



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CERVICOUTERINAS PARA LA
GENERACIÓN DE ORGANOIDES MURINOS COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA
CARCINOGENÉISIS CERVICAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

ADRIANA LUZ MARÍA GRIJALVA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

CD, MX. DICIEMBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

**“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CERVICOUTERINAS PARA LA
GENERACIÓN DE ORGANOIDES MURINOS COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA
CARCINOGENÉISIS CERVICAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

ADRIANA LUZ MARÍA GRIJALVA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, CD, MX. DICIEMBRE, 2019

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD IIBO

OFICIO CPCB/1192/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de agosto del 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **GRIJALVA PÉREZ ADRIANA LUZ MARÍA** con número de cuenta 308264807 con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CERVICOUTERINAS PARA LA GENERACIÓN DE ORGANOIDES MURINOS COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA CARCINOGENESIS CERVICAL**", realizada bajo la dirección del DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
Suplente: DR. JUAN BAUTISTA PATRICIO GARIGLIO VIDAL
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 6 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de realizar mis estudios en un programa de tan alta calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU: 658679, No. de apoyo: 463818) durante mis estudios de maestría.

También al CONACYT por el financiamiento del proyecto (No. de proyecto: 0253804), el cual permitió la realización de este trabajo.

A mi tutor principal, el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá y a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Rosana Pelayo Camacho y Dra. Martha Robles Flores, por su contribución y apoyo en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Centro de Investigaciones y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Al Dr. Alejandro Manuel García Carranca, por recibirme en su laboratorio y confiar en mi para realizar este proyecto.

Al Dr. Patricio Gariglio, por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.
Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Biól. Enrique García Villa, al Dr. Rodolfo Ocádiz Delgado y a la M. en C. Miriam Guido Jiménez por su apoyo académico y técnico.

Al Dr. Abraham Rosas Arellano por su asesoría y contribución en la obtención de los resultados de este trabajo.

A la Dra. Estela Albino Sánchez, gracias por los consejos, la asesoría y el apoyo en este camino.

A mis compañeras de trabajo y amigas Adela y Laura, gracias por las risas y enseñanzas.

A los C57BL/6J y los RAR β ^{L-/L-}

DEDICATORIA

A mis padres: Ceferina y Juan Manuel, por su amor infinito y apoyo incondicional, ya que gracias a su esfuerzo puedo decirme a lo que siempre me ha apasionado que es la biología.

A mis hermanos: Janet, Jesús e Itzel por sus consejos. Gracias por acompañarme y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis sobrinos Jony y Max, por haber traído alegría y esperanza a mi vida.

A mis hermanas y mejores amigas: Mire, Miry y Mar. Gracias por llenar mi vida de alegría. Gracias por las risas, los consejos y su apoyo en cada una de las etapas que hemos vivido juntas.

A mis amigos: Juan Manuel, Kike, Carlos e Iván, por su apoyo y cariño.

A Carlos, por las enseñanzas y por creer en mí. Gracias por compartir tus sueños conmigo inspirándome a ser mejor persona. Gracias por tus canciones que me llenan de vida.

INDICE

Agradecimientos académicos	
Agradecimientos a título personal	
Dedicatoria	
Índice	
Lista de abreviaturas	
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Cáncer.....	4
1.2 Cáncer cervicouterino.....	5
1.3 Anatomía del cérvix.....	6
1.3.1 Endocérvix.....	6
1.3.2 Exocérvix.....	7
1.3.2.1 Metaplasia epidermoide.....	8
1.3.3 Zona de transformación.....	9
1.4 Virus del Papiloma Humano.....	12
1.5 Células troncales.....	14
1.6 Células de reserva.....	15
1.6.1 Células de reserva como la población putativa de células troncales cervicouterinas	15
1.6.2 Células de reserva como células iniciadoras del cáncer cervicouterino.....	17
1.6.3 Marcadores de células troncales cervicales.....	18
1.7 Células de la unión escamocolumnar.....	19
1.8 Vitamina A y ácido retinoico.....	20
1.9 Receptores para el ácido retinoico.....	21
1.10 Ácido retinoico y RAR β en cáncer	23
1.11 Ácido retinoico y RAR β en la diferenciación celular.....	23
1.12 Organoides.....	26
2 ANTECEDENTES.....	28
3 HIPÓTESIS.....	30

4	OBJETIVOS.....	30
	4.3 Objetivos generales.....	30
	4.4 Objetivos particulares.....	30
5	ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	31
6	MÉTODO.....	32
	7.1 Población de estudio.....	32
	7.2 Genotipificación.....	32
	7.2.1 Extracción de ADN	32
	7.2.2 PCR.....	33
	7.3 Caracterización de células troncales cervicales “ <i>in situ</i> ”.....	34
	7.3.1 Obtención de muestras	34
	7.3.2 Inclusión de tejidos en parafina y cortes histológicos.....	34
	7.3.3 Inmunohistoquímica para las proteínas CK5, CK10, p63, AGR2, Ki67	35
	7.3.4 Inmunofluorescencia para las proteínas CD49f, CK5, CK17.....	36
8	RESULTADOS.....	37
	8.1 Genotipificación de ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$	37
	8.2 Las poblaciones de células de reserva de la unión escamocolumnar y células de reserva endocervicales aumentan en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$	37
	8.3 Células de reserva y células basales que expresan los marcadores putativos de células troncales cervicales CD49f, CK17 y p63, aumentan en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$	39
	8.3.1 Incremento en los niveles de expresión de la proteína p63 en células de reserva de la unión escamocolumnar, células de reserva endocervicales y células basales exocervicales en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$	39
	8.3.2 Incremento en la expresión de CD49f en células de reserva de la JSC, células de reserva endocervicales y células basales exocervicales en los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$	41
	8.3.3 La coexpresión de los marcadores de troncalidad CD49f y CK17 se ve incrementada en dos compartimentos celulares del cérvix de los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$	45
	8.4 El marcador de células de la unión escamocolumnar AGR2 se expresa en células metaplásicas inmaduras y células columnares que dan origen	

a las glándulas endocervicales.....	51
8.5 La deficiencia del receptor β para ácido retinoico disminuye la diferenciación del epitelio escamoso del cérvix en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$	52
8.6 La deficiencia del receptor β para ácido retinoico incrementa la proliferación celular del epitelio cervical en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$	54
9 DISCUSIÓN.....	55
10 CONCLUSIONES.....	61
11 PERSPECTIVAS.....	62
12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62

Lista de abreviaturas:

AR: Ácido retinoico

ASC: Células troncales adultas (Siglas en inglés)

atRa: Ácido retinoico “all trans” (Siglas en inglés)

CaCU: Cáncer cervicouterino

CSC: Células troncales cancerosas (Siglas en inglés)

CRABP: Proteína de unión a ácido retinoico celular (Siglas en inglés)

CRBP: Proteína de unión a retinol celular (Siglas en inglés)

DBD: Dominio de unión a ADN (Siglas en inglés)

DBL: Dominio de unión a ligando (Siglas en inglés)

F-JSC: Unión escamocolumnar funcional (Siglas en inglés)

ESC: Células troncales embrionarias (Siglas en inglés)

H&E: Hematoxilina y Eosina

iPSC: Células troncales pluripotentes inducidas (Siglas en inglés)

JSC: Unión escamocolumnar (Siglas en inglés)

LBD: Dominio de unión a ligando (Siglas en inglés)

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

O-JSC: Unión escamocolumnar original (Siglas en inglés)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Siglas en inglés)

RARE: Elementos de respuesta a ácido retinoico (Siglas en inglés)

RAR β : Receptor β para ácido retinoico

RNs: Receptores nucleares

RXR: Receptor X a retinoides

SC: Células troncales (Siglas en inglés)

TZ: Zona de transformación (Siglas en inglés)

VPH: Virus del papiloma humano

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo

VPH-BR: Virus del papiloma humano de bajo riesgo

“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CERVICOUTERINAS PARA LA GENERACIÓN DE ORGANOIDES MURINOS COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA CARCINOGENÉISIS CERVICAL”

RESUMEN

Durante los últimos años el establecimiento de organoides ha permitido generar grandes avances en el campo de la biomedicina y medicina regenerativa. Los organoides son cultivos en tercera dimensión que forman estructuras semejantes a órganos en miniatura a partir del crecimiento y diferenciación de células troncales (SC) *in vitro*. Los organoides tienen la capacidad de recapitular no solo la histología y fisiología de distintos órganos y tejidos, sino también la histopatología de diversas enfermedades resultando ser un modelo idóneo en el estudio del cáncer. En el caso particular del cáncer cervicouterino (CaCU) los organoides podrían representar un modelo óptimo para estudiar la relación hipotética existente entre la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo del CaCU y las células troncales, que se especula, se localizan en la zona de transformación (TZ) donde podemos encontrar células de reserva y la unión escamocolumnar (JSC) del cuello uterino. Recientemente se demostró que una dieta deficiente en ácido retinoico favorece la generación de metaplasia epidermoide en el tejido cervical de ratones. El inicio del proceso metaplásico se caracteriza por la hiperproliferación de células de reserva, una condición que pensamos nos permitirá enriquecer las poblaciones de células troncales cervicouterinas a partir de las cuales podríamos generar organoides de cérvix.

En el presente trabajo realizamos la caracterización de las células troncales del epitelio cervical de ratones normales (C57BL/6J) y ratones deficientes del receptor β para el ácido retinoico ($RAR\beta^{L-/L-}$). Nuestros resultados indican que las poblaciones de células de reserva de la JSC y células basales del epitelio estratificado de la TZ coexpresan los marcadores putativos de células troncales cervicales CD49f, p63 y citoqueratina (CK) 17 en el epitelio cervical de ambas cepas de ratones, viéndose incrementados los niveles de expresión de estas proteínas en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$. Así mismo observamos una disminución en la expresión de citoqueratinas de diferenciación CK5, CK10 en el epitelio estratificado, así como aumento en la proliferación celular medida por la expresión de Ki67 en los epitelios estratificado y columnar en los ratones deficientes del receptor β para ácido retinoico. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la deficiencia del receptor β para el ácido

retinoico favorece el incremento de las poblaciones de células tipo troncales, así como al aumento de células indiferenciadas, condición que podría favorecer la formación de organoides de cérvix en el modelo murino $RAR\beta^{L-L}$.

Palabras clave: célula troncal, célula de reserva, unión escamocolumnar, metaplasia epidermoide, $RAR\beta$.

“CHARACTERIZATION OF CERVICOUTERINE STEM CELLS TO GENERATION OF MURINE ORGANOID AS A STUDY MODEL OF CERVICAL CARCINOGENESIS”

ABSTRACT

In the last years the establishment of organoids has allowed the generation of great advances in the field of biomedicine and regenerative medicine. Organoids are three-dimensional cultures that form structures similar to miniature organs from *in vitro* growth and differentiation of stem cells (SC). Organoids have the ability to recapitulate the histology and physiology of different organs and tissues, as well as the histopathology of several diseases, so it turns out to be ideal models in the study of carcinogenesis. In the case of cervical cancer, organoids could represent an optimal model to study the hypothetical relationship between Human Papilloma Virus (HPV) infection, which is the main risk factor associated with the development of cervical cancer and the stem cells that are located in the transformation zone (TZ), where we can find reserve cells and the cervical squamocolumnar junction (JSC). Several studies have shown that a vitamin A (acid retinoic) deficient diet favors the generation of epidermoid metaplasia in the mice cervical tissue. The beginning of metaplastic process is characterized by reserve cells hyperproliferation, condition that we think will allow us to enrich the cervical stem cells populations from which we could generate cervical organoids.

In the present study we performed the characterization of the cervical epithelial stem cells of normal mice (C57BL/6J) and retinoic acid receptor β deficient mice ($RAR\beta^{L-/L-}$). Our results indicate that reserve cells populations of the JSC and basal cells of stratified epithelium of the TZ coexpress the putative markers of cervical stem cells CD49f, p63 and cytokeratin (CK) 17 in the cervical epithelium of both mice, with increased expression levels of these proteins in $RAR\beta^{L-/L-}$ mice. We also observed a decrease in the expression of cytokeratins CK5 and CK10, invoved in differentiation in the stratified epithelium as well as cell proliferation increase measured by the expresión of Ki67 in stratified and columnar epithelia in retinoic acid receptor deficient β deficient mice. In conclusion, our results suggest that retinoic acid receptor β deficiency favors the increase in stem cell populations, as well as the increase in undifferentiated cells, condition that could favor the formation of cervical organoids in the $RAR\beta^{L-/L-}$ murine model.

Keywords: stem cell, reserve cell, squamocolumnar junction, epidermoid metaplasia, $RAR\beta$.

“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES CERVICOUTERINAS PARA LA GENERACIÓN DE ORGANOIDES MURINOS COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA CARCINOGENÉISIS CERVICAL”

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de las células de un tejido en particular y su propagación hacia tejidos adyacentes como consecuencia de la desregulación de los procesos normales de supervivencia, muerte y proliferación celular (Bandi 2012). Si bien es cierto que las características del cáncer dependen del tejido de procedencia todos los tipos de cáncer comparten características que adquieren a lo largo del desarrollo tumoral pudiendo considerarse como marcas distintivas del cáncer. Dichas marcas incluyen una señalización proliferativa mantenida, evasión de la supresión del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción a la angiogénesis, activación de la invasión y la metástasis, inestabilidad genómica, inflamación, reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune (Hanahan & Weinberg 2011) (Fig. 1).



Figura 1. Marcas distintivas del cáncer (modificado de Hanahan & Weinberg 2011)

1.2 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) representa un gran problema de salud pública, ocupando el cuarto lugar de incidencia y mortalidad en mujeres de todo el mundo (Globocan 2018). La mayoría de los casos ocurren en países en vías de desarrollo y particularmente en México, el CaCU representa el tercer lugar de frecuencia de nuevos casos de cáncer, así como el tercer lugar de muertes en mujeres en edad reproductiva (Globocan 2018).

El CaCU es una enfermedad caracterizada por la transformación celular del epitelio del cuello uterino, estando implicada en la mayoría de los casos una región denominada zona de transformación (TZ, por sus siglas en inglés) (Marsh 1956; Richart 1973). El curso natural de la enfermedad consiste en la manifestación y evolución de lesiones precancerosas persistentes denominadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), las cuales conllevan en última instancia al desarrollo del cáncer. El principal factor de riesgo asociado a esta enfermedad son las infecciones persistentes por el Virus del Papiloma Humano (VPH) (zur Hausen 2000), particularmente por los subtipos oncogénicos 16 y 18. El VPH 18 es el tipo más fuertemente asociado con adenocarcinoma de cérvix, mientras que el VPH 16, seguido por el VPH 18, son los tipos más frecuentemente detectados en carcinoma de células escamosas (Clifford *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2003). El evento inicial que desencadena el desarrollo del cáncer está dado por la infección de células basales en la TZ cervicouterina. Después de 10-30 años, en un porcentaje bajo de mujeres, las lesiones no tratadas generadas por virus persistentes progresarán a cáncer invasor (De Villiers *et al.*, 2004; Woodman *et al.*, 2007) (Fig. 2).

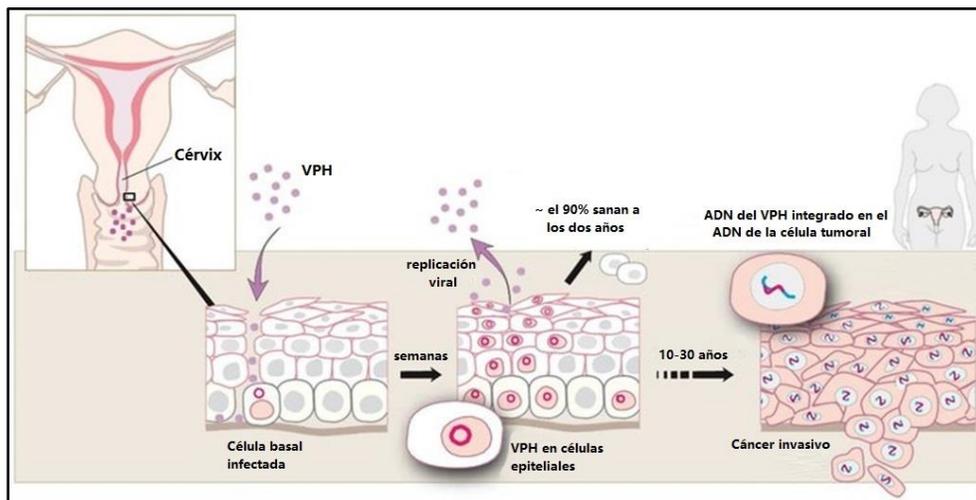


Figura 2. Patogénesis del VPH en el cáncer cervical. The Nobel Committee for Physiology or Medicine. Ilustración de Mattias Karlén (Stark & Živković 2018)

Investigaciones epidemiológicas y experimentales han identificado la infección con VPH de alto riesgo u oncogénicos como una causa necesaria pero no suficiente en la generación de lesiones cervicales y cáncer invasor (zur Hausen 2002; Roden & Wu 2006; Doorbar, 2006). Factores intrínsecos y extrínsecos del huésped actúan en conjunto con el virus en el desarrollo y progresión de la enfermedad entre los que destacan el tabaquismo, factores nutricionales y dietarios como una dieta deficiente en vitamina A (retinoides), historia familiar de cáncer de cérvix, uso de anticonceptivos orales, edad temprana en la primera relación sexual, multiparidad, historia de clamidia, herpes o tricomonas, inmunodeficiencia, VIH, entre otros (Momenimovahed & Salehiniya, 2017).

1.3 Anatomía del cérvix

El cérvix es el canal que comunica a la vagina con el endometrio. En humano su tamaño en promedio es de 3 a 4 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro, aunque este puede variar dependiendo de la edad, número de partos y momento del ciclo menstrual. Está conformado por tejido fibromuscular recubierto por células epiteliales de naturaleza glandular y escamosa, pudiendo distinguirse claramente dos regiones: el endocérvix y el exocérvix (Sellors & Sankaranarayanan 2003).

1.3.1 Endocérvix

El endocérvix es la región anatómica del cérvix más cercana al útero. En su límite superior se fusiona con el epitelio endometrial de la parte inferior del cuerpo del útero, mientras que en su límite inferior se fusiona con el epitelio escamoso en la unión escamocolumnar (JSC, por sus siglas en inglés). Está constituido por una sola hilera de células columnares secretoras de moco que recubren la superficie fibromuscular delimitada por dicha región, así como a las invaginaciones tortuosas presentes a lo largo de la misma que forman estructuras semejantes a glándulas conocidas como criptas cervicales. Las células columnares, también conocidas como cilíndricas son células alargadas que presentan un núcleo redondo u ovoide de gran tamaño dispuesto de manera basal con respecto a la membrana basal y un citoplasma alto con elevado contenido de vesículas mucinosas (Geneser 2015).

El endocérvix cumple con una función de protección y reproducción. La presencia de estrógenos en el epitelio columnar genera la estimulación de dichas células dando como resultado la generación de grandes cantidades de moco, de naturaleza alcalina y acuosa

que facilita la entrada de espermatozoides al útero, mientras que la presencia de progesterona genera menores cantidades de moco, de naturaleza ácida y gran espesor que dificulta la entrada de los espermatozoides al útero (Geneser 2015).

El endocervix presenta mitosis reducidas y se cree que la regeneración de este tipo de epitelio está dada por células de reserva que se disponen de forma dispersa a lo largo de este epitelio (Sellors & Sankaranarayanan 2003).

1.3.2 Exocervix

El exocervix es la región anatómica del cervix más cercana a la vagina. Está compuesta por varios estratos de células epiteliales escamosas no queratinizantes que recubren al tejido fibromuscular de la región del cervix que se extiende desde la unión escamocolumnar en su límite superior hasta los fórnices vaginales en su límite inferior. En dicha región se pueden distinguir cuatro estratos de células con función y anatomía particular: el estrato basal, el estrato suprabasal, el estrato intermedio y el estrato superficial (Fig. 3). El estrato basal corresponde a una sola hilera de células indiferenciadas de tamaño pequeño y núcleo grande que permanecen en contacto con la membrana basal justo por debajo del estroma del cervix. Cuando dichas células maduran y comienzan a diferenciarse se disponen por arriba de este estrato formando varias capas de células con núcleos grandes y citoplasma basófilo correspondientes al estrato suprabasal. Conforme aumenta su grado de diferenciación y maduración estas células tienden a disponerse en los estratos intermedios adquiriendo una morfología poligonal, con un aumento en el tamaño citoplasmático y una disminución en el tamaño del núcleo. Cuando dichas células concluyen su maduración se disponen en el estrato superficial aumentando considerablemente de tamaño y adquiriendo una forma aplanada y un núcleo reducido (Cardinal 2000) (Fig. 3).

La maduración del epitelio escamoso del cuello uterino depende de la presencia de estrógeno por lo que en su ausencia no se produce maduración del epitelio cervical. El epitelio del exocervix puede corresponder al epitelio de origen, formado durante la vida embrionaria, o ser una neoformación metaplásica de los primeros años adultos (Sellors & Sankaranarayanan 2003).

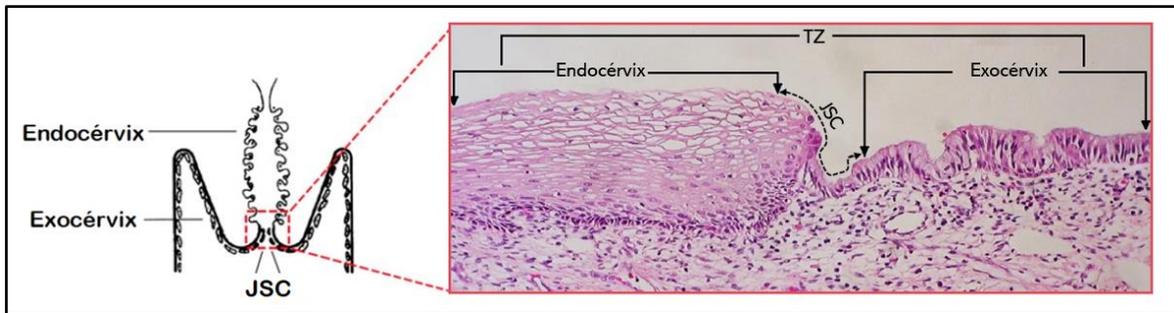


Figura 3. Anatomía del cuello uterino humano. Exocervix compuesto por estratos de células escamosas. Endocervix compuesto por una hilera de células columnares. Células de reserva dispuestas por debajo del epitelio columnar del endocervix JSC: unión escamocolumnar; TZ: zona de transformación (Modificado de Herfs *et al.*, 2012).

1.3.2.1 Metaplasia escamosa epidermoide

El proceso metaplásico hace referencia a la transformación de un tipo celular maduro hacia a otro, siendo en el caso del cérvix la transformación del epitelio columnar (endocervix) por un epitelio escamoso (exocervix) mediante la sustitución de células columnares por células de reserva subcolumnares que proliferan generando estratos de células indiferenciadas que bajo ciertos estímulos adquieren la capacidad de diferenciarse a células escamosas. El primer suceso indicativo de metaplasia escamosa corresponde a la hiperproliferación de células de reserva. En condiciones normales dichas células se disponen por debajo del epitelio columnar, presentándose de manera escasa, muy alejadas unas de otras. Cuando éstas proliferan se hace evidente la formación de una capa de células contiguas dispuestas por debajo del epitelio columnar. Dichas células permanecen indiferenciadas y presentan una morfología similar a la de las células basales del epitelio estratificado (núcleo grande y citoplasma escaso) (Fig. 4a y 4b). Conforme estas células proliferan y se diferencian comienzan a disponerse superficialmente generando varias capas de células (de 4 a 8 hileras) de núcleo más pequeño y citoplasma más abundante y definido, pudiendo observarse la presencia de vacuolas en algunas de ellas. A este punto del proceso metaplásico se le conoce como metaplasia escamosa inmadura (Fig. 4c y 4d). Conforme aumenta el grado de proliferación y diferenciación de estas células se forman estratos verdaderos de células con morfología idéntica a la de las células que conforman el epitelio escamoso original. A este punto del proceso metaplásico se le conoce como metaplasia escamosa madura y si bien, a partir de este punto ya no es posible diferenciar entre ambos epitelios, el epitelio metaplásico puede evidenciarse por la presencia de glándulas endocervicales subyacentes en el estroma, así como por su cercanía a la unión escamocolumnar (Sellors & Sankaranarayanan 2003; Martínez 2017) (Fig. 4e y 4f).

