



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE RAR β Y LA
GENERACIÓN DE LESIONES PREMALIGNAS EN CÉRVIX DE
RATONES RAR β ^{L-/L-} CONDICIONALES TRATADOS CON 17 β -
ESTRADIOL**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

TUTOR

DR. JUAN PATRICIO GARIGLIO VIDAL

PRESENTA

AZUCENA MORALES VERGARA

Los Reyes Iztacala Edo. De México 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Lista de figuras	IV
Lista de Tablas	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VII

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Antecedentes.
- 1.2 Oncogenes y Genes supresores de tumores.
- 1.3 Receptores Nucleares.
- 1.4 Retinoides y Receptores para el Ácido Retinoico.
- 1.5 Receptores para el Ácido Retinoico y Cáncer Cervical.
- 1.6 Genes blanco y procesos regulados por RAR β
- 1.7 Estrógenos y receptores de estrógenos
- 1.8 Estrógenos y cáncer cervical
- 1.9 Modelos murinos para el estudio de cáncer cervical.

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

- 4.1 Objetivo General.
- 4.2 Objetivos específicos.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 Genotipificación.

5.2 Tratamiento hormonal.

5.3 Seguimiento del ciclo estral.

5.4 Obtención de muestras de los ratones durante y después del tratamiento.

5.5 Análisis histopatológico de tejidos.

5.6 Estudio de expresión de la proteína de RAR β y PCNA (inmunohistoquímica) y mRNA de los genes RAR β , RAR α y c-Myc (RT-qPCR).

6. RESULTADOS

6.1 Genotipificación de ratones silvestres C57BL/6J y ratones transgénicos condicionales RAR $\beta^{L-/L-}$ tratados con 17 β -estradiol y sin tratar, mediante PCR punto final.

6.2 Administración del tratamiento hormonal a ratones silvestres C57BL/6J y transgénicos, mediante inyección intraperitoneal de 17 β -estradiol dosis bajas (833ng/día) y dosis altas (2500ng/día).

6.2 Seguimiento de las fluctuaciones del ciclo estral en ratones silvestres C57BL/6J y ratones transgénicos RAR $\beta^{L-/L-}$, tratados y sin tratar.

6.3 Análisis histopatológico del cérvix de ratones obtenidos de ambas cepas tratadas y sin tratar.

6.4 Detección de las proteínas RAR β y PCNA mediante inmunohistoquímica.

6.5 Determinación de los niveles de expresión de los genes RAR β , c-Myc y RAR α por RT-qPCR.

7- DISCUSIÓN

8. CONCLUSIONES

LISTA DE IMÁGENES Y FIGURAS

Imagen 1. Factores de Riesgo relacionados al desarrollo del CaCu

Imagen 2. Inducción de la transformación celular por la infección persistente del HR-HPV.

Imagen 3. Procesos moleculares generales que caracterizan a una célula cancerosa.

Imagen 4. Receptores Nucleares para el Ácido Retinoico.

Imagen 5. Mecanismo de acción de los Receptores Nucleares.

Imagen 6. Construcción de ratones transgénicos CMV-Cre(tg/0)/RAR β L2/L2 (RAR $\beta^{L-/L-}$).

Figura 1. Genotipificación de ratones.

Figura 2. Fluctuaciones del ciclo estral.

Figura 3. Histopatología hematoxilina-eosina.

Figura 4. Inmunohistoquímica: RAR β .

Figura 5. Inmunohistoquímica: PCNA.

Figura 6. Expresión de RAR β por RT-qPCR.

Figura 7. Expresión de RAR α por RT-qPCR.

Figura 8. Expresión de c-Myc por RT-qPCR.

ABREVIATURAS

atRA	“all trans Retinoic Acid”
AR	Ácido retinoico
CaCu	Cáncer Cervicouterino
DA	Dosis Altas
DB	Dosis Bajas
DBD	Siglas de su nombre en inglés: <i>DNA-binding domain</i>
DNA	Siglas de su nombre en inglés: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
E ₂	Estradiol
ER	Receptores a Estrógenos
EREs	Elementos de Respuesta a Estrógeno
GR	Receptores a Glucocorticoides
HR- HPV	Siglas de su nombre en inglés: <i>High-Risk Human Papillomaviruses</i>
HREs	Elementos de Respuesta a Hormonas
H&E	Hematoxilina y Eosina
Ip	Intraperitoneal
Kb	Kilobases
LBD	Dominio de Unión al Ligando
NRs	Receptores Nucleares
NIC	Neoplasia cervical intraepitelial
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PCR	Siglas de su nombre en inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>

RAR	Siglas de su nombre en inglés: <i>Retinoic acid receptor</i> .
RAREs	Siglas de su nombre en inglés: <i>Retinoic Acid Response Element</i> .
RAR β	Siglas de su nombre en inglés: <i>Retinoic acid receptor β</i> .
REs	Elementos de Respuesta
RNA	Siglas de su nombre en inglés: <i>Ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	Siglas de su nombre en inglés: <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> .
RXR	Receptor (es) X a Retinoides
ST	Sin Tratamiento

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el segundo lugar en incidencia mundial y constituye una de las principales causas de mortalidad de la mujer mexicana. La infección por el Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (Siglas de su nombre en inglés: *high-risk human papillomaviruses*) (HR-HPV) es el factor más importante en el desarrollo de cáncer cervical. Sin embargo, existen estudios que indican una relación entre el consumo deficiente de retinoides o alteraciones en los Receptores para el Ácido Retinoico (RARs) y el uso de anticonceptivos orales como cofactores en el desarrollo de CaCu. Para estudiar estos cofactores y su participación en la carcinogénesis usamos un animal modelo: el ratón CMV-Cre(tg/0)/RAR β L2/L2 (transgénicos condicionales, en adelante RAR β ^{L-/L-}) que presenta una delección en los exones que codifican para el dominio de unión a ligando del gen RAR β lo que genera un corrimiento en el marco de lectura y no se genera mRNA ni proteína. Estos ratones los tratamos (de 1 a 4 meses de edad) a dos concentraciones diferentes de 17 β -Estradiol (E2) por tres meses.

Los resultados indican que los ratones RAR β ^{L-/L-} (Sin Tratamiento con E2) a la edad de cuatro meses presentan una disminución (aproximadamente 50%) en los niveles de expresión de mRNA y proteína del gen RAR β en cérvix. En lo que refiere a la histología, estos ratones presentan: metaplasia epidermoide, hiperproliferación, indiferenciación de células cilíndricas, inmaduración de células escamosas, zonas de atrofia, papilomatosis, ausencia de queratinización y presencia de infiltrado inflamatorio crónico y agudo. Adicionalmente se analizaron por inmunohistoquímica los niveles en la expresión de PCNA y mediante RTqPCR los niveles del mRNA de c-Myc; ambos se observaron aumentados, lo que nos indica un aumento en la proliferación esto en comparación con el ratón control C57BL/6J.

En estos mismos ratones, al ser tratados con estrógenos a dosis de 833ng/día (Dosis Bajas; DB), se observa que aumenta la expresión de mRNA y proteína del gen RAR β ; la histología del tejido cervical fue normal. También se observó que los niveles de expresión de PCNA se mantuvieron igual que el control, mientras que c-Myc aumentó; en RAR α no se observó ningún cambio. Lo anterior nos indica que los estrógenos a estas dosis, podrían estar ejerciendo un papel aparentemente protector que no permite el desarrollo de lesiones precancerosas, las cuales si se observaron en el ratón RAR β ^{L-/L-} Sin Tratamiento (ST).

Por otro lado en el grupo RAR β ^{L-/L-} tratados con dosis de 2500ng/día de E2 (Dosis Altas; DA), la expresión de RAR β está disminuida a un nivel similar que el grupo RAR β ^{L-/L-} ST. En lo que se refiere a la histopatología, este ratón desarrolla un aumento en las alteraciones precancerosas que mostró el ratón RAR β ^{L-/L-} ST y los niveles de PCNA también incrementaron. En la expresión de c-Myc se observó una disminución y en RAR α no se observó ningún cambio.

En conclusión, la deficiencia de RAR β es capaz de generar lesiones precancerosas y aumento en la proliferación celular; el uso de cofactores como el 17 β -estradiol tiene efectos dependientes de la dosis y probablemente del tiempo de administración, ya que a DB parece tener un papel protector y a DA un fenotipo más acentuado en el desarrollo de lesiones precancerosas. Proponemos el estudio de estos cofactores durante periodos de tiempo más largos; además del estudio de la expresión de genes blanco y proteínas asociadas al ciclo celular, para elucidar mecanismos que permitan generar estrategias en el tratamiento y prevención del cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En los países en vías de desarrollo como México se está observando una transición epidemiológica curiosa, aumentan rápidamente las enfermedades frecuentes de los países desarrollados entre ellas el cáncer, pero no disminuyen con igual rapidez las enfermedades características de los subdesarrollados. El cáncer representa una de las más importantes causas de mortalidad general con cerca de 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Jemal A. *et al.* 2011); además de representar un serio problema socioeconómico, pues afecta principalmente a personas en edad reproductiva y su tratamiento tiene un costo elevado.

El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo (Parkin D. 2005), cada dos horas muere una mujer mexicana por este tipo de neoplasia (Globocan 2008); constituyendo una de las principales causas de mortalidad, después del cáncer de mama, en la mujer mexicana con altos niveles de marginación (Mohar *et al.* 1999). Algunos tipos de papilomavirus humanos (siglas de su nombre en inglés: *human papillomaviruses*) (HPV) (por ejemplo los tipos HPV16 y HPV18) son considerados de alto riesgo (AR) y constituyen el principal factor de riesgo en el desarrollo de CaCu (Brake T. y Lambert P. 2005), el riesgo a padecer CaCu es de 78 veces más en mujeres infectadas por HR-HPV (Tirado L. *et al.* 2005); afecta principalmente al epitelio cervical escamoso metaplásico ubicado en la zona de transformación (ZT) y está presente en el 90% de los carcinomas escamosos y el 50% de los adenocarcinomas contienen su DNA (Bosch F. 1995).

Los largos periodos de latencia (varias décadas) entre la infección y el desarrollo de un carcinoma, el bajo porcentaje del total de individuos infectados que desarrolla cáncer, así como diversos datos experimentales, sugieren que se necesitan otros factores para que se origine un tumor maligno después de la infección viral (Zur H. 2000) (Imagen 1). Muchos estudios han indicado que existe una relación entre la alteración de los receptores para el ácido retinoico (RARs) pertenecientes a la familia de receptores nucleares y el desarrollo de CaCu; las mujeres que exhiben disminuida la expresión del gen del receptor β para el ácido retinoico (RAR β) tienen 3 veces más probabilidades de desarrollar CaCu (Gariglio P. *et al.* 2009). El gen RAR β es considerado como un supresor de tumores, las alteraciones en la expresión génica de RAR β tanto en los niveles de mRNA como en la pérdida de la inducibilidad de su ligando son una característica importante en mujeres con cáncer cervical (Geisen C. *et al.* 1997). La ZT tiene altos niveles de expresión de RAR β y se ha demostrado el aumento medio en la expresión de RAR β 1.5 veces más en muestras benignas y una reducción progresiva de su expresión en cánceres de cuello uterino a nivel de tejido (Abu J. *et al.* 2008) y en todas las neoplasias cervicales intraepiteliales "NICs" (NIC1, NIC2 y NIC3) en un 33% de los casos; se ha sugerido a la metilación de este gen supresor como un evento importante para su disminución en la carcinogénesis cervical temprana. (Ivanova T. *et al.* 2002, Xu X. *et al.* 1999). Un mecanismo importante por el cual RAR β ejerce la función inhibitoria del crecimiento se basa en su capacidad para reprimir al factor de transcripción AP-1 (Lin F. *et al.* 2000), mediante la degradación selectiva de c-Jun en células de carcinoma cervical (De-Castro Arce *et al.* 2004). Estos hallazgos

pueden ser útiles para hacer más eficaz el uso de los retinoides como agentes preventivos y terapéuticos.

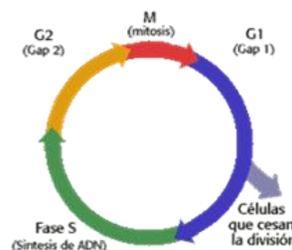
Por otro lado, la exposición crónica con estrógenos incrementa el riesgo a desarrollar CaCu en un coeficiente de 2-4 veces para mujeres con uso prolongado de anticonceptivos orales (AO) (Moodley M. et al. 2003). Los estrógenos sintéticos que se encuentran en las formulas de los AO incrementan la actividad estrogénica en comparación con los estrógenos endógenos en algunos tejidos estrógeno-dependientes (órganos diana) que incluyen el útero, la mucosa vaginal, glándulas cervicales, ovario y glándulas mamarias (Aten R. y Eisenfeld A. 1982).

Medio Ambiente.

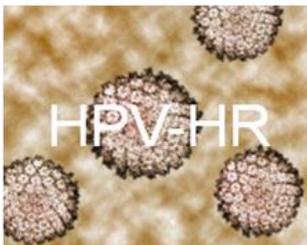


3 a 5 veces más 4 veces más 3 veces más

Protooncogenes y genes supresores de tumores.



Infecciones virales.



78 veces más.

Paridad elevada



2.6 veces más.

Imagen 1. Factores de riesgo relacionados al desarrollo de CaCu. Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del CaCu son: infección por HR-HPV, deficiencias de vitaminas, en especial de la vitamina A, factores hereditarios, el uso prolongado de anticonceptivos orales, el tabaco, la exposición a cancerígenos y la multiparidad. (Gariglio P. et al. 2009, Flores Y. et al. 2008, Muñoz N. et al. 2006).

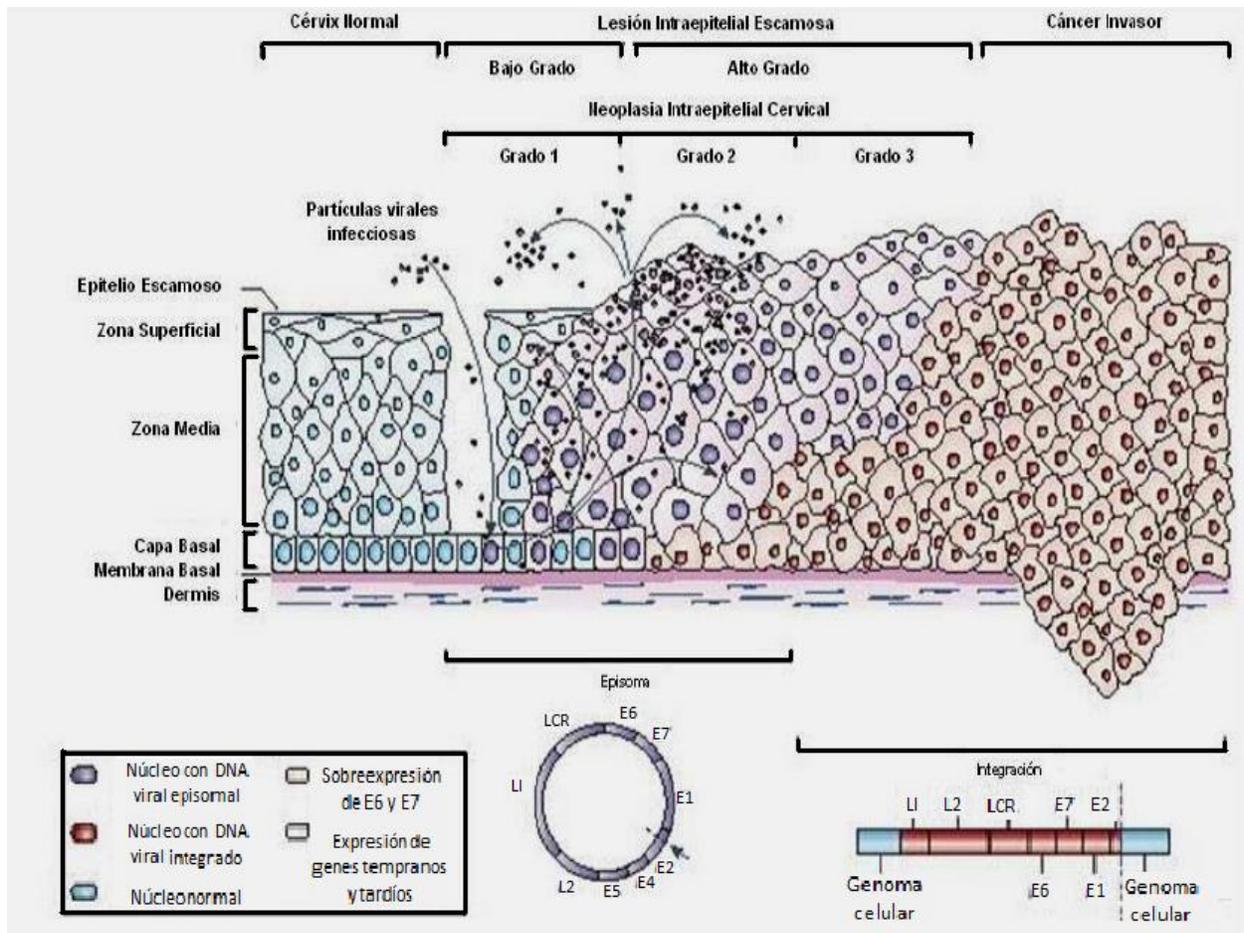


Imagen 2. Inducción de la transformación celular por la infección persistente de HR-HPV. La Figura muestra el proceso de transformación celular desde la infección por el HR-HPV a través de una lesión hasta el desarrollo de carcinoma invasor (Tomado de: Baldwin et al. 2003).

