

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INTERLEUCINA 10 SOBRE LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS POR EL VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS

P R E S E N T A

IBT. ELIZABETH MEDA MONZON

CUERNAVACA, MORELOS; MAYO 2013



COMITÉ DE TESIS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VICENTE MADRID MARINA

ASESOR:

DRA. ANA ISABEL BURGUETE GARCÍA

ASESOR:

M. EN C. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ



Este trabajo se realizó en el laboratorio de prevención y control de cáncer del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección del Dr. Vicente Madrid Marina, con la asesoría del M. en C. Alfredo Lagunas Martínez y la Dra. Ana I. Burguete García

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vicente Madrid Marina, por brindarme nuevamente su confianza y apoyo para trabajar bajo su dirección y en el laboratorio a su cargo, gracias por apoyarme, confiar en mí y principalmente por darme la oportunidad de seguir formando parte de su equipo.

Al M. en C. Alfredo Lagunas Martínez, gracias Alfred por tu tiempo, paciencia, apoyo, consejos y sobretodo por compartir conmigo tus conocimientos “Pa la mecha Alfred”. A la Dra. Ana I. Burguete García, por su apoyo, consejos y colaboración en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, M.C. Margarita Bahena, Dra. Carla Contreras, Dra. Kirvis Torres, Dr. Victor Bermúdez, Dr. Oscar Peralta, M.C. Eva Hernández gracias por darme la oportunidad de aprender de cada uno de ustedes. A la Biol. Erika Melchy del Instituto de Biotecnología por su apoyo en el uso del citómetro de flujo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Flor García, Herbey Padilla, Gabriela Roblero, Yvette López, Alex Zurita, Esmeralda Ortíz, Alicia González, Jocelin Jaen, Cesar López, Felipe de Jesús, Gabriela Martínez, Abrahan Ramírez, Cecilia, Giovanna por brindarme su amistad, compartir conmigo jornadas de trabajo y momentos de alegría.

A mis profesores de la Maestría, por brindarme sus conocimientos. A mis compañeros de grupo Sepori, Gloria, Abraham, Herbey, Flor, Yvonne, Andreu, Graciela, Jonathan, Violeta e Yvette ya que fuimos un grupo en el cual aprendimos mucho de cada uno.

A todas las personas que de alguna manera me apoyaron durante la realización de este trabajo.

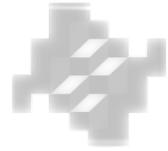
DEDICATORIA

*A **Dios** por brindarme salud y por ponerme en el camino a personas tan valiosas que me han apoyado y de las cuales he aprendido muchas cosas.*

*A **mis padres** que siempre están en mi corazón y han sido una fuente de inspiración para alcanzar mis sueños.*

*A **mi familia** mis **hermanos** Alicia, Janeth, José, Rómulo, a mis **sobrinos**, a la familia **Pérez Monzón** gracias por su confianza, apoyo y cariño.*

*A la familia **del Moral Gutiérrez** por su apoyo y cariño, principalmente a **Benjamin** por su amor y apoyo incondicional.*



RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un grave problema de salud pública. Evidencias clínicas y epidemiológicas han identificado al virus del papiloma humano (VPH) como el agente etiológico de esta enfermedad. No obstante, la infección no es suficiente para el desarrollo de lesiones y cáncer. Se sabe que la respuesta inmune es esencial para el control de la infección y eliminación del virus. Se ha encontrado que biopsias derivadas de pacientes con lesiones de alto grado y CaCU presentan expresión elevada de IL-10. La IL-10 inhibe la proliferación de linfocitos T, al inducir una disminución en la expresión de moléculas presentadoras de antígenos y moléculas co-estimuladoras, por lo cual se considera una citocina inmunosupresora. Adicionalmente, la IL-10 estimula el crecimiento de células de melanoma. De tal manera que la IL-10, además de tener efecto inhibitor de la respuesta inmune en la infección por el VPH, también tiene el potencial de aumentar la proliferación en otras células tumorales, como las derivadas de CaCU. En el presente trabajo se evaluó el efecto de IL-10 sobre la proliferación de células transformadas por el VPH. Con el fin de explicar este efecto, se identificó la expresión del receptor de IL-10 en líneas celulares derivadas de CaCU (SiHa, HeLa y C33-A). Posteriormente, se estudió el efecto de IL-10 sobre la proliferación de las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A. Además, a través de qRT-PCR se determinó que IL-10 no afecta la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 en la línea celular SiHa. Esto último es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación donde no se observó efecto de IL-10 sobre la proliferación de las células SiHa, HeLa y C33-A. Estos resultados sugieren que la IL-10 no aumenta la proliferación de líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por el VPH.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1 El CaCU, un grave problema de salud pública	13
2.2 Asociación entre el Virus de Papiloma Humano y el CaCU	14
2.3 Mecanismo de Infección y Transformación	15
2.4 Respuesta Inmune contra la infección por el VPH	18
2.5 Características de la citocina IL-10	20
2.6 Receptor y Señalización de IL-10	21
2.7 Papel de la IL-10 en la respuesta inmune contra CaCU	24
2.8 Efecto no inmune de IL-10 sobre la carcinogénesis	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIAL Y MÉTODOS	30
5.1 Cultivos celulares	30
5.2 Reactivos	30
5.3 ELISA	30
5.4 Análisis de detección de IL-10R por Citometría de Flujo	31

5.5 Ensayos de proliferación	31
5.6 Ensayos de neutralización	32
5.7 Extracción de ARN total a partir de las líneas celulares	32
5.8 Síntesis de la cadena complementaria de ADN (cADN)	33
5.9 RT-PCR punto final	33
5.91 RT-PCR tiempo real	34
5.92 Análisis estadístico	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Expresión del receptor de IL-10 en la superficie de líneas celulares derivadas de CaCU	35
6.2 Efecto de IL-10 sobre la proliferación en líneas celulares derivadas de CaCU	38
6.3 Expresión basal de la citocina IL-10 en la líneas celulares SiHa y HeLa.....	40
6.4 Efecto de IL-10 sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16	43
7. DISCUSIÓN	46
8. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN	52
9. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	53
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Incidencia y Mortalidad por cáncer en México

FIGURA 2. Mecanismo de infección y replicación del VPH

FIGURA 3. Cascada de señalización activada por la unión de IL-10 a su receptor.