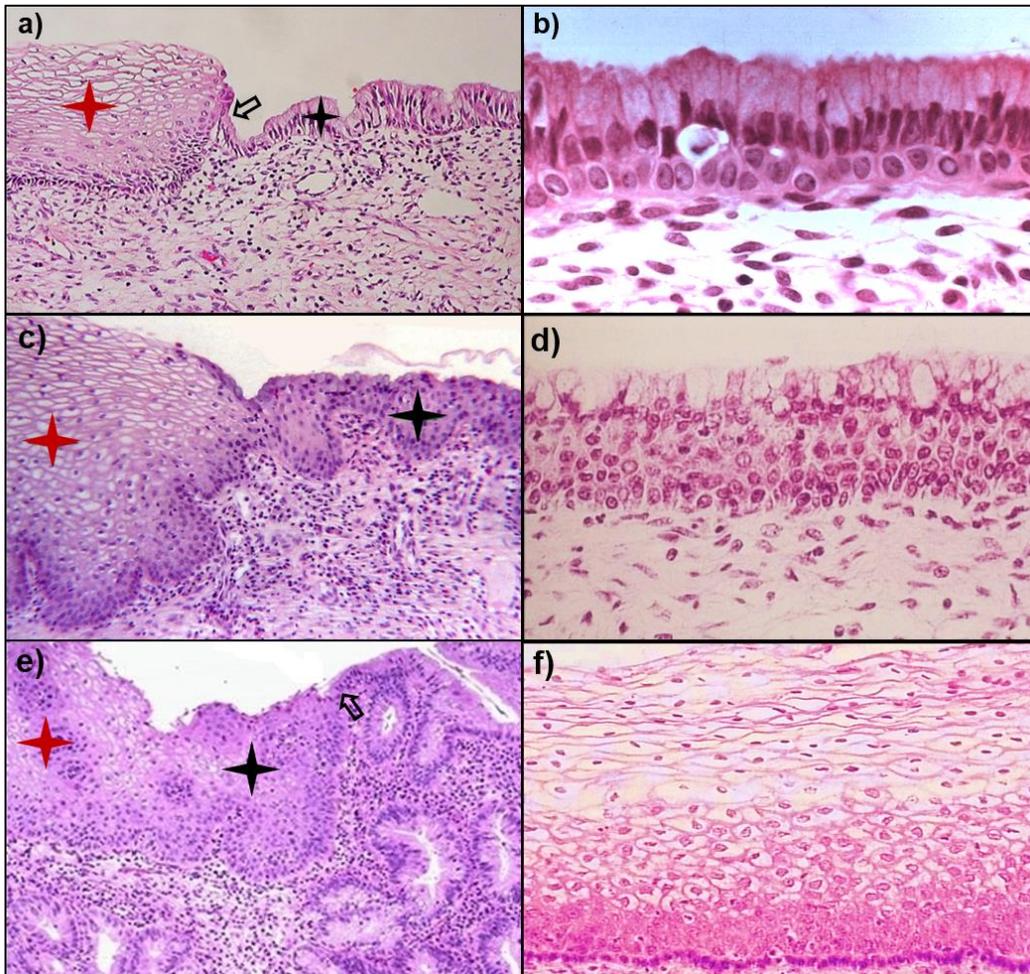


Figura 4. Proceso metaplásico del cuello uterino humano. Hiperproliferación de células de reserva en el epitelio endocervical cercano a la JSC (a y b). Metaplasia escamosa inmadura (c y d). Metaplasia escamosa madura (e y f). Estrellas rojas señalan el epitelio escamoso original. Estrellas negras señalan al epitelio endocervical en proceso metaplásico. Flechas señalan la JSC.

Imágenes tomadas de http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?flag=0&lang=1&Id=00004243&cat=B4

La metaplasia es un proceso de recambio natural regulado por procesos fisiológicos que tienen lugar en etapas específicas de la vida una mujer, sin embargo, puede ocurrir bajo condiciones de estrés como son procesos inflamaciones generados por infecciones, así como una deficiencia de vitamina A, siendo esta ultima una de las condiciones más importantes para la aparición de células de reserva (Martínez 2017).

1.3.3 Zona de transformación

Tradicionalmente la zona de transformación cervicouterina se define como a la región del cérvix donde el epitelio cervical columnar del endocérvix ha sido remplazado por epitelio escamoso metaplásico, estando delimitada por la unión escamocolumnar original (O-JSC

por sus siglas en inglés) y la unión escamocolumnar funcional (F-JSC). Sin embargo, en años recientes dicho término ha sido ampliamente utilizado para hacer referencia a un área restringida del cuello uterino que se encuentra en proceso activo de metaplasia epidermoide y resulta ser de gran importancia ya que casi todas las manifestaciones de CaCU ocurren en esta zona. Dicha región está localizada en el punto donde el epitelio columnar y el epitelio estratificado se encuentran, es decir en la unión escamocolumnar (O-JSC o F-JSC, dependiendo de la edad de la mujer) e incluye a una pequeña porción de epitelio escamoso (epitelio metaplásico inmaduro) y epitelio columnar (epitelio columnar con presencia de células de reserva en hiperproliferación) contiguos a la JSC (Fig. 5).

La JSC no tiene una localización fija, ya que se dispone en diferentes sitios dependiendo de la edad de la mujer. En el momento del nacimiento dicha zona se dispone fuera del orificio cervical y se denomina unión escamocolumnar original. Durante la pubertad el epitelio columnar del endocérnix sale del canal cervical como resultado del alargamiento y desarrollo del cérvix formando un ectoprion fisiológico (eversión del epitelio endocervical hacia la porción vaginal del cuello uterino). Posteriormente como resultado del proceso metaplásico este epitelio columnar es remplazado por un epitelio escamoso dando origen una nueva unión escamocolumnar conocida como unión escamocolumnar funcional (Sellors & Sankaranarayanan 2003) (Fig. 5).

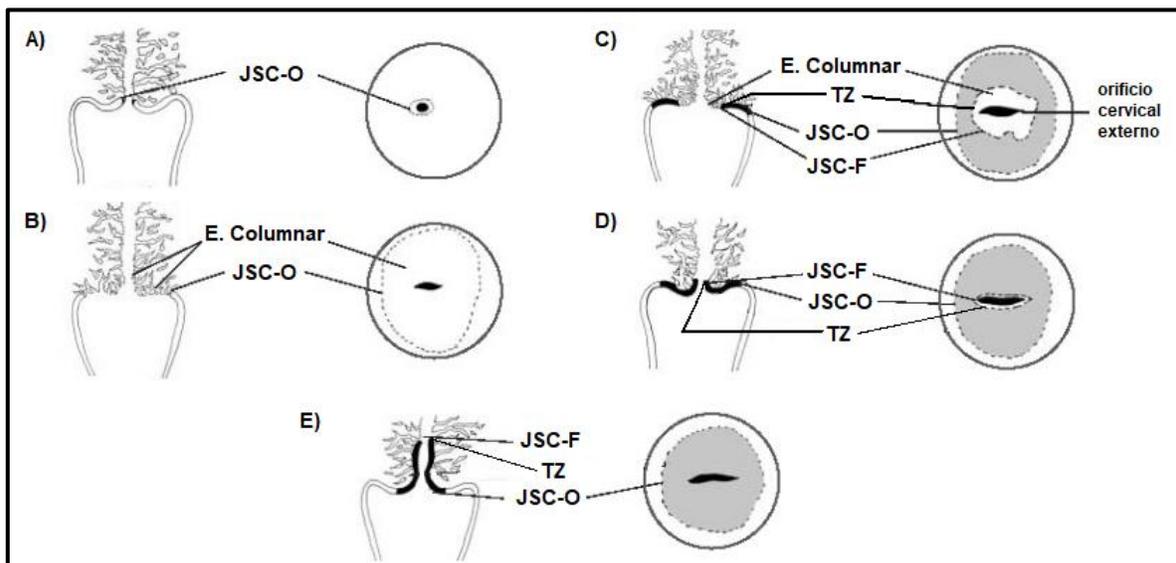


Figura 5. Ubicación de la unión escamocolumnar y la zona de transformación: A) antes de la menarquia; B) tras la pubertad y al principio del período reproductivo; C) hacia los 30 años y D) hacia la menopausia y E) después de la menopausia. JSC-O: Unión Escamocolumnar Original; JSC-F: unión escamocolumnar funcional; TZ: zona de transformación. (Modificado de Sellors & Sankaranarayanan 2003).

En ratones la anatomía del tracto reproductor femenino presenta diferencias importantes con respecto a la anatomía del tracto reproductor femenino en humanos. En ratones el útero posee dos cuernos uterinos, cada uno de los cuales conecta con un cérvix independiente (Quezada 1997). Cada cuerno uterino posee regiones histológicas: un segmento inferior (posterior) que es similar a la vagina y el segmento superior (anterior) que es transicional entre el cuello uterino y el útero. Los epitelios cervical y vaginal son sometidos a cambios cíclicos en espesor y morfología a través del ciclo estral. A pesar de las diferencias presentes en ambas especies el tracto genital es único en dos aspectos. En primer lugar, posee distintos compartimentos funcionales que, aunque continuos, son estructuralmente diferentes. En segundo lugar, los diversos compartimentos sufren cambios cíclicos a lo largo del ciclo reproductivo (ciclo menstrual en humanos y ciclo estral en ratones), presentando además procesos fisiológicos similares en ambas especies (Rendi, 2012; Wira 2015). Procesos metaplásicos son observados en el cérvix de ratones y de manera importante la TZ en ratones actúa de manera similar a la de humanos por lo que el tejido cervical de ratones ha servido como modelo para el estudio del desarrollo de lesiones cervicales y su evolución a cáncer cervical (Fig.6) (Riley *et al.*, 2013).

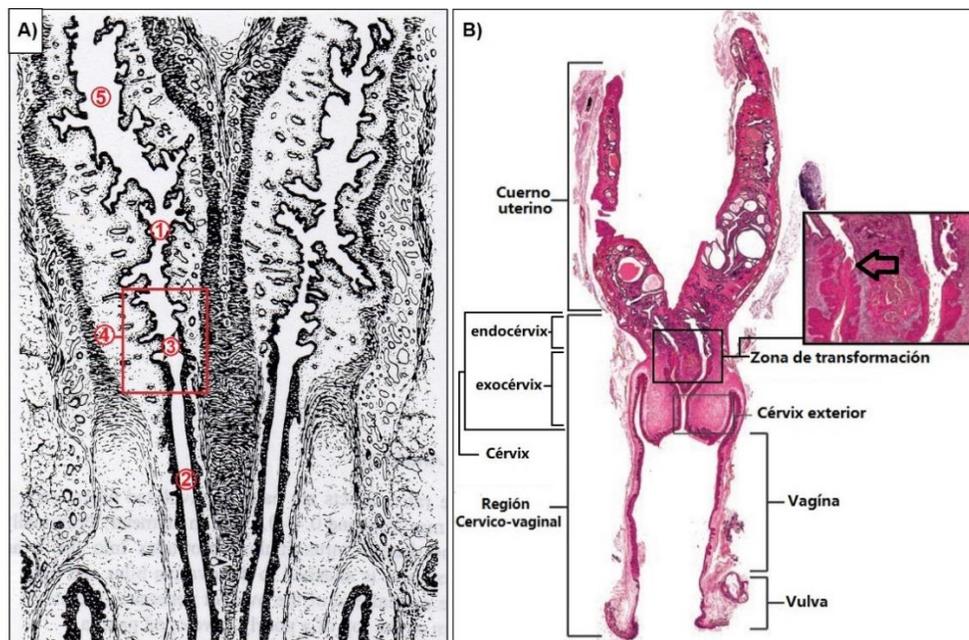


Figura 6. Anatomía de tracto reproductor de ratón. A) Imagen del cuello uterino de un ratón hembra mostrando los diferentes componentes. Epitelio columnar (endocérvix) (1) y epitelio estratificado (2) unidos en una región denominada unión escamocolumnar (3). Zona de transformación (4). Endometrio (5). B) Imagen compuesta de H&E del tracto reproductivo completo de un ratón transgénico K14-HPV tratado con estrógeno durante 6 meses. División del tracto reproductivo en regiones anatómicas. El recuadro muestra un carcinoma escamoso en la zona de transformación. La flecha corresponde a la unión escamocolumnar (Modificado de Riley *et al.*, 2013).

1.4 Virus del Papiloma Humano

El principal factor de riesgo asociado tanto al desarrollo del cáncer, así como a sus lesiones precursoras son las infecciones persistentes por uno o varios tipos oncogénicos del VPH. Mas de 200 tipos diferentes de VPH han identificados, de los cuales 40 tipos han sido asociados a canceres anogenitales (De Villiers, 2013). De acuerdo a su potencial oncogénico y su prevalencia en el cáncer, los VPH se clasifican en VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y VPH de alto riesgo (VPH-AR). El VPH 16 se asocia a aproximadamente el 60% de todos los casos de CaCU, mientras el VPH 18 se asocia entre el 10-20% de los casos totales (Muñoz 2003).

El virus del papiloma humano es un virus perteneciente a la familia *Papilloviridae* caracterizado por la presencia de una cápside icosaédrica que carece de envoltura. Está compuesto por 72 capsómeros dentro de los cuales se encuentra el genoma viral. El genoma del VPH consiste en una doble cadena circular de ADN compuesta de aproximadamente 8000 pb que se pueden dividir en tres regiones funcionales: La región larga de control (LCR por sus siglas en ingles), la región de expresión temprana (E) y la región de expresión tardía (L). La primera región corresponde a una LCR no codificante que presenta sitios de regulación para la replicación y la transcripción del virus (Doorbar *et al.*, 2015); la segunda región (E) corresponde a una región codificante para las proteínas de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7; mientras que la última región (L) codifica para dos proteínas estructurales L1 y L2 (Burd 2003).

Las proteínas E1, E2 y E4 del VPH están implicadas en el ciclo de vida del virus permitiendo que este pueda llevar con éxito infecciones productivas, mientras que las proteínas E5, E6 y E7 del VPH están implicadas en la transformación oncogénica de las células basales del exocérvix. Las proteínas E1 y E2 se encargan de la replicación del virus, las cuales se pierden tras la integración del virus al genoma del huésped permitiendo una mayor transcripción de las proteínas oncogénicas E6 y E7. La proteína E4 participa en la maduración viral, permitiendo la salida del virus al interaccionar con citoqueratinas presentes en los estratos superiores del epitelio estratificado del cérvix. La proteína E5 funciona como potenciador de la acción de las proteínas oncogénicas E6 y E7 cuando las tres se expresan en conjunto; sin embargo, no todos los VPHs tienen una región E5 y la proteína que codifican varía en longitud entre los diferentes tipos de VPH (DiMaio 2013). Por su parte, las proteínas E6 y E7 de los VPH-AR son las responsables de las alteraciones en las células basales y suprabasales del epitelio escamoso que conllevan a la generación

de lesiones intraepiteliales de alto grado (NIC II y III) y a su desarrollo en cáncer, mientras que en las infecciones generadas por VPH-BR, dichas proteínas únicamente tienen capacidad de generar lesiones intraepiteliales de bajo grado (NIC I) que no progresan a cáncer y su contribución directa a la generación de dichas lesiones aún continúa siendo incierta. La proteína E6 de los VPH-AR inhiben la apoptosis y omiten el arresto celular por daños en el ADN mediante su unión con p53 generando su posterior degradación mediante la vía proteasoma ubiquitina (Yi *et al.*, 2013), mientras que la proteína E6 de los VPH-BR se unen débilmente a p53 y no son capaces de degradarlo. Por su parte la proteína E7 de los VPH-AR tiene la capacidad de unirse a la proteína Rb impidiendo su unión con el factor de transcripción E2F, lo cual genera la entrada de las células basales y suprabasales a la fase S del ciclo celular (Hwang *et al.*, 2002). Por otro lado, la proteína E7 tiene la capacidad de inducir a la inestabilidad genómica a través de la desregulación del centrosoma en células basales en proliferación de epitelio estratificado contribuyendo a un fenotipo tumoral (Korzeniewski *et al.*, 2011).

La infección por el VPH requiere células epiteliales que se encuentren en proliferación (células basales). Evidencias sugieren que el VPH puede acceder a las células basales a través de microlesiones en el epitelio cervical o a través de células de reserva de la JSC que posteriormente se diferenciaron a células basales. Después de la infección, se expresan los genes tempranos del VPH E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal. En las capas superiores del epitelio (estrato suprabasal y superficial) el genoma viral se replica aún más, y se expresan los genes tardíos L1 y L2, y E4. Las proteínas L1 y L2 encapsulan los genomas virales para formar viriones de progenie en el núcleo y el virus liberado puede iniciar una nueva infección. Un número desconocido de infecciones por VPH-AR avanza a neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (NIC II y NIC III). La progresión de las lesiones a cáncer microinvasivo e invasivo está asociada con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped, con la pérdida o alteración asociada de E2, y la posterior regulación de la expresión del oncogén E6 y E7 (Fig. 7) (Woodman *et al.*, 2007). Evidencias sugieren que la integración del virus tiene predilección por epitelios metaplásicos escamosos, resultando ser las células troncales de la TZ el blanco de la transformación oncogénica.

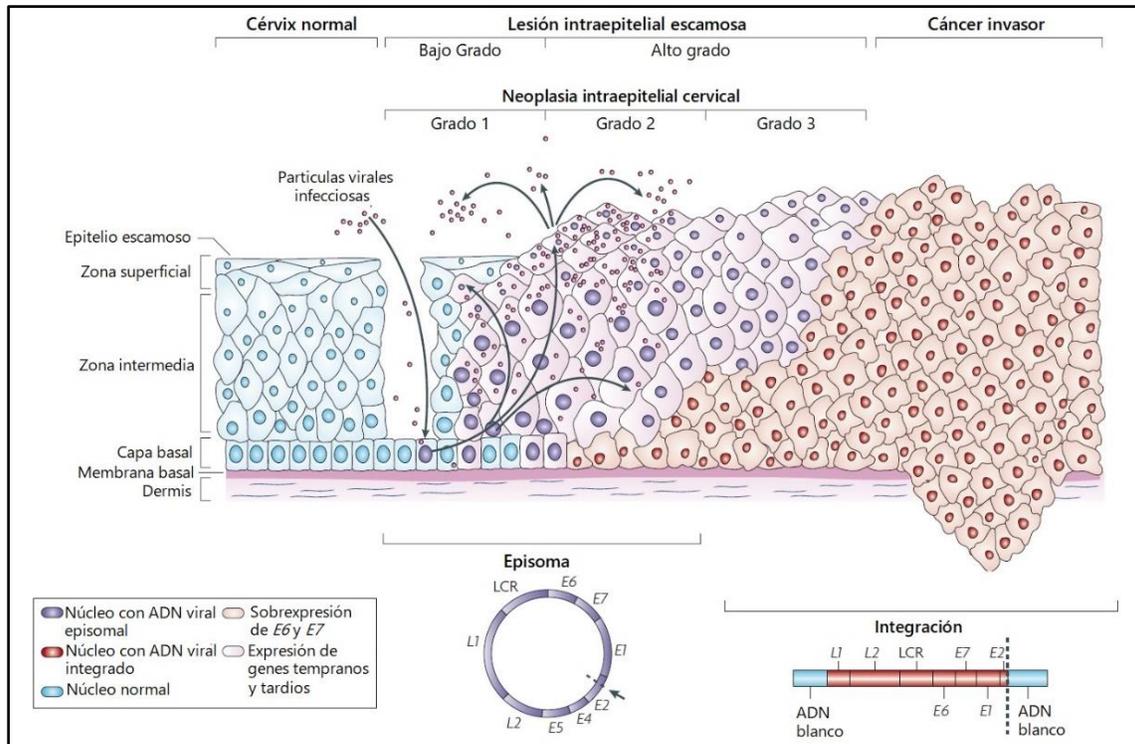


Figura 7. Progresión del cáncer cervical mediada por VPH. Virus oncogénicos infectan a células basales generando lesiones intraepiteliales que con el tiempo progresan a CaCU. ADN viral se presenta en forma episomal en lesiones de bajo grado. ADN viral integrado al genoma del huésped en lesiones de alto grado y cáncer invasor (Modificado de Woodman *et al.*, 2007).

1.5 Células troncales

El cuerpo está formado por diversas poblaciones celulares que se renuevan constantemente para sustituir a células más antiguas, así como células que han sufrido daños como consecuencia de lesiones. Esta renovación celular permite la homeostasis de un organismo y está controlada por una pequeña población de células troncales adultas residentes de dichos tejidos (Mayani 2003). Las células troncales (SC) son células que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en poblaciones celulares especializadas. Dependiendo de su capacidad de diferenciación (potencialidad) se pueden clasificar en células pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. Las primeras sólo se encuentran en el embrión (células troncales embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés)) o bien pueden surgir a partir de la reprogramación celular (células troncales pluripotentes inducidas (iPSC por sus siglas en inglés)), mientras que las dos últimas se encuentran únicamente en organismos adultos (células troncales adultas (ASC, por sus siglas en inglés)). Un ejemplo de las células pluripotenciales son las células troncales embrionarias que se aíslan de la masa interna del blastocisto del embrión y tienen la capacidad de

generar los tres tejidos embrionarios sin incluir tejidos extraembrionarios. Las células multipotentes por su parte son células con la capacidad de formar varios linajes celulares. Un ejemplo de ellas son las células troncales hematopoyéticas que tienen la capacidad de formar tanto el linaje mielóide como el linaje linfóide de la sangre. Si bien las ASC poseen un menor potencial de diferenciación que las ESC, éstas células poseen la capacidad de autorrenovarse durante toda la vida de un organismo a diferencia de las ESC que únicamente participan durante el desarrollo embrionario de un organismo (Chagastelles & Nardi 2011).

Las ASC residen en nichos específicos ubicados en el tejido de origen o cerca de este. Estos nichos les confieren un ambiente propicio para su mantenimiento, es decir, las mantienen en un estado quiescente y bajo ciertos estímulos permiten su proliferación en células indiferenciadas que mantienen el mismo potencial de diferenciación, así como su proliferación en células comprometidas que se diferenciarán y madurarán en células especializadas que realizarán una función específica en el tejido (Morrison & Spradling 2008).

El estudio de las células troncales ha tomado gran importancia en décadas recientes ya que por sus características de autorrenovación y diferenciación han sido ampliamente utilizadas en la medicina regenerativa. Así mismo se ha mostrado que las SC están involucradas en ciertos procesos patológicos incluyendo el cáncer. Evidencias recientes sugieren que el tumor está compuesto por poblaciones heterogéneas de células con diferentes niveles de malignidad y el desarrollo del tumor está impulsado por una pequeña población celular que comparte características de células troncales normales (Wicha *et al.*, 2006). Estas células se denominan células troncales cancerosas (CSC por sus siglas en inglés) y es probable que se generen a partir de células troncales o precursoras normales dentro de los tejidos, después de que se produzcan las mutaciones.

1.6 Células de reserva

1.6.1 Células de reserva como la población putativa de células troncales cervicouterinas

Si bien, en la actualidad la identidad de las células troncales cervicouterinas sigue siendo objeto de especulación, existen fuertes evidencias que postulan a las células de reserva como la población troncal dentro del cérvix. Numerosos estudios evidencian la capacidad que tiene las células de reserva para generar los dos tipos de epitelio que recubren al cérvix.

De manera normal las células de reserva generan epitelio cilíndrico, sin embargo, mediante los procesos metaplásicos que ocurren a partir de la edad reproductiva de la mujer, dichas células son capaces de generar epitelio estratificado (Fluhmann 1954; Tsanova *et al.*, 2006). En 2004 Martens y colaboradores realizaron ensayos inmunohistoquímicos detectando células positivas para p63 y citoqueratina 17 (CK17), dos marcadores putativos de SC cervicales. Las poblaciones correspondientes para células de reserva mostraron fuerte expresión de dichos marcadores. Posteriormente, en el año 2007 este mismo grupo determinó el origen embrionario de las células de reserva proponiendo un modelo jerárquico de células del epitelio del cuello uterino desde etapas embrionarias hasta tejidos adultos (Fig. 8). Ellos observaron la aparición de una población celular por debajo del epitelio columnar Mülleriano a las 20 semanas de desarrollo embrionario, de las cuales aproximadamente el 10% fueron positivas para los marcadores de células de reserva p63 y CK5. Esta pequeña población fue denominada epitelio Mülleriano tipo II. Conforme transcurrió el tiempo embrionario esta población adquirió el marcador CK17 (marcador de células de reserva y células basales exocervicales), sugiriendo que las células Müllerianas son las células troncales embrionarias que dan origen a las células de reserva, así como a las células columnares en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Martens *et al.*, 2007).

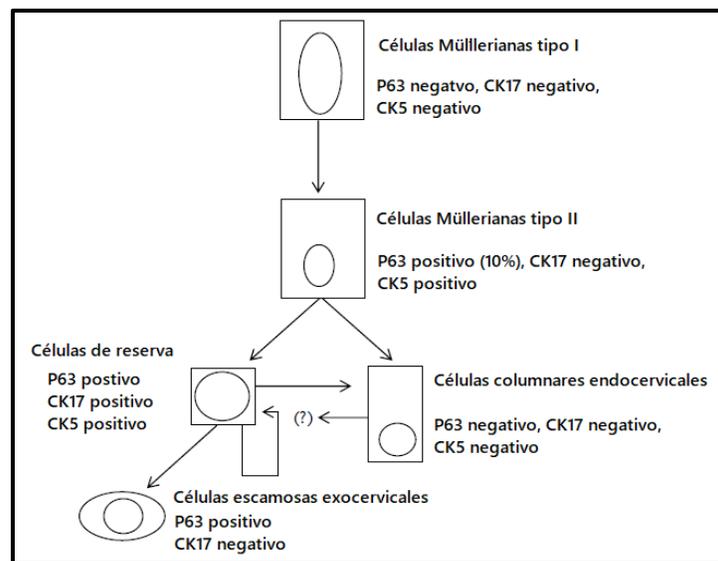


Figura 8. Modelo jerárquico para el linaje de células de cuello uterino humano. Células müllerianas tipo I (p63⁻, CK5⁻ y CK17⁻) revisten las trompas de Müller. A las 20 semanas de gestación se expresa p63 y CK5 en una pequeña fracción de estas células (células müllerianas tipo II). Simultáneamente se observa la aparición de células de reserva bajo estas células columnares tipo II. El fenotipo p63 y citoqueratinas de ambas células es idéntico. Sin embargo, con el aumento de la edad gestacional, las células de reserva expresan adicionalmente la citoqueratina 17. Aproximadamente al mismo tiempo se observa la aparición de verdaderas células endocervicales (p63⁻CK5⁻CK17⁻) (Tomado de Martens *et al.*, 2014).

1.6.2 Células de reserva como células iniciadoras del cáncer cervicouterino

Existe un consenso en suponer que las células iniciadoras del CaCU se tratan de un pequeño grupo de células con características de células troncales que residen en la TZ del cérvix. Esta hipótesis se fundamenta en primer lugar por el hecho de que es en esta zona donde se generan la gran mayoría de lesiones intraepiteliales que evolucionan a cáncer invasor (Foote & Stewart 1948) sugiriendo la existencia de un tipo celular susceptible a la transformación oncogénica en dicha zona. En segundo lugar, esta hipótesis se sustenta en el hecho de que el requisito indispensable para la generación del CaCU son las infecciones por VPHs oncogénicos que logran persistir a través del tiempo. Por lo tanto, la célula iniciadora de la enfermedad debería de ser una célula troncal capaz de persistir en el tejido después de varios años de la infección capaz de transmitir sus características oncogénicas a sus descendientes una vez que esta salga de su estado quiescente y entre en división (López *et al.*, 2012).