1.2 Oncogenes y Genes Supresores de Tumor.

El estilo de vida actual de las personas aumenta el riesgo a de contraer ciertos tipos de cánceres. Los cánceres por lo general no son hereditarios y son iniciados por agentes medio ambientales (compuestos químicos, radiaciones, virus, etc.), los cuales provocan una mutación en algún gen que permite a la célula ciertas ventajas en su crecimiento, en divisiones sucesivas de las células mutadas se puede introducir una segunda mutación y posteriormente otras mutaciones en los mencionados genes favoreciéndose cada vez más el crecimiento descontrolado de los nuevos tipos celulares. Después de varios años de la primera mutación se llega a una célula maligna capaz de dividirse rápidamente y ser muy resistente a quimioterapia o radioterapia (Gariglio P. 2003). El cáncer es una enfermedad multifactorial en la cual se ha identificado que la célula mantiene cambios como: autosuficiencia en señales de crecimiento,

evasión de la apoptosis, metástasis e invasión de tejidos, evasión de señales antiproliferativas, angiogénesis sustentada y potencial replicativo ilimitado (Imagen 3) (Douglas *et al.* 2000).

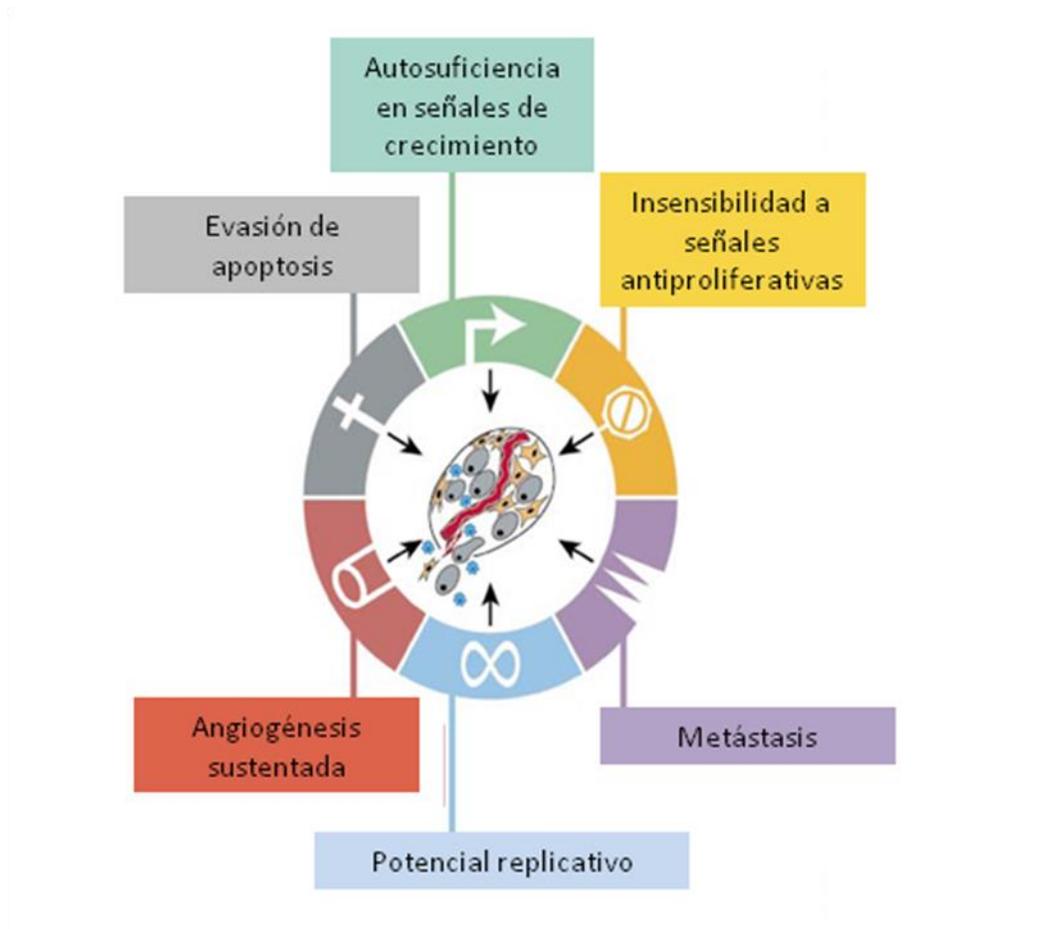


Imagen 3. Capacidades funcionales adquiridas durante el desarrollo de cáncer a través de diversas estrategias mecanicistas. (Hanahan D. *et al.* 2000)

Se ha establecido que en el inicio y en el desarrollo de una neoplasia intervienen básicamente dos clases de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores (también llamados antioncogenes). Los oncogenes se caracterizan por que regulan positivamente el crecimiento y la división celular y son el producto alterado de genes denominados protooncogenes. Las proteínas oncogénicas tienen una actividad aumentada si se compara con las proteínas protooncogénicas. Por su parte, los genes supresores de tumor tienen como característica importante la de inhibir el crecimiento y la proliferación celular.

Debido a su carácter dominante, las mutaciones que dan origen a los oncogenes no se heredan; sin embargo aquellas que afectan a los genes supresores de tumor pueden en algunos casos transmitirse a la descendencia (Hanahan D. 2000). Los genes supresores de tumores o antioncogenes más estudiados son el gen del retinoblastoma (rb), p16ink4a y el gen p53; pero en la actualidad se ha observado una gran importancia en otros genes que también funcionan

como reguladores negativos del ciclo celular y tienen actividad supresora tumoral como es el gen RAR β (Mangelsdorf, *et al.* 1995). Los genes supresores de tumores son inactivados por cambios genéticos, incluidos las mutaciones, eliminaciones y reorganizaciones genómicas. Sin embargo, en muchos cánceres humanos estos genes son también con frecuencia silenciados por alteraciones epigenéticas tales como la metilación del DNA en la región promotora y la modificación de las histonas (Feinberg A. 2004).

1.3 RECEPTORES NUCLEARES.

Los receptores nucleares (NRs) son factores de transcripción regulados por ligando, activados interactúan con elementos de respuesta (REs) en la región promotora de genes blanco y modulan su transcripción (Mangelsdorf *et al.* 1995); desempeñan diversos papeles en el crecimiento celular, diferenciación, desarrollo, apoptosis y homeostasis de los epitelios (Chambon 1996). La elucidación de los mecanismos moleculares referentes a la acción de estos receptores es central en biomedicina molecular y puede tener implicaciones importantes en la prevención y terapia del cáncer

La superfamilia de receptores nucleares ha sido dividida en dos subfamilias: la de receptores a esteroides y la de receptores a retinoides y hormonas tiroideas (no esteroides) (Mangelsdorf *et al.*, 1995). La familia esteroidea incluye receptores a glucocorticoides (GR), mineralocorticoides, progestinas (PRs), andrógenos (AR) y estrógenos (ER) (Mangelsdorf *et al.* 1995). La familia no esteroidea de NRs incluye receptores para el ácido retinoico (RAR), receptores X a retinoides (RXR), receptores a hormonas tiroideas (TRs), receptores de vitamina D (VDR) y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs).

Los integrantes de la superfamilia de NRs tienen motivos funcionales y estructurales comunes aunque los miembros de la familia de receptores no esteroideos pueden unirse al DNA como monómeros y homodímeros, la forma activa más importante parece estar representada por heterodímeros (Mangelsdorf *et al.* 1995; Chambon 1996).

Los miembros de la familia se caracterizan por presentar dos dominios funcionales conservados, en la porción N-terminal de la proteína se encuentra un dominio de unión al DNA (siglas en Inglés: DBD) el cual contiene dos dedos de zinc; en la porción C-terminal hay un dominio hidrofóbico denominado dominio de unión al ligando (siglas en Inglés: LBD), el cual es responsable de la interacción con el ligando, de la dimerización de la proteína y activación transcripcional (Imagen 4).

Recientemente, se descubrió que ciertos NRs interactúan de una forma dependiente de ligando con coactivadores (Altucci L. *et al.* 2007). Una vez unidos por el receptor al promotor apropiado en genes blanco para el ácido retinoico, los coactivadores estimulan la transcripción por su interacción con la maquinaria basal de transcripción y/o por modulación local de la estructura del nucleosoma vía acetilación de histonas y de factores de transcripción (Altucci L. *et al.* 2007).

Existen también proteínas correpresoras que interactúan con los LBDs de los NRs y forman complejos con histonas deacetilasas impidiendo la transcripción, lo cual sugiere que la

remodelación de la cromatina por desacetilación puede desempeñar un papel importante en la represión transcripcional mediada por receptores (Altucci L. *et al.* 2007; Noy N. 2010).

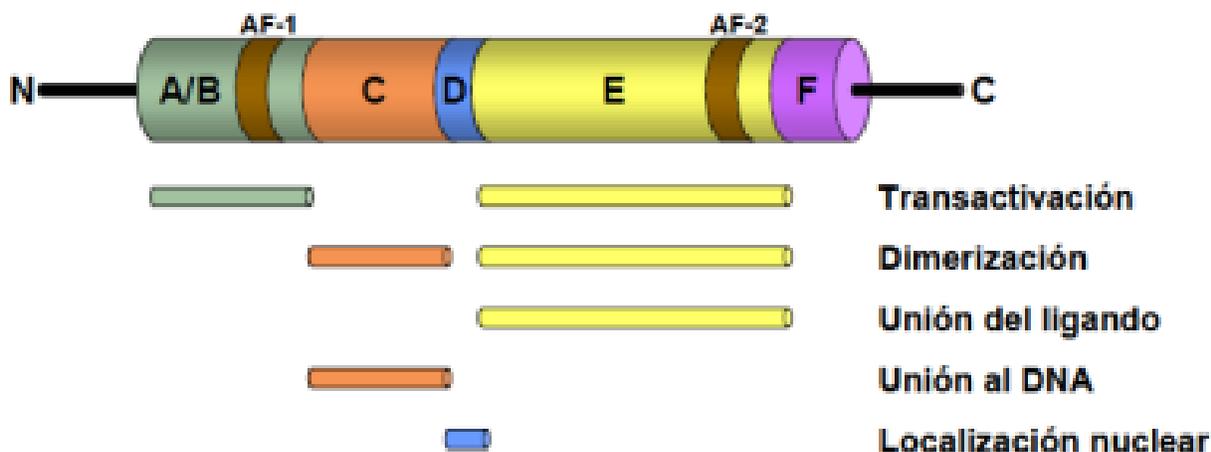


Imagen 4. Estructura modular de los receptores nucleares y localización de sus principales funciones (Source J. 2001).

1.4 Retinoides y Receptores para el Acido Retinoico.

Los retinoides son metabolitos activos de la vitamina A, regulan múltiples procesos fisiológicos que van desde la embriogénesis hasta su uso como medicamentos en varias enfermedades incluyendo el cáncer (Chambon P. 1996); la eficacia clínica de los retinoides depende principalmente en su capacidad para modular el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis de los epitelios en células premalignas y malignas. Los retinoides actualmente se utilizan como medicamentos preventivos y terapéuticos contra toda una variedad de tumores malignos humanos tales como mama, pulmón, ovario, hígado, leucemia, cáncer de próstata, y cáncer cervicouterino (Altucci L. y Gronemeyer H. 2001).

Los RARs incluyen tres diferentes isotipos e isoformas (α , β , γ) codificados por genes distintos (Chambon P. 1996; Altucci L. y Gronemeyer H. 2001) y conservados evolutivamente, 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.*, 1995).

Los RARs se unen tanto al all-trans ácido retinoico (ATRA) como a su isómero 9-cis-ácido retinoico, mientras que los RXRs solo se unen a este último. En presencia del ligando los RXRs pueden formar homodímeros o heterodímeros con RARs, que a su vez interactúan con elementos de respuesta al ácido retinoico (RAREs) o (RXREs) (Zhang X., *et al.*1992). La existencia de distintos RAREs y RXREs dentro de las regiones promotoras, indica que RAR homodímeros y heterodímeros (RXR-RAR) transitan por distintas vías en adición de ácido retinoico (Roy B. *et al.*1995). La regulación de la expresión génica positiva de los RARs requiere

de su interacción a proteínas con actividad acetiltransferasa (P300 o la proteína CREB vinculante), proporcionan un enlace funcional directo con el núcleo de la maquinaria de transcripción y la modulación del nucleosoma. Además de su función reguladora positiva, los RARs también afectan negativamente la expresión génica. En ausencia de ligando, RAR/RXR reclutan desacetilasas de histonas dando como resultado el silenciamiento genético mediante la condensación de la cromatina (Imagen 5) (Weston A. *et al.* 2003).

