H, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. (2006). Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 25:5046-5055.

Noy N. (2010). Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu Rev Nutr* 30:201-217. DOI: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155509

Ocadiz-Delgado R, Castañeda-Saucedo E, Indra AK, Hernandez-Pando R, Flores-Guizar P, Cruz-Colin JL, Recillas-Targa F, Perez-Ishiwara G, Covarrubias L, Gariglio P. (2012). RXR α deletion and E6E7 oncogene expression are sufficient to induce cervical malignant lesions in vivo. *Cancer Lett.* Apr 28;317(2):226-36.

O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. (1998) *EMBO J* 17:384-395.

Peeyananjarassi K, Baber R. (2005) Effects of low-dose hormone therapy on menopausal symptoms, bone mineral density, endometrium and the cardiovascular system: a review of randomized clinical trials. *Climacteric* 8(1):13-23.

Persson, E. K., H. Uronen-Hansson, M. Semmrich, A. Rivollier, K. Hägerbrand, J. Marsal, S. Gudjonsson, U. Häkansson, B. Reizis, K. Kotarsky, and W. W. Agace. (2013). IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38: 958–969.

Poulain S., Evenou F., Carré M-C., Corbel S., Vignaud J-M., Martinet N.(2009). Review. Vitamin A/retinoids signalling in the human lung. *J Lung Can* 66:1–7.

Richard J., Diana C., Márquez-Gabán. (2007) Membrane-Associated Estrogen Receptor Signaling Pathway in Human Cancers. *Molecular Paways*.

Ratzinger, G., P. Stoitzner, S. Ebner, M. B. Lutz, G. T. Layton, C. Rainer, R. M. Senior, J. M. Shipley, P. Fritsch, G. Schuler, and N. Romani. (2002). Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol.* 168: 4361–4371.

Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF, Arbeit JM. (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 63:4862-4871.

Roy, B., Taneja, R., and Chambon, P. (1995) Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6487

Samarawardana P, Dehn DL, Singh M, Franquemont D, Thompson C, Gaido L, Torkko KC, Homer P, Burke S, Titmus MA, Nayi V, Shroyer KR. (2010). p16(INK4a) is superior to high-risk human papillomavirus testing in cervical cytology for the prediction of underlying high-grade dysplasia. *Cancer Cytopathol* 118:146-156. DOI: 10.1002/cncy.20078

Serafin-Higuera N, Hernandez-Sanchez J, Ocadiz-Delgado R, Vazquez-Hernandez J, Albino-Sanchez ME, Hernandez-Pando R, Gariglio P. (2012). Retinoic acid receptor beta deficiency reduces splenic dendritic cell population in a conditional mouse line. *Immunol Lett* 146:15-24. DOI: 10.1016/j.imlet.2012.04.006

Sheng Z., Sun W., Smith E., Cohen C., and Xu X. X. (2000) Restoration of positioning control following Disabled-2 expression in ovarian and breast tumor cells. *Oncogene*, 19: 4847–4854

Schneider A, Hotz M, Gissman L (1987) Increased prevalence of human papillomavirus in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 40:198

Stephensen CB. (2001). Vitamin A, infection, and immune function. *Annual review of nutrition* 21:167-192. DOI: 10.1146/annurev.nutr.21.1.167

Sun SY, Wan H, Yue P, Hong WK, Lotan R. (2000) Evidence that retinoic acid receptor α induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition. *J Biol Chem* 275:17149

Swishhelm K, Ryan K, Lee X, Tsou HC, Peacocke M, Sager R. (1994). Down-regulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ* 5:133-141.

Tang XH, Gudas LJ. (2011). Retinoids, retinoic acid receptors and cancer. *Pathol Rev.* 6:345-64.

Treutin PM., Chen LI., Buetow BS., Zeng W., Birkebak TA., Seewaldt VL., Sommer KM., Emond M., Moggio-Price L., Swishhelm K. (2002) Retinoic acid receptor beta2 inhibition of metastasis in mouse mammary gland xenografts. *Cancer Res.* 72:79--88.

Volgareva Galina, Zavalishina Larisa, Andreeva Yulia, Frank Georgy, Krutikova Ella, Golovina Darya, et al. (2004) Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004, 4:58

Vuillemenot RB., Pulling C. L., Palmisano A. W., Hutt A. J., Belinsky A. S. (2004). Carcinogen exposure differentially modulates RAR-b promoter hypermethylation, an early and frequent event in mouse lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 25 (4): 623-629.

Weston AD, Blumberg B, Underhill TM. (2003). Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *J Cell Biol* 161:223-228. DOI: 10.1083/jcb.200211117

Widschwendter M., Berger J., Daxenbichler G., Muller-Holzner E., Widschwendter A., Mayr A., Marth C., and Zeimet A. (1997). Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res.*, 57: 4158–4161

Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49:1618-1631. DOI: 10.1093/rheumatology/keq045

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9:140-147. DOI: 10.1016/S0959-437X(99)80021-5

Xu XC. (2007). Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett* 253:14–24. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.019

Yuan F, Auburn K, James C (1999) Altered growth and viral gene expression in human papillomavirus type 16-containing cancer cell lines treated with progesterone. *Cancer Invest* 17:19

Zhang H, Rosdahl I. (2004). Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 25:303-308.