Como se mencionó con anterioridad, las células de reserva son la población candidata de células troncales dentro del cérvix y existen evidencias que sustentan su participación en la transformación oncogénica. Evidencias epidemiológicas sugieren que si la integridad de las células de reserva se ve afectada por la infección de virus oncogénicos al inicio del proceso metaplásico, la generación de un epitelio escamoso maduro se verá interrumpida y en su lugar se formará un epitelio metaplásico atípico displásico que, si bien puede regresar a su estado normal o persistir como displasia, en algunas mujeres evolucionará a cáncer a través del tiempo (Jayshree *et al.*, 2009) (Fig. 9). Otra observación importante que permite postular a las células de reserva como la población responsable del inicio del CaCU es la presencia de NICs en focos dispersos a lo largo de la zona de transformación que se intercalan con epitelio normal mediante cambios abruptos. Reich y colaboradores proponen que dicho patrón corresponde a la proliferación clonal de las células de reserva a lo largo de la zona de transformación después de ser infectadas por virus oncogénicos (Reich *et al.*, 2008). Por otro lado, experimentos "*in situ*" demuestran que las células de reserva en tejidos sanos expresan p63 y CK17, dos marcadores característicos de poblaciones de CSC de cérvix (Martens *et al.*, 2004).

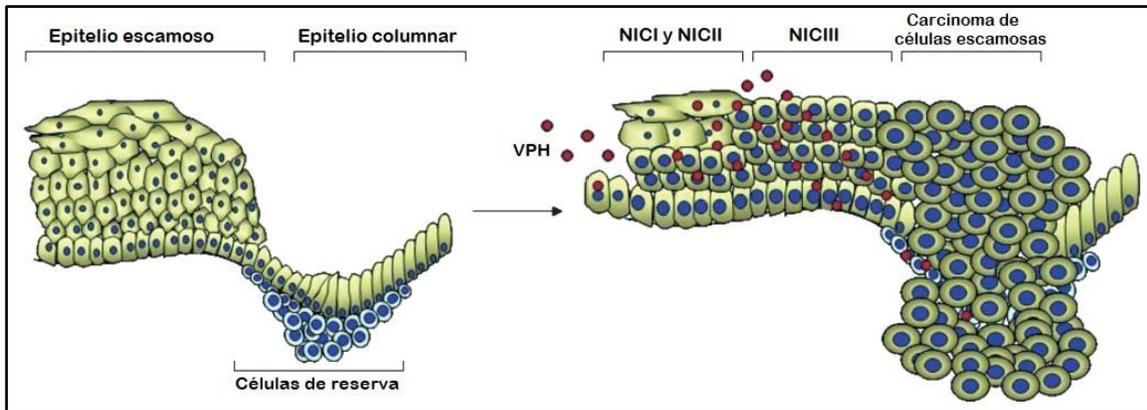


Figura 9. Desarrollo del cáncer cervicouterino por infección de VPHs oncogénicos en las células de reserva de la zona de transformación. NIC: Neoplasia intraepitelial cervical. VPH: Virus del papiloma humano (Modificado de Jayshree *et al.*, 2009).

1.6.3 Marcadores de células troncales cervicales

La identificación y aislamiento de ESC y ASC ha resultado de suma importancia en años recientes. Sus características de autorrenovación y diferenciación las convierten en candidatos potenciales en el ámbito de la medicina regenerativa, además de resultar ser blancos potenciales en la terapia de enfermedades como el cáncer. Sin embargo, una de las principales limitantes en la investigación de las células troncales resulta en su identificación y aislamiento, ya que a pesar de que en la actualidad se conocen varias moléculas de superficie que funcionan como marcadores moleculares de dichas células, raramente estos marcadores son exclusivos de la población de células troncales, resultando necesario el establecimiento de una combinación de marcadores para la identificación y aislamiento de una población celular tipo troncal (Lopez *et al.*, 2012).

En la actualidad se han establecido un pequeño número de marcadores putativos de células troncales cervicales, tanto cancerosas como normales. Uno de los más importantes es CD49f, el cual es una molécula de superficie que ha sido ampliamente utilizada para la identificación de células troncales epiteliales. CD49f también conocida como $\alpha 6$ -integrina es una glicoproteína transmembrana que forma parte de receptores con afinidad por la matriz extracelular. Labouesse y colaboradores en 1996 observaron que su depleción en ratones conduce a la muerte neonatal y a un fenotipo de malformaciones cerebrales y ampollas en la piel. Además, se sabe que Oct4 y Sox2 (factores de transcripción involucrados en la pluripotencia de la ESC) se unen a los promotores de CD49f regulando su expresión (Yu *et al.*, 2012). Dicha molécula se encuentra presente en más de 30 poblaciones de células troncales incluyendo células troncales cancerosas (Krebsbach &

Villa 2017). Numerosos estudios indican una participación importante de esta molécula en la renovación de células troncales. Estos datos indican que CD49f juega un papel importante en el desarrollo embrionario de órganos y en la renovación de células somáticas en tejidos resultando ser así un fuerte candidato como marcador de células troncales cervicales en tejidos adultos.

Recientemente, p63, una proteína perteneciente a la familia de p53, fue establecida como un factor de transcripción importante en el desarrollo embrionario. Ratones nulos de p63 mostraron un desarrollo deficiente de epitelio estratificado, evidenciando su participación en el desarrollo de epitelios en estado embrionario. Así mismo en varios epitelios de tejidos adultos como cérvix, pulmón y próstata se ha mostrado su presencia. En epitelio pulmonar p63 se expresa en las células de reserva bronquiales encargadas de la generación epitelial (Wang *et al.*, 2002), mientras que en próstata su expresión se limita a las células basales del epitelio (Shah 2002). Estos datos sugieren que p63 desempeña un papel en la regulación y maduración del epitelio en la fase adulta y podría ser un marcador de troncalidad del epitelio cervical.

Los patrones de polipéptidos de queratina han sido utilizados para la subclasificación de poblaciones celulares epiteliales. En el 2004 Martens y colaboradores identificaron células de reserva positivas para el marcador CK17. Dichas células de reserva, previamente propuestas como una posible población de células troncales del cérvix, mostraban un patrón de expresión de queratina típico del cual la citoqueratina 17 era prominente y específica.

1.7 Células de la unión escamocolumnar

En el año 2012 Herfs y colaboradores identificaron una nueva población celular ubicada en la zona de transformación cervicouterina, la cual correspondía a un número reducido de células de la JSC con morfología cuboidal completamente diferente a la de las células columnares y escamosas que conformaban el cérvix, así como un perfil de expresión único compartido por células embrionarias (AGR-2, CK7, CD63, MMP7 y GDA). Mediante ensayos inmuno-histopatológicos observaron que los marcadores de esta población celular se expresaban en un alto porcentaje de NICs de alto grado asociados a VPHs oncogénicos y a cáncer, mientras que en NICs de bajo grado asociados a VPHs no oncogénicos dichos marcadores raramente se encontraron presentes, sugiriendo que dicha población podría tratarse de una población diferente a las células de reserva con características de células

troncales que al ser infectadas por virus oncogénicos podrían desencadenar el desarrollo del cáncer (Figura 10).

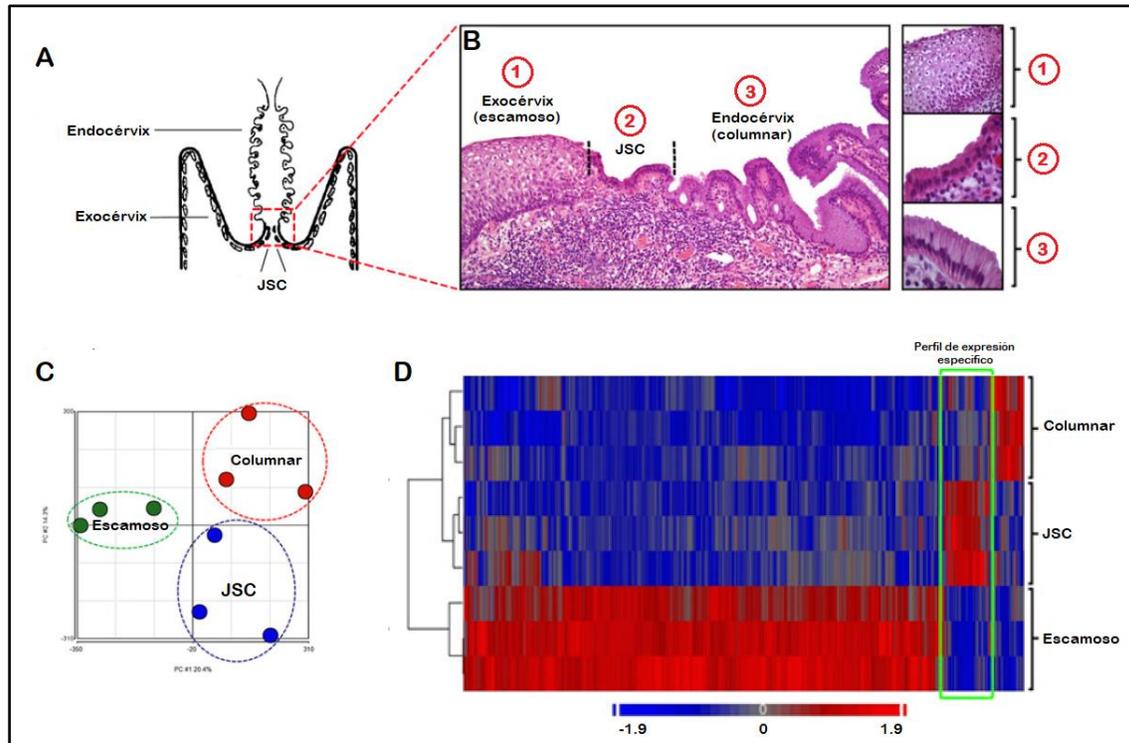


Figura 10. Identificación y análisis transcripcional de células de JSC. (A) Representación esquemática del cuello uterino humano. (B) Histología del cérvix adulto, con células escamosas (1), de unión (2) y columnares (3). (C) Representación bidimensional de un análisis de componentes principales de los datos de microarreglos de expresión derivados de las tres poblaciones celulares. (D) Mapa de calor de los datos de microarreglos de expresión anclados por una comparación entre los tres grupos; La expresión específica de la unión SC está entre corchetes. JSC: Unión escamocolumnar (Modificado de Herfs *et al.*, 2012).

1.8 Vitamina A y ácido retinoico

Los retinoides son un grupo de compuestos químicos que comprenden a la Vitamina A (retinol) y a sus análogas naturales y sintéticos (Sporn & Roberts 1984). El ácido retinoico (RA) o ácido retinoico “all-trans” (atRA), es el metabolito biológicamente más activo de la vitamina A, y está involucrado en una variedad de funciones biológicas que incluyen visión, reproducción, metabolismo, diferenciación tisular de células normales y cancerosas, hemopoyesis, desarrollo óseo, espermatogénesis, embriogénesis, entre otros (Abu *et al.*, 2005). En el caso particular del cérvix cumple importantes funciones al regular la diferenciación celular del epitelio cervical mediante su unión a receptores RAR y RXR (Gudas 1994).

Los animales no son capaces de sintetizar la vitamina A de novo, por lo que ésta debe obtenerse a través de la dieta mediante la ingesta tanto de productos de origen animal, en forma de retinol y de ésteres de retinol, como de origen vegetal en forma de carotenoides (Barua & Furr 1998). El retinol es transportado a su célula blanco y metabolizado a atRA mediante una serie de reacciones enzimáticas que ocurren en el citoplasma de ésta (McLaren & Kraemer 2012). Dentro de la célula blanco, el retinol se une a proteínas de unión de retinol celular (CRBP), mientras que el atRA se une a proteínas de unión al ácido retinoico celular (CRABP) para poder ser transportado al núcleo. Una vez en el núcleo se une a su receptor induciendo a la transcripción de genes blanco. El atRA es el ligando natural para los receptores para ácido retinoico (RAR), mientras que el ácido retinoico 9-cis es el ligando natural del receptor X a retinoides (RXR) (Mark *et al.*, 2006). Los receptores funcionales de ácido retinoico se encuentran en forma de heterodímeros (RAR/RXR) unidos a secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) ubicados en los promotores de los genes blanco. En ausencia de ligando, RAR y RXR reclutan correpresores, tales como el correpresor nuclear (N-Cor) y el receptor de hormona tiroidea (SMRT), que a su vez reclutan deacetilasas de histonas. Este complejo represor induce la condensación de la cromatina regulando a la baja la expresión de los genes diana. En presencia de atRA, las proteínas CRABP facilitan su interacción con RAR o RXR, actuando como coactivadores (Delva *et al.*, 1999) al reclutar proteínas que tienen una actividad de histona acetiltransferasa o una actividad de metil transferasa. Estos complejos multiproteicos inducen la descondensación de la cromatina, permitiendo la expresión de los genes blanco (Xu *et al.*, 1999) (Figura 11A).

1.9 Receptores para ácido retinoico

Los receptores para ácido retinoico forman parte de una superfamilia de proteínas conocidas como receptores nucleares (RNs). Los RNs son factores de transcripción regulados por ligando que participan en diversos procesos celulares incluyendo crecimiento celular, diferenciación celular, desarrollo, apoptosis y homeostasis de epitelios (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Los miembros de esta familia se caracterizan por presentar dominios conservados denominados A, B, C, D, E y F, partiendo del extremo N-terminal al C-terminal. La región A/B comprende el primer dominio de activación transcripcional (AF-1), posteriormente se encuentra la región C que contiene el dominio de unión al ADN (DBD), seguido de la región D que actúa como una estructura bisagra entre la región C y E y está involucrada en los cambios conformacionales de los RNs. La región E contiene el dominio

de unión al ligando (LBD) y un segundo dominio de función de activación transcripcional (AF-2). Algunos RNs presentan una región F relacionada con la modulación de su actividad (Germain *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2014) (Fig.11B).

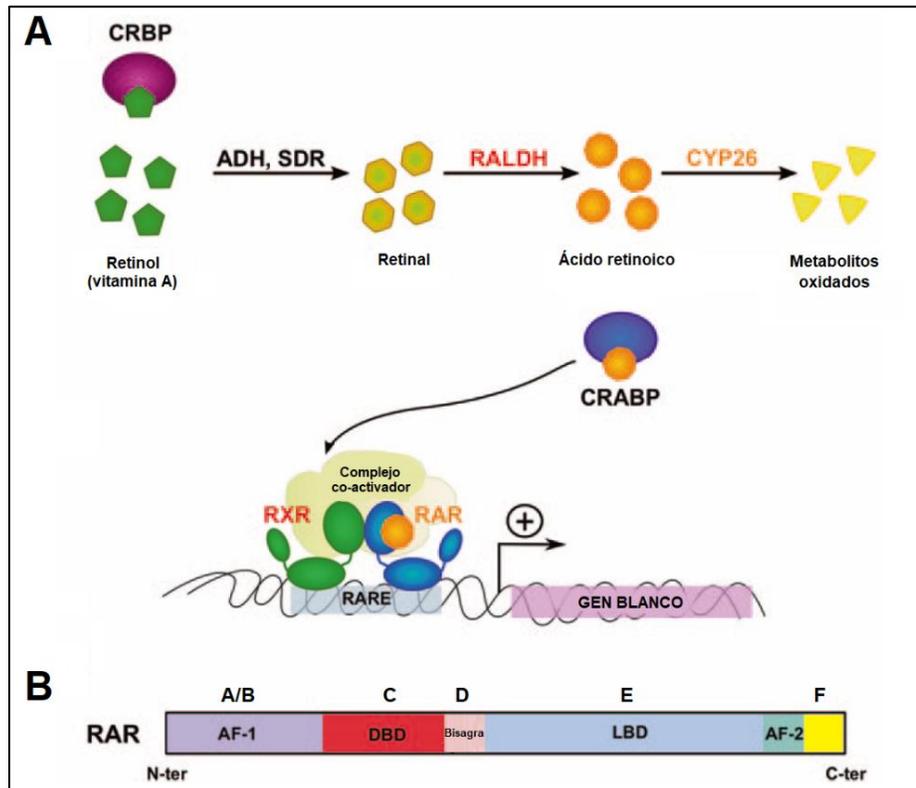


Figura 11. Vía de señalización RA. A) Metabolismo y señalización de la AR. El retinol se convierte en AR en dos pasos, primero es catabolizado a retinal a través de ADH, y posteriormente a AR por RALDH. El AR se transporta al núcleo donde se une al receptor del ácido retinoico (RAR), que forma un heterodímero con el receptor del retinoide X (RXR). Tras la unión del AR, el heterodímero RAR-RXR recluta coactivadores activando la transcripción de los genes diana. AR: ácido retinoico; RAR: receptor para ácido retinoico; RXR: receptores X a ácido retinoico; RARE: elemento de respuesta a ácido retinoico; CRBP: proteína de unión a retinol celular; CRABP: proteína de unión a ácido retinoico celular; CYP26: citocromo P450 subfamilia 26; RALDH: Deshidrogenasa retinaldehído; SDR; deshidrogenasa/reductasa de cadena corta. B) Estructura de la proteína RAR: El dominio de activación transcripcional independiente del ligando N-terminal (AF-1) (A), un dominio de unión al ADN (DBD) que consiste en una región central altamente conservada, que contiene dos módulos de dedos de zinc, una bisagra que permite flexibilidad entre la parte N-terminal y C-terminal de la molécula (D) y un dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) (E), que interactúa con el ligando, lo que permite la dimerización del receptor y además sirve como un dominio de la función de activación transcripcional activada por el ligando (AF-2) (Modificado de Gutiérrez *et al.*, 2014).

Los receptores para ácido retinoico se clasifican en dos subfamilias: los receptores de ácido retinoico RAR y los receptores X de retinoides RXR. los receptores de la familia RAR son codificados por los genes α , β y γ , generando varias isoformas de cada uno que incluyen a los receptores RAR α 1 y RAR α 2, RAR β 1, RAR β 2, RAR β 3 y RAR β 4, RAR γ 1 y RAR γ 2. Del

mismo modo existen tres genes del receptor RXR, que codifican para RXR α , RXR β y RXR γ (Mark *et al.*, 2006).

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).

1.10 Ácido retinoico y RAR β en cáncer

Una de las principales funciones del ácido retinoico es regular los procesos de diferenciación celular que ocurren en tejidos adultos y tejidos embrionarios por lo que su deficiencia está asociada con la dediferenciación y el desarrollo del cáncer. Varios estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado la actividad antiproliferativa de los retinoides y su uso potencial en el tratamiento de varios tipos de cáncer incluyendo al cáncer de cuello uterino (Abu *et al.*, 2005). Evidencias indican que el ácido retinoico actúa como un inhibidor de la carcinogénesis al bloquear la promoción de células ya iniciadas o transformadas (Niles 2000) mediante tres mecanismos: inducción de apoptosis, inhibición en la proliferación de células anormales (detención del crecimiento) e inducción de diferenciación de células anormales indiferenciadas (Abu *et al.*, 2005).

De todas las diferentes isoformas de los receptores de retinoides, el receptor del ácido retinoico β (particularmente la isoforma 2) parece tener el papel dominante como supresor de tumores y su pérdida está asociada con la progresión del tumor. La regulación por una disminución de RAR β 2 se ha demostrado en varios tumores, incluidos los cánceres de pulmón, mama, cabeza y cuello, y carcinomas cervicales (Ivanova *et al.*, 2002). RAR β ha mostrado jugar un papel importante en el desarrollo de CaCU. Reportes indican que las mujeres que exhiben una disminución en la expresión de RAR β tienen tres veces más probabilidades de desarrollar CaCU (Gariglio *et al.*, 2009). En condiciones normales la zona de transformación cervicouterina exhibe altos niveles de expresión de RAR β , viéndose considerablemente disminuida en lesiones intraepiteliales de alto (NIC III) y bajo grado (NIC I y NIC II) (Xu *et al.*, 1999).

1.11 Ácido retinoico y RAR β en la diferenciación celular

El AR juega un papel importante en el desarrollo embrionario. Su importancia fue reconocida por primera vez en 1930 cuando se demostró que la deficiencia de la vitamina

A materna estaba asociada a varios defectos (Hale, 1937; Mason, 1935). Posteriormente se demostró la presencia de un gradiente de concentración de AR en el eje anteroposterior de embriones de ratones. Concentraciones crecientes de AR son observadas en regiones posteriores viéndose disminuidas hacia regiones anteriores en embriones de ratones al séptimo día de gestación (Sakai et al., 2011). Dicho gradiente es regulado por la síntesis y degradación diferencial de AR en diferentes partes del embrión. Los genes Hox (genes implicados en la morfogénesis y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario temprano) presentan receptores de ácido retinoico en sus “enhancers” y se ha mostrado que la administración de AR en embriones de ratones puede hacer que estos genes se expresen en regiones atípicas (Conlont y Rossant 1992). Por otro lado, se ha demostrado que el AR es capaz de inducir la diferenciación celular de células pluripotentes de carcinoma embrionario, así como de ESC (Soprano et al., 2007). Se ha demostrado que el AR puede inducir la diferenciación de ESC en una gran cantidad de diferentes tipos de células, incluidas neuronas, células gliales, adipocitos, condrocitos, osteocitos, epitelio corneal, músculo esquelético, músculo liso y cardiomiocitos ventriculares (Eiges & Benvenisty 2002; Rohwedel et al., 1999; Schuldiner et al., 2000). Dichos hallazgos ponen en evidencia la importancia del AR en la diferenciación ESC.

Por otro lado, el AR promueve la diferenciación celular de SC presentes en epitelios adultos, actuando como un potente regulador del crecimiento y diferenciación celular de células epiteliales normales. El AR ha mostrado ser un regulador crítico de la neurogénesis embrionaria y se ha demostrado que juega un papel importante durante la neurogénesis en adultos in vivo (Jacobs et al., 2006). Así mismo, la deficiencia de retinoides ha sido fuertemente asociada al desarrollo de metaplasia epidermoide, una condición que epidemiológicamente ha sido fuertemente asociada al desarrollo de lesiones cervicales que preceden al desarrollo del CaCU. Ponnampertuma y colaboradores en 1999 observaron que una dieta deficiente de vitamina A en ratones generaba zonas con abundantes metaplasias escamosas en el cérvix, precedidas de la hiperproliferación de células de reserva (células troncales putativas), las cuales son células no diferenciadas que tienen la capacidad de generar los dos tipos de epitelio cervical bajo ciertos estímulos (epitelio columnar en condiciones normales y epitelio escamoso mediante procesos de metaplasia epidermoide) (Fig. 13). Recientemente un estudio realizado en un modelo murino deficiente del receptor β para ácido retinoico ($RAR\beta^{L-/L-}$) mostró resultados similares. Los ratones deficientes generaron zonas metaplásicas cervicales con un aumento considerable de células de reserva (Albino et al., 2016).

El ratón condicional NE75 RAR β L-/L- (RAR $\beta^{L-/L-}$) es un modelo murino deficiente del receptor β para ácido retinoico que ha sido ampliamente utilizado para estudiar la deficiencia de retinoides. Se caracteriza por la delección de dos exones del gen RAR β . Para la obtención de este ratón se realizaron cruza previas de ratones con diferentes características genéticas. Inicialmente se obtuvieron ratones RAR β L2/L2, caracterizados por la presencia de sitios *loxP* que flanqueaban a los exones 9 y 10 del gen RAR β en ambos alelos. Estos ratones fueron cruzados con una cepa que expresa la Cre recombinasa en células germinales (CMV-Cre $tg/0$) y los animales resultantes fueron heterocigotos para RAR β +/L-. El alelo L- no contiene los exones 9 y 10 que codifican la mayoría de los aminoácidos del dominio de unión al ligando, generando un corrimiento en el marco de lectura. La cruce de los ratones RAR β +/L- generaron una cepa RAR $\beta^{L-/L-}$. Esta cepa a su vez 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 Citomogalovirus (Fig. 12). El ratón RAR $\beta^{L-/L-}$ posee un fondo genético, resultado de la cruce entre ratones 129/Sv y C57BL/6J (Chapellier *et al.*, 2002). Dichos ratones son homocigóticos para la mutación condicional, por lo que las cruza posteriores no generan ratones heterocigotos o silvestres (Serafín *et al.*, 2012; Albino *et al.*, 2016).

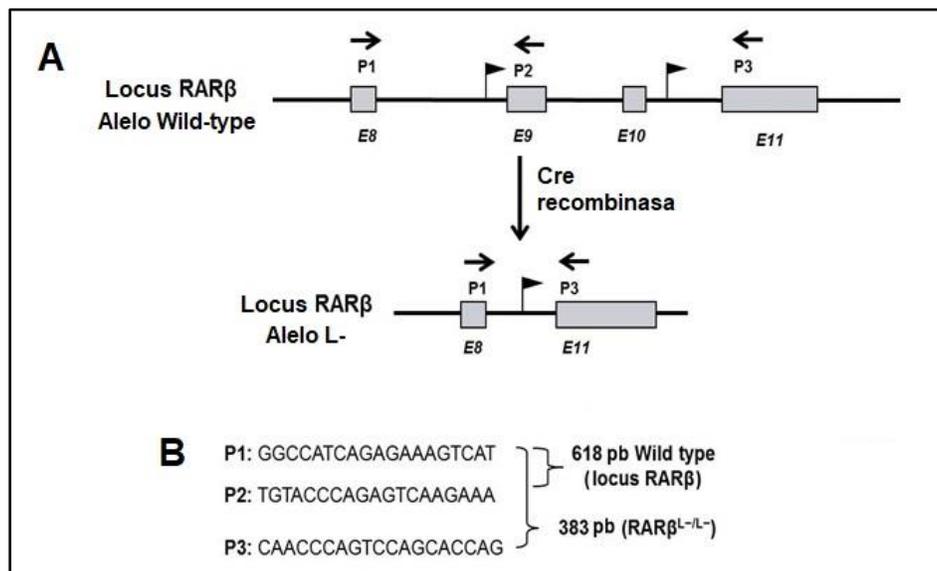


Figura 12. Alteración dirigida al alelo RAR β en los ratones condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$. A) Alelo “wild type” del locus RAR β con los elementos para la construcción del alelo RAR $\beta^{L-/L-}$. Alelo L- del locus RAR β después del corte en los exones 9 y 10 realizado por la acción de CRE recombinasa. Los rectángulos representan los exones 8-11 (E8-E11). Las banderas representan los sitios *LoxP*. Flechas indican la localización de los primers (P1, P2 y P3) para la genotipificación.