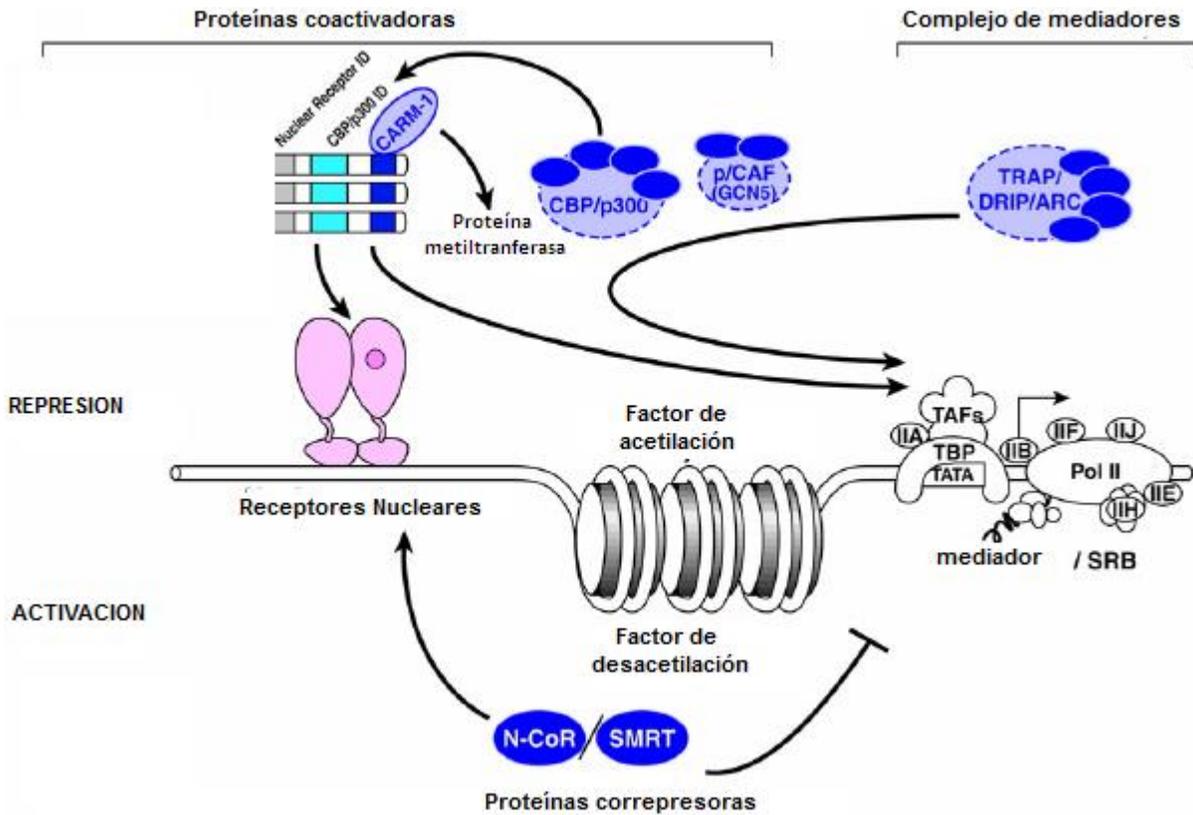


Imagen 5. Regulación transcripcional por receptores nucleares. En ausencia de ligando, los NRs pueden inhibir la transcripción de diversos genes. Cuando se activan por ligando, los NRs pueden inducir la transcripción por reclutamiento de acetilasas de histonas (Castro E. 2010)

Uno de los isotipos de RAR, el RAR β actúa manteniendo la homeostasis de los epitelios, por un lado se sabe que en el epitelio cervical de ratón y humano sin alteraciones es altamente responsivo al estado de vitamina A y expresa altos niveles transcripcionales de RAR β . Por otro lado, los niveles bajos de mRNA y la pérdida de inducibilidad de la expresión del gen RAR β son características notables de los cánceres humanos de líneas celulares derivadas de tumores. Los

tipos de cáncer que tienden a anomalías en el gen RAR β incluyen al cáncer de pulmón (Gebert J. *et al.* 1991), cabeza y cuello (Xu X. *et al.* 1994), mama (Swisshelm K. *et al.* 1994), cavidad oral (Crowe D. *et al.* 1991) y carcinoma cervicouterino. (Geisen C. *et al.* 1997).

En conclusión, los retinoides transducen señales importantes en cérvix, piel y otros tejidos epiteliales. En tejido cervical los RAR y en particular RAR β , podrían jugar un papel importante en la regulación de genes implicados en proliferación y apoptosis, es decir en el control de procesos neoplásicos.

1.5 Genes blanco y procesos regulados por RAR β

El ácido retinoico regula más de 532 genes; en algunos casos este control es directo, ejerciendo su acción a través de un heterodímero de RARs unidos a RAREs en genes blanco, en otros casos es indirecto, lo que refleja las acciones de factores de transcripción intermediarios (no clásicos), asociaciones de receptores con otras proteínas, o incluso mecanismos más distantes. 27 de estos genes son controlados a través de la vía clásica del ácido retinoico en contextos celulares. 105 pueden ser modulados a nivel transcripcional, por regulación directa pero en la mayoría de los casos, no tienen relación con RAREs o con la participación de RAR-RXR. Hay 124 genes que parecen ser regulados de manera indirecta. Los restantes 267 genes, están regulados por AR, de alguna manera, pero los datos disponibles en la actualidad no nos permiten predecir el control directo *versus* indirecto. La mayoría aún no han sido estudiados, salvo en contextos de largo plazo o con dosis elevadas, y para muchos, el interés último ha sido clínico, de desarrollo o de diagnóstico y no mecanicista (James E. *et al.* 2007).

En el caso del RAR β al unirse a su ligando activa la transcripción por unión a RAREs localizados en regiones promotoras de genes blanco. Los RAREs generalmente consisten en dos repeticiones de la secuencia motivo central AGGTCA separada por dos o cinco pares de bases (pb) (elementos DR2 y DR5) (Hoffmann B. *et al.* 1990), los genes blanco codifican una amplia gama de proteínas que regulan una variedad de procesos biológicos. Se identificaron 27 genes que están regulados directa o indirectamente por RAR β en líneas celulares de tumor de pulmón que no expresan RAR β . Varios de los genes afectados codifican para proteínas cuyas funciones sería aumentar el proceso de apoptosis y/o la respuesta inmune del huésped. El último grupo incluye ICAM-1 y MHC de clase I de cadena pesada, cuya proteína desempeña papeles particularmente importantes en el montaje de una respuesta eficaz anti-tumor (Toulouse A. *et al.* 1999). Se han identificado genes blanco de RAR β como son: RAR α , c-Myc, FGF21, AP1, p28, glutamato deshidrogenasa (GLUD), gen responsivo a la fosfoproteína p96 (Dab2), PDGF- α receptor y meis1a, entre otros. La mayoría de los genes diana se regulan por la unión de ligando, aunque algunos genes tales como Dab2, Hic5, Fox y p28, también son reguladas por RAR β en ausencia de ácido retinoico añadido exógenamente. Algunos genes blanco de RAR β son específicos por lo que cada isotipo RAR tiene funciones distintas. (Kastner P. *et al.* 1990; Zelent A. *et al.* 1991; Widschwendter M. *et al.* 1997).

c-Myc y RAR α son genes blanco de RAR β , estos participan durante el crecimiento celular y proliferación. El proto-oncogen c-Myc, se activa en varios tumores animales (Dang C. *et al.* 1999), es un factor de transcripción que regula muchos procesos biológicos, incluyendo el ciclo celular y la diferenciación celular (Eisenman R. 2001). La proteína c-Myc puede regular algunas

quinasas dependientes de ciclina (CDKs), y los inhibidores de CDK, que son reguladores del ciclo celular (Amati B. *et al.* 1998). La desregulación de la expresión de c-Myc a menudo resulta en aumento de la expresión de ciclina E y ciclina A (Barrett J. *et al.* 1995).

RAR α está implicado de forma redundante en los vertebrados en el control pleiotrópico de desarrollo embrionario y la organogénesis, la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y control homeostático en múltiples sistemas fisiológicos. RAR α se expresa en muchos sistemas fisiológicos principales (sistema nervioso central [SNC], enfermedades endócrinas, metabólicas, gastrointestinales, reproductivas y cardiopulmonares), con niveles particularmente altos en el ojo, la lengua, el riñón, el útero y los testículos. Deleción dirigida (knockout) del gen RAR α en ratones se asocia con defectos en el SNC, la homeostasis y metabolismo (Anxun Wang *et al.* 2010; Bookout A. *et al.* 2005).

FGF21 o factor de crecimiento de fibroblastos 21, es una hormona derivada del hepatocito que restaura la homeostasis de glucosa y lípidos en la obesidad inducida por diabetes. Se ha identificado a FGF21 como blanco directo de RAR β . La transcripción del gen de FGF21 se incrementa por la sobreexpresión de RAR α y RAR β en células HepG2 (línea celular de hepatocarcinoma). *In vivo*, la sobreexpresión de RAR β en el hígado mejora la producción y secreción de FGF21, que a su vez promueve la oxidación hepática de ácidos grasos. Además, RAR β se une a sitios RARE putativos del promotor de FGF21, lo que contribuye a su inducción (Li Y. *et al.* 2013).

El factor de transcripción AP-1 es una proteína heterodimérica compuesta de proteínas pertenecientes a la familia c-Fos y c-Jun, controla una serie de procesos celulares, incluyendo la diferenciación, proliferación y apoptosis (Glover J., Harrison S. 1995); juega un papel central en la regulación de la transcripción de determinados tipos de HR-HPV tales como HPV 16 y HPV 18, RAR β invalida tanto la afinidad de unión de AP-1 y su actividad por una degradación selectiva de la proteína c-Jun como socio de dimerización importante, sin sustitución por otros miembros de la familia Jun (De-Castro Arce J. *et al.* 2004).

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

Estos datos implican a RAR β como un gen supresor de tumores, alteraciones en la estructura y su expresión son asociados con la carcinogénesis humana, jugando un rol protector contra la progresión de neoplasias.

1.6 Receptores para el Acido Retinoico y Cáncer Cervical.

En condiciones normales el epitelio cervical tiene dos fenotipos: escamoso estratificado y simple columnar, los cuales se unen en la zona de transformación. La condición de esta zona varía a lo largo de la vida, dependiendo de la edad, estado hormonal y dieta. El ácido retinoico es esencial para la diferenciación del epitelio cervical normal y ha sido utilizado como agente preventivo y terapéutico en displasias y neoplasias cervicales (Dong et al. 1995). Bajos niveles dietéticos de vitamina A se han correlacionado con el desarrollo de neoplasia intraepitelial (NIC) y de cáncer cervical. De gran importancia fue la observación de que la mayoría de las líneas celulares derivadas de carcinomas de células escamosas presentaban una baja expresión de los receptores para el ácido retinoico (Hu et al. 1991).

Los retinoides son efectivos suprimiendo el desarrollo de tumores en varios modelos de carcinogénesis, incluyendo los de piel y cérvix (Moon et al. 1994); tienen un efecto sobre la supresión del crecimiento de varias líneas celulares tumorales *in vitro* e *in vivo*. Su actividad está mediada por RAR y RXR (Rogers M. 1997). El hecho de que los RAR y RXR muestran un patrón de expresión diferencial en tejidos embrionarios y adultos indica que tienen funciones específicas. Los patrones de expresión de los diferentes transcritos de RAR han sido ampliamente estudiados por Northern blot y por análisis de hibridación *in situ* en todas las etapas de la embriogénesis del ratón y en los tejidos adultos (Zelent A. et al. 1991; Kastner P. et al. 1990; Vollberg T. et al. 1992). La concentración de múltiples isótipos de RAR y RXR varía entre los diferentes tejidos. El epitelio cilíndrico y escamoso cervical de ratón expresa altos niveles transcripcionales de RAR α , RAR β , y RXR (α y β); el gen RAR β es altamente expresado en el epitelio simple columnar en condiciones normales y principalmente en las células basales en los focos de metaplasia de células escamosas pero esta ausente en el epitelio estratificado (Darwiche et al. 1994).

Todos estos resultados sugieren que el bajo nivel de retinoides o el silenciamiento de RAR β en combinación con otros cofactores como podrían ser HR-HPV, estrógenos, edad o multiparidad influyen en la progresión de las lesiones precancerosas en el cuello uterino.

1.7 Estrógenos y Receptores a Estrógenos

Otro factor involucrado en la carcinogénesis que ha sido identificado, es la acción ejercida por las hormonas esteroides, principalmente los estrógenos.

Las hormonas esteroideas son derivados del colesterol y por lo tanto formadas por el ciclopentanoperhidrofenantreno. El colesterol proviene de la captación por el ovario de las lipoproteínas circulantes ricas en colesterol o bien puede ser sintetizado *in situ* a partir del acetato; el AMP cíclico promueve la fosforilación de una proteína que transporta el colesterol desde sus depósitos intracelulares hacia la mitocondria, donde es convertido en pregnenolona por la enzima dependiente del citocromo P450 llamada desmolasa o P450scc (Aten R. et al. 1982). La pregnenolona formada en esta vía puede convertirse en progesterona, esta no puede convertirse como tal en andrógenos (los precursores de los estrógenos) sino que también debe hidroxilarse a 17 α -hidroxiprogesterona por la P45017 α OH, en forma similar a la pregnenolona. Así, a partir de la 17 α -hidroxiprogesterona se forma androstenediona, que puede convertirse en

testosterona y a partir de esta se sintetiza el estradiol. La síntesis de andrógenos en el ovario ocurre en la *teca*, siendo la misma estimulada por la LH hipofisaria.

La acción reguladora primaria de los estrógenos está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen B. *et al.* 2000). En el tracto reproductivo femenino los estrógenos actúan manteniendo la diferenciación del epitelio vaginal y exocervical (Dallenbach G. 1981); así como regulando el ciclo menstrual, existiendo un delicado balance en sus niveles circulantes durante el embarazo, las fases premenstrual, menstrual y postmenopáusicas. Este balance es influenciado de manera importante por la ingesta de hormonas esteroideas en forma de anticonceptivos orales (AO) con componentes que incluyen al estradiol, en mujeres jóvenes o por terapia hormonal de remplazo en mujeres postmenopáusicas (Richard *et al.* 2007).

El mecanismo de acción de este esteroide se lleva a cabo a través de los receptores de estrógeno (REs) activados por estrógenos y por moléculas estructuralmente similares, para ejercer sus diversos efectos biológicos. Hay dos isoformas RE α y RE β ; ambas han sido purificadas y caracterizadas desde diferentes tejidos blanco (Germain P. *et al.* 2003) y en diversas especies como rata, ratón, humano, bovino y pollo entre otros (Enmark E. 1999), el RE α está localizado en el brazo largo del cromosoma 6 en humanos, mientras que el RE β está ubicado en la banda q22-24 del cromosoma 14 y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido (Enmark E. *et al.* 1997). El RE α y RE β varían su expresión durante la proliferación y diferenciación celular, de forma tal que el RE α parece ser necesario para el desarrollo básico y crecimiento de tejidos sensibles a estrógeno y el RE β se considera el responsable de la maduración funcional y está involucrado en la inhibición de la proliferación celular (Kowalski A. *et al.* 2002). De esta manera, los REs ejercen roles determinantes en el mecanismo de acción de estrógeno.

Actualmente se conoce que la estructura del RE α esta formada por 595 amino ácidos y tiene tres dominios, uno amino-terminal regulador, hipervariable, relacionado con la función de transactivación (Kowalski A. 2001), otro central de unión al DNA (DBD), altamente conservado, responsable de la dimerización, especificidad de unión y localización nuclear del receptor, y uno carboxi-terminal de unión al ligando (LBD). En cambio, RE β contiene 530 amino ácidos y es más corto porque le falta una porción del dominio carboxi-terminal, que determina la unión de ciertos antiestrógenos.

Tanto el RE α como el RE β presentan dominios estructurales y funcionales comunes, la más alta homología entre ellos corresponde al DBD (97%), mientras que el LBD presenta una homología menor (55%) (Kumar R. y Thompson E. 1999). Ambos receptores se unen al estrógeno y a los elementos de respuesta a estrógeno (EREs) con alta afinidad (Mas, M. 2007), sin embargo, algunas diferencias en su estructura y en la distribución en los tejidos los hacen comportarse en forma distinta con respecto a la función (Kuiper, G. *et al.* 1997).

El estrógeno y ligandos similares circulan en el plasma sanguíneo unidos a proteínas plasmáticas, éstos se disocian para entrar en la célula donde se unen a sus receptores en el citoplasma (Bukovsky A. *et al.* 2003). En ausencia de ligando, los REs están secuestrados en el

citosol de las células blanco y son mantenidos en forma inactiva. La unión del RE con estrógenos o moléculas similares le producen un cambio conformacional que promueve la homodimerización del receptor, facilitando su traslado al núcleo y la unión del mismo con alta afinidad a regiones promotoras ubicadas en el DNA (Kuiper G. *et al.* 1997).

Es importante recordar que el RE no actúa solo en la transcripción genética, requiere de proteínas correguladoras que se encuentran en las células y juegan un papel importante como intermediarios de la señalización activando ó reprimiendo la expresión de genes (Imagen 6). Debido a que los REs responden a la hormona con la expresión de genes blanco, los REs son considerados como factores determinantes en el mecanismo de acción de estrógeno y ejercen su acción tanto en la transcripción como en la traducción de la señal (Zivadinovic D. *et al.* 2005). Existe un tercer receptor de estrógenos intracelular transmembranal GPR30 (vía no canónica), que actúa de manera independiente al RE α y al RE β .