FIGURA 4. Análisis de expresión del ARNm de IL-10R α e IL-10R β por RT-PCR en las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A.

FIGURA 5. Expresión del receptor de IL-10 en líneas celulares derivadas de CaCU.

FIGURA 6. Proliferación de las líneas celulares SiHa, HeLa, C33-A y B16-0.

FIGURA 7. Proteína IL-10 soluble producida por las líneas celulares derivadas de CaCU.

FIGURA 8. Proliferación de las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A.

FIGURA 9. Graficas de eficiencias de amplificación para los ARNm.

FIGURA 10. Efecto de IL-10 sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 en la línea celular SiHa.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TRABAJO

CaCU	Cáncer Cérvico Uterino
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
IL-10	Interleucina 10
IARC	International Agency for Research on Cancer
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
LCR	Long Control Region
ORF	Open Reading Frame
IFN	Interferón
MHC	Mayor Histocompatibility Complex
IL-10R	Receptor de Interleucina 10
JAK	Janus Kinasa
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
ARN	Ácido Ribonucleico
S	Sentido
AS	Antisentido
NK	Natural Killer
NA	Neutralizing Antibody

1. INTRODUCCIÓN



En la actualidad el cáncer es un grave problema de salud pública a nivel mundial. Se le atribuyen 7,6 millones de defunciones ocurridas en el año 2008¹. El cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el cuarto lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres². En México durante el 2010, el CaCU representó el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres³.

El CaCU es una enfermedad multifactorial. Diversos factores de riesgo se han identificado en el desarrollo del CaCU, como son el inicio precoz de las relaciones sexuales sin protección, el número de parejas sexuales⁴, multiparidad⁵, uso prolongado de anticonceptivos orales⁵, inmunosupresión y la infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR)⁶.

Un estudio realizado en biopsias de pacientes con tumores malignos mostró que un 99.7% fueron positivas para el genoma del VPH-AR, lo cual implica que el virus juega un papel importante en el desarrollo del CaCU, considerándose el factor etiológico de esta enfermedad. Sin embargo, a través de estudios epidemiológicos se ha determinado que la infección por el VPH-AR es una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar CaCU⁷. Actualmente, se conocen más de 120 tipos de papilomavirus que infectan a humanos, los cuales se dividen en grupos de alto y bajo riesgo, basados en la frecuencia de asociación con el desarrollo de CaCU⁸. El VPH 16 de alto riesgo es el de mayor prevalencia en la población general (50%)³.

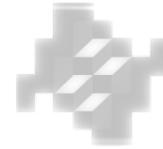
Muchas mujeres están infectadas por alguno de los 120 tipos del VPH, pero solo una minoría desarrollará lesiones que progresarán a CaCU. La respuesta inmune es un factor clave para la eliminación del virus y regresión de lesiones precursoras de CaCU. Existen evidencias de regresión de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) a epitelio normal, que sugieren que la respuesta inmune celular es la responsable de la eliminación de células premalignas, infectadas por el VPH⁹. Los mecanismos de respuesta inmune contra el VPH, son

los mismos que utiliza el organismo contra otras infecciones virales; sin embargo, en algunos casos estos mecanismos fallan y no son capaces de controlar la infección viral, por lo que se da lugar a la persistencia del virus y el desarrollo de lesiones cervicales⁹.

Se ha demostrado que la respuesta inmune celular es crítica en la eliminación de células infectadas por el VPH. Los VPH pueden causar infecciones persistentes mediante el desarrollo de numerosos mecanismos que disminuyen su detección por el sistema inmune. Uno de estos mecanismos es a través de la generación de un estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral, que puede darse por medio de la expresión de citocinas inmunosupresoras como la interleucina 10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β 1), favoreciendo la respuesta inmune humoral (Th2), y disminuyendo la respuesta inmune celular (Th1), lo cual se ha asociado con la persistencia viral¹⁰.

La IL-10 es una citocina pleiotrópica, inhibe la función de las células presentadoras de antígeno, monocitos activados, células asesinas naturales (NK) y bloquea la síntesis de citocinas tipo Th1 (como IL-12 e INF γ). Entre otras de sus funciones normales se identificó que estimula la proliferación de células B, timocitos y células cebadas¹¹.

Se ha determinado que el ARNm de IL-10 se encuentra elevado en pacientes con lesiones del cérvix y CaCU, esto es favorecido por la infección por el VPH, como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Sin embargo, se han reportado efectos no inmunes de IL-10 en diversos tipos de cáncer como leucemia linfocítica crónica, cáncer de pulmón y melanoma^{12,13}. Se ha sugerido que IL-10 favorece el desarrollo de las enfermedades antes mencionadas, al inhibir la muerte celular por apoptosis e inducir la proliferación de células malignas.



2. ANTECEDENTES

2.1 El CaCU, un grave problema de salud pública

El CaCU es el tercer cáncer más diagnosticado en mujeres alrededor del mundo. En el 2008, se diagnosticaron 529,000 casos nuevos de cáncer y 275,100 muertes a causa del CaCU en mujeres. Más del 85% de los casos y muertes ocurren en países en desarrollo². En México, cada año se diagnostican 10,186 mujeres con CaCU y mueren 5,061 por esta enfermedad (Fig. 1)³.

México tiene una población de 37.45 millones de mujeres entre las edades de 15 y 44 años que están en riesgo de desarrollar CaCU³. Aunque esta enfermedad puede evitarse en gran medida, los esfuerzos colectivos para prevenirla no han logrado disminuir su prevalencia. El CaCU se puede prevenir y curar cuando el tamizaje (prueba de papanicolau), está disponible junto con un tratamiento y seguimiento apropiados, por lo que es importante establecer programas de detección oportunos de esta enfermedad¹⁴.