1.12 Organoides

Recientemente se describió el establecimiento de cultivos celulares en tercera dimensión conocidos como organoides. Los organoides son estructuras tridimensionales conformadas por diversas poblaciones celulares que se agrupan y se disponen de forma ordenada asemejando la anatomía y función de un órgano o tejido (Kretzschmar & Clevers 2016). Poseen enormes ventajas en comparación de los cultivos en dos dimensiones ya que estos han mostrado ser genéticamente estables y tienen la capacidad de recapitular histológicamente la malignidad de un padecimiento. Por ejemplo, organoides de intestino se han aplicado para el modelado de enfermedades genéticas, como la fibrosis quística y han conservado las anormalidades genéticas presentes en dicha enfermedad (Huch *et al.*, 2015). Otro ejemplo importante es el cultivo de organoides establecidos a partir de CSC. Se ha observado que dichos organoides al ser xenotrasplantados recapitulan la histopatología del tumor parental del que derivaron conservando las lesiones genéticas y patrones de expresión génicos del mismo. Por lo anterior el cultivo de organoides representa una posibilidad de pruebas de fármacos *in vitro* para la predicción de la respuesta al tratamiento clínico en pacientes (Sato & Clevers 2015).

El cultivo de organoides se genera a partir de la expansión de células troncales. Estas pueden ser células ASC o ESC. La formación de estos cultivos está sustentada en la capacidad de autorrenovación y diferenciación que presentan las células troncales. Por un lado, la capacidad de autorrenovación permite su expansión y mantenimiento, mientras que la capacidad de diferenciación permite generar los diferentes linajes celulares que constituyen al órgano o tejido *in vivo*. Esto debido a los estímulos a los que son sometidas las células (factores de crecimiento que regulan vías de señalización implicadas en el mantenimiento y diferenciación de las SC *in vivo*) (Sato & Clevers 2016).

El aislamiento y la caracterización de las células troncales del intestino adulto, así como la identificación de la participación de la vía de señalización WNT en procesos de autorrenovación y diferenciación de células troncales permitieron la generación del primer cultivo de organoides a largo plazo. La estimulación de células troncales con factores de crecimiento R-spondina 1, factor de crecimiento epidermal y Noggin, así como el suministro de un andamio conformado por componentes de la matriz extracelular tales como colágeno y laminina que impidieran la muerte celular por anoikis dieron lugar al primer cultivo de organoides procedente del epitelio intestinal adulto. Los organoides obtenidos incorporaron muchas de las características del tejido *in vivo*, compartimentalizándose en

estructuras semejantes a las criptas intestinales presentes en el epitelio intestinal adulto, y se conformaron a su vez por células trocales, células de paneth, células caliciformes, células enteroendocrinas y enterocitos (Sato & Clevers 2009) (Figura 13).

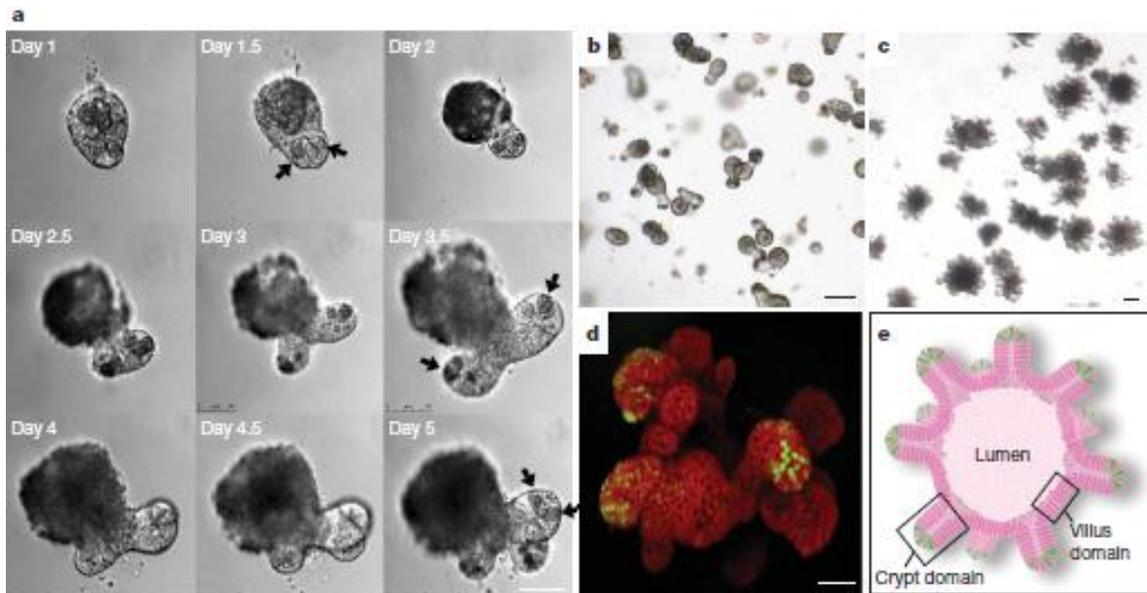


Figura 13. Establecimiento del sistema de cultivo de la cripta intestinal. a) Crecimiento de organoide a partir de una cripta intestinal. Presencia de células de paneth con gránulos en el fondo de la cripta (flechas). a-c) Las criptas aisladas individuales forman eficientemente organoides dentro de los 14 días (día 5 (b) y día 14 (c)). d) Reconstrucción tridimensional después de 3 semanas de cultivo. Las células madre Lgr5-GFP1 (verdes) están localizadas en la punta de los dominios similares a criptas. Contraintinción: ToPro-3 (rojo). e) Representación esquemática de un organoide, que consiste en un lumen central revestido por un epitelio similar a vellosidades y varios dominios circundantes similares a criptas. Barra de escala: 50 μ m (Modificado de Sato & Clevers 2009)

Las modificaciones de los factores de crecimiento en el medio de cultivo de organoides intestinales original permitieron el establecimiento de cultivos organoides epiteliales de varios otros órganos gastrointestinales humanos y murinos, incluidos la vesícula biliar (Lugli *et al.*, 2016), hígado (Huch *et al.*, 2013, 2015), páncreas (Boj *et al.*, 2015), y estómago (Barker *et al.*, 2010). Posteriormente, al emplear métodos similares, se lograron generar cultivos organoides a partir de otros tejidos epiteliales no gastrointestinales como el esófago (DeWard *et al.*, 2014), trompa de Falopio (Kessler *et al.*, 2015), glándula mamaria (Linnemann *et al.*, 2015), próstata (Chua *et al.*, 2014), entre otros. Así mismo modificaciones en la fuente de las células troncales utilizadas para el cultivo de organoides ha permitido generar organoides del mismo tejido, pero con diferentes características. En el caso de los organoides de intestino se han establecido cultivos organoides a partir de tres fuentes celulares diferentes como lo son células epiteliales puras (células individuales como células troncales Lgr5+ o agregados celulares como criptas intestinales), trozos de tejido picados

que contienen células tanto epiteliales como mesenquimales y células troncales pluripotentes que se diferencian hacia linajes celulares deseados (Fig. 14).

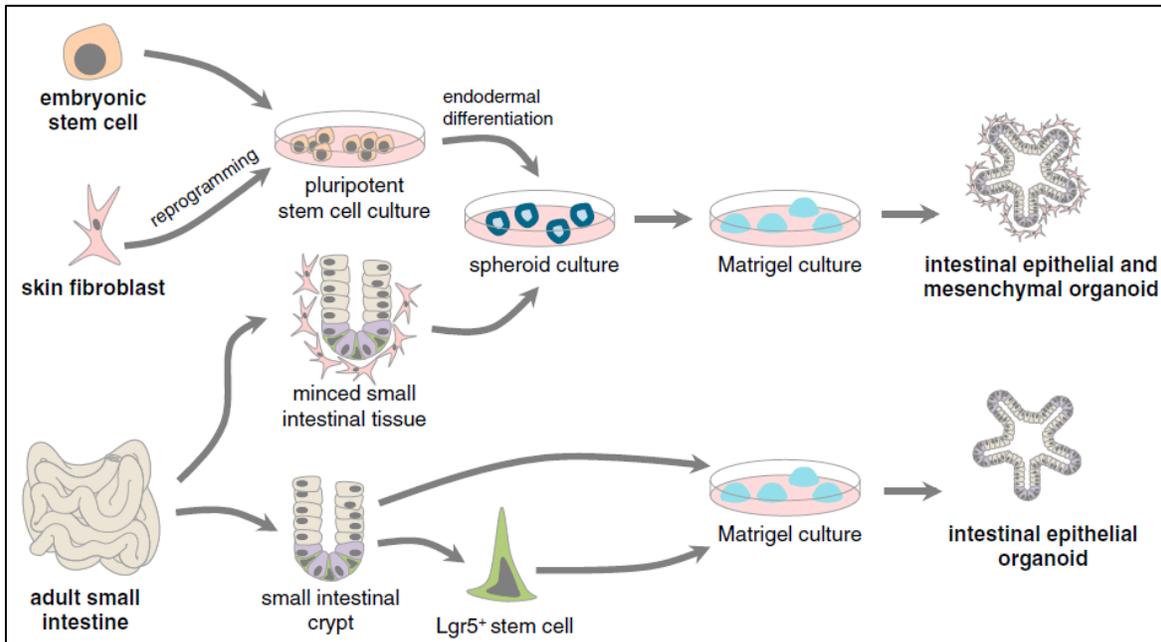


Figura 14. Diferentes vertientes para la generar organoides. El cultivo de organoides se pueden generar a partir de células troncales pluripotentes, trozos de tejido picado o células troncales adultas (Modificado de Kretschmar & Clevers 2016).

2. ANTECEDENTES

Los organoides son cultivos celulares que surgen a partir de la autorrenovación y diferenciación *in vitro* de células troncales dando como resultado la formación estructuras tridimensionales conformadas por diversas poblaciones celulares agrupadas y dispuestas de forma ordenada, asemejando la anatomía y función de un órgano o tejido. El cultivo de organoides representa enormes ventajas sobre los cultivos en dos dimensiones, ya que han mostrado ser genéticamente estables, además de tener la capacidad de recapitular histológicamente la malignidad de un padecimiento, por lo que resultan modelos ideales para el estudio de enfermedades complejas como lo es el cáncer (Kretschmar & Clevers 2016). En México, el CaCU representa el tercer lugar de ocurrencia de nuevos casos de cáncer, así como el tercer lugar de muertes en mujeres en edad reproductiva. Recientemente se ha determinado un fenotipo extendido para las células troncales

cancerosas cervicales, este fenotipo muestra un aumento de la expresión de CK-17, p63 +, All +, CD49f +, junto con una mayor actividad de la Aldehído deshidrogenasa (ALDH) en cultivos tridimensionales enriquecidos en CSC cervicales (Ortiz *et al.*, 2016). Interesante las células de reserva de la zona de transformación comparten dos de estos marcadores (p63 y CK17), y ya que se ha observado que las CSC comparten marcadores con sus contrapartes sanas es probable que las células de reserva correspondan a las poblaciones troncales dentro del cérvix. Por otro lado, los retinoides y particularmente el ácido retinoico han mostrado tener un papel fundamental en la homeostasis de epitelios. Una de las principales funciones del ácido retinoico es regular los procesos de diferenciación celular que ocurren en tejidos adultos y tejidos embrionarios por lo que su deficiencia está asociada con la dediferenciación y el desarrollo del cáncer (Abu *et al.*, 2005). Los retinoides ejercen sus funciones a través sus receptores RARs y RXRs. RAR β ha mostrado jugar un papel importante en el desarrollo de CaCU. Reportes indican que las mujeres que exhiben una disminución en la expresión de RAR β tienen tres veces más probabilidades de desarrollar CaCU (Gariglio *et al.*, 2009) y así mismo se ha observado que la deficiencia de RAR β en un modelo murino (RAR $\beta^{L-/L-}$) genera zona metaplásicas con hiperproliferación de células de reserva (Albino *et al.*, 2016), condición que podría enriquecer a las poblaciones potenciales (células troncales y células progenitoras) para la formación de organoides.

Teniendo en cuenta estos hechos, investigar las características y aislar células troncales cervicales resulta ser el primer paso para establecer y describir un método para diferenciar estas células troncales que permita generar organoides de cérvix. Nuestro planteamiento nos permitirá generar un modelo que proporcione información valiosa para la investigación de las células que pensamos probablemente dan origen a esta patología, es decir las células de reserva.

El objetivo de esta investigación es identificar a las poblaciones de células tipo troncales potenciales para la formación de organoides mediante la inmunodetección de los marcadores putativos de troncalidad (p63, CK17 y CD49f) en el tejido cervical de modelos murinos. Así mismo este estudio pretende determinar si la deficiencia del receptor β en ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ puede enriquecer las poblaciones de células troncales y progenitoras favoreciendo con ella la formación de organoides.

4. HIPÓTESIS

La deficiencia del receptor β para ácido retinoico permitirá enriquecer las poblaciones de células troncales y células progenitoras en ratones $RAR\beta^{L-/L-}$.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES:

Caracterizar las poblaciones de células tipo troncales del cérvix de ratones normales (C57BL/6J) y ratones deficientes del receptor β para el ácido retinoico ($RAR\beta^{L-/L-}$).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar las poblaciones de células tipo troncales presentes en el epitelio cervical de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ mediante la inmunodetección de CD49f, CK17 y P63 (marcadores de células troncales putativas) en la zona de transformación cervicouterina.
- Identificar células de la JSC en ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ mediante la inmunodetección de AGR2 en la zona de transformación cervicouterina.
- Medir el patrón de diferenciación del epitelio cervical de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ mediante la identificación de las citoqueratinas características del epitelio estratificado CK5 y CK10.
- Determinar los niveles de proliferación celular en el epitelio cervical de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ mediante la identificación de Ki67.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

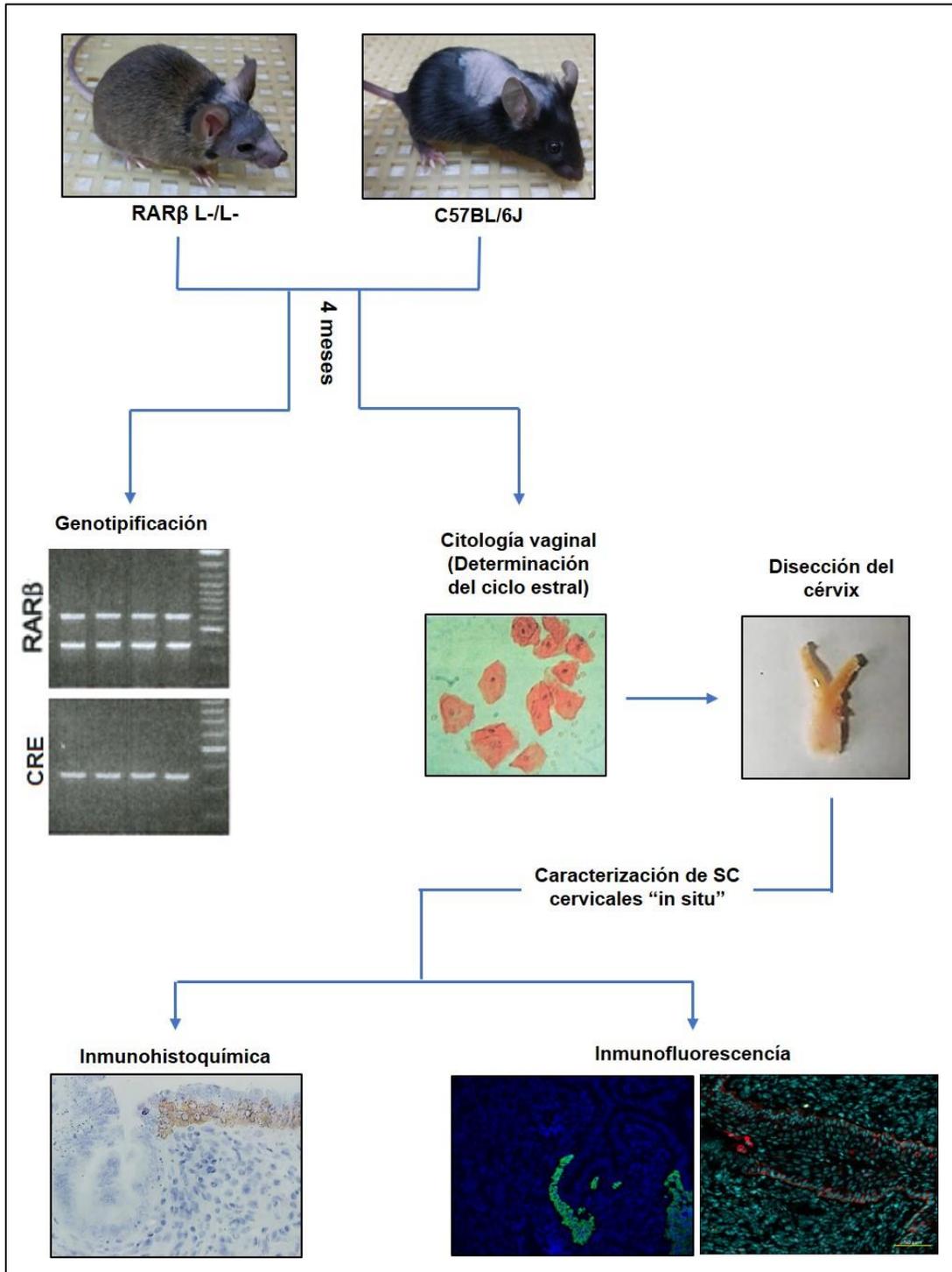


Figura 15. Estrategia experimental. Genotipificación de ratones hembra C57BL6J y RARβ^{L-/L-} de 4 meses de edad mediante la amplificación de los genes RARβ y CRE recombinasa. Obtención del tejido cervical de los ratones C57BL6J y RARβ^{L-/L-} que se encontraran en fase de estro del ciclo estral. Obtención de cortes histológicos para la caracterización "in situ" de poblaciones de células troncales mediante ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

7. MÉTODO

7.1 Población de estudio

Se utilizaron ratones hembra de 3-4 meses de edad de las cepas $RAR\beta^{L-/L-}$ y C57BL/6J, estos últimos utilizados como control. Ambas cepas fueron generadas en la Unidad de Producción y Experimentación de animales de laboratorio (UPEAL; protocolo 212/04) del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco (NOM-062-200-1999)

7.2 Genotipificación:

Se realizó la genotipificación de ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ y C57BL/6J mediante la identificación de los genes $RAR\beta$ (en estado normal y transgénicos) y Cre recombinasa mediante una PCR en punto final.

7.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir del tejido obtenido de la oreja de los ratones a genotipificar. El tejido se cortó de la base de la oreja con ayuda de un orador y se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. El tejido se incubó a 45°C durante toda la noche en 300 μ l de solución de lisis (NaCl 4M, TRIS 1M, SDS 10M, EDTA 8M) que contenía proteinasa K. Pasado este tiempo se adicionaron 150 μ l de Plant DNAzol® Reagent (ThermoFisher Scientific) a la solución obtenida y se dejó incubar durante 7 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional. Posteriormente se adicionaron 150 μ l de cloroformo y se centrifugó a 11,500 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y se agregaron 250 μ l de etanol absoluto frio. La solución obtenida se mezcló y se incubó en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 150 μ l de una solución compuesta por 600 μ l de Plant DNAzol® Reagent y 450 μ l de etanol absoluto. Esta mezcla se dejó incubar durante 5 minutos y se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 150 μ l de etanol al 80%. La solución obtenida se centrifugó a 7500 rpm durante 7 minutos retirando la mayor cantidad de sobrenadante. La pastilla obtenida se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ l de H₂O estéril libre de DNAsas. La muestra de ADN se dejó hidratar toda la noche a 4°C para su posterior análisis.

Por último, se procedió a la cuantificación del ADN mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de la marca Thermo Scientific.

La integridad del ADN se evaluó mediante la electroforesis de un gel de agarosa al 1% bajo las condiciones de 90 V durante 45 minutos. Para ello en cada pozo se colocó la mezcla del volumen correspondiente a 100 ng/μl ADN más buffer de carga 1X (Invitrogen) que contenida colorante Red Gel.

7.2.2 PCR

Se realizó la amplificación por PCR de las regiones correspondientes al alelo “wild type” (618 pb) y al alelo mutado (383 pb) del gen $RAR\beta$, así como la amplificación de una región de 400 pb correspondiente al gen de la Cre recombinasa en las muestras de ADN obtenidas previamente. Los primers utilizados fueron los siguientes (tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los primers utilizados para la genotipificación de los ratones C57BL6J y los ratones $RAR\beta^{L-L}$

Gen	Amplicón	Secuencia de primers	Pares de bases
RARB	Alelo Recombinado	P1 (5'-TGTACCCAGAGTCAAGAAA-3') P2 (5'- GGCCATCAGAGAAAGTCAT-3')	383
	Alelo WT	P1 (5'-TGTACCCAGAGTCAAGAAA-3') P3 (5'-CAACCCAGTCCAGCACCAG-3')	618
CRE	Cre recombinasa	Fw (5'-ATTTGCCTGCATTACCGGTC-3') Rv (5'-ATCAACGTTTTCTTTTCGG-3')	400

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μl que contenían 50 mM de $MgCl_2$, 100 mM de primer Fw, 100 mM de primer Rv, buffer 1X, 100 mM de dNTPs, 0.2 U de Taq polimerasa y 1 μg/μl de ADN. El volumen final de la reacción se ajustó con agua ultrapura libre de DNAsas.

Los productos de amplificación de cada muestra fueron visualizados mediante una electroforesis. Para ello en cada pozo se colocaron 4 μl de cada muestra más 1 μl de buffer de carga (Invitrogen) que contenía colorante Red Gel ADN. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2% a 90 V durante 45 minutos.

7.3 Caracterización de células troncales cervicales “*in situ*”

Se caracterizó el epitelio cervical de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ mediante la inmunodetección “*in situ*” de las poblaciones celulares positivas para los marcadores putativos de células troncales cervicales CD49f, CK17 y p63, así como mediante la inmunodetección de AGR2, un marcador putativo de troncalidad presente en células de la JSC del cérvix humano. Así mismo se determinó el patrón de diferenciación del epitelio cervical de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ mediante la inmunodetección de dos citoqueratinas de diferenciación del epitelio estratificado, CK5 y CK10. Los niveles de proliferación celular en el tejido epitelial de ambos ratones fueron determinados mediante ensayos inmunohistoquímicos contra la proteína Ki67. La inmunotinciones de las proteínas evaluadas se realizaron en el cérvix de tres ratones diferentes de cada cepa, realizando tres repeticiones biológicas por individuo.

7.3.1 Obtención de muestras

Se extrajo el cérvix de ratones hembra C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ de 3-4 meses de edad que se encontraran en la fase de estro del ciclo estral. La determinación del ciclo estral se realizó mediante lavados vaginales con PBS. Las muestras obtenidas se colocaron en portaobjetos y posteriormente fueron teñidas con hematoxilina y eosina para su visualización en el microscopio (campo claro).

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. El cérvix se extrajo cortando desde la base de la vagina hasta la parte superior de los cuernos uterinos. El tejido obtenido se lavó dos veces con PBS para retirar el excedente de sangre y grasa. Las muestras utilizadas para inmunohistoquímica (IHC) fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 48 horas. Las muestras utilizadas para inmunofluorescencia (IF) se preservaron en medio de inclusión Tissue-Tek® a -70°C.

7.3.2 Inclusión de tejidos en parafina y cortes histológicos

Posterior a la fijación de los tejidos en PFA al 4% (durante 48 horas), estos fueron deshidratados mediante su incubación en alcoholes de graduación creciente hasta etanol al 100%. Para ello los tejidos se colocaron dentro de cassettes de plástico y se sumergieron en etanol al 70%, 80%, 90% 1, 90% 2, 100% 1 y 100% 2 respectivamente, cada cambio durante 1 hora. Previamente a la inclusión en parafina los tejidos fueron incubados en una solución intermedia miscible tanto en alcohol absoluto como en parafina, esto con la

finalidad de favorecer la penetración de la parafina en los espacios del tejido ocupados inicialmente por el agua. Para ello, los tejidos se incubaron en una solución compuesta por etanol-xilol al 50-50%, seguida de la incubación en xilol al 100% 1 y xilol al 100% 2, cada cambio durante 1 hora. Para la inclusión en parafina, los tejidos fueron transferidos a parafina líquida (Paraplast Embedding Media, McCormick Scientific, USA) dentro de un horno a 60°C. Se realizaron tres cambios de parafina cada uno de una hora. Pasado este tiempo los tejidos se colocaron en moldes de aluminio que fueron rellenos con parafina líquida y se dejaron enfriar y solidificar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se realizaron cortes de tejido cervical de 3 µm de grosor con ayuda de un microtomo. Los cortes obtenidos se colocaron en laminillas electrocargadas y se fijaron a 60°C durante 15 min.