1.8 Estrógenos y Cáncer Cervical.

El cuello uterino es una parte del tracto reproductivo femenino que es muy sensible a estrógenos. Los estrógenos incrementan la tasa de células en fase S en mujeres con cáncer cervical (Bhattacharya D. *et al.* 1997); varios estudios han demostrado un vínculo entre la exposición hormonal y el riesgo de cáncer cervical. Un importante estudio (Brisson J. *et al.* 1994) indicó que las mujeres que consumen AO que contienen estrógeno durante 6 años o más tenían un mayor riesgo de desarrollar adenocarcinomas y carcinoma de células escamosas. Los niveles séricos de 17 β -estradiol son significativamente mayores en mujeres que utilizan AO con un mayor riesgo de neoplasia cervical (Salazar E. *et al.* 2001), por lo que se ha sugerido que el uso de los AO durante varios años puede incrementar el riesgo de neoplasia cervical, por daño al DNA inducido por metabolitos de estrógenos (Lacey, *et al.* 2000) (Bhattacharya 1997). En el epitelio escamoso del cuello uterino, se ha demostrado que contiene el RE α que responde a la administración crónica de estrógenos con proliferación persistente, resultando una hiperplasia benigna, además se observó un incremento del RE α y RE β en tumores en comparación con el cuello uterino normal (Nair H. *et al.* 2005). Los estudios epidemiológicos han implicado la exposición de los estrógenos en pacientes positivas al HR-HPV (tipo 16 y 18) como un factor de riesgo de cáncer cervical (Nair H. *et al.* 2005). La evidencia directa de la participación del HPV en el entorno hormonal se ha obtenido gracias a modelos murinos, los cuales poseen los transgenes que codifican para las oncoproteínas E6 y E7 del HPV 16 que inactivan a p53 y pRb respectivamente. La expresión continua de E6 y E7 puede conducir a una desregulación del crecimiento celular persistente facilitando la inestabilidad genómica (Galloway *et al.* 1994). Estos ratones desarrollan cáncer cervical cuando son tratados crónicamente con 17 β -estradiol (Elson D. *et al.* 2000); la infección con el HR-HPV incrementa la 16 β -hidroxilación del estradiol, aumentando los niveles de 16 β -hidroxiestrone, un metabolito carcinogénico (Birkhauser, 1994), la cual aumenta el crecimiento independiente y la pérdida del anclaje de células epiteliales inmortalizadas con HR-HPV (Newfield, *et al.* 1998); posteriormente, el grupo de Riley y Cols. (2003), logran disertar la actividad que ejercen los oncogenes E6 y E7, estos investigadores encuentran una potente actividad carcinogénica de E7 en presencia de estrógenos administrados en forma crónica; la proteína oncogénica E6 actuó como modulador de la carcinogénesis cervical mediada por E7 en presencia de 17 β -estradiol (Riley *et al.* 2003).

En conclusión, la disminución en la expresión del gen supresor de tumores RAR β y la administración de 17 β -estradiol en conjunto podrían tener un importante papel en el desarrollo de CaCu.

1.9 Modelos murinos condicionales para el Receptor β para el Ácido Retinoico en el estudio de cáncer cervical.

Todos los resultados citados anteriormente sugieren que los receptores a retinoides están asociados a transformación celular y a la formación de tumores, es importante estudiar el efecto fenotípico causado por la inactivación específica de los receptores a retinoides en especial del gen supresor de tumores RAR β en tejido cervical aunado a otro cofactor como el E₂.

El grupo del Dr. Pierre Chambon (IGBMC, Estrasburgo, Francia), ha generado un ratón mutante condicional RAR $\beta^{L-/L-}$. Este ratón posee un fondo genético resultado de la cruce entre ratones 129/Sv y C57BL/6J. La mutagénesis condicional se basa en el uso de la enzima Cre recombinasa que puede permitir la inactivación del gen RAR β (ubicado en el cromosoma 14). (Metzger y Chambon 2001).

Esta línea de ratón tiene un alelo condicional para el locus de RAR β . El vector de orientación incluye los exones 8-11 (E8–E11, 204–448 residuos de aminoácidos) (Zelent *et al.* 1989) y contiene un gen selector de neomicina loxP-flanqueando río arriba del exón 8, así como un loxP-flanqueando río abajo. Después de la recombinación en células madre embrionarias, clones positivos contienen un alelo RAR β loxP-flanqueado (NE75), después de la electroporación con un plásmido que codifica pSG5Cre, el casete de neomicina fue eliminado en células madre de ratones NE75.4, transmitiendo el alelo RAR β a través de su línea germinal, al ser cruzados con ratones transgénicos CMV-Cre^{tg/0}, expresan a Cre recombinasa en células germinales generando la línea de ratón RAR $\beta^{L-/L-}$ (Dupe' *et al.*, 1997).

El análisis por PCR del DNA revela la presencia de CRE recombinasa que elimina el alelo RAR β^{L-} , consiguiendo animales heterocigotos RAR $\beta^{L-/L-}$. El alelo L- eliminado, suprime los exones 9 y 10 que codifican para los dominios de unión a ligando, y causa mutación con desplazamientos en el marco de lectura. Para comprobar que un alelo nulo es generado se cruzan los ratones para producir RAR $\beta^{L-}/L-$ homocigotos cuyo genoma no expresa la proteína RAR β (Imagen 6 C). Generando así una línea de ratón con un alelo condicional "floxed" RAR β .

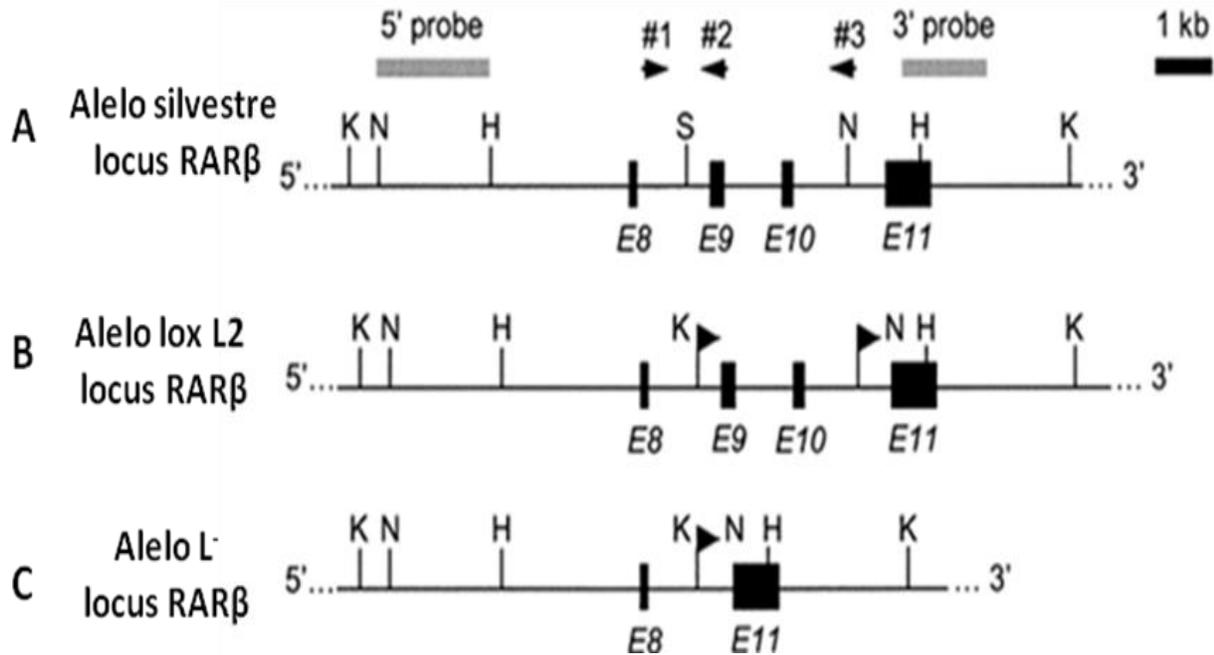


Imagen 6. Construcción del ratón $RAR\beta^{L-/L-}$. A) Gen silvestre de $RAR\beta$ con sitios Lox P flanqueados. B) Ratones NE75 transmitieron el alelo $RAR\beta$ L- a través de su línea germinal. C) ratones NE75 homocigotos con alelo nulo de $RAR\beta$ (ratones $RAR\beta^{L-/L-}$).

Estos ratones presentan un desarrollo y longevidad casi normal, son fértiles y homocigóticos para la mutación condicional, por lo que las cruces posteriores no generan ratones heterocigotos o silvestres. Se ha reportado que estos ratones presentan ligeras alteraciones a nivel de desarrollo pulmonar así como malformaciones vertebrales leves y alteraciones en la membrana retrolenticular (Chapellier B. *et al.* 2002). En vaso se ha observado defectos en la organización celular y la estructura del tejido (Serafin-Higuera N. *et al.* 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

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

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

3. HIPÓTESIS.

La disminución en la expresión de RAR β y la administración de estrógeno (17 β -estradiol) de forma crónica, generará lesiones cervicales premalignas en muestras cervicales de ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ condicionales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- Determinar los cambios en la expresión de RAR β y su relación con la generación de lesiones premalignas cervicales en el modelo murino RAR $\beta^{L-/L-}$ condicional tratado a dosis bajas 833ng/día y a dosis altas 2500ng/día con 17 β -estradiol durante tres meses.

4.2 Objetivos Particulares:

- Genotipificar a ratones silvestres y condicionales.
- Tratar a los ratones con 17 β -estradiol a dos dosis (8300ng/día y 2500ng/día) por tres meses.
- Seguimiento del ciclo estral.
- Realizar el análisis histopatológico del tejido cervical de los ratones para determinar si existen grados de lesiones malignas o premalignas.
- Determinar el efecto del tratamiento hormonal y la disminución de RAR β en la expresión de este gen supresor de tumores y de la proteína nuclear de proliferación celular (PCNA), en cérvix de ratones silvestres y condicionales, tratados y sin tratar.
- Determinar los niveles de expresión (mRNA) de RAR β en cérvix de ratones silvestres y condicionales con y sin tratamiento.
- Determinar el efecto del tratamiento hormonal y la disminución de RAR β en la expresión del gen blanco de E₂ (c-Myc) y el gen blanco de RAR β (RAR α) en cérvix de ratones.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 Genotipificación.

Todos los ratones fueron genotipificados por PCR punto final. La muestra para la extracción de DNA se obtuvo a partir de la porción terminal de la oreja de los ratones hembras, el tejido fue cortado y posteriormente incubado con buffer de lisis (H₂O, NaCl 4M, Tris 1M, SDS 10%) y 2 μ l de proteínasa K (PK). Después se procedió a la extracción y purificación del DNA utilizando el reactivo DNazol y cloroformo para separar la fase orgánica de la fase acuosa, se precipitó el DNA con EtOH absoluto, luego se lavó con una mezcla de EtOH y DNazol, posteriormente se hizo un segundo lavado con EtOH 80%, se dejó secar la pastilla, ya seca fue suspendida en H₂O (Invitrogene, EUA) y almacenada a -20°C.

Con la finalidad de determinar su integridad y concentración, cada muestra de DNA se analizó en geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. A partir de los DNAs que no presentaron degradación en los geles de agarosa, se realizaron los experimentos para la amplificación del gen RAR β y para Cre recombinasa (ratones condicionales). Estos ratones son propagados y genotipificados de acuerdo a lo descrito en la literatura (Ghyselinck, *et al.* 1997; Massaro, *et al.* 2000 y Lohnes, *et al.* 1994).

5.2 Tratamiento hormonal.

Se formaron seis grupos de tres ratones hembra vírgenes de un mes de edad cada uno, un grupo de ratones C57BL/6J y un grupo de ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ fueron tratados con vehículo (100 μ l de aceite de ajonjolí 3 veces por semana); un grupo de C57BL/6J y un grupo de RAR $\beta^{L-/L-}$ se trataron con 17 β -estradiol a dosis bajas (DB) de 833ng/día; un grupo de C57BL/6J y un grupo de RAR $\beta^{L-/L-}$ se trataron a dosis altas (DA) de 2500ng/día, todos mediante inyección intraperitoneal (ip).

Este tratamiento se continuó hasta completar 3 meses; después de este tiempo los ratones hembras fueron sacrificados a los 4 meses de edad (Elson *et al.* 2000).

5.3 Seguimiento del ciclo estral.

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

5.4. Disección de tejido cervical y vaginal.

La obtención de la muestra de cada ratón fue llevada a cabo bajo condiciones estériles.

Muerto el ratón fue expuesto para extraer útero y vagina. El tejido obtenido por este procedimiento fue seleccionado para extracción de RNA total y se colocó en tubos con 3 ml de "RNA Later" y congelados para después ser procesados para la valoración de la expresión de los genes de interés.

Para el análisis histopatológico los órganos fueron colocados en alcohol absoluto 100% (fijación) durante una semana, posteriormente a esto el tejido fue deshidratado con alcohol 100%, alcohol-xilol 50:50, xilol 100%, para después ser incluido en parafinas 1, 2, y 3.

5.5 Análisis Histopatológico de Tejidos.

Después de que se incluyeron en bloques de parafina, se realizaron cortes de 5µm fijándolos en laminillas convencionales, se les realizó un proceso de desparafinación (xilol-alcohol) y tinción hematoxilina-eosina (Ivanova, et al. 2007 y Volgareva, et al. 2004). Posteriormente fueron cuidadosamente estudiados por un patólogo experto en el área (Dr. Rogelio Hernández Pando; Dept. de patología, INCMNSZ, México, D.F) y se determinó si existen evidencias morfológicas de displasias (grados) y/o condiciones preneoplásicas.

5.6 Análisis Inmunohistoquímico de Tejidos.

Los cortes se desparafinaron a 65 °C por 15 minutos colocándolos consecutivamente en Xilol 1 y Xilol 2 por 15 minutos cada uno, etanol 1 y 2 por 5 minutos respectivamente y se rehidrató con PBS 1X. Para el ensayo de Inmunohistoquímica se utilizó el kit *Bio SB (U.S.A)*.

Para la recuperación de antígeno los cortes se colocaron en buffer de citratos y se mantuvieron a ebullición durante 6 minutos en una olla de presión *Mantrra (USA)*. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peroxidasa (*Bio SB, U.S.A*) por 40 minutos en una cámara húmeda y se lavó con PBS 1X.

Para bloquear se utilizó una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA) durante 45 minutos en cámara húmeda.

Para determinar la expresión de RARβ se utilizó el anticuerpo primario anti-RARβ y como marcador de proliferación celular se utilizó el anticuerpo anti-PCNA. Estos anticuerpos se dejaron incubando toda la noche en cámara húmeda. Se lavó con PBS 1X y posteriormente a esto se incubó con un anticuerpo secundario por 30 minutos. Para determinar la presencia de señal se utilizó el substrato cromógeno Diaminobenzidina (DAB) Kit Bio SB (USA) con una dilución 1:100.

Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina, se agregó una solución de premontaje y posteriormente se montaron con resina cubriendo con cubreobjetos y se dejaron secar.

5.7 Anticuerpos

Para las inmunohistoquímicas se utilizó el anticuerpo policlonal IgG anti-RARβ (*C-19, Santa Cruz Biotechnology*). Este anticuerpo se une a los aminoácidos 430 – 447 de la proteína RARβ de origen humano localizados en la región carboxilo-terminal y puede ser usado en muestras de ratón, rata, humano y otras especies.

También se utilizó el anticuerpo monoclonal IgG_{2a} anti-PCNA, este anticuerpo puede ser utilizado para la detección de la proteína PCNA proteína expresada a alto nivel en las células que proliferan, y puede ser usado en tejidos provenientes de ratón, rata, humano, entre otros, es un marcador de las células en las fases tempranas G₁ y S del ciclo celular.

5.8 Captura de imágenes

Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara digital DFC 290 HD Leica Microsystems, (USA) a una resolución 10 X y 67 X.

5.9 Extracción de RNA Total

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el método de “TRIZOL® Reagent” (*Invitrogen, USA*).

Los tejidos cervicales congelados se trituraron con Nitrógeno líquido y se adicionó 1 ml de “TRIZOL® Reagent” incubando a 4 ° C. Posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de “TRIZOL® Reagent”, se agitó hasta obtener una mezcla homogénea seguido de una centrifugación a 10,000 rpm. La fase acuosa se pasó a un tubo estéril, añadiendo isopropanol mezclando por inversión suave, y se dejó incubar a -20°C seguido de una centrifugación a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con ETOH al 80 % utilizando 1 ml de agua tratada con DEPC, se centrifugó a 9000 rpm durante y se desechó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar y se suspendió con agua tratada con DEPC (30 µl) y se colocó en hielo inmediatamente.