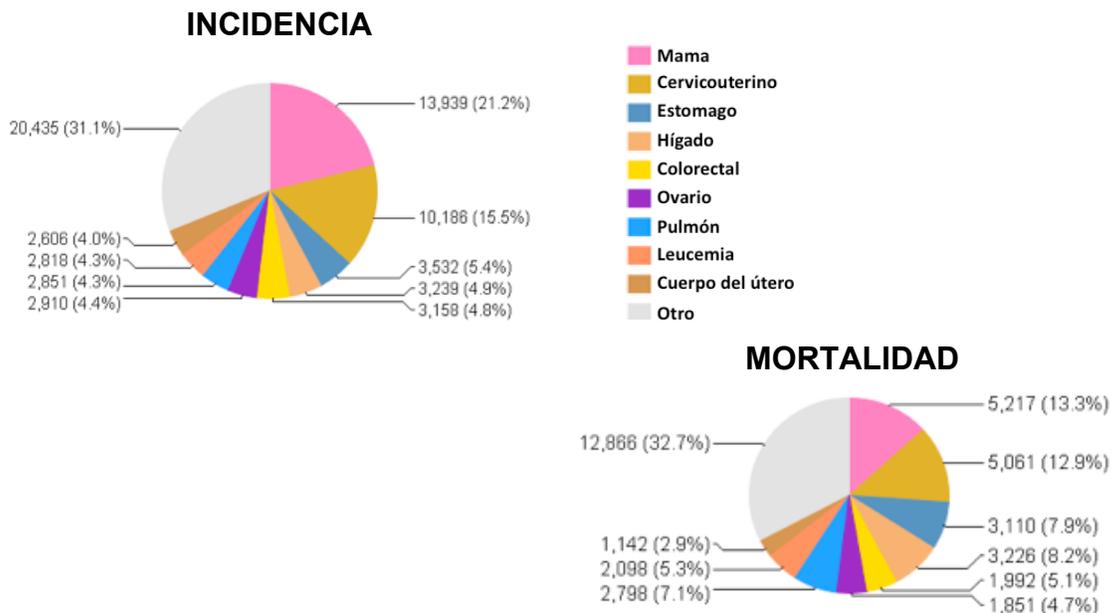


Fig. 1. Incidencia y Mortalidad por cáncer en mujeres en México (Globocan, 2008).

2.2 Asociación entre el Virus de Papiloma Humano y el CaCU

Entre 1974 y 1976, diversos investigadores analizaron el posible papel del VPH en el desarrollo del CaCU. En 1976, Meisels y Fortin publicaron dos reportes que describen por primera vez a los coilocitos (células atípicas que presentan un halo perinuclear) en biopsias de CaCU, los cuales indican la presencia de una infección por el VPH¹⁵. La identificación del agente etiológico del CaCU ocurrió en 1983, cuando Dürst, Gissman y otros colaboradores del Dr. Zur Hausen aislaron el VPH 16 y un año después el VPH 18, a partir de biopsias de CaCU. Esta fue la primera evidencia experimental de la asociación del VPH con el CaCU. Con esos descubrimientos se fortaleció la hipótesis del VPH como agente causal del CaCU.

Hasta el momento se han descubierto cerca de 120 tipos virales que infectan a humanos, 100 de éstos bien caracterizados⁸. Alrededor de 40 tipos del VPH-AR se conoce que infectan el tracto genital. Los VPH se han clasificado, con base en su asociación con el desarrollo de cáncer, en virus de alto (por ejemplo tipo 16, 18, 31, 33, 35, 26, 53, 66) y bajo riesgo (tipo 6, 11, 40). En 1995, la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) concluyó que había suficiente evidencia para clasificar a los VPH tipo 16 y 18 como oncogénicos¹⁶. En México, se estima que el 67.5% de los CaCU invasivos son atribuidos a VPH 16 y 18³. La mayoría de las infecciones ocurren poco después de iniciar la vida sexual activa y son transitorias. La adquisición del VPH es muy común, particularmente entre jóvenes sexualmente activas y mujeres adultas. La incidencia de infección con tipos oncogénicos o de alto riesgo aparentemente es más alta que la infección con tipos no oncogénicos o de bajo riesgo. Aunque la infección por el VPH es común, se cree que la mayoría de los individuos infectados eliminan el virus sin desarrollar manifestaciones clínicas, por lo que, muy pocos individuos infectados progresan a CaCU¹⁷.

2.3 Mecanismo de Infección y Transformación

El VPH es un virus tejido específico, capaz de infectar células basales del epitelio del cérvix, e inducir tumores epiteliales escamosos. Diversos estudios han identificado que la replicación de éstos virus esta ligada al programa de diferenciación de las células del epitelio basal (queratinocitos). Poco se sabe acerca de los procesos iniciales de entrada del virus a la célula. Sin embargo, se ha establecido que receptores como el heparán sulfato ubicado en la superficie de los queratinocitos participan en la interacción e internalización del virus a la célula^{18,19}.

Se ha determinado que durante la actividad sexual, el microtrauma del epitelio genital, permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión de la proteína de la cápside viral L1 con la célula basal, dicho receptor ha sido asociado con el heparán sulfato para algunos tipos virales de alto riesgo como los VPH 16 y 33¹⁹. Una vez unido el virus a la superficie celular, se internaliza por endocitosis. Dos sistemas de endocitosis han sido reportados: endocitosis mediada por clatrina, inducida por los tipos VPH 16 y 18, y endocitosis por caveolas, proceso observado en VPH 31. Posteriormente, la cápside viral es desensamblada en capsómeros en el endosoma, por efecto de agentes que dañan los puentes disulfuro de la cápside, se sabe que la proteína L2 facilita el escape del complejo L2/genoma viral de los endosomas. El mecanismo por el cual el genoma viral entra al núcleo no esta aún entendido. Sin embargo, se sabe que L2 posee dos péptidos terminales que funcionan como señales de localización nuclear, lo que sugiere que L2 proporciona señales para que el complejo L2 /genoma viral ingrese al núcleo²⁰. Inicialmente el ADN viral se encuentra en forma extracromosomal o episomal, y su replicación se mantiene con un número reducido de copias. Las células basales en proliferación migran a los estratos parabasal y espinoso, favoreciendo el aumento en el número de copias virales por célula, esta etapa se denomina fase productiva.

El genoma viral está formado por tres regiones: una región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés), la región de expresión temprana que presenta seis marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) que codifican para seis proteínas (E1, E2, E4, E5, E6, E7), y una región de expresión tardía que presenta dos ORF, que codifica para dos proteínas (L1 y L2)²¹.