7.3.3 Inmunohistoquímica para las proteínas CK5, CK10, p63, AGR2, Ki67

Los cortes se desparafinaron mediante la implementación de calor y el uso de solventes. Para ello los cortes se sometieron a una temperatura de 65°C (temperatura de fusión de la parafina) durante 15 minutos, seguido de su pasaje por xilol 1 y xilol 2 durante 3 minutos, etanol al 100% 1, etanol al 100% 2 y etanol al 70% durante 5 minutos. Posteriormente los tejidos se rehidrataron haciendo dos lavados con PBS Tween 20 al 0.1% durante 5 minutos. La recuperación antigénica se realizó mediante la incubación de los tejidos en un buffer de citratos durante 10 minutos a una temperatura de 120°C dentro de una olla de presión. Los tejidos se dejaron enfriar durante 30 minutos. Pasado este tiempo se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena mediante la incubación de los tejidos en la solución de bloqueo de la peroxidasa (Bio BS U.S.A) durante 30 minutos en una cámara húmeda (este paso se realizó dos veces). Los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron durante 40 minutos con la solución de bloqueo general compuesta por 2% de SFB, 50 mM de glicina, 0.05% de Tween 20, 0.1% de Triton X-100 y 0.1% de BSA diluido en PBS (Rosas *et al.*, 2016). Para el marcaje de las proteínas los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-p63 (orb11214), anti-AGR2 (11275-1-AP), anti-CK5 (GTX61583) y anti-CK10 (ab76318) toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron diluidos con una solución potenciadora ASE compuesta por 10 mM glicina, Tween 20 al 0.05%, Triton X-100 al 0.1% y peróxido de hidrogeno al 0.1% en PBS (Rosas *et al.*, 2016). Pasado el tiempo de incubación, los tejidos se lavaron con PBS para retirar el excedente de anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario y el polímero (MACH 3 Rabbit HRP Polymer Detection, BIOCARE) durante 10 minutos respectivamente. Los tejidos se lavaron

con PBS Tween 20 al 0.05% para retirar el excedente de anticuerpo secundario. La detección de la proteína se realizó mediante la incubación del tejido con la solución reveladora (cromógeno Diaminobenzidina (DAB) diluida en el buffer de Diaminobenzidina (1:100)). Una vez detectada la señal la reacción se detuvo con PBS. Los tejidos fueron teñidos con hematoxilina y se dejaron secar completamente. Las laminillas se montaron con medio de montaje Permount (Fisher Chemical, catálogo: 15820100) para poder ser visualizadas en el microscopio. Los niveles de expresión de las proteínas evaluadas se determinaron mediante la cuantificación de la intensidad de señal de las imágenes generadas utilizando el software ImageJ.

7.3.4 Inmunofluorescencia para las proteínas CD49f, CK5, CK17

Las muestras obtenidas previamente se colocaron en moldes que contenía resina para preservar tejidos en congelación (Tissue-Tek®). Los moldes se colocaron en hielo seco. Una vez que éstos solidificaron se realizaron cortes de tejido en criostato, de 3 µm de grosor y se colocaron en laminillas electrocargadas. Los cortes se colocaron en acetona durante 15 minutos para su fijación. Para la tinción con anticuerpos los tejidos se hidrataron con PBS Tween 20 al 0.5% durante 3 minutos (2 veces). Posteriormente los tejidos se bloquearon mediante su incubación con solución de bloqueo (Rosas *et al.*, 2016) durante 30 minutos. Para el marcaje de las proteínas los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (PE Rat anti-human CD49f (#555736), CK17 Alexa 647 (sc-393002), CK5 (#GTX61583) diluidos en solución potenciadora ASE (Rosas *et al.*, 2016) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda protegida de la luz. Pasado este tiempo los tejidos se lavaron 3 veces con PBS Tween 20 al 0.1% para retirar el excedente de anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 minutos. Para la visualización de los núcleos los tejidos fueron incubados con DAPI durante 30 minutos. Por último, los tejidos se montaron con medio de montaje DAPCO y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX5). La colocalización de proteínas fue visualizada con ayuda de un microscopio confocal (Zeiss LSM 800). Los niveles de expresión de las proteínas evaluadas, así como su nivel de colocalización fueron determinados mediante el análisis de los archivos ortogonales.

8. RESULTADOS

8.1 Genotipificación de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L/L-}$

Se realizó la genotipificación de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L/L-}$ mediante una PCR punto final. Se detectó una banda de 618 pb correspondiente al gen RAR β en estado silvestre (“wild type”) en todos los individuos genotipificados, mientras que la banda correspondiente al alelo recombinado del gen RAR β (383 pb) únicamente se observó en los ratones RAR $\beta^{L/L-}$ (Fig. 16A). La presencia de la Cre recombinasa (400 pb) se detectó exclusivamente en los ratones RAR $\beta^{L/L-}$ (Figura 16B).

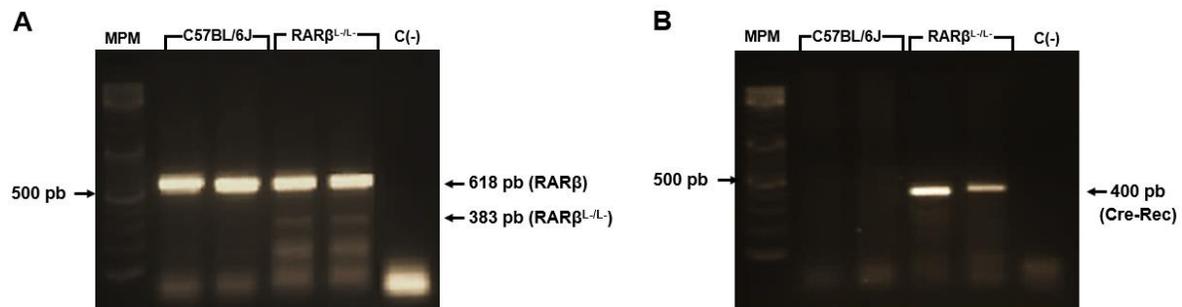


Figura 16. Genotipificación de ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L/L-}$. Expresión del gen RAR β en estado silvestre (618 pb) en los ratones C57BL/6J (A). Expresión del gen RAR β en estado silvestre (618 pb) y estado mutado (383 pb) (A) en presencia de la Cre recombinasa (400 pb) (B) en los ratones deficientes del receptor β para ácido retinoico (RAR $\beta^{L/L-}$). MPM: marcador de peso molecular. C(-): control negativo.

8.2 Las poblaciones de células de reserva de la unión escamocolumnar y células de reserva endocervicales aumentan en los ratones condicionales RAR $\beta^{L/L-}$

Con la finalidad de determinar el efecto de la deficiencia del receptor β para el ácido retinoico sobre las poblaciones de células de reserva cervicouterinas se realizaron tinciones inmunohistoquímicas contra CK5 en el cérvix de ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L/L-}$. CK5 es una queratina que se expresa en células de reserva del endocérvix y en células basales del exocérvix. Nuestros resultados muestran un enriquecimiento 3 veces mayor en las poblaciones de células de reserva ubicadas en la zona de transformación en los ratones condicionales. En los ratones RAR $\beta^{L/L-}$ (n=3) se observa una hilera de células de reserva distribuidas a partir de la JSC hacia una porción del endocérvix cercana a la misma zona (33 células aproximadamente), mientras que en los ratones C57BL/6J (n=3) dichas células se restringen a la JSC cervicouterina (10 células aproximadamente). Así mismo, se

observan regiones metaplásicas con hiperproliferación de células de reserva positivas para CK5 (32 células aproximadamente) únicamente en los ratones $RAR\beta^{L/L}$ (Figura 17).

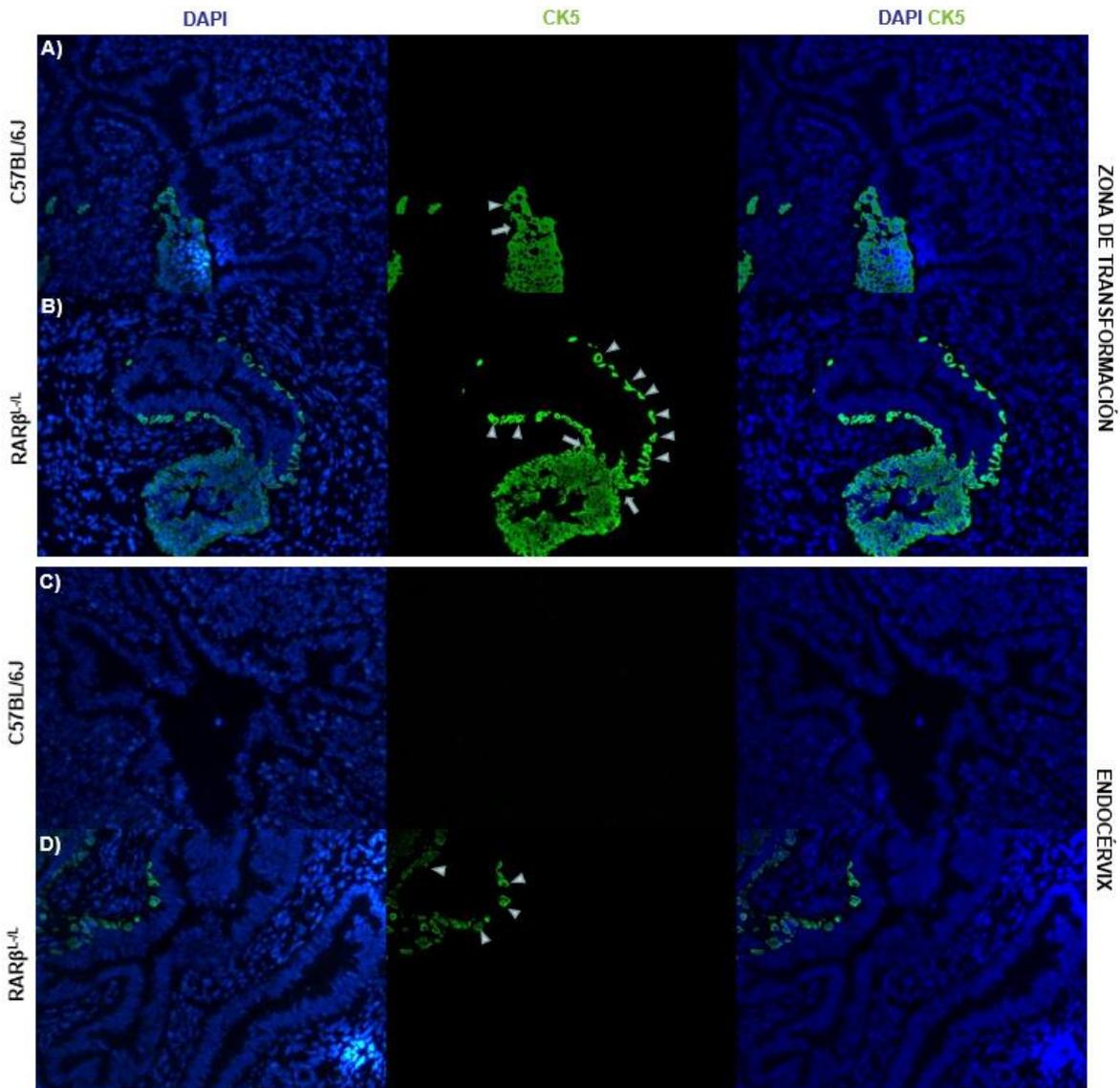


Figura 17. Expresión de CK5 en la zona de transformación y endocérnix de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L/L}$. Se observa un enriquecimiento de células de reserva subcolumnares positivas para el marcador CK5 en la JSC (B) de los ratones $RAR\beta^{L/L}$ en comparación de la JSC de los ratones C57BL/6J (A). No se observa presencia de células de reserva en los ratones (C). Hiperproliferación de células de reserva subcolumnares en el endocérnix de los ratones $RAR\beta^{L/L}$ (D). Flechas blancas señalan la JSC. Puntas de flecha señalan células de reserva CK5 positivas. Señal verde: CK5. Señal azul: DAPI. Aumento: 10X.

8.3 Células de reserva y células basales que expresan los marcadores putativos de células troncales cervicales CD49f, CK17 y p63, aumentan en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$.

Se realizaron inmunohistoquímicas contra CD49f, CK17 y p63 en el cérvix de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ con la finalidad de determinar las poblaciones positivas para los marcadores putativos de células troncales cervicales en condiciones normales y en condiciones de deficiencia de retinoides. Un mayor número de células positivas para dichos marcadores fueron observadas en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (Figs. 18-22).

8.3.1 Incremento en los niveles de expresión de la proteína p63 en células de reserva de la unión escamocolumnar, células de reserva endocervicales y células basales exocervicales en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$

Las inmunotinciones contra p63 revelan que en condiciones normales (ratones C57BL/6J (n=3)) la expresión de esta proteína se restringe a células de reserva ubicadas en la JSC, así como a células basales y algunas células suprabasales del endocérvix mostrando un aumento considerable en su nivel de expresión en condiciones de deficiencia de retinoides (ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (n=3) (Figura 18).

Se observó un número muy reducido de células de reserva positivas para p63 en la JSC de los ratones C57BL/6J presentando una tinción muy tenue correspondiente a un bajo nivel de expresión de la proteína (28.40 UA (unidades arbitrarias) (Fig. 18A y 18G), mientras que en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ se observó un aumento en la cantidad de células de reserva positivas a dicho marcador, así como un aumento en sus niveles de expresión (52.93 UA) (Fig. 18B y 18G).

La expresión de la proteína p63 en el exocérvix de los ratones C57BL/6J se observó en aproximadamente el 50% de las células basales, así como en baja proporción de células suprabasales del epitelio estratificado, mientras que en los ratones condicionales $RAR\beta^{L-/L-}$ dicha expresión se vio aumentada, abarcando una mayor proporción de células basales (90% aprox.) y células suprabasales que se extiendan hacia los estratos más superficiales del exocérvix (Fig. 18D). Así mismo los niveles de expresión de p63 en dichas células fueron mayores en el exocérvix de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (58.1 UA) a comparación del exocérvix de los ratones C57BL6J (27.65 UA) (Figura 18G).

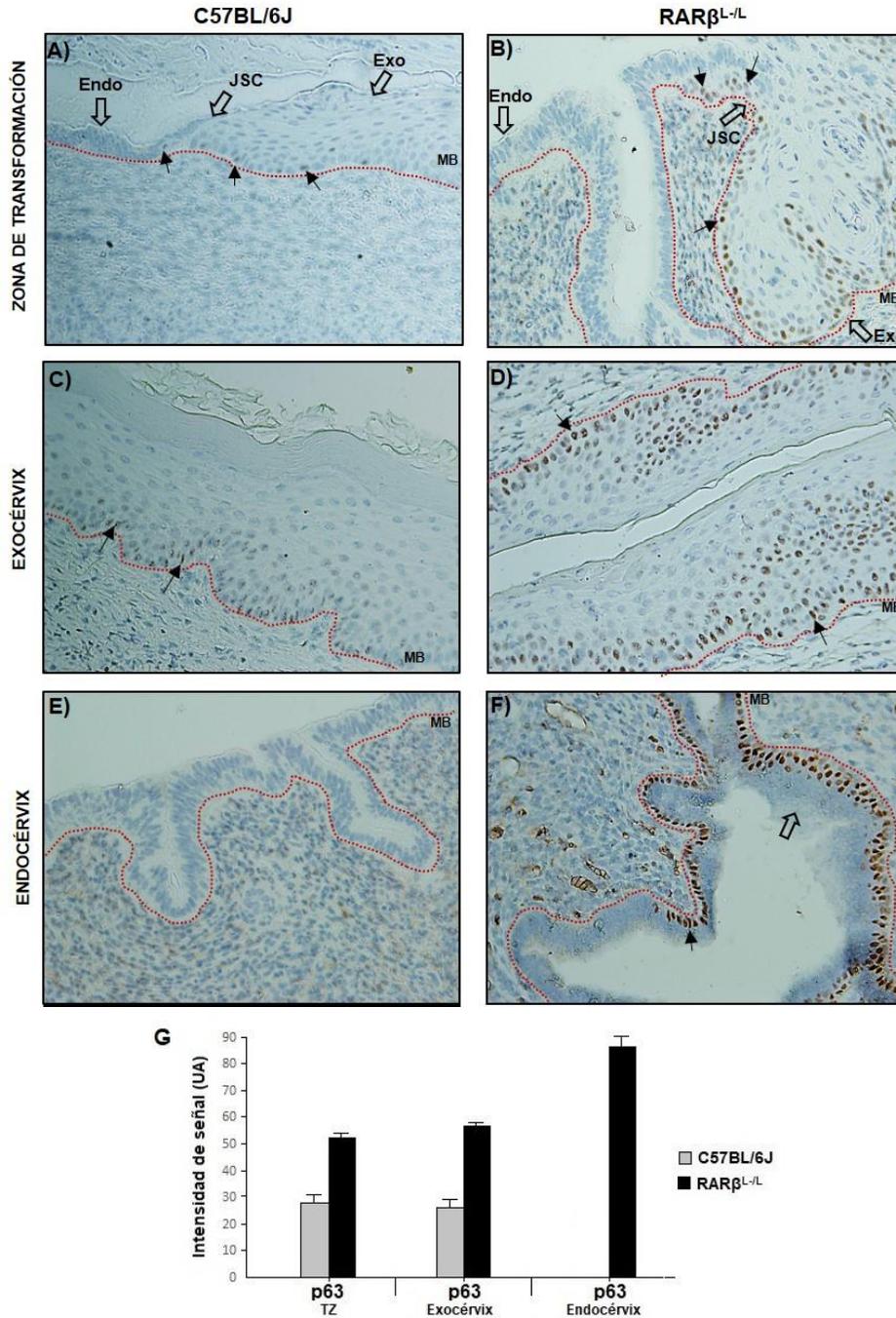


Figura 18. Expresión de p63 zona de transformación, exocervix y endocervix de ratones C57BL/6J y RAR β ^{L-L}. Enriquecimiento de células de reserva y células basales positivas para la proteína p63 en la JSC (B) y exocervix (D) de los ratones RAR β ^{L-L} a comparación de la JSC (A) y exocervix (C) de los ratones C57BL/6J. Endocervix sin presencia de células de reserva en los ratones C57BL6J (E). Metaplasia epidermoide con presencia de células de reserva p63 altamente positivas en el endocervix de los ratones RAR β ^{L-L} (F). Tinción: Hematoxilina. Flechas negras indican señal positiva para el marcador p63. JSC: unión escamocolumnar. Endo: endocervix. Exo: exocervix. MB: membrana basal. Aumento: 20X. Niveles de expresión de p63 en la zona de transformación (ZT), endocervix y exocervix (G) UA: unidades arbitrarias.

Con respecto a lo observado en el endocérvix, se detectaron focos metaplásicos a lo largo del epitelio endocervical de los ratones condicionales $RAR\beta^{L/L-}$. Dichos focos metaplásicos estaban formados por zonas con hiperproliferación de células de reserva altamente positivas para p63, así como por zonas metaplásicas con epitelio metaplásico inmaduro con presencia de células basales positivas para p63 (87.18 UA) (Fig. 18F). En los ratones C57BL/6J únicamente se observaron zonas metaplásicas en el epitelio endocervical adyacente a la JSC (zona de transformación) con una expresión mínima de p63, presente solo en algunas células de reserva. El epitelio endocervical alejado de la JSC no presentó expresión de p63 en el cérvix de los ratones C57BL/6J (Figura 18E y 18G).

8.3.2 Incremento en la expresión de CD49f en células de reserva de la unión escamocolumnar, células de reserva endocervicales y células basales exocervicales en los ratones $RAR\beta^{L/L-}$

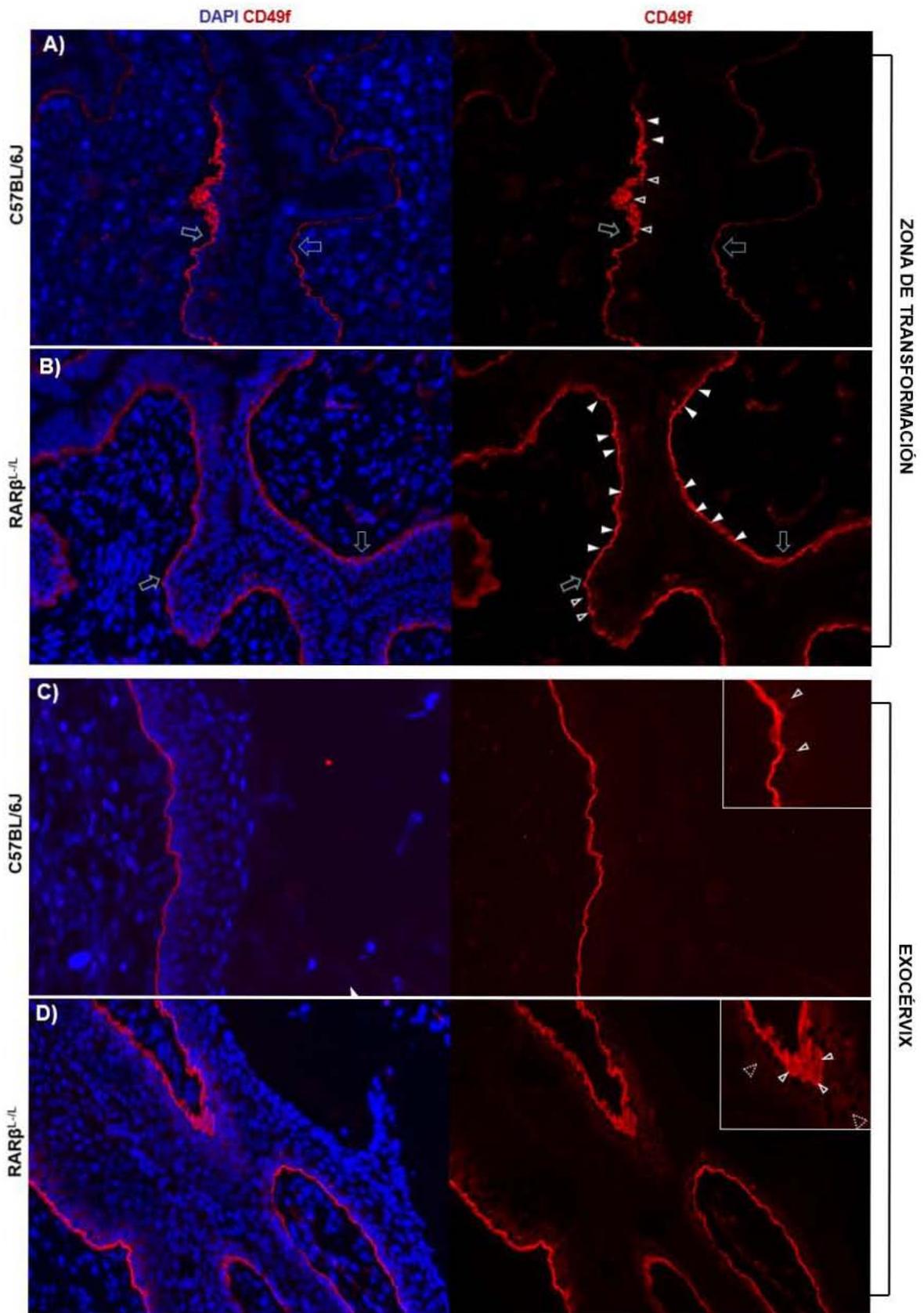
La expresión del marcador de troncalidad CD49f se observó a lo largo de la membrana basal de todas las células epiteliales, mostrándose como una línea continua que separaba el epitelio cervical del estroma. Dicho marcador se distribuyó además alrededor de la membrana celular de las células de reserva de la JSC, así como alrededor de las células basales endocervicales en el cérvix de ambos ratones, observándose en mayor porción en los ratones deficientes para el receptor β para ácido retinoico.

La zona de transformación de los ratones C57BL/6J (n=3) mostró poblaciones de células altamente positivas para CD49f que incluían células de reserva subcolumnares y células escamosas de morfología pequeña restringidas a una pequeña región de la JSC, así como regiones de la JSC con escasa expresión de CD49f y sin presencia de células de reserva (Fig. 19A), mientras que la zona de transformación del cérvix de los ratones $RAR\beta^{L/L-}$ (n=3) mostraron amplias regiones metaplásicas formadas por una hilera de células de reserva subcolumnares distribuidas desde la JSC hasta regiones más alejadas del endocérvix (Fig. 19B). Los niveles de expresión de CD49f fueron mayores en la zona de transformación de los ratones $RAR\beta^{L/L-}$ (17.71 UA) a comparación de la zona de transformación de los ratones C57BL6J (13.45 UA) (Figura 19G).

La expresión de CD49f en el exocérvix de los ratones C57BL/6J se observó únicamente en el estrato basal del epitelio, presentando un nivel de expresión de 11.29 UA (Fig. 19C), mientras que en los ratones $RAR\beta^{L/L-}$ dicho marcador se expresó tanto en células basales como suprabasales, observándose altamente expresado tanto en la membrana como en el

citoplasma de algunas células basales (Fig. 19D) presentando un nivel de expresión de 27.84 UA, dos veces y media mayor al observado en los ratones “wild type” (Fig. 19G).

Con respecto al endocérvix las células columnares del epitelio cervical únicamente presentaron expresión de CD49f en la cara basal que permanecía en contacto con la membrana basal. Dicho marcador se expresó escasamente en la membrana basal del epitelio endocervical de los ratones C57BL/6J presentando un nivel de expresión de 6.03 UA (Fig. 19E y 19G) mientras que en los ratones $RAR\beta^{L/L-}$ su nivel de expresión aumentó dos veces (13.4) (Fig. 19F y 19G). Únicamente se observaron zonas metaplásicas endocervicales en los ratones deficientes del receptor β para ácido retinoico observándose proteína secretada por debajo de las células de reserva que dieron origen al epitelio metaplásico inmaduro. La expresión de este marcador no se observa en células indiferenciadas ubicadas por encima de las células de reserva (Fig. 19F).