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

5.10 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de cDNA, se realizó conforme al protocolo “First Strand cDNA Synthesis” (*Fermentas USA*) de la siguiente manera: Se agregaron los reactivos en un tubo estéril, libre de nucleasas, todo a 4°C. Se incubaron 5 µl de las muestras de RNA en presencia de 1 µl “random primers” (Oligo dT) con 5 µl de H₂O DEPC durante 10 min a una temperatura de 65-70°C para separar las cadenas.

La reacción de retrotranscripción se realizó a 37°C durante 2 horas en presencia de 4 µl buffer de reacción 5X (Tris-HCl pH 8.3 50mM; KCl 75mM; MgCl₂ 3mM), 1 µl DNTP, 1 µl de inhibidor de ribonucleasas, 2 µl Transcriptasa reversa SuperScript RT. Esta reacción se detuvo incubando las muestras a 70°C durante 15 minutos. El cDNA se conservó a -20 °C.

Con la finalidad de verificar la integridad de los productos de cDNA obtenidos se llevó a cabo una reacción de PCR punto final y se determinó presencia del gen HPRT en cada una de las muestras.

Primers HPRT utilizados:

Fw: 5´GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC3´
Rev: 5´CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA3´

El amplificado del gen se visualizó en un gel de agarosa al 2 %, con TAE 1X durante 40 minutos.

5.15 Niveles de expresión del mensajero RAR β , c-Myc y RAR α

Para medir la expresión del mensajero de RAR β se llevó a cabo una RT-qPCR siglas de su nombre en inglés: *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction real time*, utilizando “SYBR Green” como agente intercalante y se realizó una comparación del cDNA de ratones hembra C57BL/6J como control con ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ tratados y sin tratar.

Secuencia de bases de los primers utilizados para la PCR en tiempo real.

PRIMER	SECUENCIA DE BASES 5'---3'
HPRT	Forward: GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC Reverse: CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA
RAR β	1 ABH74: CAACCCAGTCCAGCACCAG 2 ABH75: TGTACCCAGAGTCAAGAAA 3 ABH76: GGCCATCAGAGAAAGTCAT
RAR α	Forward: CGCCTGTGAGGGCTGTAAG Reverse: GGTCACCTTGTTGATGATGCA
c-Myc	Forward: AAAACGACAAGAGGGCGGACAC Reverse: GCTTGTGCTCGTCTGCTTGAA

La RT-qPCR se realizó utilizando el equipo 7300 Applied Biosystem (USA). Una vez finalizado el programa se extrajeron los datos a excel y se realizó el cálculo de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2002).

RESULTADOS

- Genotipificación de ratones silvestres C57BL/6J y ratones Condicionales $RAR\beta^{L-/L-}$ mediante la técnica de PCR punto final.

Como fase inicial del proyecto se identificó el gen silvestre de $RAR\beta$ (618pb) en ratones silvestres C57BL/6J, mientras que en los ratones Condicionales $RAR\beta^{L-/L-}$ se observa el gen de $RAR\beta$ recombinado (383pb) y el gen silvestre (618pb) (Figura 1a). También se observó en los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ la presencia del gen para la enzima Cre recombinasa, que se encuentra ausente en los ratones silvestres C57BL/6J (Figura 1b).

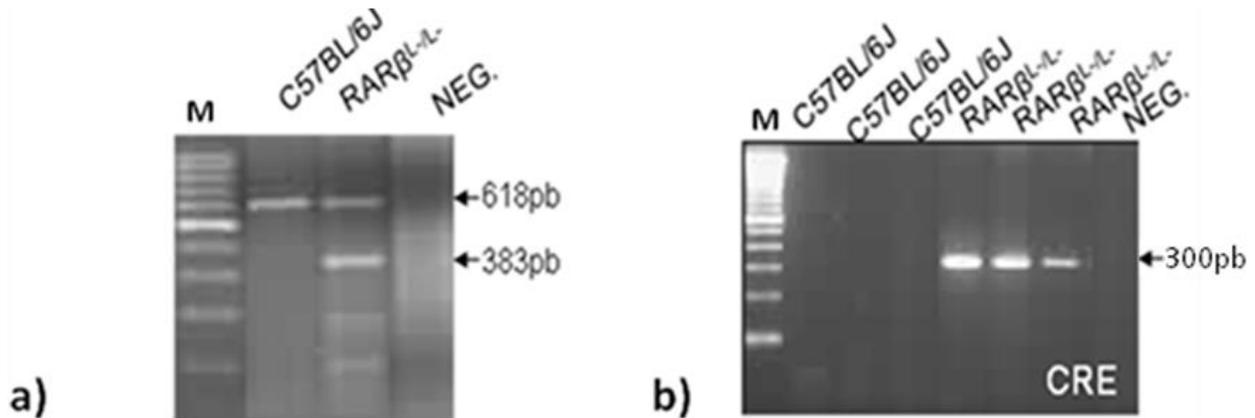


Figura 1. Genotipificación de ratones por PCR punto final. a) Los ratones C57BL/6J contienen la forma silvestre de $RAR\beta$ (618 pb), mientras que los ratones transgénicos Condicionales $RAR\beta^{L-/L-}$ tienen las formas silvestre y recombinante (383 pb) del gen $RAR\beta$. b) presencia del gen para la enzima Cre recombinasa en ratones $RAR\beta^{L-/L-}$. Neg: negativo (mix para PCR sin DNA), M: marcador.

- Tratamiento con 17β estradiol.

Para determinar la eficiencia del tratamiento con 17β estradiol, se realizó el seguimiento del ciclo estral a ratones hembras que comenzaron el tratamiento al 1 mes de edad con DB de 833ng/día y DA de 2500ng/día de E_2 por tres meses. (Figura 2).

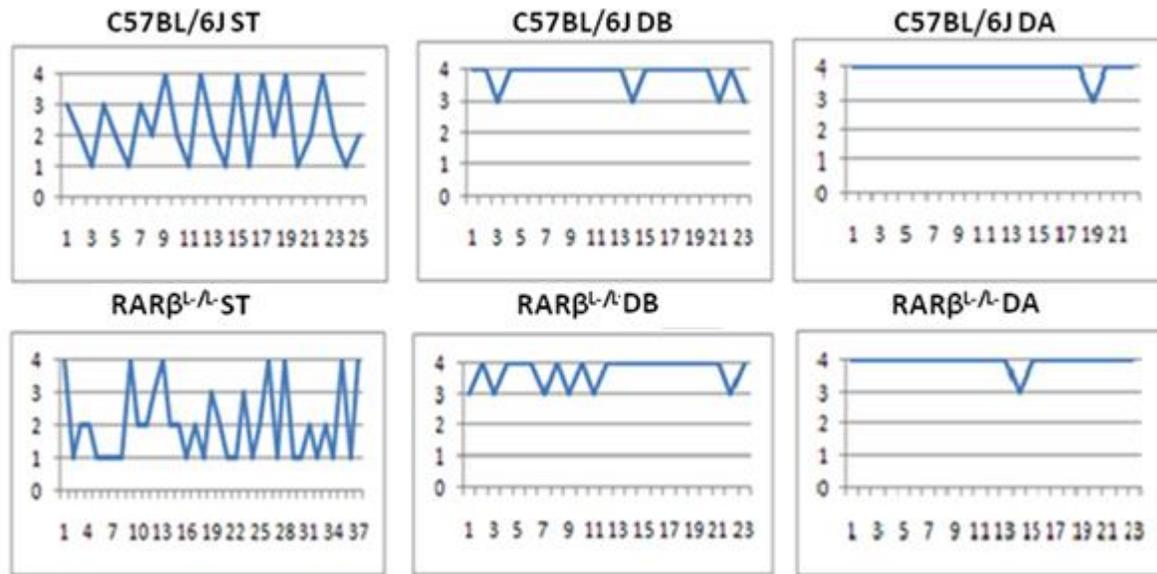


Figura 2. Fluctuaciones del ciclo estral en ratones silvestres C57BL/6J y ratones condicionales $RAR\beta^{L/L-}$ tratados y sin tratar (eje X); fases del ciclo estral (eje Y); 1: Diestro, 2: Metaestro, 3: Proestro, 4: Estro.

- **ANALISIS HISTOLOGICO.**

Los hallazgos en la histopatología de ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L/L-}$ tratados y sin tratar con 17β -estradiol (Figura 3):

C57BL/6J ST:

- A) Zona de transformación: normal con epitelio bien diferenciado entre epitelio escamoso estratificado y epitelio columnar del canal endocervical.
- B) Endocérvix: estrato único de células cilíndricas.
- C) Exocérvix: epitelio escamoso estratificado, diferenciado, maduro y sin alteraciones.
- D) Vagina: epitelio escamoso estratificado, queratinización normal y sin alteraciones.

C57BL/6J DB (833ng/día):

(E, F, G, H) No hubo cambios histológicos en comparación con los C57BL/6J sin tratamiento. Solo un incremento no significativo en la actividad proliferativa del exocérvix.

C57BL/6J DA (2500ng/día):

I) Zona de transformación: sin alteraciones.

j) Endocérvix: con focos de metaplasia.

k) Exocérvix: normal.

L) Vagina: disminución en la queratinización.

RAR $\beta^{L-/L-}$ ST:

M) Zona de transformación: metaplasia epidermoide e hiperproliferación.

N) Endocérvix: hiperproliferación, indiferenciación de células cilíndricas y metaplasia epidermoide.

Ñ) Exocérvix: hiperproliferación, indiferenciación, inmaduración de células escamosas y zonas de atrofia.

O) Vagina: hiperproliferación, papilomatosis, ausencia de queratinización e inmaduración.

Presencia de infiltrado inflamatorio agudo y crónico abundante en exocérvix, endocérvix y vagina.

RAR $\beta^{L-/L-}$ DB (833ng/día):

(P, Q, R, S) No hubo cambios histopatológicos en comparación con los C57BL/6J ST, no hay alteraciones patológicas en comparación con los RAR $\beta^{L-/L-}$ ST.

RAR $\beta^{L-/L-}$ DA (2500ng/día):

(T, U, V, W) Presentan las mismas alteraciones histológicas que los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ ST: metaplasia epidermoide, inmaduración de células escamosas, zonas de atrofia, disminución y desprendimiento de queratina, infiltrado agudo y crónico.

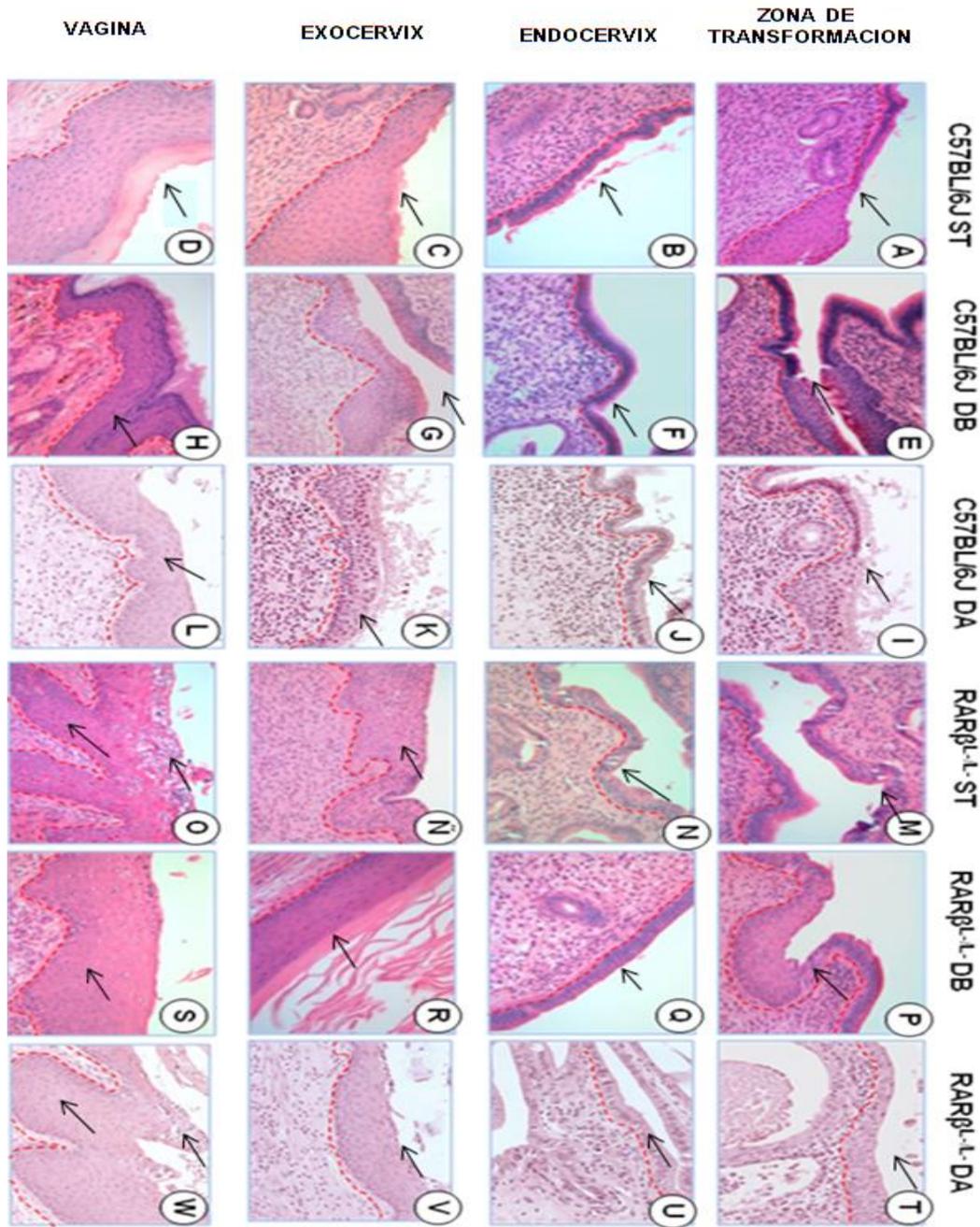


Figura 3. Efecto del 17β Estradiol y la deficiencia de RAR β sobre la histopatología cervical de ratones C57BL/6J (A-L) y RAR $\beta^{L-/L-}$ (M-W) de 4 meses de edad. Sin tratamiento (ST), Dosis bajas (DB), dosis altas (DA). Zonas que se muestran: zona de transformación, endocérnix, exocérnix y vagina. Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E), aumento 40x. Las flechas señalan la zonas de interés y/o los cambios histológicos.

Análisis inmunohistoquímico

Análisis por inmunohistoquímica de la proteína RAR β en ratones C57BL/6J y RAR $\beta^{L-/L-}$ tratados y sin tratar con 17 β -estradiol (Figura 4).

C57BL/6J ST:

(A, B y C) Endocérvix, exocérvix y vagina exhiben la expresión normal de la proteína RAR β perinuclear en todo los estratos de los epitelios.

Ratones C57BL/6J DB:

(D, E y F), La expresión perinuclear de la proteína RAR β en todas las zonas se muestra con mayor inmunotinción.

Ratones C57BL/6J DA:

(G, H y I), Señal perinuclear de la proteína RAR β disminuida en epitelio endocervical, exocervical y vagina. Limitada a la zona basal del epitelio.

Ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ ST:

(J, K y L) Señal perinuclear de la proteína RAR β disminuida en focos del endocérvix, exocérvix y vagina, limitándose a la zona basal.

Ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ DB:

(M, N y Ñ) Expresión normal de la proteína RAR β en comparación con los C57BL/6J ST y aumentada en comparación con los RAR $\beta^{L-/L-}$ ST en todas las zonas.

Ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ DA:

(O, P, Q) Presenta inmunotinción disminuida en todos los estratos epiteliales y en exocérvix se limita a la parte superior del epitelio escamoso.