Las proteínas del virus participan de manera importante en el proceso de replicación del virus y transformación de la célula huésped, al interactuar con proteínas celulares importantes en el control del ciclo celular²². Las proteínas E5, E6 y E7 se expresan en los estadios iniciales de la infección. Estas proteínas desestabilizan a la célula infectada y promueven su proliferación. Posteriormente se expresan las proteínas E1 y E2 cuya función es generar copias del genoma viral. La proteína E2 también puede funcionar como un factor de transcripción, ya que regula la actividad del promotor viral temprano (p97 en el VPH 16 y p105 en el VPH 18), que controla la expresión de los genes E6 y E7⁶. La proteína E4 se une a proteínas del citoesqueleto, modificándolo y permitiendo la liberación de viriones. En los últimos estadios de la diferenciación se expresan las proteínas tardías L1 y L2 que son componentes de la cápside del virus, lo cual favorece la liberación de los viriones.

Un acontecimiento importante durante la transformación de las células infectadas es la integración del genoma viral al genoma de la célula huésped. Durante este proceso el ADN viral se rompe en la región E1-E2, perdiéndose la expresión de la proteína E2, que mantenía bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7 (Fig. 2). Por lo tanto, la integración del genoma viral produce la expresión permanente de las oncoproteínas virales, E6 y E7, las cuales inhiben la función de las proteínas celulares p53 y pRB, respectivamente, perdiéndose así la función de estos genes como reguladores del ciclo celular y favoreciendo la transformación y proliferación de la célula huésped^{23,24}.

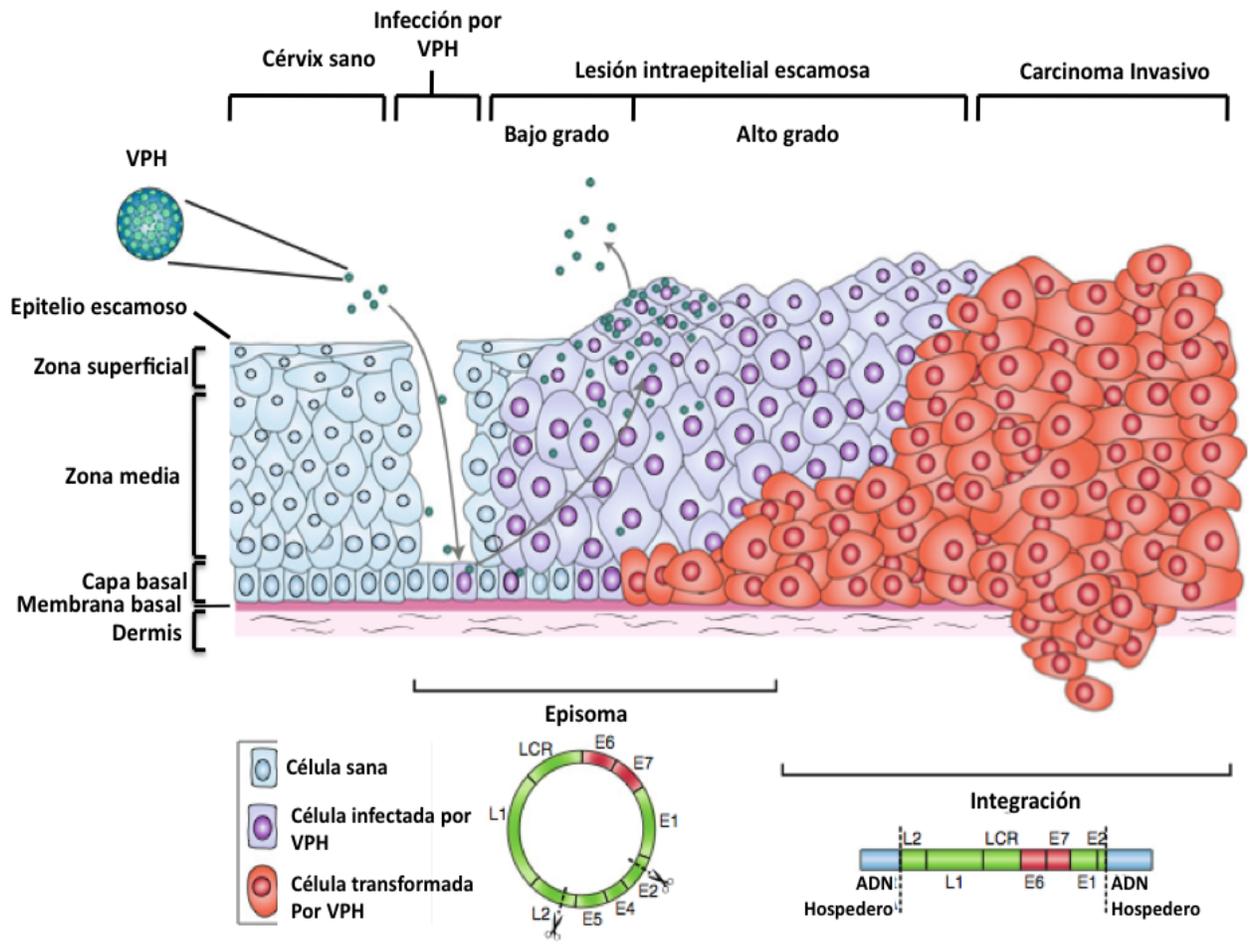


Fig 2. Mecanismo de infección y replicación del VPH (Modificado de Piersma, 2011).

2.4 Respuesta Inmune contra la infección por el VPH

A pesar de que la infección con VPH es común, la mayoría de las mujeres infectadas no desarrollan CaCU. Además, en el caso de las mujeres que desarrollan lesiones, el periodo entre la infección y la aparición de lesiones es altamente variable, de semanas a meses, sugiriendo que el estado de la respuesta inmune es importante para permitir el establecimiento de la infección.

La primera línea de defensa contra la infección por VPH es el sistema inmune innato, el cual provee protección no específica contra una variedad de patógenos y favorece la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, las células infectadas evaden el reconocimiento inmune innato e impiden su eliminación. Se sabe que las proteínas virales inhiben componentes específicos del sistema inmune innato. Los IFN α y β se inducen en respuesta a infecciones virales. La proteína viral E7 bloquea la actividad del IFN α , al inhibir la expresión de sus genes blanco. E7 además inhibe la activación del promotor del IFN β . E5 y E7 inhiben expresión de proteínas del MHC I sobre la superficie celular. También se ha demostrado que células infectadas son resistentes a lisis por células asesinas naturales (NK). De esta forma el virus evade la respuesta inmune innata²⁵.