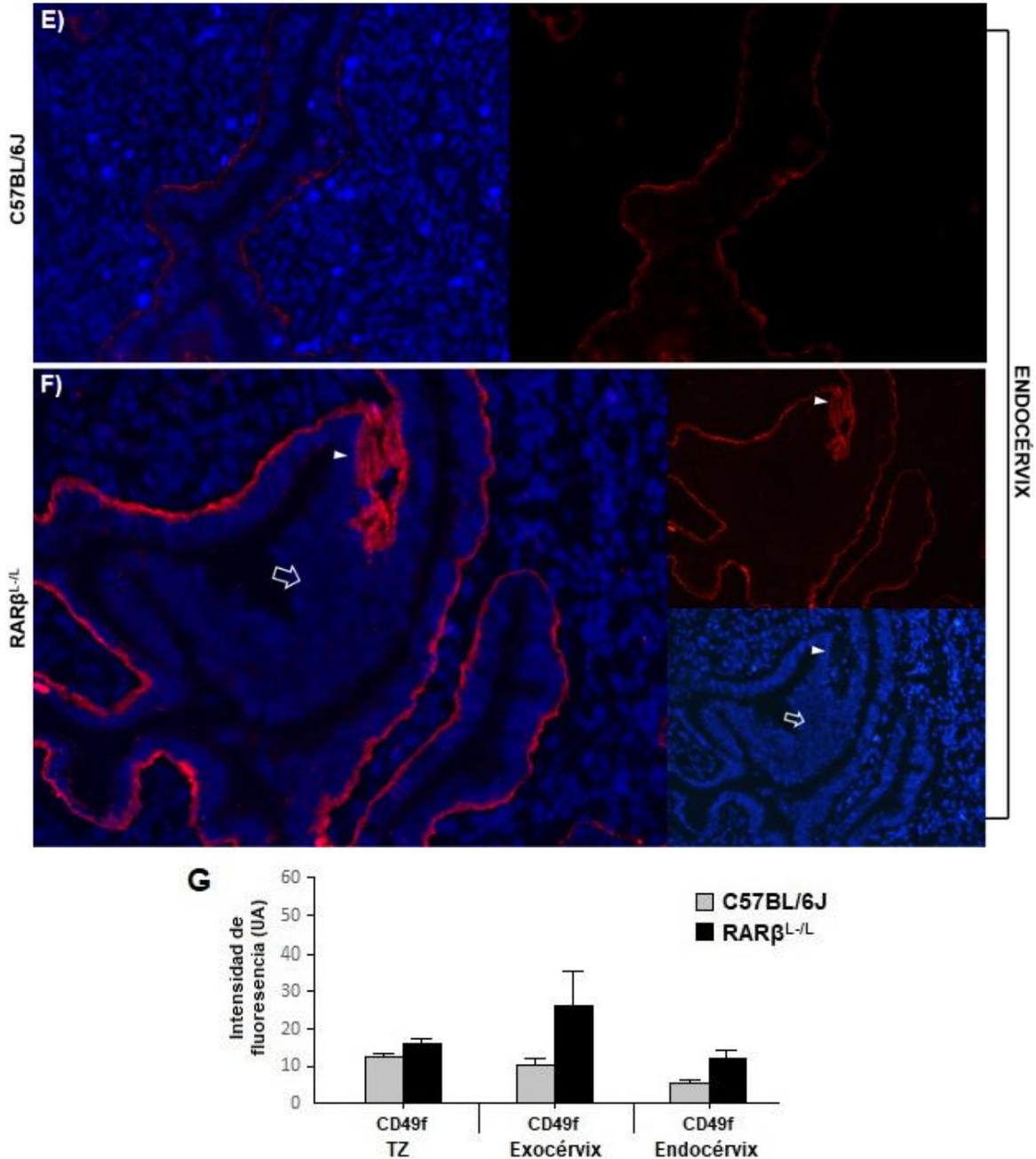


Figura 19. Expresión de CD49f en la zona de transformación, exocérnix y endocérnix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L}$. Se observa una mayor expresión del marcador CD49f en células de reserva cercanas a la JSC en la zona de transformación del cérvix (A y B) de los ratones deficientes para el receptor β del ácido retinoico (RAR $\beta^{L-/L}$). La expresión de CD49f aumenta en células basales y se distribuye hacia las células suprabasales en el exocérnix (C y D) de los ratones RAR $\beta^{L-/L}$. Aparición de zonas metaplásicas con células de reserva positivas para CD49f en el endocérnix de los ratones RAR $\beta^{L-/L}$ (F). Flechas huecas señalan la JSC del epitelio cervical (A y B) y células metaplásicas endocervicales inmaduras (F). Puntas de flecha señalan células de reserva (A, B y F), puntas de flecha sin relleno señalan células basales (A, B, C y D) y puntas de flecha punteadas señalan células suprabasales (D) positivas para CD49f. Señal roja: CD49f; señal azul: DAPI. Aumento: 20X. G) Cuantificación de los niveles de expresión de p63 en la TZ, endocérnix y exocérnix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L}$. n=3. TZ: zona de transformación; UA: unidades arbitrarias.

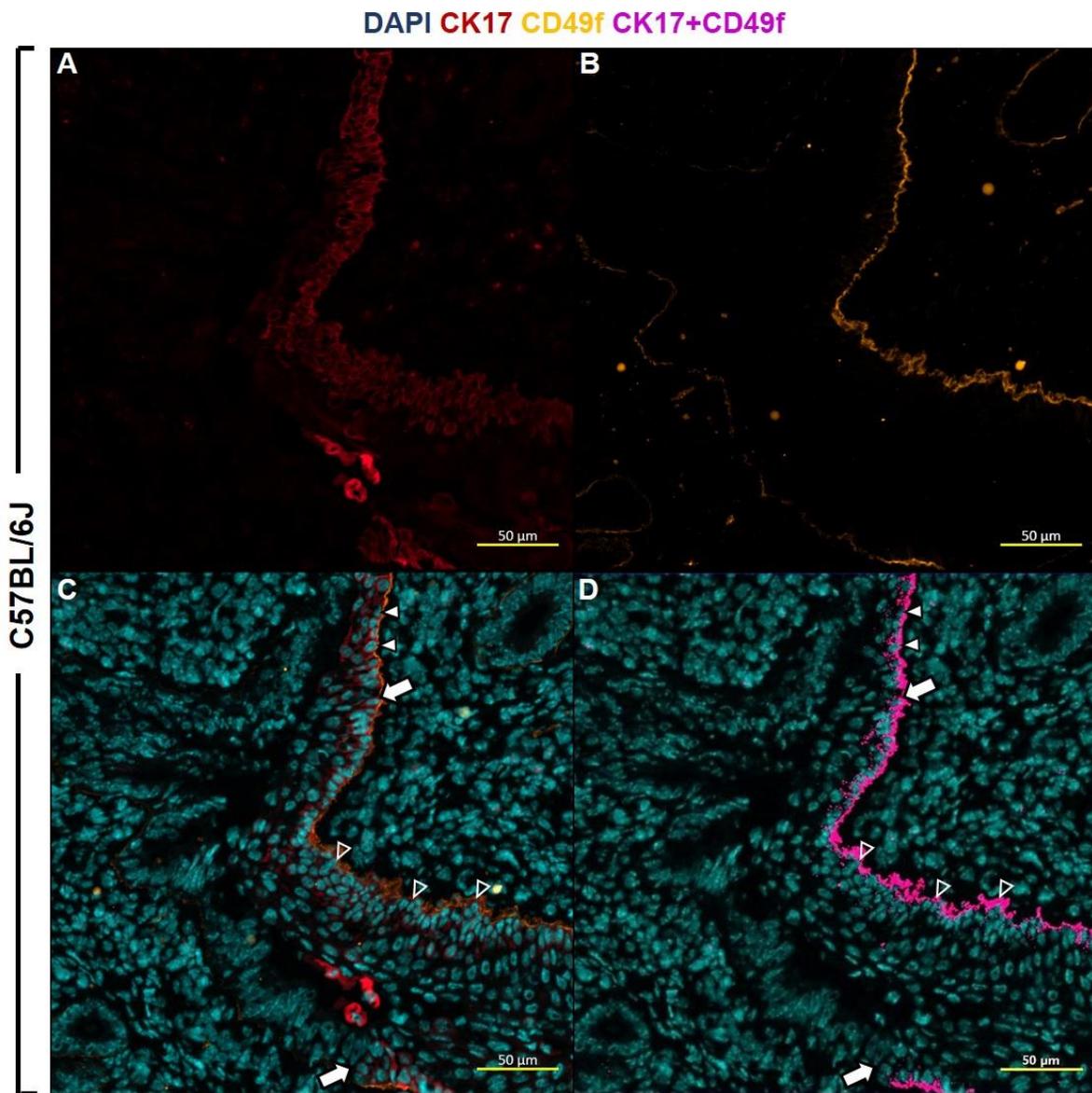
8.3.3 La coexpresión de los marcadores CD49f y CK17 se ve incrementada en dos compartimentos celulares del cérvix de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$

Con la finalidad de identificar poblaciones de células troncales en el cérvix de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ se realizaron inmunotinciones contra los marcadores putativos de troncalidad CD49f y CK17. Nuestros resultados indican la coexpresión de dichos marcadores en células de reserva cercanas a la JSC y células basales de la TZ y el exocérvix. Curiosamente a pesar de que habíamos observado una fuerte expresión de CD49f en células de reserva en metaplasias endocervicales no observamos expresión de CK17 en dichas células.

La zona de transformación de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ presento mayores niveles de expresión de ambas proteínas (19.81 UA para CK17 y 11.19 UA para CD49f) a comparación de lo observado en los ratones C57BL/6J (11.2 UA para CK17 y 8.43 UA para CD49f) (Figs. 20 y 23). Células de reserva y células basales de la zona de transformación de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ presentaron mayores niveles de coexpresion correspondientes a un coeficiente de correlación de Pearson de 0.33 y un porcentaje de área relativa de 9.18 UA en comparación de lo observado en los ratones C57BL/6J que presentaron un coeficiente de correlación de Pearson y un porcentaje de área relativa de 0.11 y 4.43 UA respectivamente. Interesantemente la expresión de CD49f se observó distribuida tanto en la membrana celular como en citoplasma de las células de reserva, células basales y algunas células suprabasales en la TZ de los ratones condicionales (20F) a diferencia de lo observado en los ratones C57BL/6J que únicamente expresaron este marcador a nivel de membrana celular de células de reserva y células basales (Fig. 20B). Esta misma distribución de CD49f y CK17 se conservó en las zonas del epitelio exocervical más alejadas de la JSC (Fig. 21A). Células basales exocervicales de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ presentaron mayores niveles de expresión de CK17 (19.33 UA) y CD49f (9.35 UA), así como una mayor proporción de colocación de ambos marcadores (coeficiente de correlación de Pearson de 0.23 y un porcentaje de área relativa compartida de 6.84) (Figs. 21 y 23) a comparación de lo observado en el exocérvix de los ratones C57BL6J (nivel de expresión de CK17 y CD49f de 17.1 y 8.32 UA, respectivamente; un coeficiente de correlación de Pearson de 0.14 y un porcentaje de área relativa compartida por ambos marcadores de 6.24 UA) (Figs. 21 y 23).

Se observó un mayor número de zonas metaplásicas con presencia de células de reserva en el endocérvix de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$. Dichas células presentaron una mayor expresión de CD49f (8.72 UA) a comparación de las células de reserva metaplásicas presentes en los

ratones C57BL/6J (2.57 UA) (Fig. 22B y 22E). Sin embargo, ambas presentaron una expresión del marcador de troncalidad CK17 prácticamente inexistente (nivel de expresión de 1.74 UA en ratones C57BL/6J y 0.76 UA en ratones $RAR\beta^{L/L-}$) (Figs. 22C y 22F). Así mismo, las células epiteliales que formaban las glándulas del epitelio endocervical y la zona de transformación expresaron CD49f únicamente en la membrana basal y fueron negativas para CK17. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.07 y el porcentaje de área relativa fue de 0.56 UA en los ratones C57BL/6J, mientras que en los ratones $RAR\beta^{L/L-}$ el coeficiente de correlación de Pearson y el porcentaje de área relativa fueron de 0.14 y 0.2 UA respectivamente (Fig. 23).



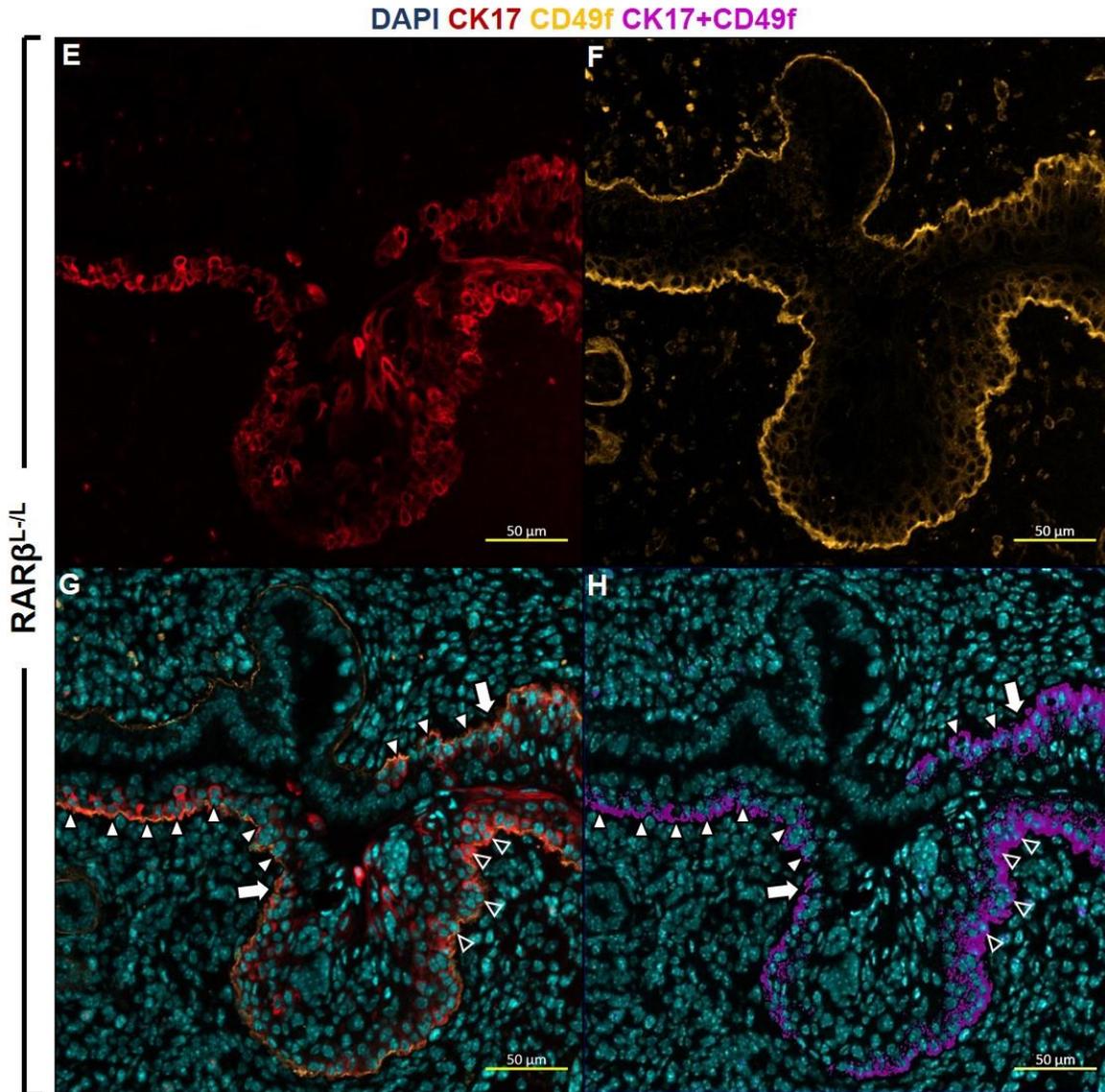


Figura 20. Coexpresión de CD49f y CK17 en la zona de transformación de los ratones RAR β^{L-L} y ratones C57BL/6J. Los marcadores CD49f y CK17 son coexpresados en células de reserva de la JSC y células basales del exocérnix de ambos ratones (C, D, G y H). Se observa una mayor expresión en células de reserva y células basales en la zona de transformación de los ratones RAR β^{L-L} (G-H) en comparación a la zona de transformación de los ratones C57/BL6J (C-D). Flechas gruesas: JSC. Punta de flechas: células de reserva. Flechas huecas: células basales. Señal roja: CK17. Señal amarilla: CD49f. Señal morada: coexpresión de CK17 y CD49f. Señal azul: DAPI.

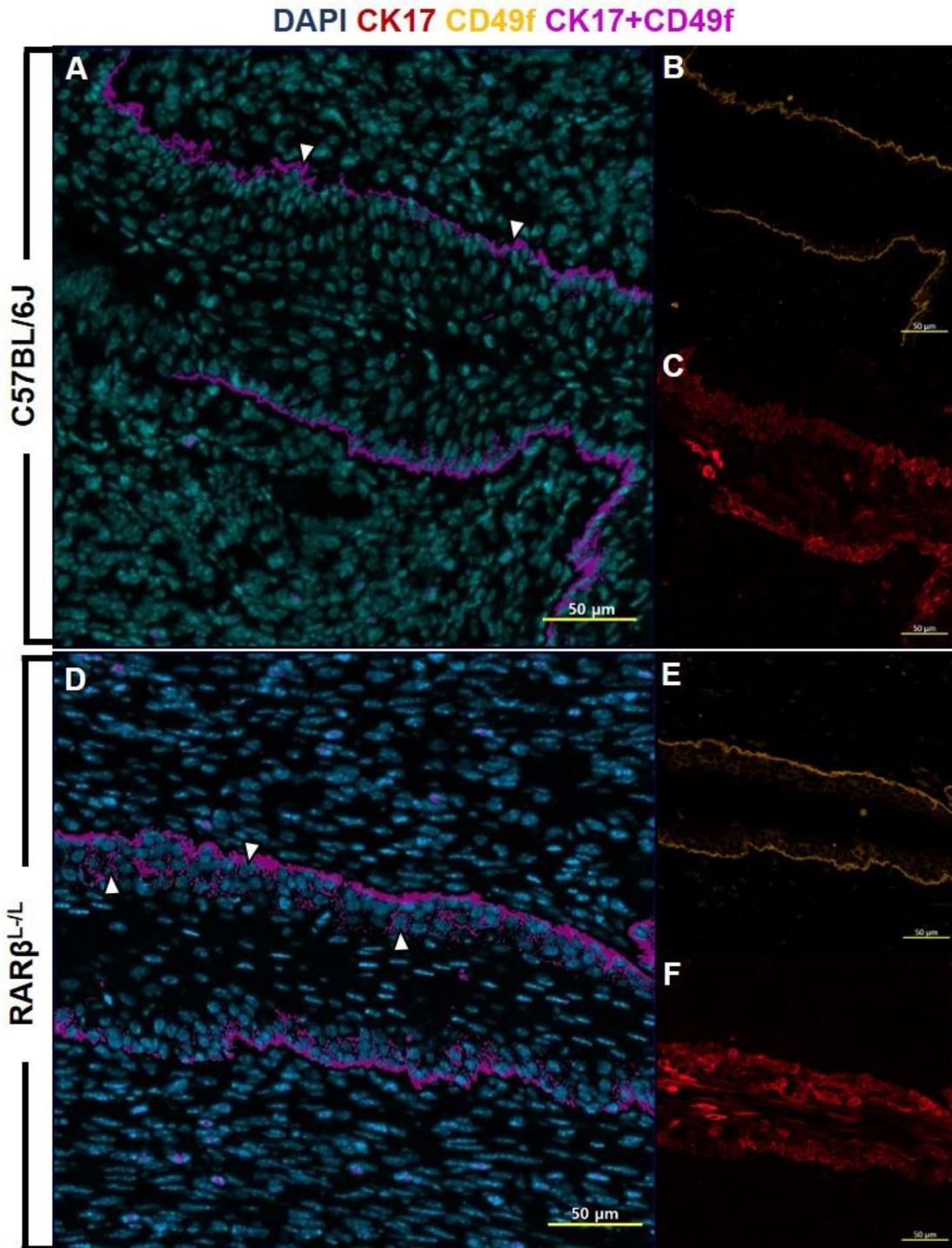


Figura 21. Coexpresión de CD49f y CK17 en el exocérvix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L/L}$. Los marcadores CD49f y CK17 que son coexpresados en células basales del exocérvix de los ratones C57BL/6J (A, B y C) presentan mayores niveles de expresión en células basales en los ratones RAR $\beta^{L/L}$, entendiéndose incluso hacia algunas células suprabasales exocervicales (D, E y F). Flechas blancas señalan células basales (A y D). Señal roja: CK17. Señal amarilla: CD49f. Señal morada: coexpresión de CK17 y CD49f. Señal azul: DAPI.

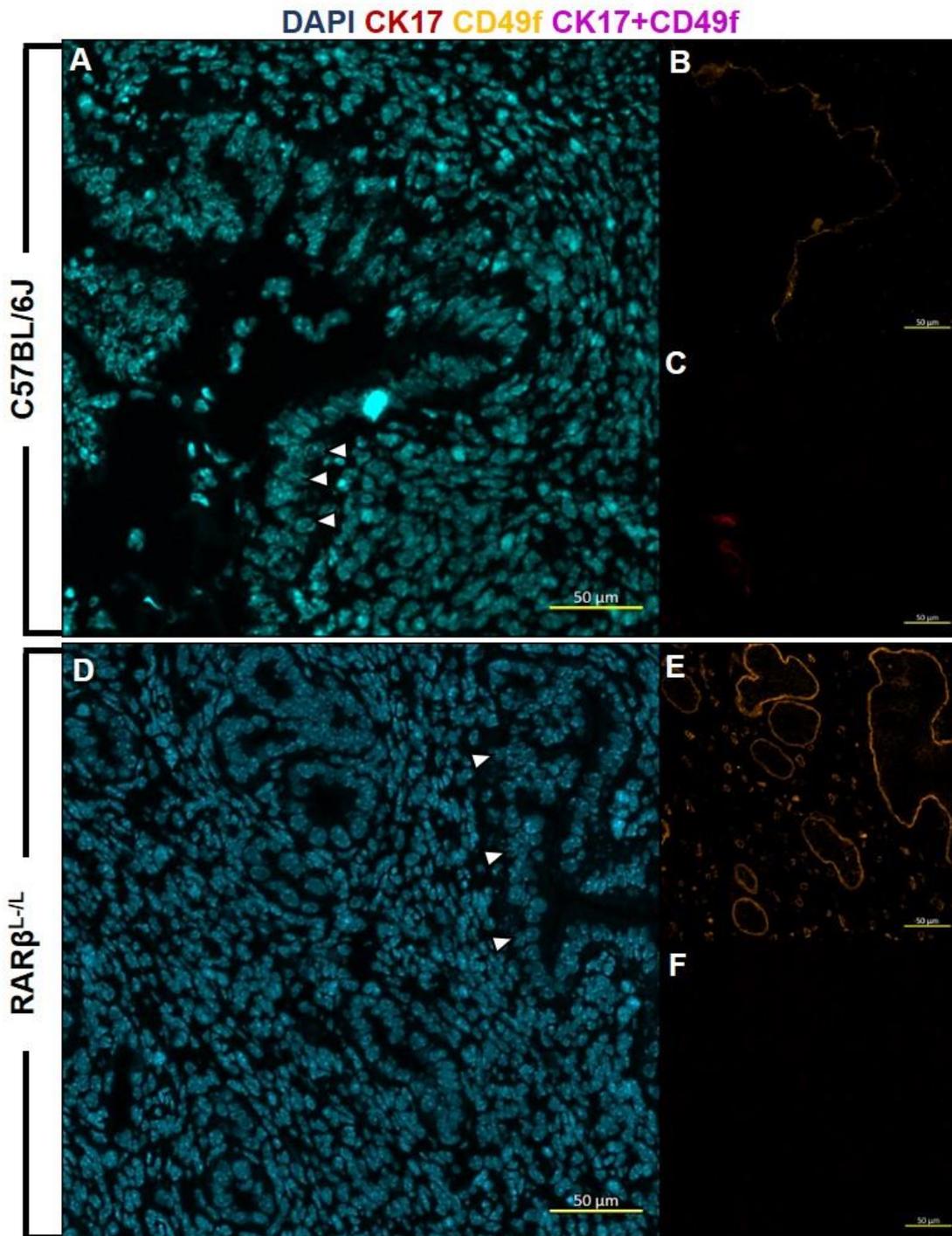


Figura 22. Coexpresión de CD49f y CK17 en el endocérvix de los ratones C57BL/6J y RARβ^{-/-}. Células de reserva metaplásicas del endocérvix no expresan CK17 (A, C, D y F). Flechas blancas señalan células de reserva (A y D). Señal roja: CK17. Señal amarilla: CD49f. Señal morada: coexpresión de CK17 y CD49f. Señal azul: DAPI.