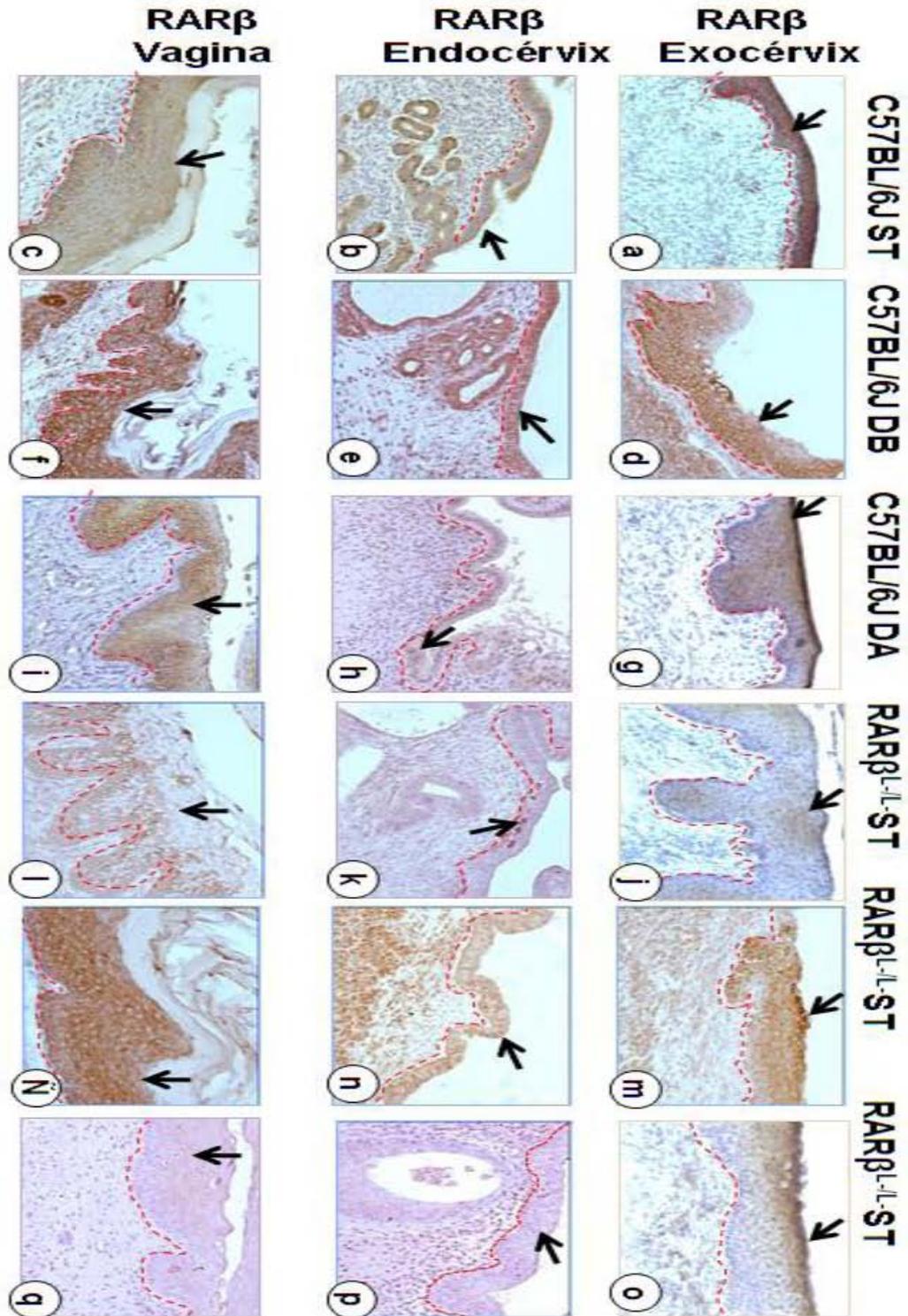


Figura 4. Inmunohistoquímica anti-RAR β . Efecto del 17 β - Estradiol sobre la expresión de la proteína RAR β por inmonohistoquímica; en endocérviix, exocérviix y vagina de ratones C57BL/6J y RAR β^{L-L} . Sin tratamiento (ST), Dosis bajas (DB), dosis altas (DA).Las flechas indican la zona de Inmunotinción.

Análisis inmunohistoquímico para la proteína PCNA en ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ tratados y sin tratar con 17β estradiol muestran Imagen 5:

C57BL/6J ST, C57BL/6J DB y $RAR\beta^{L-/L-}$ DB: (A, B) (C, D) Exocérnix y vagina exhiben la expresión normal de la proteína PCNA. Limitada al estrato basal del epitelio escamoso.

C57BL/6J DA: (E, F) La expresión de la proteína PCNA en exocérnix y vagina muestra un aumento no significativo en los núcleos de las células basales.

$RAR\beta^{L-/L-}$ ST y $RAR\beta^{L-/L-}$ DA: (K, L) La expresión de la proteína PCNA en exocérnix y vagina está aumentada en los núcleos de las células basales e intermedias y así también en el epitelio vaginal en comparación con los C57BL/6J.

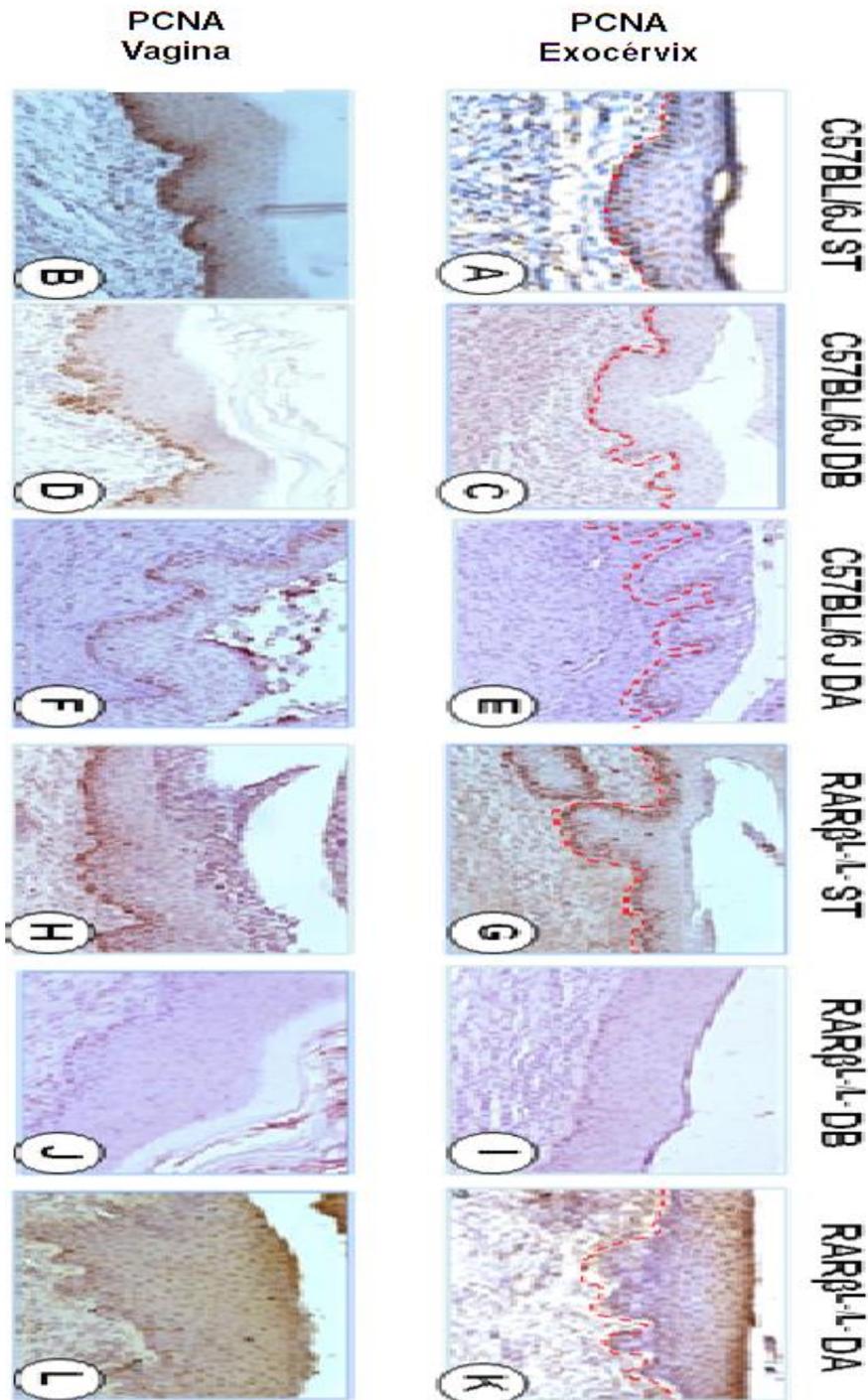


Figura 5. Inmunohistoquímica anti-PCNA. Efecto del 17β- Estradiol y la deficiencia de RAR β sobre los niveles de proliferación en exocérvix y vagina de ratones C57BL/6J y RARβ^{L-/L-} sin tratamiento (ST), dosis bajas (DB), dosis altas (DA).

Mediante la técnica de RT-qPCR en tiempo real, detectamos la expresión normal del gen RAR β en ratones C57BL/6J ST. La expresión de RAR β fue aumentada al ser tratados a DB y disminuida al ser tratados a DA.

En los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ no hay diferencias en la expresión de RAR β tratados a DB y la expresión de RAR β a DA en comparación con el control C57BL/6J.

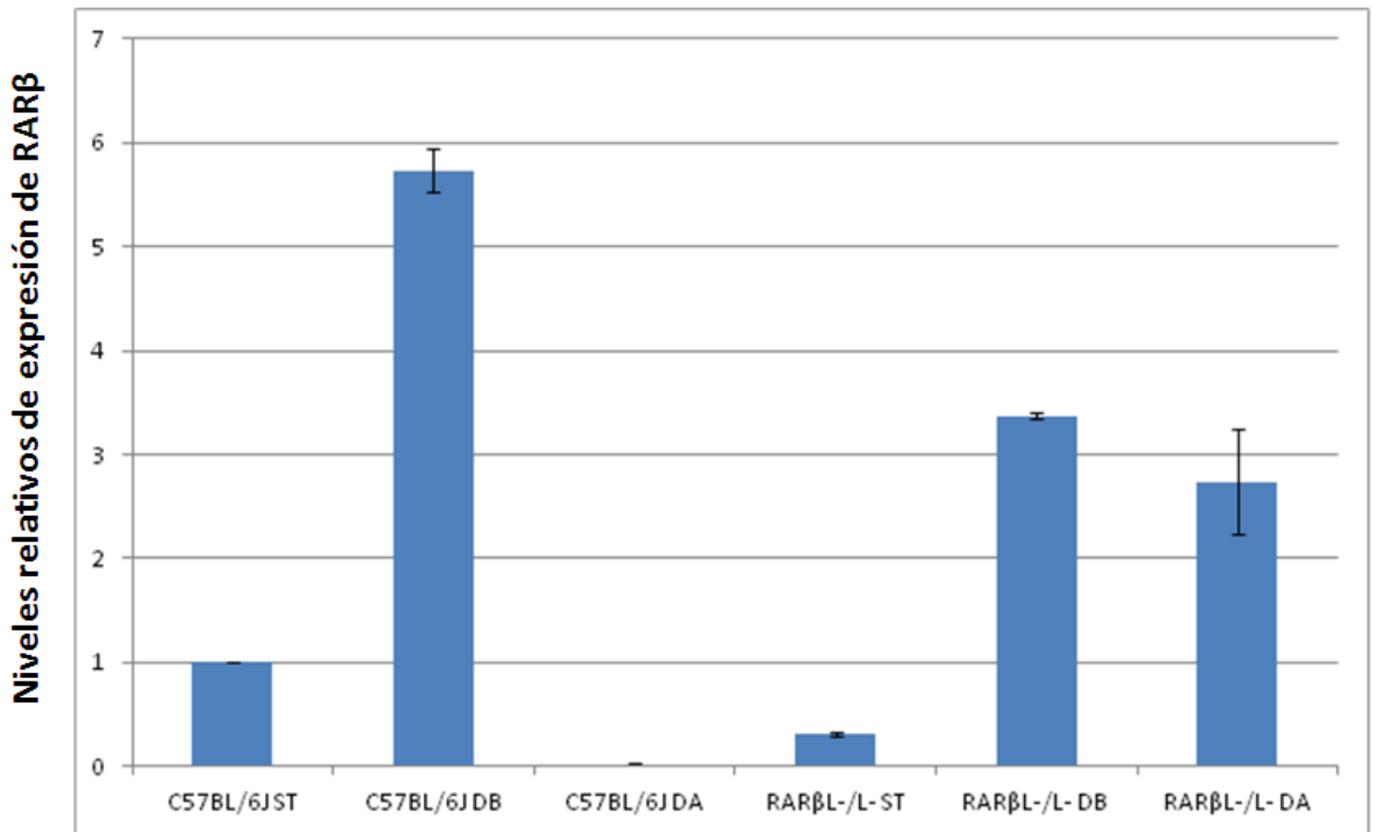


Figura 6. Expresión de RAR β en ratones C57BL/6J y ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ ST, tratados con DB y DA de 17 β estradiol.

Expresión por RT-qPCR del gen c-Myc en los ratones control C57BL/6J ST; estos mismos ratones al ser tratados con 17 β estradiol a DB la expresión aumenta y a DA la expresión aumenta aun más. Los ratones RAR $\beta^{L-/L-}$ ST y con DB sobreexpresan c-Myc, por el contrario a DA c-Myc disminuye

- Expresión de c-Myc

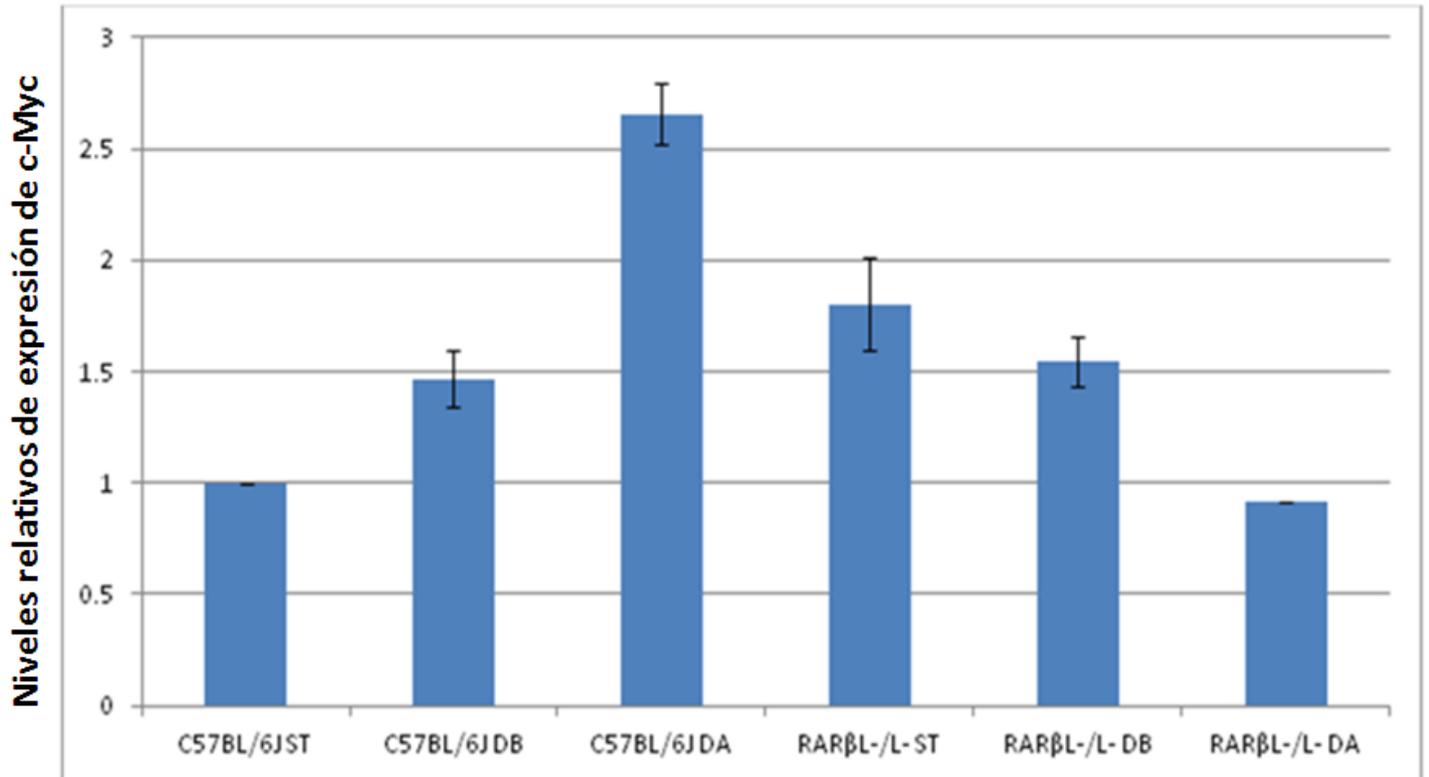


Figura 7. Expresión de c-Myc por RT-PCR tiempo real, en los ratones C57BL/6J y en los ratones RARβ^{L-/L-} tratados a DA y DB de 17β estradiol.