En la respuesta inmune adaptativa, se requiere del reconocimiento de antígenos virales para reconocer a la célula infectada y activar a las células efectoras de la respuesta inmune para eliminarla. Este mecanismo de respuesta requiere de la activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B). La activación de los linfocitos T, requiere que las células dendríticas (DC) capturen y procesen los residuos celulares procedentes de la célula infectada, migren a los nódulos linfáticos regionales para que sean presentados los antígenos a los linfocitos T. Los linfocitos T solo reconocen antígenos que han sido procesados en pequeños péptidos, además que estén unidos a proteínas del MHC, de tal forma que sean presentados como un complejo-receptor unido a membrana²⁶.

Las células presentadoras de antígeno (CPA) expresan receptores y secretan citocinas locales, que junto con las citocinas presentes en el microambiente dirigen a las células T a tomar un perfil (Th1, Th2, Treg, etc.) para activar una respuesta específica. Trabajos previos han mostrado evidencias de eliminación de infecciones por VPH y regresión de NIC a epitelio normal, que sugieren fuertemente que la respuesta inmune celular es la responsable de la eliminación de células infectadas o premalignas. A pesar de que la respuesta inmune es capaz de eliminar a las células infectadas o tumorales, existen mecanismos desencadenados por el VPH para evadir la respuesta inmune⁹.

Algunos de los factores que participan en la generación de un microambiente inmunosupresor en el sitio de infección, es la expresión elevada de las citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β 1, lo que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, y como consecuencia la respuesta inmune celular. Por lo que, la presencia de IL-10 es uno de los factores que aumenta la persistencia del VPH y la progresión de lesiones relacionadas a la infección por el VPH¹⁰.

2.5 Características de la citocina IL-10

El gen que codifica para la citocina IL-10 está localizado en el brazo largo del cromosoma 1, el cual codifica para una proteína de 178 aminoácidos, que es secretada después de sufrir un corte de 18 aminoácidos que corresponde al péptido señal. La IL-10 humana bioactiva es un homodímero de 35 kD, que está compuesto por dos monómeros unidos por enlaces no covalentes. La IL-10 fue inicialmente descrita como una citocina tipo Th2, pero evidencia posterior sugirió que IL-10 era secretada principalmente por células T reguladoras o tolerantes (T regs). Sin embargo, IL-10 es una citocina ampliamente expresada por muchas células del sistema inmune adaptativo incluyendo grupos Th1, Th2 y Th17, células T regs, células T CD8+ y células B. También es expresada por células del sistema inmune innato como células dendríticas, macrófagos, células cebadas, células NK, eosinófilos y neutrófilos²⁷, además de ser expresada por queratinocitos. Su expresión es dependiente de diversos factores de transcripción, dependiendo del tipo celular: NF- κ B, ATF1, PBX1, SP1, CREB en macrófagos, SMAD 4 en células TH1 y GATA3, Jun en células Th2²⁷. La IL-10 es una citocina inmunomoduladora con propiedades para suprimir o activar diferentes tipos de células inmunes. IL-10 inhibe funcionalmente a las células presentadoras de antígeno, monocitos activados, células NK, y bloquea la síntesis de citocinas tipo Th1 (IL-12, IFN- γ). Por otro lado, también estimula la proliferación de células B, timocitos y células cebadas y disminuye la generación de linfocitos T citotóxicos.

IL-10 disminuye la respuesta inmune específica contra el tumor a través de varios mecanismos:

- Suprime directamente la producción de IFN- γ e IL-12, lo que impide la activación de LT citotóxicos y células NK.
- Disminuye la expresión del MHC sobre la superficie de células tumorales, para prevenir la formación de los complejos binarios formados por antígenos tumorales asociados a moléculas MHC sobre la superficie.
- Inhibe la presentación de antígenos por células presentadoras de antígenos profesionales²⁸.

2.6 Receptor y Señalización de IL-10

IL-10 media sus efectos biológicos por interacción con receptores de superficie específicos. El receptor de IL-10 (IL-10R) es un complejo que consiste de al menos dos cadenas de receptor separadas, una cadena alfa (IL-10R1 ó R α) de unión a ligando y una cadena beta (IL-10R2 ó R β), la cual es esencial para la transducción de señal. Ambos pertenecen a la familia de receptores tipo II, junto con los receptores de IFN α e IFN γ . Éste tipo de receptores presentan dos dominios de fibronectina en su región extracelular y carecen de residuos de cisteína característicos de receptores tipo I. La principal actividad del receptor es unirse a IL-10 e iniciar la transducción de señales, la cual permite la modificación de respuestas biológicas.

IL-10 se une con alta afinidad a la subunidad IL-10R1, además también participa en la transducción de señal. La subunidad IL-10R1 es expresada por la mayoría de las células hematopoyéticas como son células T, células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, células cebadas y varios progenitores hematopoyéticos. Además, el receptor IL-10R1 también se expresa en células tumorales de origen hematopoyético como células de mieloma, al igual que en células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos²⁹.

La subunidad IL-10R2 o IL-10R β es la encargada de la señalización. IL-10R2 fue originalmente descubierto como un componente del complejo de señalización heterodimérico formado por la cadena IL-10R1 e IL-10R2. Tiene menor afinidad por la IL-10. IL-10R2 funciona como una cadena de señalización común en la familia de citocinas de clase 2. Las citocinas que envían señales vía IL-10R2 inducen actividades pleiotrópicas que protegen al hospedero de respuestas inmunes exacerbadas³⁰.

La vía de señalización mejor caracterizada de IL-10 es el sistema Jak/Stat. La interacción IL-10/IL-10R produce un aumento en la afinidad de dominio intracelular por las cinasas de residuos de tirosina Jak1 y Tyk 2, las cuales están constitutivamente asociadas con IL-10R1 e IL-10R2 respectivamente.

La unión de la IL-10 con el complejo de IL-10R1 e IL-10R2 induce la fosforilación de residuos de tirosina y la activación de los factores de transcripción STAT 3, STAT 1 y STAT5. STAT3 es reclutado a través de dos residuos de tirosinas fosforiladas en el dominio citoplasmático de IL-10R1. Se ha demostrado que la activación de STAT3 es necesaria y suficiente para mediar la inhibición de la proliferación de macrófagos por IL-10, debido a que induce la expresión de inhibidores del ciclo celular como p19^{INK4D} y p21^{CIP1}. Se ha comprobado que el INF γ es una citocina antagonista de la señal de IL-10. La IL-10 durante la señalización induce la transcripción de SOCS3, gen regulado por STAT3, que desencadena la autorregulación negativa para la cascada de señalización de IL-10²⁹ (Fig. 3).