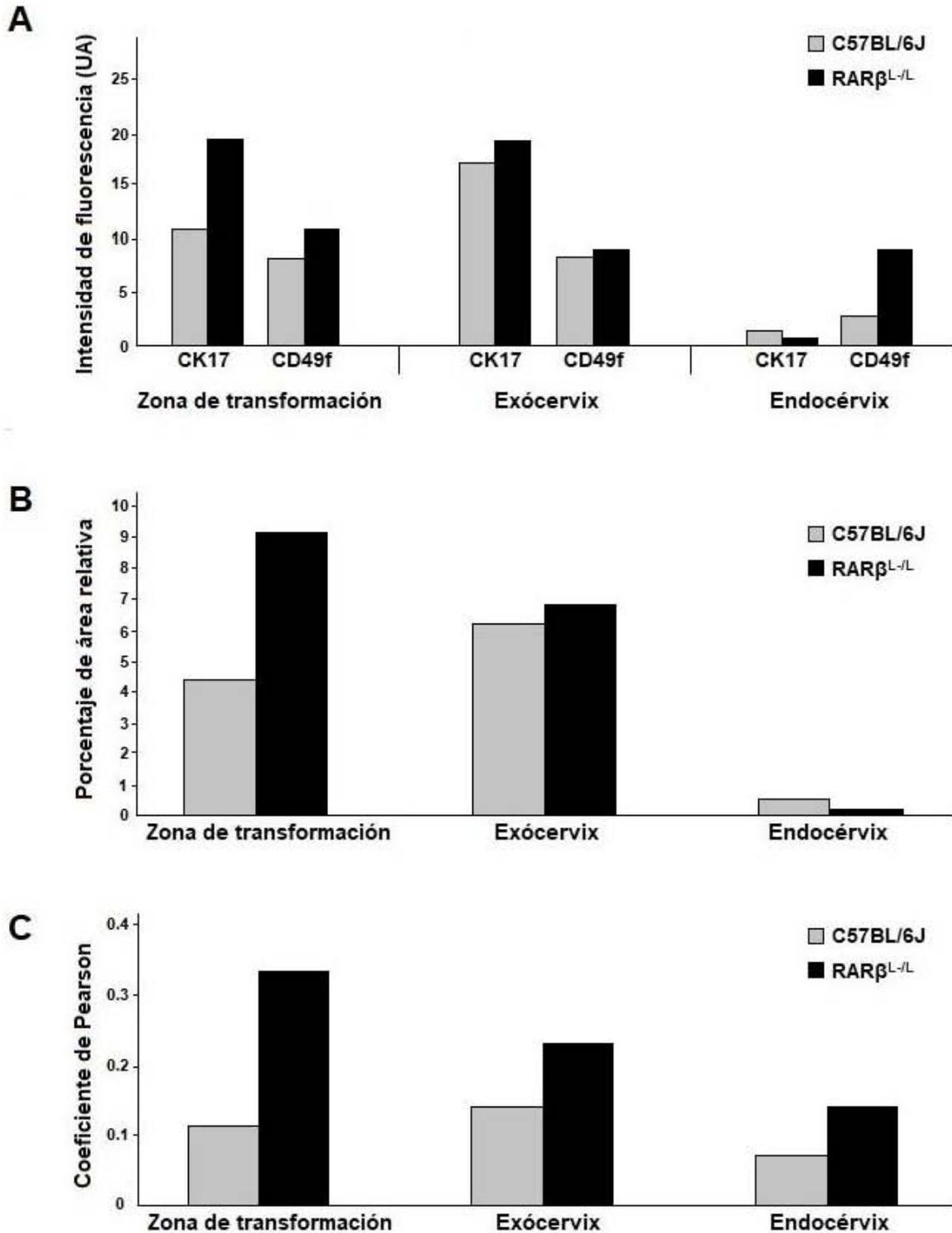


Figura 23. Niveles de expresión y colocación de CD49f y CK17 en el cérvix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L}$. Cuantificación de los niveles de expresión de CD49f y CK17 (A), porcentaje de área relativa (B) y Coeficiente de Pearson en la TZ, endocervix y exocervix de los ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L}$. TZ: zona de transformación; UA: unidades arbitrarias.

8.4 El marcador de células de la unión escamocolumnar AGR2 se expresa en células metaplásicas inmaduras y células columnares que dan origen a las glándulas endocervicales.

Se realizaron inmunotinciones contra el marcador de la JSC AGR2 para determinar si este se expresaba en células de reserva cercanas a la JSC o alguna otra población de la zona de transformación cervicouterina. Nuestros resultados indican que, a diferencia de lo observado en tejidos humanos, la población de células de la JSC tanto de los ratones C57BL/6J (n=3) como de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (n=3) son negativas para el marcador AGR2. Sin embargo, células endocervicales cercanas a la JSC que se encontraban en proceso de formación de glándulas mostraron alta expresión de este marcador. Tanto en los ratones C57BL/6J como $RAR\beta^{L-/L-}$ se observa la presencia de células columnares endocervicales que al invaginarse sobre el estroma subyacente comienzan a adquirir la expresión de la proteína AGR2 en la membrana celular (Figs. 24b y 23e).

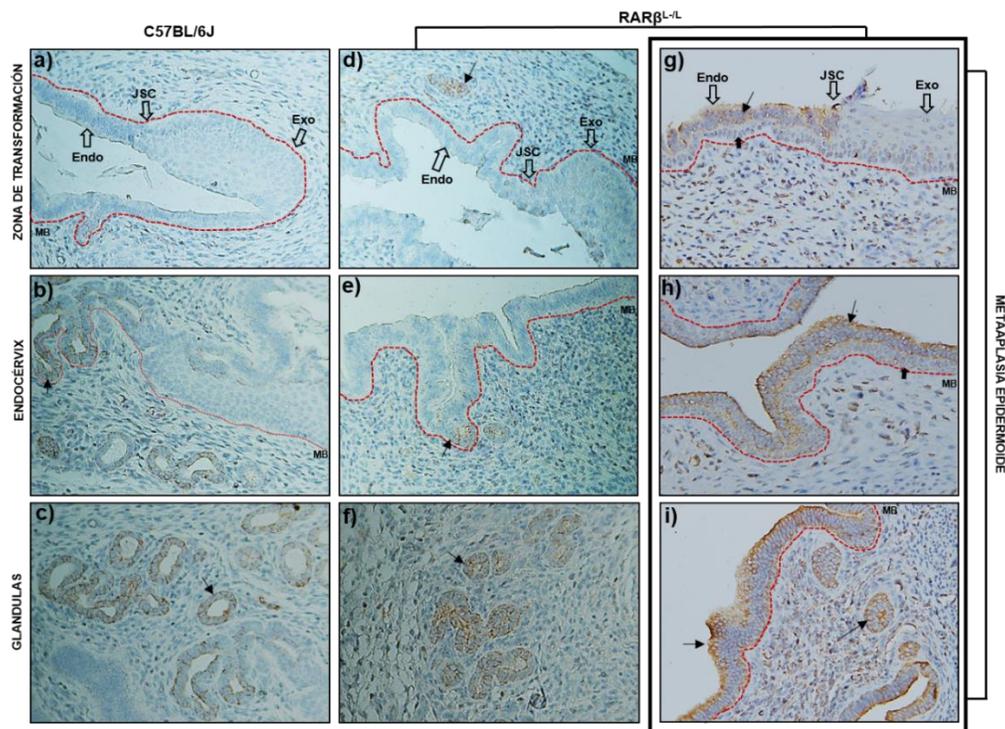


Figura 24. Expresión de AGR2 en el cérvix de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$. El marcador de células de la JSC AGR2 se expresa en células epiteliales que se encuentran recubriendo glándulas endocervicales, así como en células columnares en proceso de formación de glándulas tanto en ratones C57BL/6J (b y c) y $RAR\beta^{L-/L-}$ (e y f). Expresión inexistente de AGR en células de la JSC de ratones C57BL/6J (a) y $RAR\beta^{L-/L-}$ (d). Células metaplásicas indiferenciadas presentan expresión de AG2 en la JSC y en zonas metaplásicas endocervicales en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (g-i). Flechas delgadas muestran células positivas para AGR. Flecha gruesa en (g) muestra células de reserva negativas para AGR2. End: endocérnix. Exo: exocérnix. JSC: unión escamocolumnar MB: membrana basal. Tinción: hematoxilina. Aumento: 20X.

Así mismo, todas las células epiteliales presentes en las glándulas del endocérvix y glándulas de la TZ mostraron altos niveles de expresión de AGR2: 38.75 UA en los ratones C57BL/6J y 46.27 UA en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (Figs. 24c y 24f).

El cérvix de los ratones deficientes para el receptor β para ácido retinoico presentó zonas metaplásicas a lo largo del endocérvix y de la JSC con una abundante población de células de reserva negativas para el marcador AGR2. Células metaplásicas dispuestas por encima de las células de reserva mostraron diferentes niveles de expresión de este marcador (Figs. 24g-i), sugiriendo que al proliferar y comprometerse a un linaje celular las células de reserva adquieren la expresión de esta proteína.

8.5 La deficiencia del receptor β para ácido retinoico disminuye la diferenciación del epitelio escamoso del cérvix en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$

Con la finalidad de determinar cambios en los niveles de expresión de proteínas asociadas a procesos de diferenciación celular generados por la deficiencia del receptor β para ácido retinoico se realizaron la inmunotinciones del epitelio cervical de ratones C57BL/6J y ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ contra CK5 y C10, dos citoqueratinas presentes en células diferenciadas del epitelio estratificado cervical.

Las inmunotinciones contra CK5 mostraron altos niveles de expresión en células del epitelio exocervical de los ratones C57BL/6J (30.63 UA), viéndose disminuidos en un 43% en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (17.40 UA). Además, células de estratos superiores del epitelio estratificado de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ presentaron una morfología correspondiente a células escamosas indiferenciadas (Fig. 25F). De igual forma, la TZ de los ratones C57BL/6J presento mayores niveles de expresión de CK5 (34.41 UA) a comparación de lo observado en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (26.09 UA). Células columnares del epitelio endocervical no presentaron expresión de CK5 en ninguno de los dos ratones (Figs. 24C-D). Células de reserva subcolumnares positivas para CK5 se observaron cerca de la JSC del cérvix, así como dentro de focos metaplásicos del endocérvix en todos los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ evaluados (100%), presentando altos niveles de expresión de CK5 (32.89 UA) (Figs. 25B y 25D), mientras que en los ratones C57BL/6J no se observaron células de reserva cercanas a la JSC de la TZ en los ratones evaluados.

Así mismo, la evaluación de la expresión de CK10 por inmunohistoquímica reveló una disminución considerable en la expresión de esta proteína en el epitelio estratificado de los

ratones deficientes del receptor β para ácido retinoico. Los ensayos inmunohistoquímicos de esta proteína mostraron altos niveles de expresión en células basales y niveles intermedios en células suprabasales del epitelio estratificado de los ratones C57BL/6J (Fig. 25K), con un nivel de expresión correspondiente a 29.58 UA (Fig. 27). Éste mismo patrón de expresión se observó en el exocérnix de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$, sin embargo, los niveles de expresión de CK10 disminuyeron hasta en un 60% en todas las células positivas (Fig. 24I) presentando un nivel de expresión de 8.9 UA. De igual forma, la zona de transformación de los ratones C57BL/6J presento mayores niveles de expresión de esta proteína (20.35 UA) a comparación de lo observado en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (11.76 UA) (Fig. 26). Células basales del epitelio estratificado de ambos ratones no presentaron expresión de CK10 (Figs. 25I-J).

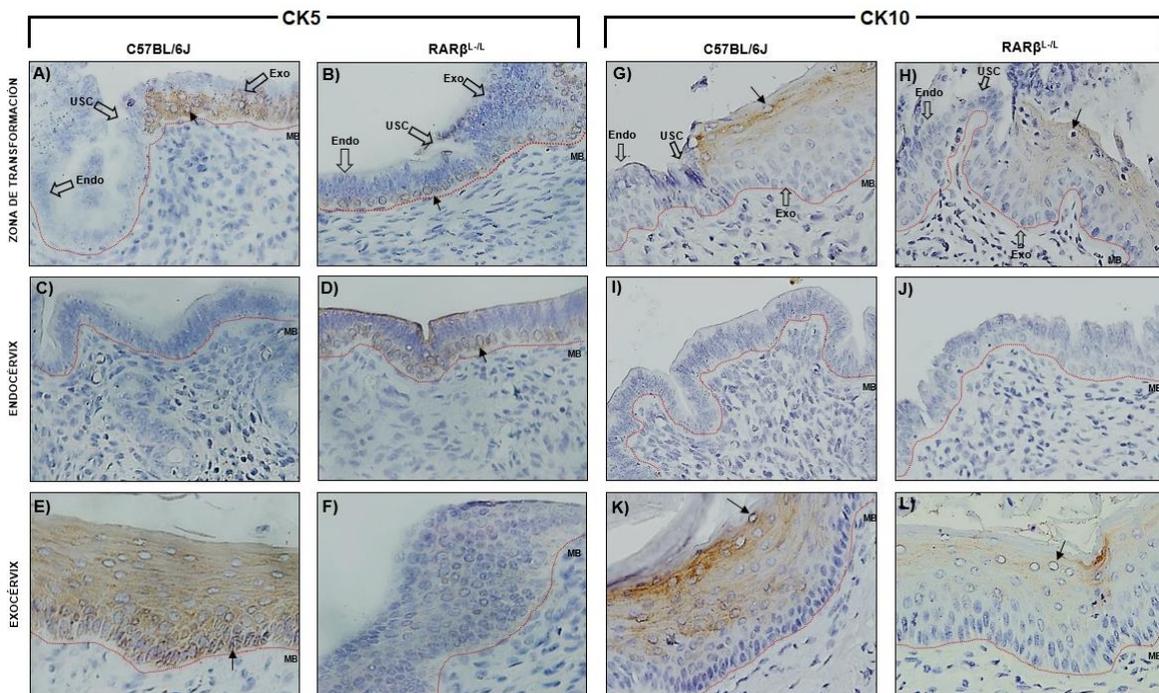


Figura 25. Expresión de CK5 y CK10 en el cérvix de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$. Se observa un aumento en células de reserva CK5+ tanto en la JSC como en el endocérnix de los ratones condicionales $RAR\beta^{L-/L-}$ (B y D). La zona de transformación (A) y endocérnix (C) de los ratones C57BL/6J no presenta células de reserva. La deficiencia del receptor β para ácido retinoico disminuye los niveles de expresión de CK5 y CK10 en el epitelio estratificado de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (F y L) a comparación de los ratones C57BL/6J (E y K). Células del epitelio columnar y células de reserva endocervicales no presentan expresión de CK10 en ambos ratones (I y J). Flechas negras indican señal positiva para CK5 y CK10. End: endocérnix. Exo: exocérnix. JSC: unión escamocolumnar MB: membrana basal. Tinción: hematoxilina. Aumento: 40X.

8.6 La deficiencia del receptor β para ácido retinoico incrementa la proliferación celular del epitelio cervical en los ratones $RAR\beta^{L/L-}$

Con la finalidad de determinar si la deficiencia del receptor β para ácido retinoico intervenía en los procesos de proliferación celular se determinó la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 en el cérvix de ratones C57BL/6J (n=3) y $RAR\beta^{L/L-}$ (n=3). Nuestros resultados indican un aumento en la proporción de células positivas para la proteína Ki67 en el tejido cervical de los ratones $RAR\beta^{L/L-}$.

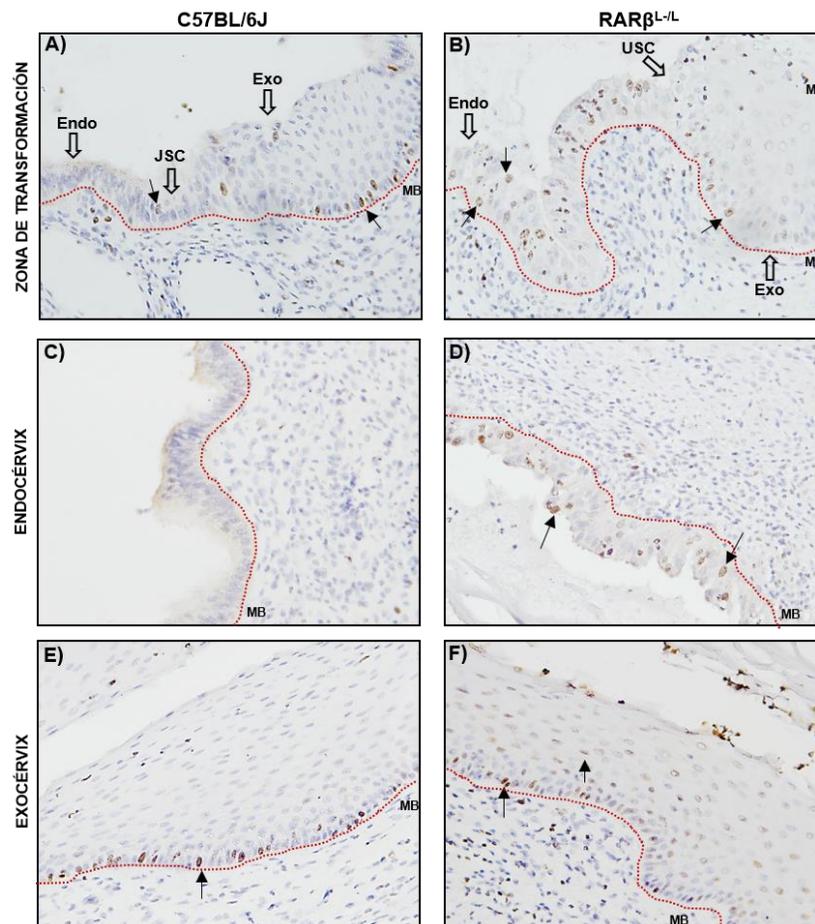


Figura 26. Expresión de la proteína Ki67 en el epitelio cervical de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L/L-}$. La deficiencia del receptor β para ácido retinoico favorece el incremento en los niveles de expresión de la proteína Ki67 en la TZ (B), endocérnix (D) y exocérnix (F) de los ratones $RAR\beta^{L/L-}$ a comparación de la TZ (A), endocérnix (C) y exocérnix (E) de los ratones C57BL/6J. Flechas negras indican señal positiva para el marcador de proliferación Ki67. End: endocérnix. Exo: exocérnix. JSC: unión escamocolumnar MB: membrana basal. Tinción: hematoxilina. Aumento: 40X.

La zona de transformación de los ratones C57BL/6J mostró una baja proporción de células positivas para el marcador de proliferación Ki67 (Fig. 26A), mientras que en el tejido cervical

de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$, esta misma zona se caracterizó por la presencia de metaplasias epidermoides con aumento en la proporción de células de reserva positivas para el marcador de proliferación Ki67 (Fig. 26B). Los niveles de expresión de dicha proteína fueron mayores en la TZ de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ (85.04 UA) en comparación con la TZ de los ratones C57BL/6J (61.6 UA) (Fig. 27). Células columnares del epitelio endocervical de los ratones C57BL/6J no presentaron expresión de Ki67 (Fig. 26C), mientras que en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ se observaron zonas metaplásicas endocervicales con presencia de células columnares y células de reserva positivas para este marcador con un nivel expresión correspondiente a 33.94 UA (Fig., 26D y 27). El epitelio estratificado de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ mostró mayores niveles de expresión de Ki67 (46.11 UA) (Fig. 26E), a comparación de lo observado en el epitelio exocervical de los ratones C57BL/6J (43.52) (Fig. 26E-F y 27).

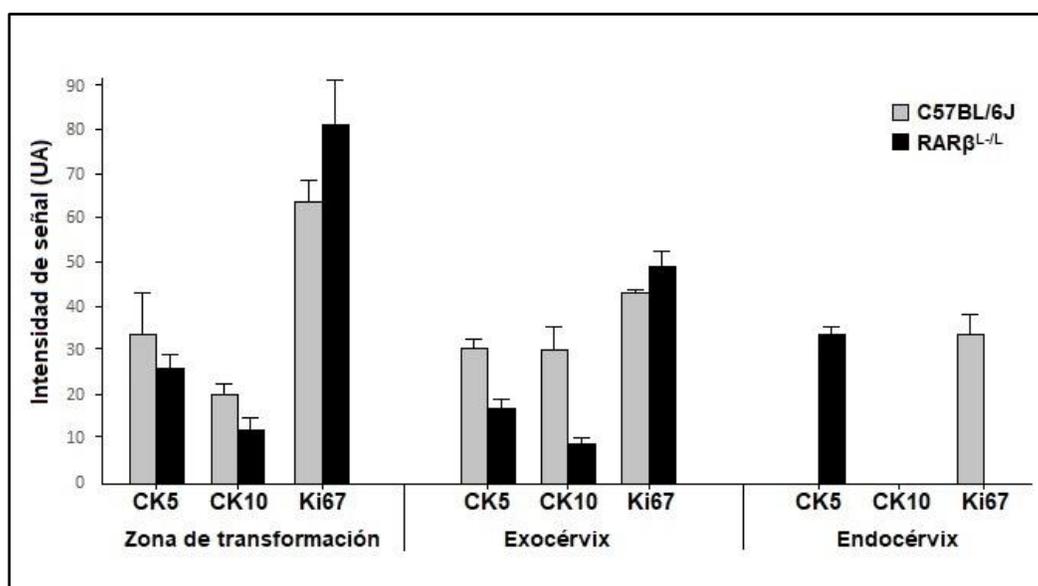


Figura 27. Niveles de expresión de CK5, CK10 y Ki67 en el epitelio cervical de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$. Cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas CK5, CK10 y Ki67 en la TZ, endocérvis y exocérvis de los ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$. n=3. TZ: zona de transformación; UA: unidades arbitrarias.

9. DISCUSIÓN

Las infecciones persistentes por los diferentes tipos oncogénicos del VPH están fuertemente relacionadas al desarrollo y progresión del CaCU, estando implicada en la mayoría de los casos una región anatómica denominada como zona de transformación.

Esto sugiere la existencia de una población celular susceptible a la transformación oncogénica en dicha zona. Varios estudios postulan a las células troncales de la JSC como la población blanco de la transformación oncogénica mediada por el virus. Si bien es cierto que la identidad de las células troncales del cérvix sigue siendo objeto de especulación, numerosos estudios señalan a las células de reserva como la población de células troncales dentro del cérvix, ya que se ha observado de manera natural tienen la capacidad de generar epitelio columnar del endocérvix y mediante procesos metaplásicos tienen la capacidad de generar epitelio estratificado del exocérvix.

Caracterización de células tipo troncales en el cérvix murino: Células de reserva de la unión escamocolumnar y células basales exocervicales expresan marcadores putativos de troncalidad de cérvix

En este trabajo identificamos dos poblaciones celulares que expresan los marcadores putativos de troncalidad CD49f, p63 y CK17 en el cérvix de dos cepas murinas diferentes (en ratones “wild type” (C57BL/6J) y ratones deficientes para el receptor β para ácido retinoico ($RAR\beta^{L-/L-}$) que generan metaplasias epidermoides cervicales con hiperproliferación de células de reserva). Dichas poblaciones corresponden a las células de reserva ubicadas cerca de la JSC y las células basales del epitelio estratificado. Parte de nuestros resultados concuerdan con lo observado por Martens y colaboradores en el 2004 y posteriormente en el 2009, en donde a partir de la tinción del epitelio cervical identificaron células positivas para CK17 y p63 en estos dos compartimentos celulares mencionados (células de reserva de la JSC y células basales exocervicales), reportando la existencia de un compartimento adicional correspondiente a células de reserva endocervicales alejadas de la JSC que expresaban los marcadores de troncalidad p63 y CK17, pero con una disminución considerable de este último. Nuestros resultados muestran expresión inexistente de CK17 (en ambos ratones) y bajos niveles de expresión de p63 (en ratones “wild type”) en dicho compartimento celular. Si bien, el fenotipo de las células de reserva de este último compartimento celular (endocérvix) es distinto en ambos estudios, mediante estos resultados podemos especular que el epitelio endocervical no es homogéneo y que las poblaciones de células de reserva distribuidas a lo largo de este son poblaciones celulares diferentes con un potencial de diferenciación distinto. Una disminución en la expresión de CK17 en células de reserva que se encuentran alejadas de la JSC sugiere una pérdida en su capacidad de potencialidad, implicando un compromiso a la

diferenciación de epitelio columnar y una pérdida de su capacidad para diferenciarse a células del epitelio escamoso (Martens J. *et al.*, 2009).

p63 es una proteína que juega un papel importante en la morfogénesis epitelial. Existen varias isoformas de p63 y se caracterizan por presentar diferentes niveles y patrones de expresión. $\Delta Np63\alpha$ es la isoforma predominante, y se expresa selectivamente en niveles altos en las células basales de los epitelios estratificados. Nuestros resultados muestran una alta expresión de p63 en células basales del epitelio estratificado representando un patrón de expresión consistente con el papel funcional de las células progenitoras epiteliales. p63 ha sido propuesta como una proteína indispensable en la especificación y diferenciación de las células epiteliales estratificadas. Kurita y colaboradores en el 2005 midieron la expresión de dos isoformas de p63 en el tracto urogenital de fetos de ratones. Observaron que en ratones nulos para cualquier isoforma de p63, el seno vaginal era capaz de desarrollarse, sin embargo, este no presentaba diferenciación hacia epitelio estratificado, lo cual confirmó el papel esencial de p63 en la diferenciación epitelial escamosa. En nuestro estudio observamos una fuerte expresión de p63 en células de reserva ubicadas cerca de la JSC en el cérvix de ambos ratones reafirmando con ello la potencialidad que tienen estas células para formar epitelio estratificado.

La integrina alfa-6, también conocida como CD49f ha sido ampliamente asociada a poblaciones de células troncales, tanto sanas como cancerosas y a partir del 2001 fue postulada como la proteína receptora primaria en la infección por VPH (Yoon *et al.*, 2001; Fothergill *et al.*, 2006). Esto sugiere que las células de reserva ubicadas en la zona de transformación que expresan CD49f pueden corresponder a poblaciones de células troncales adultas que probablemente pueden ser el blanco preferente de los tipos oncogénicos del VPH causantes del cáncer. En este estudio observamos la expresión consistente de CD49f en la cara basal de todas las células epiteliales que se encontraban en contacto con el estroma, sin embargo, en las células basales y células de reserva de la JSC observamos mayores niveles de expresión de esta proteína distribuidos alrededor de toda la membrana celular (caras basolaterales y apicales), siendo además positivas para el marcador de troncalidad CK17. Todas las células basales presentaron coexpresión de estos marcadores, viéndose drásticamente disminuidos en estratos superiores del epitelio estratificado. Dicho patrón de expresión sugiere que la JSC representa el compartimento celular que alberga la población de células troncales (células de reserva) proporcionándoles un apoyo microambiental para permanecer quiescentes, para proliferar como células

indiferenciadas (autorrenovación), y para diferenciarse en progenitores (células basales) mediante procesos de metaplasia epidermoide. Así mismo, por las características físicas y anatómica de dicha región es probable que el virus pueda acceder con mayor facilidad a las células de reserva ubicadas en la JSC transformándolas en células cancerosas. A pesar, de que el origen de las CSC sigue siendo controversial, es razonable pensar que las células troncales sanas que han mutado en células cancerosas den origen a las CSC (Ortiz *et al.*, 2016; Marotta *et al.*, 2009).