Zhang X., Lehmann J., Hoffmann B. et al. (1992). Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid, *Nature* 358:587.

Zheng A, Mäntymaa P, Säily M, Savolainen E, Vähäkangas K, Koistinen P. (2000). p53 pathway in apoptosis induced by all-trans-retinoic acid in acute myeloblastic leukaemia cells. *Acta Haematol* 103:135-143. DOI: 10.1159/000041036

Zur Hausen H. (2000) Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl Cancer Inst* 92:690.

Zur Hausen H. (2009). The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*. 392:1-10. DOI: 10.1016/j.virol.2009.06.001



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr

Research article

Decreased RAR β expression induces abundant inflammation and cervical precancerous lesionsME Albino-Sanchez^a, J Vazquez-Hernandez^a, R Ocadiz-Delgado^a, N Serafin-Higuera^{a,1}, I León-Galicia^a, E Garcia-Villa^a, R Hernandez-Pando^b, P Gariglio^{a,*}^a Department of Genetics & Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México, DF, México^b Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Vasco de Quiroga 15, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14000 México, DF, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form

3 May 2016

Accepted 15 May 2016

Keywords:

Retinoic acid receptor β P16^{INK4a}

Conditional mice

Squamous metaplasia

Moderate dysplasia

Inflammatory infiltrate

ABSTRACT

It is well known that vitamin A and its receptors protect against cancer development and that Retinoic Acid Receptor β (RAR β) is epigenetically silenced during tumoral progression. Cervical Cancer (CC) has been causally linked to high risk human papillomavirus (HR-HPV) infection. However, host factors are important in determining the outcome of persistent HR-HPV infection as most cervical precancerous lesions containing HR-HPVs do not progress to invasive carcinomas. Increasing evidence suggests that low diet in vitamin A and their receptors participate in the development of CC. The aim of this study has been to investigate the effects of abated RAR β expression in the development of cervical premalignant lesions in 4 month-old conditional mice (RAR $\beta^{fl/fl}$). Results demonstrated the development of spontaneous squamous metaplasia, inflammatory infiltrate, enhanced mitotic activity, loss of cell differentiation, as well as decreased apoptosis and p16^{INK4a} protein levels in RAR $\beta^{fl/fl}$ mice cervix. All these changes are hallmarks of moderate dysplasia. Importantly, our results suggest that the low expression of RAR β , may induce the down regulation of p16^{INK4a}, chronic inflammation and decreased apoptosis and may be involved in vulnerability to HR-HPV and early stage cervical carcinogenesis.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is a multistep and multifactorial disease that is characterized by the accumulation of various cell-damaging events such as chromosomal instability, inactivation of cell cycle regulatory proteins, apoptosis inhibition, and epigenetic modifications, among others [28,42]. High-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) are the main etiological agents of cervical cancer (CC), as they are present in over 95% of tumors [42]. However, most cervical precancerous lesions containing HR-HPVs do not progress to invasive carcinomas, implicating that both genetic (cellular oncogenes or tumor suppressor gene mutations) and environmental cofactors (low dietary micronutrients such as vitamin A, chronic estrogen intake or other epigenetic regulators) could cooperate in those cases where cancer progression occurs [24,71].

* Correspondence to: Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, CP 07360 México City, México.

E-mail address: vidal@cinvestav.mx (P. Gariglio).

¹ Present address: Laboratory of Molecular Biology, Unidad de Ciencias de la Salud, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, BC, México.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.05.010>

0014-4827/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Retinoids are regulators of multiple physiological processes ranging from embryogenesis to metabolism and are effective as therapeutic agents for several disorders including cancer [10]. Retinoid-deficient epithelial tissues acquire a premalignant phenotype, which is characterized by enhanced mitotic activity and loss of differentiation altering crucial aspects of cell proliferation, differentiation, apoptosis and both innate and adaptive immune response [27,38]. The transcriptional activities of retinoic acid (RA) are mediated by retinoic acid receptors (RARs) which are ligand-activated transcription factors and members of the nuclear hormone receptors family [51].

Retinoic Acid Receptor β (RAR β) displays unique expression patterns in both embryo and adult; but is expressed mainly in normal cervical epithelial cells [14,25,8]. This receptor blocks cell cycle progression at the G1 phase by down-regulating Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2), Cdk4/6 and Cyclin D1 expression [16,57], as well as by up-regulating the expression of cell cycle inhibitors such as p16^{INK4a}, p21^{WAF1} and p27 [57], via down-regulation of DNA methyltransferases [36]. Moreover, several RAR-controlled genes are known to mediate proapoptotic activities, including Caspases 3 and 9. Similarly, apoptosis induced by RA is accompanied by the down-regulation of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, A1) and up-regulation of

Please cite this article as: M. Albino-Sanchez, et al., Decreased RAR β expression induces abundant inflammation and cervical precancerous lesions, *Exp Cell Res* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.05.010>