La expresión por RT-qPCR del gen RARα no es concluyente, dado que la desviación estandar es muy grande entre los grupos. Pero podríamos decir que no hubo cambios.

- Expresión de RAR α

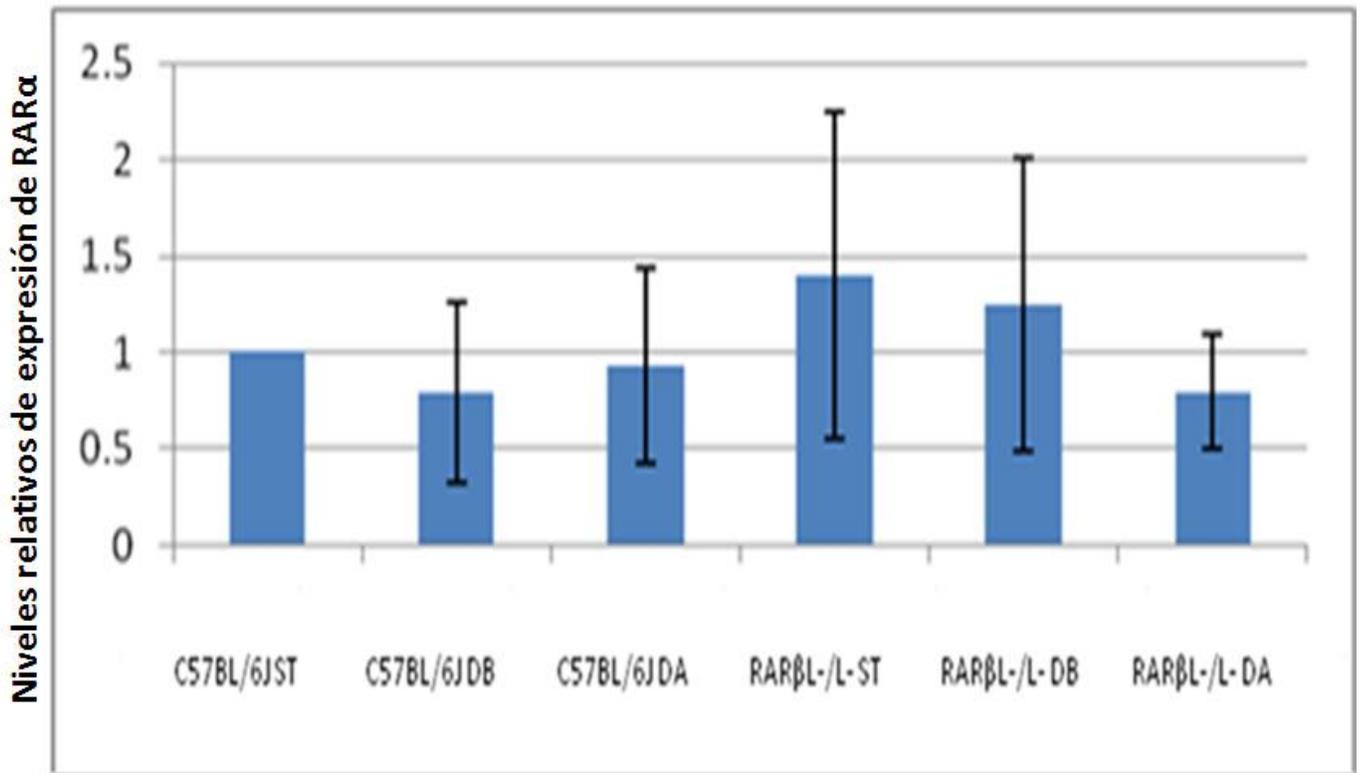


Figura 8. Expresión de RAR α en los ratones silvestres C57BL/6J y en los ratones condicionales RAR β ^{L-/L-} tratados a DB y DA de 17 β estradiol.

DISCUSIÓN

La genotipificación por PCR en punto final de los ratones condicionales RAR β ^{L-/L-} nos mostró que efectivamente contienen esta identidad al observar una banda de 383pb que nos indica que la recombinación se está efectuando; también hay una pequeña proporción del gen silvestre al observar una banda de 618pb (Imagen 1), ya que la construcción del ratón permite tener una pequeña proporción del gen completo dado que los ratones no pueden sobrevivir con la expresión nula de los receptores nucleares para el ácido retinoico (Chapellier, *et al.* 2002). Al analizar los niveles de expresión de mRNA (RT-qPCR) y proteína (inmunohistoquímica) en estos ratones se observó que está disminuida aproximadamente en un 50% en comparación con el ratón C57BL/6J (Figuras 4 y 6).

Se ha observado que la deficiencia de retinoides altera la diferenciación epitelial, el crecimiento celular y la apoptosis de las células malignas (Hernández E. *et al.* 2005; Zamora J. *et al.* 2005), también esta deficiencia origina metaplasia escamosa pulmonar, metaplasia intestinal de la mucosa gástrica, metaplasia escamosa en el epitelio respiratorio, metaplasia pavimentosa del cuello uterino entre otras alteraciones (Goswami U. 2005; Velmurugan B. *et al.* 2002). Se ha reportado que ratones condicionales para el receptor X para el ácido retinoico alfa (RXR α)

muestran la presencia de metaplasia epidermoide cervical, indiferenciación celular, atrofia en el 60% de los casos y frecuentes mitosis (Ocadiz D. *et al.* 2008). También se ha observado en el modelo $RAR\beta^{L-/L-}$ en bazo que hay una disminución de células dendríticas y células MHC II, habiendo también defectos en la organización celular y la estructura del tejido. Estos resultados sugieren que $RAR\beta$ está implicado en la organización de células del bazo (Serafin-Higuera N. *et al.* 2012).

Estas observaciones ayudan a confirmar lo encontrado en el cérvix de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$, ya que esta delección causó displasias moderadas en cérvix, que son consideradas preneoplásicas; tales alteraciones son: metaplasia epidermoide, hiperproliferación, indiferenciación, inmaduración de células escamosas y zonas de atrofia. Mientras que en el epitelio vaginal se observó papilomatosis, hiperproliferación, inmaduración y baja queratinización. Además de manera general en todo el cérvix y vagina un abundante infiltrado inflamatorio crónico y agudo (Figura 3); esto sugiere que la deficiencia $RAR\beta$ promueve la formación de estas lesiones consideradas preneoplásicas y reafirma su papel de supresor tumoral.

Aunque $RAR\beta$ juega un papel de gran importancia en el desarrollo de lesiones premalignas no desarrolla cáncer como tal, por lo cual fue necesario analizar otro factor de riesgo de gran importancia como lo son los estrógenos dado que estos son un regulador principal de la fisiología vaginal y cervical, el E_2 al ser administrado artificialmente, aumenta los niveles de estrógeno, manteniendo a ratones en la fase del ciclo estral conocida como estro (Lai M. *et al.* 2002). Las evidencias indican que la división celular estimulada por estradiol está asociada con la inducción de una variedad de factores de crecimiento, E_2 a dosis bajas de 1 mg por día se utiliza como terapia hormonal en mujeres con problemas de privación hormonal ovárica: síndrome climatérico y atrofia vaginal (Peeyananjarassi K, Barber R. 2005). En este trabajo los ratones condicionales $RAR\beta^{L-/L-}$ fueron tratados durante tres meses con E_2 a dosis bajas de 833ng/día y dosis altas 2500ng/día, siendo sincronizados en las fases del ciclo estral: estro y proestro (Figura 2); esto para conocer el efecto de los estrógenos en el tracto reproductor femenino y su asociación con la deficiencia de $RAR\beta$.

Se sabe que en ratones transgénicos K14 HPV 16 que expresan los oncogenes virales en las células epiteliales escamosas basales, el tratamiento crónico con 17β -estradiol (0.1 mg/kg de peso) favorece la aparición de cáncer escamoso, principalmente en la vagina y el ectocérvix. El efecto depende de la dosis de hormona administrada; las dosis menores (0.05 mg por kg) favorecen la aparición de células neoplásicas en el sitio, que se restringe a la “zona de transformación” cervical (Arbeit J. *et al.* 1996; Riley R. *et al.* 2003; Brake T. y Lambert P. 2005).

En nuestro trabajo el epitelio cervical y vaginal de los ratones $RAR\beta^{L-/L-}$ tratados con DB de E_2 , se observó sin alteraciones y sin cambios histológicos en comparación con los ratones C57BL/6J y $RAR\beta^{L-/L-}$ ST. En cambio, al ser tratados con DA las alteraciones histológicas de los $RAR\beta^{L-/L-}$ ST se mantienen (Figura 3 T-W). Esto podría sugerir el efecto protector a dosis bajas de E_2 y el efecto como cofactor en el desarrollo de lesiones premalignas a dosis altas. Se corroboró que los cambios en el fenotipo histológico de estos ratones fueran relacionados con el cambio de expresión de la proteína $RAR\beta$ por inmunohistoquímica y mRNA por RT-qPCR.

Para analizar más a detalle el fenotipo premaligno se utilizó a PCNA como un marcador molecular de proliferación, encontrándose una señal aumentada y en estratos suprabasales del ectocervix de los ratones $RAR\beta^{L/L}$ ST y tratados con DA, tratados con DB la señal se muestra normal, esto quiere decir en el estrato basal (Figura 5 G-L). Lo que nos indica una vez más la hiperproliferación celular y la desdiferenciación por la falta del receptor para ácido retinoico β y la administración de E_2 a DA. Mientras que a DB parece ser que el efecto es contrario.

Además, realizamos un análisis para genes blanco de $RAR\beta$ y E_2 : $RAR\alpha$ y c-Myc (Brychtová S. *et al.* 2004). La expresión de $RAR\alpha$ no fue concluyente dado que la desviación estándar es muy grande y no hubo diferencias entre los grupos. Al analizar el mRNA de c-Myc en los ratones $RAR\beta^{L/L}$ tratados con E_2 se encontró aumentada en ratones control tratados con estradiol y en ratones $RAR\beta^{L/L}$ ST y tratados a DB; en estos ratones tratados a DA la expresión de c-Myc disminuyó. c-Myc participa de manera importante en procesos relacionados con apoptosis y proliferación, la sobreexpresión de c-Myc induce la apoptosis extensa que es independiente de p53 (Shim H. *et al.* 1998). Por lo que nosotros sugerimos que a DB está actuando como marcador de proliferación y a DA c-Myc pueda estar induciendo apoptosis.

Hay muchos factores adicionales a la presencia de HR-HPV que cooperan con este virus en el desarrollo de CaCu. La exposición crónica a estrógeno es un factor clave en el desarrollo de esta enfermedad; mientras que la deficiencia de retinoides implica una baja expresión del gen supresor de tumores $RAR\beta$ generando lesiones consideradas como premalignas en el cérvix de ratones $RAR\beta^{L/L}$. La actividad sinérgica de los estrógenos y la inhibición en la expresión de $RAR\beta$ (o el bajo consumo de retinoides) podría ser dosis-tiempo dependiente, ya que el efecto de los estrógenos a DB es diferente que a DA, presentándose mayores cambios malignos en los ratones tratados a DA, revirtiéndose este efecto a DB pero manteniendo incrementada la expresión de c-Myc.

CONCLUSIÓN

El modelo de ratón $RAR\beta^{L/L}$ y la administración de 17β -estradiol, permite conocer la acción que ejercen estos cofactores en el desarrollo de CaCu. La expresión del gen supresor de tumores $RAR\beta$ disminuyó en un 50% en ratones $RAR\beta^{L/L}$ de cuatro meses de edad y generó lesiones cervicales consideradas como premalignas: hiperproliferación, indiferenciación, inmaduración, metaplasia epidermoide, zonas de atrofia, papilomatosis, ausencia de queratinización y presencia de infiltrado inflamatorio agudo y crónico; estas lesiones podrían regresionar, persistir o progresar y convertirse en malignas, siendo importante el estudio en tiempos de vida más largos. La detección de lesiones premalignas cervicales en mujeres, juega un papel fundamental en la prevención de cáncer invasivo y la aplicación de un tratamiento específico. Las alteraciones observadas durante la histopatología fueron confirmadas con el aumento en la expresión de la proteína de proliferación celular PCNA (inmunohistoquímica) y del mRNA del protooncogen c-Myc (RTqPCR). Esto indica que $RAR\beta$ es un posible blanco terapéutico, al proteger el epitelio cervical y vaginal de estas alteraciones, teniendo una importante participación durante el ciclo celular, como un mecanismo que retardaría la evolución de las células normales a células premalignas.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Altucci L., de Lera A., Bourquet W. Gronemeyer H. (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. Universidade de Vigo, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, 36310 Vigo, Spain. *Nat Rev Drug Discov.* 6(10):811-20.

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

Anxun Wang, Irina N. Alimova, Peihua Luo, Ambrose Jong, Timothy J. Triche, and Lingtao Wu (2010). Loss of CAK phosphorylation of RAR α mediates transcriptional control of retinoid-induced cancer cell differentiation. *FASEB J.* 24(3): 833–843

Arbeit JM, Hoeley PM, Hanaham D. (1996). Chronic estrogen induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in HPV16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*93:2930-2935.

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

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

Auborn K., Woodworth C., DiPaolo J. et al., (1991). The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis, *Int J Cancer* 49, pp. 867–869. Bhattacharya D.,

Baldwin B, Wallace R, Papenfuss R, Abrahamsen M, Vaught C, Kornegay R *et al.* (2003). Human papillomavirus infection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis*; 187: 1067-

Barber, R., M. Hickey y M. Kwik (2005). Therapy for menopausal symptoms during and after treatment for breast cancer. *Drug Safety* 28: 1085–1100.

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

Bhattacharya D., Redkar A., Mitra I., et al. (1997). Oestrogen increases S-phase fraction and oestrogen and progesterone receptors in human cervical cancer in vivo, *Br J Cancer* 75:558..

- Birkhauser M. (1994). Hormone replacement therapy and estrogen-dependent cancer. *Int J Fertil* 39:99.
- Birchmeier C, Meyer D, Riethmacher D. (1995). Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells. *Int Rev Cytol* 160:266.
- Brychtová S, Brychta T, Sedláková E, Kolár Z (2004). Proto-oncogene c-myc in uterine cervix carcinogenesis. *Neoplasma*;51(2):84-9
- Bo W., Smith M., (1966). The effect of retinol and retinoic acid on the orphology of the rat uterus. *The Anatomical Record* 156 (1), 5–10.
- Bonanni B. y Lazzeroni M. (2009). Retinoids and breast cancer prevention, *Recent Results Cancer Res* 181: 77–82.
- Bookout A., Jeong Y., Downes M., Yu R., Evans R., y Mangelsdorf D. (2005). Tissue-specific expression patterns of nuclear receptors, www.nursa.org/10.1621/datasets.02001.
- Bosch F., Manos M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A., Peto J., Schiffman M., Moreno V., Kurman R., and Shah K. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 796–802.
- Bosch A., Bertran S., Lu Y., Garcia A., Jones A., Dawson M. and Farias E. (2012). Reversal by RAR α agonist Am580 of c-Myc-induced imbalance in RAR α /RAR γ expression during MMTV-Myc tumorigenesis
- Brake T, Lambert P. (2005). Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus- transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2495.
- Brisson J., Morin C., Fortier M. *et al.* (1994). Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions, *Am J Epidemiol* 140:710.
- Brychtová S., Brychta T., Sedláková E., Kolár Z. (2004). Proto-oncogene c-myc in uterine cervix carcinogenesis. Institute of Pathology, Faculty Hospital Olomouc. *Neoplasma* 51(2):84-9.
- Bukovsky A., Caudle M., Cekanova M., Fernando R., Wimalasena J., Foster J., Henley D., Elder R. (2003). “Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant – comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen–dependent cells”. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1,1 – 21.
- Castro E. (2010). Regulación transcripcional por receptores nucleares.