Otras vías de señalización mediadas por IL-10 consistentes con su habilidad para inhibir la activación de macrófagos y de monocitos, son la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B por IL-10 en respuesta a estímulo in vitro en células T CD3+ a través de la inhibición de la activación del inhibidor NF- κ B y la cinasa I κ B. Además se ha reportado que la estimulación con IL-10 activa a los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en células T CD8+ e induce la expresión de Bcl-2 (una proteína antiapoptótica) en progenitores CD34+ y células B de centros germinales. En monocitos, se ha comprobado que IL-10 activa a las cinasas p70 S6 y p13K, y el bloqueo de estas vías afecta las actividades de regulación de la proliferación por IL-10²⁹.

La señalización por IL-10 tiene efectos en la supervivencia, proliferación y diferenciación de células B humanas, a través del incremento en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, e inducción de la expresión de hTERT y aumento en la actividad de la telomerasa²⁹.

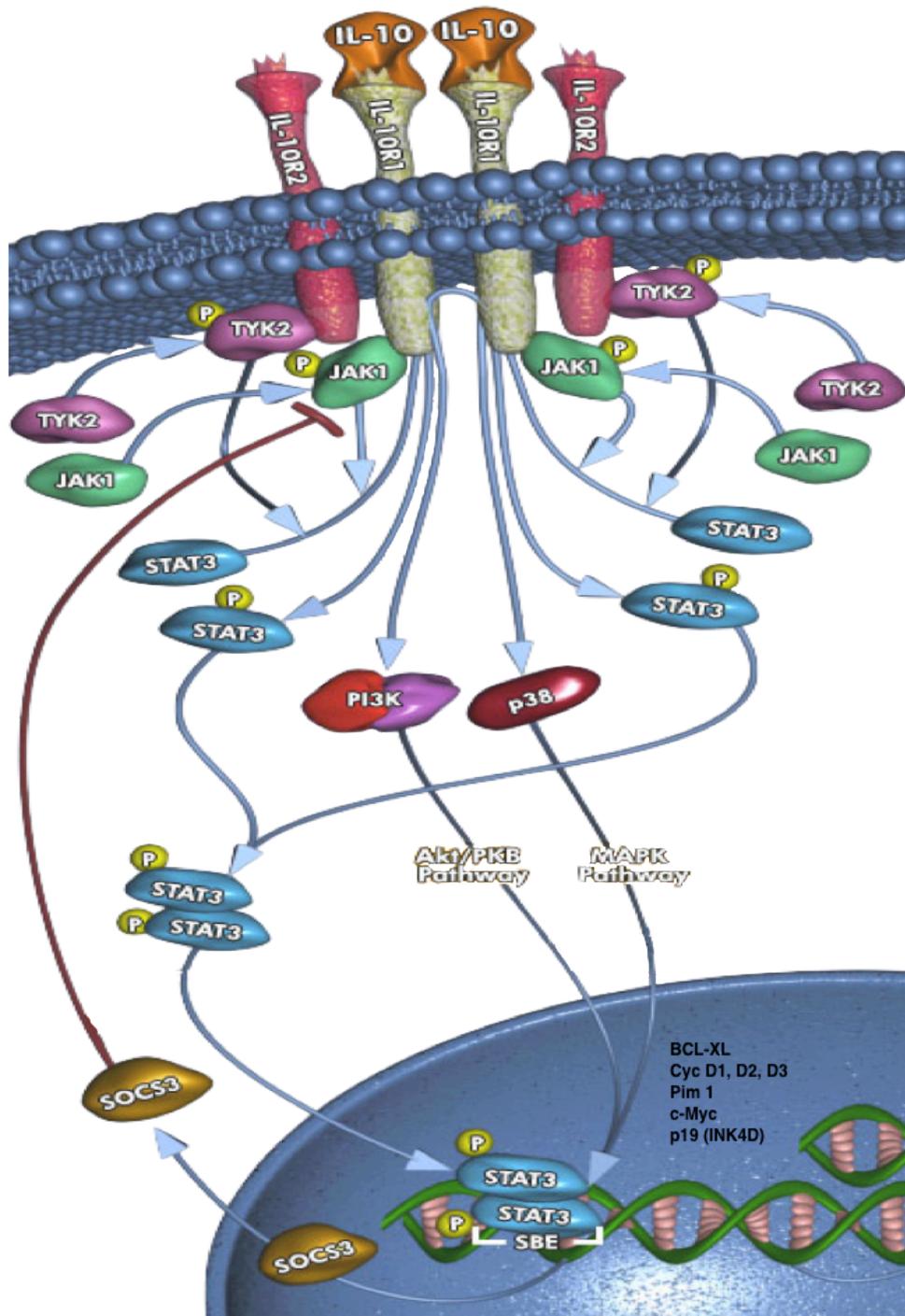


Fig. 3. Cascada de señalización activada por la unión de IL-10 a su receptor. Genes de respuesta a IL-10 SOCS 3, BCL-XL, Ciclina D1, D2, D3, Pim 1, c-Myc y P19 (INK4D) (Qiagen GeneGlobe pathways).

2.7 Papel de la IL-10 en la respuesta inmune contra CaCU

Después de la infección por el VPH, el hospedero desarrolla una respuesta inmune mediada por células, específica para infecciones virales, respuesta que en la mayoría de los casos permite la eliminación de la infección; la ausencia de esta respuesta permite la persistencia del virus y el desarrollo de lesiones y CaCU. La inmunidad tumoral es regulada positivamente por citocinas tipo Th1 e inhibida por citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- β ¹⁰.