Si bien en la actualidad se han propuesto varios marcadores putativos de las poblaciones de células troncales del cérvix, la determinación de una combinación adecuada sigue siendo controversial. Creemos que la combinación de anticuerpos utilizados en nuestro estudio nos permite identificar poblaciones representativas de células troncales. De hecho, en un estudio realizado Ortiz-Sánchez y colaboradores en el 2016, se observó que las poblaciones CSC de líneas celulares del CaCU con fenotipo p63⁺CK17⁺CD49f⁺All⁺ sobreexpresaban OCT4, Nanog y β -catenina, factores de transcripción importantes para el mantenimiento del estado "stemness" de las células troncales. Si bien, estos hallazgos fueron reportados en líneas celulares cancerosas, se ha observado que la mayoría de las poblaciones de células troncales cancerosas comparten los mismos marcadores de superficie que su contraparte normal (Al-Hajj *et al.*, 2003; Blagosklonny *et al.*, 2005), sugiriendo la importancia de la coexpresión de estos marcadores en las poblaciones de células troncales de epitelio cervical normal.

La población de células de la unión escamocolumnar AGR2+ (células troncales putativas) no fue identificada en el cérvix de ratones

La zona de transformación del cérvix juega un papel muy importante en el desarrollo del CaCU, ya que es en zona donde más del 90% de los casos de CaCU se originan. La zona de transformación corresponde a la parte del cuello uterino en la que el epitelio columnar ha sido remplazado por un epitelio estratificado metaplásico e incluye a la JSC y parte proximal del cérvix donde células de reserva se encuentran hiperproliferando para dar inicio al proceso metaplásico. Recientemente se describió una población discreta de células con una morfología y un perfil de expresión génica único (AGR-2, CK7, CD63, MMP7 y GDA), ubicadas en la JSC dentro de la zona de transformación. Interesantemente esta población además expresó marcadores de células troncales embrionarias y su expresión se mantuvo en lesiones cervicales de alto grado, así como en CaCU (Herfs, 2012). Este estudio ha sugerido la participación de una población celular distinta a las células de reserva en el

desarrollo del CaCU, planteando la posibilidad de la existencia de dos poblaciones responsables de la transformación oncogénica, ambas probablemente con características de troncalidad. En este estudio realizamos la inmunodetección de AGR2 en el cérvix de ratones normales y ratones deficientes del receptor β para ácido retinoico, en primer lugar, con la finalidad de determinar si la población de la JSC expresaba los marcadores putativos de troncalidad del cérvix p63, CK17 y CD49f y en segundo lugar con la finalidad de determinar si la deficiencia de ácido retinoico aumentada la población de células de la JSC. A diferencia de lo observado por Herfs y colaboradores nuestros resultados mostraron que las células de la JSC del cérvix en ambas cepas de ratones no expresan AGR2 en condiciones normales, sin embargo, observamos una baja expresión de AGR2 en poblaciones discretas de células columnares dispuestas a lo largo del endocérvix (contiguas y alejadas de la JSC) que se encontraban en proceso de formación de glándulas (evaginación). Así mismo observamos un incremento en la expresión de AGR2 en células que conforman a las glándulas endocervicales. Estos resultados sugieren que la expresión de AGR2 en cérvix está asociada a la diferenciación glandular, lo cual concuerda con la expresión de AGR2 en otros tejidos que secretan moco o funcionan como órganos endocrinos, tales como los pulmones, el estómago, el colon, la próstata y el intestino delgado (Thompson *et al.*, 1998). En este estudio además pudimos observar la adquisición de este marcador en células metaplásicas inmaduras generadas a partir de las células de reserva de la JSC y células de reserva endocervicales. Las células de reserva que se encontraban en contacto con la membrana basal y que fueron positivas para los tres marcadores de troncalidad no presentaron positividad para AGR2. Conforme avanzó el proceso metaplásico, las células de reserva dieron origen a células metaplásicas inmaduras (con cierto grado de diferenciación) que adquirieron positividad para este marcador. Resultados similares fueron observados por Wang y colaboradores al identificar células metaplásicas positivas para AGR2 en embriones de ratones nulos para p63 que desarrollaban metaplasias en el tracto gastrointestinal asemejando la histología de lesiones correspondientes al esófago de Barrett en humanos (Wang *et al.*, 2011). A pesar de que AGR2 presenta un perfil de expresión específico para población de células de la JSC en tejidos humanos, los resultados obtenidos mediante la inmunodetección de AGR2 en nuestro estudio no nos permitieron identificar a la población celular descrita por Herfs, evidenciando las diferencias presentes en el epitelio murino con respecto al epitelio humano. Resulta necesaria la caracterización de esta población celular mediante la inmunodetección de otros marcadores propuestos por Herfs y colaboradores.

Papel del ácido retinoico en la generación de metaplasia epidermoide cervical.

Los retinoides juegan un papel importante en el desarrollo embrionario regulando procesos de diferenciación celular. Estudios demuestran que el ácido retinoico induce la diferenciación celular de ESCs mediante diferentes mecanismos. Se ha observado que Rex1, un gen que se expresa en altos niveles en ESC (Hosler *et al.*, 1989) es inhibido transcripcionalmente por el AR. El mecanismo de inhibición implica la pérdida de la unión del factor de transcripción de Oct4 a un sitio en el promotor Rex1 en respuesta al AR (Hosler *et al.*, 1993). También se sabe que el AR es capaz de modular la diferenciación celular a través de la modulación de miRNAs. Se ha observado que en ESC el AR induce una disminución de los miR-200b y miR-200c suprimiendo la expresión de genes pluripotentes, incluidos Oct4 y Nanog y activando la expresión del marcador ectodérmico Nestina en mESCs (Zhang *et al.*, 2015). Así mismo, el AR promueve la diferenciación celular en células troncales presentes en epitelios adultos, actuando como un potente regulador del crecimiento y diferenciación celular de células epiteliales normales. Wolbach y Howe observaron que durante la deficiencia de vitamina A, la diferenciación correcta de las ASCs en células epiteliales maduras no se producía y que la diferenciación celular anormal, caracterizada en particular por la acumulación excesiva de queratina, fue un evento frecuente. Además, observaron que había una proliferación celular excesiva en muchos de los epitelios deficientes. Un estudio reciente mostró que la deficiencia del receptor β para ácido retinoico en ratones condicionales generaba zonas metaplasias con hiperproliferación células de reserva (Albino *et al.*, 2016), correspondientes a la población putativa de células troncales cervicouterinas, sin embargo, en este estudio no se caracterizaron las células de reserva mediante marcadores de troncalidad. En este estudio identificamos a las poblaciones celulares que coexpresan los marcadores putativos de troncalidad CD49f, CK17 y p63 en el cérvix de ratones deficientes del receptor β para ácido retinoico ($RAR\beta^{L-/-}$) y en ratones “wild type” (C57BL/6J) con la finalidad de sustentar un modelo que permitiera el enriquecimiento de células troncales para la formación de organoides murinos de cérvix como modelo de estudio de la carcinogénesis cervical. Nuestros resultados mostraron un enriquecimiento de células positivas para los marcadores de troncalidad en el cérvix de los ratones $RAR\beta^{L-/-}$ en los dos compartimentos celulares identificados previamente (células basales y células de reserva de la JSC). Así mismo, en estos ratones se observó un aumento considerable de zonas metaplásicas a comparación de los ratones “wild type”, con un enriquecimiento considerable de células de reserva endocervicales $CD49f^+p63^+CK17^-$ (alejadas de la JSC) y células metaplásicas inmaduras (AGR2). Además,

el epitelio estratificado de estos ratones mostró menores niveles de expresión de dos citoqueratinas presentes en epitelio diferenciados (CK5 y CK10). Estos resultados además de confirmar la participación del ácido retinoico en la diferenciación de epitelio cervical adulto, proporcionan evidencias sobre la contribución de los ligandos que activan al receptor β del ácido retinoico en la diferenciación celular del epitelio cervical; y así mismo, demuestran que la deficiencia del receptor β para ácido retinoico genera un enriquecimiento de células de reserva de la JSC (CD49f⁺p63⁺CK17⁺) potenciales para la generación de epitelio columnar y epitelio estratificado, células basales progenitoras (CD49f⁺p63⁺CK17⁺) potenciales para la generación de epitelio estratificado y células de reserva subcolumnares (CD49f⁺p63⁺CK17⁻) potenciales para la generación de epitelio columnar.

Las evidencias proporcionadas por este estudio nos permiten sugerir al ratón RAR $\beta^{L/L-}$ como un modelo que facilitará el aislamiento y obtención de células troncales y células progenitoras a partir de las cuales se puedan generar organoides de cérvix para estudiar la carcinogénesis cervical. Particularmente, este modelo nos permitirá estudiar la participación del receptor β para ácido retinoico en la generación de metaplasia epidermoide, y su contribución en la aparición de lesiones precancerosas y desarrollo del CaCU.

10. CONCLUSIONES

- Células de reserva cercanas a la JSC y células basales del epitelio estratificado coexpresan los marcadores putativos de células troncales cervicales CD49f, p63 y CK17.
- Las células de reserva metaplásicas del endocérvix (CD49f⁺p63⁺CK17⁺) presentan un fenotipo diferente al de las células de reserva que se ubican cerca de la JSC de cérvix (CD49f⁺p63⁺CK17⁻), indicando ser poblaciones celulares diferentes.
- La deficiencia del receptor β para ácido retinoico incrementa las poblaciones de células de reserva de la JSC (CD49f⁺p63⁺CK17⁺), células de reserva metaplásicas endocervicales (CD49f⁺p63⁺CK17⁻) y células basales exocervicales (CD49f⁺p63⁺CK17⁺).
- La deficiencia del receptor β para ácido retinoico disminuye la diferenciación celular del epitelio estratificado del cérvix.

- La deficiencia del receptor β para ácido retinoico incrementa la proliferación celular de los epitelios columnar y estratificado del cuello uterino.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de trazado de linaje marcando células de reserva a través de CK5 para confirmar su papel como células troncales dentro del epitelio cervical adulto.
- Cuantificar y aislar por citometría de flujo las poblaciones de células cervicales tipo troncales de fenotipo $CD49f^+p63^+CK17^+$ identificadas en los ratones C57BL/6J y los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$.
- Caracterizar los cultivos de queratinocitos obtenidos mediante la inmunodetección de los marcadores de troncalidad (CD49f y CK17 y p63) y marcadores citoqueratinas del epitelio columnar (CK8) y escamoso (CK5 y CK10), para confirmar el establecimiento de organoides mediante las condiciones de cultivo establecidas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abu, J., Batuwangala, M., Herbert, K., & Symonds, P. (2005). Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *The Lancet Oncology*, 6(9), 712–720. doi:10.1016/s1470-2045(05)70319-3

Albino-Sanchez, M., Vazquez-Hernandez, J., Ocadiz-Delgado, R., Serafin-Higuera, N., León-Galicia, I., Garcia-Villa, E., ... Gariglio, P. (2016). Decreased $RAR\beta$ expression induces abundant inflammation and cervical precancerous lesions. *Experimental Cell Research*, 346(1), 40–52. doi:10.1016/j.yexcr.2016.05.010

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983–3988. doi:10.1073/pnas.0530291100

Bandit P. 2012. Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos. American Cancer Society. No.862412 <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/cancer-facts-and-figures-for-hispanics-and-latinos/datos-y-estadísticas-sobre-el-cáncer-entre-los-hispanos-latinos-2012-2014.pdf>

Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., et al. (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6, 25–36.

Barua, A. B., & Furr, H. C. (1998). Properties of retinoids. *Molecular Biotechnology*, 10(2), 167–182. doi:10.1007/bf02760863

Blagosklonny, M. V. (2005). Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia*, 20(3), 385–391. doi:10.1038/sj.leu.2404075

Boj, S.F., Hwang, C.I., Baker, L.A., Chio, I.I., Engle, D.D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M.S., et al. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160, 324–338.

Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:321–22.

Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17. doi:10.1128/cmr.16.1.1-17.2003

Cardinal L, (2000) Anatomía, citología e histología del cuello uterino, la vagina y la vulva normales y patológicos. *Ecosistema vaginal*. pp: 3-7.

Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67. doi:10.1038/kisup.2011.15

Chapellier, B., Mark, M., Bastien, J., Dierich, A., LeMeur, M., Chambon, P., & Ghyselinck, N. B. (2002). A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor beta (RAR β) gene. *Genesis*, 32(2), 91–94. doi:10.1002/gene.10073

Chua, C.W., Shibata, M., Lei, M., Toivanen, R., Barlow, L.J., Bergren, S.K., Badani, K.K., McKiernan, J.M., Benson, M.C., Hibshoosh, H., et al. (2014). Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat. Cell Biol.* 16, 951–961, 951–954.

Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Muñoz, N., & Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88(1), 63–73. doi:10.1038/sj.bjc.6600688

Conlon RA, Rossant J. (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development*. 116(2):357-68.

De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, et al. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 11,1048–56.

De Villiers, E.-M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445(1-2), 2–10. doi:10.1016/j.virol.2013.04.023

De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033

Delva, L., Bastie, J.-N., Rochette-Egly, C., Kraïba, R., Balitrand, N., Despouy, G., ... Chomienne, C. (1999). Physical and Functional Interactions between Cellular Retinoic Acid Binding Protein II and

the Retinoic Acid-Dependent Nuclear Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 7158–7167. doi:10.1128/mcb.19.10.7158

DeWard, A.D., Cramer, J., and Lagasse, E. (2014). Cellular heterogeneity in the mouse esophagus implicates the presence of a nonquiescent epithelial stem cell population. *Cell Rep*, 9, 701–711.

DiMaio, D., & Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, 445(1-2), 99–114. doi:10.1016/j.virol.2013.05.006

Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525–541. doi:10.1042/cs20050369

Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25, 2–23. doi:10.1002/rmv.1822

Eiges, R., and Benvenisty, N. (2002). A molecular view on pluripotent stem cells. *FEBS Lett.* 529, 135–141.

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

Foot F.W and Stewart FW. (1948). The anatomical distribution of intraepithelial epidermoid carcinomas of the cervix. *Cancer* 1: 431-440.

Fothergill T, McMillan NA. (2006). Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding. *Virology*, 352(2), 319-328.

Gariglio, P., Gutiérrez, J., Cortés, E., & Vázquez, J. (2009). The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Archives of Medical Research*, 40(6), 449-465. doi:10.1016/j.arcmed.2009.08.002

Geneser F. (2015). *Histología*. 4ta edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 685–704. doi:10.1124/pr.58.4.2

GLOBOCAN, 2018. Graph production: Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr/>)

Gudas LJ. (1994) Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem.* 269(22):15399-402

Gutierrez-Mazariegos, J., Schubert, M., & Laudet, V. (2014). Evolution of Retinoic Acid Receptors and Retinoic Acid Signaling. *The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level*, 55–73. doi:10.1007/978-94-017-9050-5_4

Hale, F. (1937). Relation of maternal vitamin A deficiency to microphthalmia in pigs. *Texas State J. Med.* 33, 228–232

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M. R., McLaughlin-Drubin, M. E., ... Crum, C. P. (2012). A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10516–10521. doi:10.1073/pnas.1202684109

Hosler BA, LaRosa GJ, Grippo JF, Gudas LJ. (1989) Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 9(12), 5623-5629.

Hosler BA, Rogers MB, Kozak CA, Gudas LJ. (1993). An octamer motif contributes to the expression of the retinoic acid-regulated zinc finger gene Rex-1 (Zfp-42) in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 13(5), 2919-2928.

http://screening.iarc.fr/atlashisto_detail.php?flag=0&lang=1&id=00004243&cat=B4

Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., et al. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.

Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M.M., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S.A., de Ligt, J., et al. (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160, 299–312.

Hwang G, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. (2002). Human Papillomavirus Type 16 E7 Binds to E2F1 and Activates E2F1-Driven Transcription in a Retinoblastoma Protein Independent Manner. *J Biological Chem.* 277:2923-2930.

Ivanova T, Petrenko A, Gritsko T, et al. (2002). Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer*; 21:2-4.

Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3902–3907. doi:10.1073/pnas.0511294103

Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, Chambon P. (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*. 124(2):313-26

Kessler, M., Hoffmann, K., Brinkmann, V., Thieck, O., Jackisch, S., Toelle, B., Berger, H., Mollenkopf, H.J., Mangler, M., Sehoul, J., et al. (2015). The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat. Commun.* 6, 8989.

Korzeniewski N, Spardy N, Duensing S. (2011). Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett.* 305(2):113-22.

Krebsbach, P. H., & Villa-Diaz, L. G. (2017). The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development*, 26(15), 1090–1099. doi:10.1089/scd.2016.0319

Kretzschmar, K., & Clevers, H. (2016). Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental Cell*, 38(6), 590–600. doi:10.1016/j.devcel.2016.08.014

Kurita, T., Cunha, G. R., Robboy, S. J., Mills, A. A., & Medina, R. T. (2005). Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs. *Mechanisms of Development*, 122(9), 1043–1055. doi:10.1016/j.mod.2005.04.008

Labouesse G, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A and Le Meur M. (1996). Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet* 13:370–373.

Linnemann, J.R., Miura, H., Meixner, L.K., Irmeler, M., Kloos, U.J., Hirschi, B., Bartsch, H.S., Sass, S., Beckers, J., Theis, F.J., et al. (2015). Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* 142, 3239–3251.

López J., Ruíz G., Organista-Nava J, Gariglio P. & García-Carrancá A. (2012). Human Papillomavirus Infections and Cancer Stem Cells of Tumors from the Uterine Cervix. *The Open Virology Journal*, 6, 232-240.

Lugli, N., Kamileri, I., Keogh, A., Malinka, T., Sarris, M.E., Talianidis, I., Schaad, O., Candinas, D., Stroka, D., and Halazonetis, T.D. (2016). R-spondin 1 and noggin facilitate expansion of resident stem cells from non-damaged gallbladders. *EMBO Rep.* 17, 769–779.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83(6), 835–839. doi:10.1016/0092-8674(95)90199-x

Marotta, L. L. C., & Polyak, K. (2009). Cancer stem cells: a model in the making. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(1), 44–50. doi:10.1016/j.gde.2008.12.003

Marsh M (1956) Original site of cervical carcinoma; topographical relationship of carcinoma of the cervix to the external os and to the squamocolumnar junction. *Obstet Gynecol* 7:444–452

Martens J, Arends J, Van Der P, De Boer B, Helmerhorst T. (2004). Cytokeratin 17 and p63 are Markers of the HPV Target Cell, the Cervical Stem Cell. *ANTICANCER RESEARCH* 24: 771-776

Martens, J. E., Smedts, F. M. M., Ploeger, D., Helmerhorst, T. J. M., Ramaekers, F. C. S., Arends, J. W., & Hopman, A. H. N. (2009). Distribution Pattern and Marker Profile Show Two Subpopulations of Reserve Cells in the Endocervical Canal. *International Journal of Gynecological Pathology*, 28(4), 381–388. doi:10.1097/pgp.0b013e31819932f8

Martens, J. E., Smedts, F., van Muyden, R. C. P. A., Schoots, C., Helmerhorst, T. J. M., Hopman, A., ... Arends, J. W. (2007). Reserve Cells in Human Uterine Cervical Epithelium Are Derived from Müllerian Epithelium at Midgestational Age. *International Journal of Gynecological Pathology*, 26(4), 463–468. doi:10.1097/pgp.0b013e31803c7c18

Martínez R. (2017) Citología ginecológica. Madrid, España. Paraninfo. pp:187-192.

Mason, K. E. (1935). Foetal death, prolonged gestation, and difficult parturition in the rat as a result of vitamin A deficiency. *Am. J. Anat.* 57, 303–349.

Mayani H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res*, 34, 3-15.

McLaren DS, Kraemer K. (2012). Vitamin A in health. *World Rev Nutr Diet.* 103:33-51. doi:10.1159/000170954

Morrison SJ, Spradling AC (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132:598–611

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527. doi:10.1056/nejmoa021641

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(1), 24. doi:10.1186/1476-4598-2-24

Niles RM. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* 2000; 16: 1084–89.

Ortiz-Sánchez, E., Santiago-López, L., Cruz-Domínguez, V. B., Toledo-Guzmán, M. E., Hernández-Cueto, D., Muñiz-Hernández, S., ... García-Carrancá, A. (2016). Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*, 7(22). doi:10.18632/oncotarget.8218

Ponnamperuma, R. M., Kirchof, S. M., Trifiletti, L., & De Luca, L. M. (1999). Ovariectomy increases squamous metaplasia of the uterine horns and survival of SENCAR mice fed a vitamin A-deficient diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), 502–508. doi:10.1093/ajcn/70.4.502

Quezada D. (1997). *Introducción al manejo de animales de laboratorio. Roedores y pequeñas especies*. México. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi. Unidad de Ciencias Biomédicas. Primera edición. Mexico. pp:67.

Reich, O., Pickel, H., & Regauer, S. (2008). Why Do Human Papillomavirus Infections Induce Sharply Demarcated Lesions of the Cervix? *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 12(1), 8–10. doi:10.1097/Igt.0b013e31806dba20

Rendi, M. H., Muehlenbachs, A., Garcia, R. L., & Boyd, K. L. (2012). Female Reproductive System. *Comparative Anatomy and Histology*, 253–284. doi:10.1016/b978-0-12-381361-9.00017-2

Richart RM (1973) Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 8:301–328.

Riley R, Duensing S, Brake T, Munger K, Lambert P, and Arbeit J. (2003). Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse Models of Cervical Carcinogenesis. *CANCER RESEARCH* 63, 4862–4871.

Roden, R., & Wu, T.-C. (2006). How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 753–763. doi:10.1038/nrc1973

Rohwedel, J., Guan, K., and Wobus, A. M. (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165, 190–202.

Rosas-Arellano, A., Villalobos-González, J. B., Palma-Tirado, L., Beltrán, F. A., Cárabez-Trejo, A., Missirlis, F., & Castro, M. A. (2016). A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(4), 421–430. doi:10.1007/s00418-016-1447-2

Sakai, Y. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes & Development*, 15(2), 213–225. doi:10.1101/gad.851501

Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science*, 340(6137), 1190–1194. doi:10.1126/science.1234852

Sato, T., & Clevers, H. (2015). SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. *Cell*, 161(7), 1700–1700.e1. doi:10.1016/j.cell.2015.06.028

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. doi:10.1038/nature07935

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., and Benvenisty, N. (2000).

Sellors J.W. & Sankaranarayanan R. (2003). *La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes*. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud.

Serafin H., Hernández J., Ocadiz R., Vazquez J., Albino M., Hernandez R., & Gariglio P. (2012). Retinoic acid receptor β deficiency reduces splenic dendritic cell population in a conditional mouse line. *Immunology Letters*, 146(1-2), 15–24. doi:10.1016/j.imlet.2012.04.006

Shah RB, Zhou M, LeBlanc M, Snyder M and Rubin MA. (2002). Comparison of the basal cell-specific markers, 34betaE12 and p63, in the diagnosis of prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 26: 1161-1168.

Soprano, D. R., Teets, B. W., & Soprano, K. J. (2007). Role of Retinoic Acid in the Differentiation of Embryonal Carcinoma and Embryonic Stem Cells. *Vitamins & Hormones*, 69–95. doi:10.1016/s0083-6729(06)75003-8

Sporn, M.B., & Roberts A.B (1984). Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Perspectives in Cancer Research*. 73: 1382-86.

Stark, H., & Živković, A. (2018). HPV Vaccination: Prevention of Cervical Cancer in Serbia and in Europe. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 35(1), 5–16. doi:10.2478/afmna-2018-0001

Thompson, D., & Weigel, R., (1998). hAG-2, the Human Homologue of the *Xenopus laevis* Cement Gland Gene XAG-2, Is Coexpressed with Estrogen Receptor in Breast Cancer Cell Lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(1), 111–116. doi:10.1006/bbrc.1998.9440

Tsanava RM, Burkadze GM, Chkhobadze MD, Berdzenishvili BR. (2006). The characteristics of proliferation activity in squamous metaplasia and reserve cell hyperplasia of uterine cervix. *Georgian Med News*.139:44-6.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189, 12–19.

Wang, B. Y., Gil, J., Kaufman, D., Gan, L., Kohtz, D. S., & Burstein, D. E. (2002). p63 In pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors. *Human Pathology*, 33(9), 921–926. doi:10.1053/hupa.2002.126878

Wang, X., Ouyang, H., Yamamoto, Y., Kumar, P. A., Wei, T. S., Dagher, R., ... McKeon, F. (2011). Residual Embryonic Cells as Precursors of a Barrett's-like Metaplasia. *Cell*, 145(7), 1023–1035. doi:10.1016/j.cell.2011.05.026

Wicha MS, Liu S, Dontu G. (2006). Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Res*. 66:1883-90.

Wira, C. R., Rodriguez-Garcia, M., & Patel, M. V. (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nature Reviews Immunology*, 15(4), 217–230. doi:10.1038/nri3819

Wolbach, S. B., and Howe, P. R. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *J. Exp. Med.*, 42: 753-777,1925.

Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11–22. doi:10.1038/nrc2050

Xu, L., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(2), 140–147. doi:10.1016/s0959-437x(99)80021-5

Yi W, Jang M, Kim J, Kim S, Rhee E. (2013). Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Oncol.Reports*. 29: 1617-1622.

Yoon, C.-S., Kim, K.-D., Park, S.-N., & Cheong, S.-W. (2001). $\alpha 6$ Integrin Is the Main Receptor of Human Papillomavirus Type 16 VLP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(3), 668–673. doi:10.1006/bbrc.2001.4838

Yu KR, Yang SR, Jung JW, Kim H, Ko K, Han DW, Park SB, Choi SW, Kang SK, Scholer H. and Kang KS. (2012). CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells* 30:876–887

Zhang, J., Gao, Y., Yu, M., Wu, H., Ai, Z., Wu, Y., Liu, H., Du, J., Guo, Z. & Zhang, Y. (2015). Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cell Differentiation by Altering Both Encoding RNA and microRNA Expression. *PLOS ONE*, 10(7), e0132566. doi:10.1371/journal.pone.0132566

zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 690-698.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342–350. doi:10.1038/nrc798