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

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

Chapellier B., Mark M. and Bastien J. *et al.* (2002). A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor beta (RARbeta) gene, *Genesis* 32:91-94.

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

Crowe D., Hu L. y Gudas L. *et al.*, (1991). Variable expression of retinoic acid receptor (RAR β) mRNA in human oral and epidermal keratinocytes; relation to keratin 19 expression and keratinization potential, *Differentiation* 48:208.

Darwiche N., Celli G., y De luca M. (1994). Specificity of Retinoid Receptor Gene Expression in Mouse Cervical Epithelia *Endocrinology* 134:2018.

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

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

De-Castro Arce J., Soto U., Riggelen J., *et al.*, (2004). Ectopic expression of nonliganded retinoic acid receptor beta abrogates AP-1 activity by selective degradation of c-Jun in cervical carcinoma cells, *J Biol Chem* 279:45416

Delvene P, Herman L, Kholod N, Coberg JH, Herf M, *et al.* (2007). Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol*; 264:1-5.

Díaz-González, Sacnité del Mar, Castro JI y Madrid-Marina V. (2008). Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud Pública: Efecto del 17 β -estradiol y progesterona en la proliferación de células cervicales y en la regulación de los oncogenes E6 y E7 del HPV-16. Instituto Nacional de Salud Pública.

Dong ZG, Lavrovsky V, Colburn NH. (1995). Transformation reversion induced in JB6 cells by AP-1 inhibitors. *Carcinogenesis* 16:749. In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:339–410.

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

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

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M & Gustafsson JA (1997). Human estrogen receptor β , gene structure, chromosome localization, expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:4258–4265.

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

Evan G. y Vousden K. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 17; 411(6835):342-8.

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

Feinberg A., Tycko B.(2004), The history of cancer epigenetics, *Nat. Rev. Cancer* 4:153.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D.(2010) GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer; Year. Available at:* <http://globocan.iarc.fr>. 2010.

Flores Y., Bishai D., Shah k. Lazcano-Ponce E. (2008). Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico *Salud pública Méx* v.50 n.1

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

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

Gariglio P., Gutiérrez J., Cortés E., Vázquez J. (2009). The Role of Retinoid Deficiency and Estrogens as Cofactors in Cervical Cancer. *Archives of Medical Research* 40:449.

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

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

Gebert F., Moghal N. and Frangioni J. *et al.* (1991). High frequency of retinoic acid receptor beta abnormalities in human lung cancer, *Oncogene* 6:1859. View Record in Scopus.

Germain P., Altucci L., Bourguet W., Rochette Egly C., Gronemeyer H. (2003). Nuclear receptor Superfamily: Principles of signaling. *Pure Appl. Chem.* 75 (11-12): 1619 –1664.

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

Glover J., Harrison S. (1995). "Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA". *Nature* 373 (6511): 257–61.

Globocan (2008) Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 Summary
CANCER FACT SHEET (IARC), *Section of Cancer Information*.

Goodman L., Gilman A., Brunton L. et al., (2006). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (11th ed), McGraw-Hill, New York.

Goswami UC, Sharma N. (2005) Efficiency of a few retinoids and carotenoids in vivo in controlling benzo[a]pyrene-induced forestomach tumour in female Swiss mice. *Br J Nutr.* 94: 540-3.

Gudas LJ, Sporn MB, Roberts, A. B. (1994). Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: MB Sporn AB Roberts and DS Goodman (eds), *The retinoids: biology, chemistry and medicine* (2nd ed) Raven Press, New York pp 443-520.

Hernández E., Reyes H., Cortés P. (2005). Ácido retinoico y función pulmonar. *Rev. Inst. Nai. Enf. Resp. Mex.* V.18 N.1

Hanahan, D. y Weinberg R. (2000). The Hallmarks of Cancer *Cell.* 100(1):57-70.

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

Huang C., Ma W., Dawson M., *et al.* (1991). Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5830.

Hu L, Crowe DL, Chambon P, Gudas L. (1991). Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51:3972.

Ivanova T., Golovina D., Zavalishina L., Volgareva G., Katargin A., Andreeva Y. Frank G., 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*, 2: 4.

Ivanova T., Golovina D., Zavalishina L., Volgareva G., Katargin A., Andreeva Y., Frank G., Kisseljov F., Kisseljova N. (2007). Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16 INK4a in HPV-positive cervical carcinomas. *BMC Cancer.* 14; 7:47.

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

Jemal A., Bray F., Center M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011). Global Cancer Statistics. CA CANCER J CLIN 2011;61:69–90

Kamei Y., Xu L., Heinzl T., et al. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, Cell 85:414.

Kastner P., Mark M. Chambon P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?. Cell 83:859

Kastner P., Krust A., Mendelsoh C., Garnier J., Zelent A., Leroy P., Staub A., Chambon P. (1990). Murlne isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. Proc Natl Acad Sci USA 87:2700-2704

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

Kisseljov F., Kisseljova N., (2007). Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16INK4a in HPV-positive cervical carcinomas BMC Cancer, 7:47.

Klinge C. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Research 2905:2919.

Kowalski A. (2001). Steroid hormone regulation of embryo development and embryomaternal communication for implantation. Tesis Doctor of Philosophy. University of Florida.

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

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

Kumar R., Thompson E. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. Steroids. 64 (5): 310 – 319.

Kumar R., Thompson EB. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. Mol Endocrinol 17:10.

- Lacey J., Brinton L., Barnes W., Gravitt P., Greenberg M. *et al.* (2000). Use of hormone replacement therapy and adenocarcinomas and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 77:149.
- Lai M., Jiang M., Wing L. (2002) Estrogen stimulates expression of p21Waf1/Cip1 in mouse uterine luminal epithelium. *Endocrine* Apr;17(3):233-9.
- Lambert P., Pan H., Pitot H., Liem A., Jackson M., Griep A. (1993). Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5583.
- Li M., Indra A. y Warot X. *et al.* (2000). Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis, *Nature* 407:633–636.
- Lin F., Xiao D., Kolluri S. K., and Zhang X. (2000). Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res.* 60(12):3271-80.
- Li Y., Wong K., Walsh K., Gao B., Zang M. (2013). Retinoic Acid Receptor beta Stimulates Hepatic Induction of Fibroblast growth factor 21 to Promote Fatty Acid Oxidation and Control Whole-body Energy Homeostasis in Mice *Biol Chem.*
- Livak K. Shmittgen T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Applied Biosystems, Foster City, California* 94404, USA; *Methods* 25(4):402-8.
- Massaro G., Massaro D., Chan W., Clerch L., Ghyselinck N., Chambon P. (2000). Chandraratna RA. *Physiol. Genomics*; 4 :51–57. [PubMed]
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835.
- Mas, M. (2007). Sustratos hormonales de la respuesta sexual femenina. *Rev. Int. Androl* 5(1): 38 – 49.
- Men- Hsun Wu, James Yi-Hsin Chan, Pei-Yao Liu, Shu Ting Liu, Shih-Ming Huang (2007). Human papillomavirus E2 protein associates with nuclear receptors to stimulate nuclear receptor- and E2-dependent transcriptional activations in human cervical carcinoma cells. *Int. J Biochem* 8i *Cell Biol.* 39:413-425.
- Metzger D, Chambon P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24:71–80.
- Metzger D., Indra A. and Li M. *et al.* (2003) Targeted conditional somatic mutagenesis in the mouse: temporally-controlled knock out of retinoid receptors in epidermal keratinocytes, *Methods Enzymol* 364:379–408

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

Mohar A, Lazcano E, Gariglio P. (1999) Carcinoma cérvico-uterino en México: Una perspectiva multidisciplinaria. En: *Diez Problemas de Salud Pública* (J.R. de la Fuente y J. Sepúlveda, compiladores) Fondo de Cultura Económica. Pg. 187-208.

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

Moon R., Kelloff G., Detrisac C., Steele V., Thomas C., Sigman C., (1994). Chemoprevention of OH-BBN-induced bladder cancer in mice by oltipraz, alone and in combination with 4-HPR and DFMO. *Anticancer Res.*14:11.

Moras D., Gronemeyer H., (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:391.

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

Münger K., Basile J., Duensing S., Eichten A., Gonzalez S., Grace M., Zacny V., (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* 20:98.

Muñoz N., Castellsague X. and Gonzalez A. *et al.* (2006), Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer, *Vaccine* 24:10.

Nagy L., Kao H., Chakravarti D., Lin R., Hassig C-, Ayer D., Schreiber S-, Evans R. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 89:373

Nair H., Luthra R., Kirma N., et al. (2005) Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65:11173.

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

Niederreither K., Abu-Abed S. and Schuhbauer B. et al. (2002) Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development, *Nat Genet* 31:84

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tjuange M, Thomsen J, Anderson G, et al. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*; 81:1535.

Noy N. (2000) Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *The Biochemical Journal* 348 (3), 481–495.

Noy N. (2010) Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu Rev. Nutr.* 21; 30:201 Pubmed PMID:20415582.

Ocadiz-Delgado R, Castaneda-Saucedo E, Indra AK, Hernandez-Pando R, Gariglio P. (2008). Impaired cervical homeostasis upon selective ablation of RXRalpha in epithelial cells. *Genesis.* 46(1):19-28.

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

Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. (2009) Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cervix en México entre 1979 y 2006. *Salud Publica Mex*;51 supl 2:S208-S219.

Parkin D., Bray F., Ferlay J., Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*; 55:74-108

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

Piper J. (1985) Oral contraceptives and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 22(1):1.

Prusty B. y Das B. (2005) Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin, *Int J Cancer* 113:960

Rathi A., Zochbauer-Muller S. et al., (2000) Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas, *J Natl Cancer Inst* 92:1307.

Redkar A. and Mitra I. et al. (1997) Oestrogen increases S-phase fraction and oestrogen and progesterone receptors in human cervical cancer in vivo, *Br J Cancer* 75, pp. 554–558.

Renaud, J., Moras D., (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1748.

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

Riley R., Duensing S., Brake. (2003) Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 63:4862.

Rogers M. (1997) Life-and-death decisions influenced by retinoids. *Curr Top Dev Biol.* 35:1-46.

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

Salazar E., Sojo I., Lopez R. et al. (2001), The evidence for an etiological relationship between oral contraceptive use and dysplastic change in cervical tissue, *Gynecol Endocrinol* 15:28

Santner S., Pauley R., Tait L. et al. (1997). Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells, *J Clin Endocrinol Metab* 82:208.

Scheffner M, Romanczuk H, Münger K, Huibregtse JM, Mietz JA, Howley PM. (1994) Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 186:99.

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

Schule R., Rangarajan P., Yang N., et al. (1991), Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6096.

Serafin-Higuera N., Hernandez-Sanchez J., Ocadiz-Delgado R., Vazquez-Hernandez J., Albino-Sanchez E., Hernandez-Pando R., Gariglio P. (2012). Retinoic acid receptor β deficiency reduces splenic dendritic cell population in a conditional mouse line. *Immunol Lett* 146(1-2):15-24, PMID 22546502.

Seewaldt V., Kim J., Parker M., Dietze E., Srinivasan K., Caldwell L., Seewaldt V., Kim J., Parker M., Dietze E., Srinivasan K., Caldwell L., (1999). Dysregulated Expression of Cyclin D1 in Normal Human Mammary Epithelial Cells Inhibits All-trans-Retinoic Acid-Mediated G0/G1-Phase Arrest and Differentiation in Vitro. *Exp Cell Res* 249:83.

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

Shim H., Chun Y. S., Lewis B. C., Dang C. V. (1998) A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1511–1516.

Singer A, Jordan J. et al. 1996. Basic structure and function of the cervix. 2nd ed. London: Wiley-Blackwell.

Sommer K. , Chen Li. , Treuting P. et al. (1999), Elevated retinoic acid receptor beta(4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization, *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8651.

Song S., Liem A., Miller J., Lambert P. (2000) Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology*. 267(2):141.

Soto U., Denk C., Finzer P. et al. (2000) Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition, *Int J Cancer* 86:817

Source: J. 2001. *Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 40, 36863-36864.

Sporn M. y Roberts A. (1984) Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *J.N.C.I.*, 73:1382.

Spyridopoulos I., Sullivan A., Kearney M. (1997) Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation* 95:1505.

Suh Y., Lee H., Virmani A. et al., (2002) Loss of retinoic acid receptor beta gene expression is linked to aberrant histone H3 acetylation in lung cancer cell lines, *Cancer Res* 62: 3949.

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

Suzukawa K. y Colburn N. (2002). AP-1 transrepressing retinoic acid does not deplete coactivators or AP-1 monomers but may target specific Jun or Fos containing dimers, *Oncogene* 21:2190

Swisshelm K., Ryan K. y Lee X. (1994), Down-regulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells, *Cell Growth Differ* 5:141.

Tirado L., Carranca A., Mohar A. et al. (2005) Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas *Salud Publica Mex.* 47:342-350.

Tomoko K., Hideki I., Masatoshi M., Yager J., y Liehr J. (1996) Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36: 203–232.

Toulouse A., Martine L., Morin J., Pappas J., Wu J. Bradley E. (1999) RAR β involvement in enhancement of lung tumor cell immunogenicity revealed by array analysis. *FASEB J.* 14(9):1224-32.

Velmurugan B, Bhuvaneshwari V, Burra UK, Nagini S. (2002) Prevention of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and saturated sodium chloride-induced gastric carcinogenesis in Wistar rats by lycopene. *Eur J Cancer Prev*; 11: 19-26.

Virmani A., Muller C., Rathi A., Zochbauer-Muller Mathis M., Gazdar A. (2001) Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 7:584-589

Volgareva G., Zavalishina L., Andreeva Y., Frank G., Krutikova E., Golovina D., Bliev A., Spitkovsky D., Ermilova V., Kissel'ov F. (2004) Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*. Aug 31;4:58.

Vollberg TM, Nervi C, George MD, Fujimoto W, Krust A, Jetten AM (1992). Retinoic acid receptors as regulators of human epidermal keratinocyte differentiation. *Mol Endocrinol* 6:667-676

Vousden K., Lane D. (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 275-83.

Weston A. D., Blumberg B., and Underhill T. M. (2003). Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR- α). *J. Cell Biol.* 161:228

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

Xu X., Ro J., Lee J. et al., (1994). Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues, *Cancer Res* 54:3580.

Xu X., Mitchell M., Silva E. et al., (1999). Decreased expression of retinoic acid receptors, transforming growth factor beta, involucrin, and cornifin in cervical intraepithelial neoplasia, *Clin Cancer Res* 5:1508.

Yang-Yen H., Zhang X., Graupner G. et al., (1991), Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation, *New Biol* 3:1219.

Youssef E., Lotan D., Issa J., et al., (2004) Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis, *Clin Cancer Res* 10:1742

Zamora J. Otárola I., Brenes O. (2005) La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev Chil Nutr* Vol. 32, No. 3.

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

Zhou Q., Stetler-Stevenson M., Steeg P. (1997). Inhibition of cyclin D expression in human breast carcinoma cells by retinoids in vitro, *Oncogene* 15:108.

Zhou X., Shen X. y Shemshedini L. (1999). Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization, *Mol Endocrinol* 13:285.

Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P. (1989). Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* 339: 714–717.

Zelent A., Mendelsohn C., Kastner P., Gamier J., Ruffenach F., Leroy P., Chambon P. (1991). Differentially expressed isoforms of the retinoic acid receptor beta are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO* 10:71-81

Zivadinovic D., Gametchu B., Watson C. (2005). Membrane estrogen receptor- alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res.* 7 (1): 101 – 112.

zur Hausen H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas, *Curr Top Microbiol Immunol* 78:3

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

Zur Hausen H. (2009). The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 48: 808.