IL-10 inhibe secreción de una variedad de citocinas Th1 normalmente sintetizadas por macrófagos activados y células mononucleares; además inhibe la actividad coestimuladora de células presentadoras de antígenos, y la activación de macrófagos¹¹ y disminuye la expresión del MHC clase II en monocitos, lo que inhibe la presentación antigénica llevada a cabo por estas células. Además, suprime la producción de IFN- γ e IL-12, previniendo la activación de LT citotóxicos y células NK³¹. Estas propiedades sustentan el papel de IL-10 como citocina inmunosupresora, ya que su expresión disminuye la producción de citocinas Th1 a través de la ausencia de activación de células T en el microambiente tumoral, contribuyendo así al desarrollo del cáncer. Se ha sugerido una asociación entre la expresión de IL-10 y el desarrollo del CaCU ya que se demostró que la mayoría de biopsias provenientes de CaCU expresan IL-10¹⁰, expresión de IL-10 observada solo en células tumorales. IL-10 y TGF- β son consideradas citocinas inmunosupresoras y se ha encontrado su expresión en diversos tumores epiteliales humanos, sugiriendo que ambas citocinas juegan un papel importante en el desarrollo del CaCU. En 2008, Bermúdez y colaboradores observaron expresión elevada del ARN mensajero de IL-10 asociada con el grado de lesión cervical y correlacionada con la presencia de la infección por el VPH³¹. Este evento, sugiere una posible inmunosupresión en el sitio del tumor inducido por la presencia viral. Se ha demostrado que las proteínas E6 y E7 del VPH 16 regulan la expresión del gen TGF- β 1 a través del elemento regulador Sp1 ubicado en el promotor TGF- β 1³². De forma similar, se demostró que la proteína E2 transactiva el promotor del gen de IL-10³³. Estos hallazgos sugieren un posible mecanismo

por el cual las proteínas de VPH-AR regulan la expresión de los genes IL-10 y TGF- β 1 durante el desarrollo del CaCU, como una estrategia mediada por el VPH para inhibir la respuesta inmune.

2.8 Efecto no inmune de IL-10 sobre la carcinogénesis

Existe evidencia de que IL-10 posee además efectos no asociados a las funciones del sistema inmune que promueven el crecimiento y la supervivencia de las células, lo que favorece el desarrollo de cáncer¹².

En condiciones normales, IL-10 induce la proliferación de células B. Además, en leucemia linfocítica crónica (proliferación descontrolada de células B) se identificó que IL-10 se encontraba en altas concentraciones en el suero de éstos pacientes. Posteriormente, en un trabajo publicado por Chong y colaboradores en el 2001, se analizó *in vitro* el efecto de IL-10 sobre el ciclo celular en células malignas B-1 (linfoma), para esto inhibieron la expresión del gen de IL-10 mediante oligonucleótidos antisentido, los resultados revelaron una disminución de la proteína p27^{KIP1} (inhibidor de los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina D/CDK4), lo cual resultó en un aumento en la actividad de cinasa asociada a ciclinas D2, E y A, que trajo como consecuencia una progresión del ciclo celular acelerada, un bloqueo en G2/M y finalmente apoptosis. Los autores postulan a IL-10 como un factor de crecimiento autocrino para las células malignas B-1¹³.

En 1997, Yun y colaboradores analizaron el efecto *in vitro* de IL-10 sobre la proliferación de células derivadas de melanoma humano, para esto las células se incubaron en presencia de 100, 500 y 1000 U/mL de IL-10 recombinante, y 10 μ g/mL de anticuerpo neutralizante específico para IL-10 en ensayos individuales. Los resultados revelaron que IL10 aumentó la proliferación y prolongó la supervivencia de células derivadas de melanoma humano. Esto sugiere que IL-10 es un factor de crecimiento para las células de melanoma humano analizadas¹². Al respecto, García y colaboradores identificaron en el 2002, un aumento sobre la proliferación de líneas celulares derivadas de melanoma B16 de ratón; inducido por IL-10 y un crecimiento tumoral en un modelo de melanoma

B16 de ratón, los resultados indicaron que IL-10 induce el crecimiento del tumor en el modelo de melanoma B16, por inducción de la proliferación celular tumoral, angiogénesis e inmunosupresión³⁴.

En el 2010, Zeng y colaboradores, analizaron el efecto *in vitro* de IL-10 en células no pequeñas derivadas de carcinoma de pulmón, los resultados revelaron que IL-10 promueve angiogénesis e incrementa la resistencia a apoptosis³⁵. Sin embargo, a la fecha no se conocen estudios al respecto en células derivadas de CaCU transformadas por VPH, por lo que es importante investigar que papel juega IL-10 como inductora de la proliferación en estas células.

Se ha establecido que entre algunos de los genes de respuesta a IL-10 se encuentran ciclinas D1, D2, D3, p19^{INK4} y p21^{kip}. Estas proteínas son importantes reguladores del ciclo celular³⁶.



3. JUSTIFICACIÓN

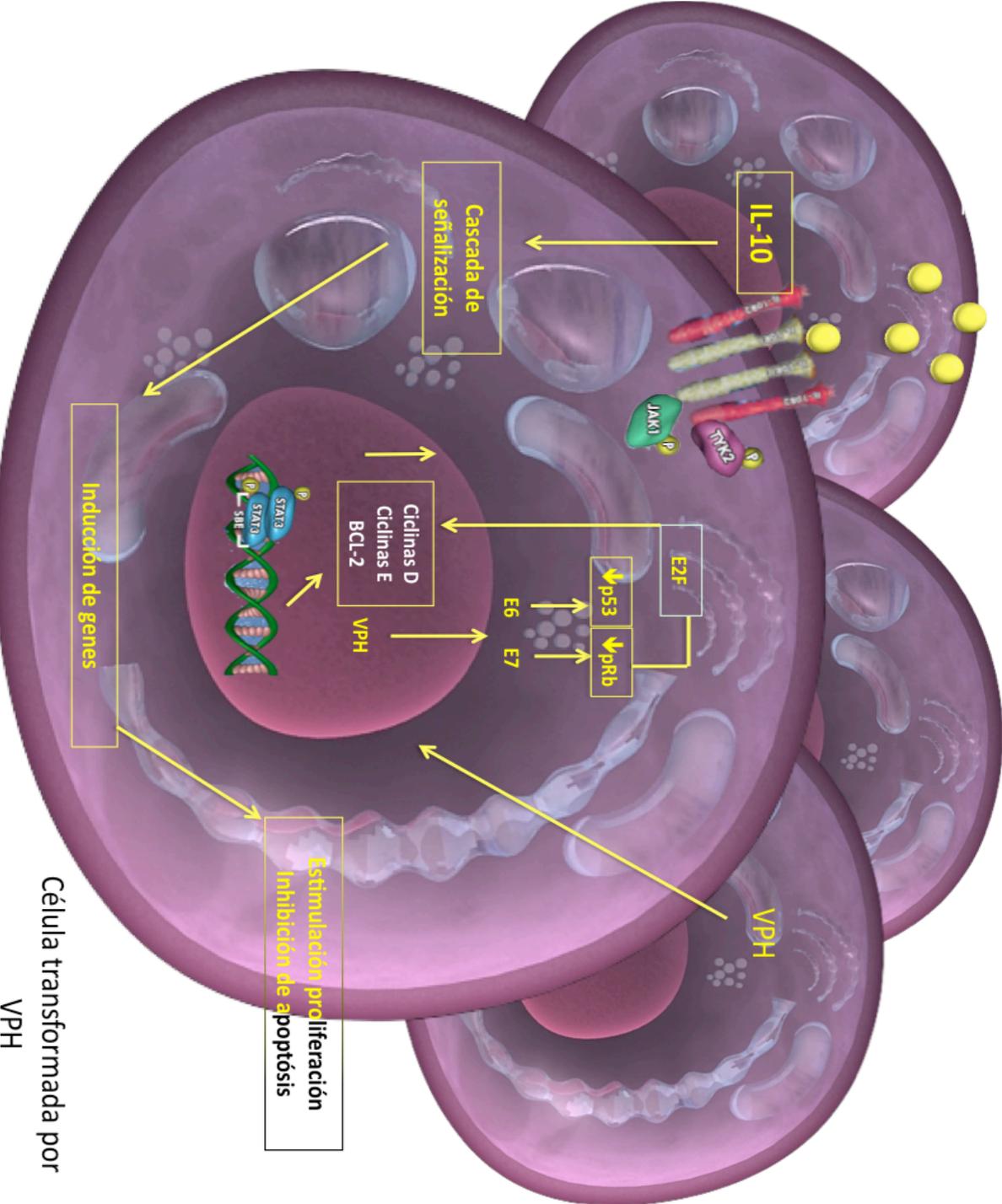
El CaCU representa un grave problema de salud pública. La infección persistente por el VPH en células epiteliales del cérvix, está asociada con el desarrollo de CaCU y es favorecida por un estado de inmunosupresión local explicado, en parte, por la expresión de citocinas como IL-10.

Estudios previos identificaron que IL-10 se encuentra sobreexpresada en lesiones cervicales y CaCU, y que el VPH participa en la inducción de la expresión de esta citocina.

Se ha demostrado que IL-10 es un factor de crecimiento para células de melanoma. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios sobre su efecto en la proliferación de células tumorales derivadas de CaCU transformadas por VPH.

Con base a lo anterior, es de relevancia identificar la posible implicación funcional de IL-10 en la inducción de proliferación de células tumorales derivadas de CaCU transformadas por VPH, y así determinar el papel de IL-10 en el desarrollo de CaCU.

MARCO CONCEPTUAL



4. OBJETIVO GENERAL



Determinar el efecto de IL-10 sobre la proliferación de células transformadas por el virus del papiloma humano de alto riesgo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia del receptor de IL-10 en líneas celulares transformadas por el VPH-AR.
- Evaluar el efecto de la variación de la concentración de IL-10 sobre la proliferación de células transformadas por el VPH-AR.
- Evaluar el efecto de la inactivación biológica de IL-10 sobre la proliferación de líneas celulares transformadas por el VPH-AR.
- Evaluar el efecto de la IL-10 sobre los niveles de expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH 16.



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares [HeLa (VPH 18+), SiHa (VPH 16+) y C33-A (VPH -)] se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) GIBCO, suplementado con antibiótico (penicilina/estreptomicina) y suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) Equitech-Bio. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera 5% de CO₂.

5.2 Reactivos

Para evaluar el efecto de la IL-10 en las líneas celulares, se usó la proteína recombinante humana de IL-10 (rIL-10, R&D Systems). Para la inactivación biológica de la IL-10 humana, se usaron anticuerpos neutralizantes (NA IL-10, IgG policlonal, anti-IL-10, AF-217-NA R&D Systems).

5.3 ELISA

Se sembraron 4×10^6 células de las líneas celulares (SiHa, HeLa y C33-A). Se cultivaron durante 24 hrs a 37° C en una atmosfera de 5% de CO₂ con medio DMEM sin SBF, en frascos de 25 cm². Los sobrenadantes celulares se colectaron, se centrifugaron a 4°C, a 14,000 rpm durante 5 min para remover desechos celulares, las muestras se almacenaron en tubos estériles a -20°C hasta su análisis. El procedimiento fue realizado de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Abcam, High Sensitivity IL-10 Human ELISA Kit). A partir de los sobrenadantes de cada una de las líneas celulares, se determinó la concentración de la proteína IL-10 basal (una sola cuantificación para cada línea celular). Para determinar la concentración de los sobrenadantes se utilizó una curva estándar. El valor menor de la curva estándar fue de 1.56 pg/mL y el máximo fue de 50 pg/mL. Las lecturas fueron realizadas a una densidad óptica de 450 nm en un espectrofotómetro.

5.4 Análisis de detección de IL-10R por Citometría de Flujo

Las células fueron despegadas con verseno (PBS suplementado con 0.05% EDTA). Posteriormente, se lavaron con PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 2% y 0.1% de azida de sodio (solución amortiguadora FACS), se centrifugaron a 1700 rpm y se resuspendieron en 100 μ l de solución amortiguadora FACS. Las células se incubaron en frío durante 30 min en oscuridad, con el anticuerpo que reconoce específicamente a la subunidad alfa del receptor de IL10 (anti-human IL-10Ra policlonal conjugado con el fluorocromo ficoeritrina (PE), R&D Systems), a una concentración de 250 ng/mL. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS y se resuspendieron en la misma solución suplementada con paraformaldehído al 2% hasta su análisis. La fluorescencia de las células fue cuantificada en un citómetro FacsCanto (Becton Dickinson). El porcentaje de células positivas a la presencia de la subunidad alfa del receptor de IL-10 en la superficie celular, se obtuvo con el programa FlowJo (TreeStar), al comparar la fluorescencia de células incubadas con el control de isotipo (IgG-PE), con la fluorescencia de células incubadas con el anticuerpo específico (IgG-anti-human IL-10Ra-PE).

5.5 Ensayos de proliferación

Se sembraron 10×10^3 y 7.5×10^3 células de las líneas celulares SiHa, C33-A y HeLa respectivamente, en cajas de cultivo de 96 pozos. La línea celular B16-0 de melanoma derivada de un tumor espontáneo originado en ratones C57BL/6 fue usada como control positivo para estos ensayos. Las células se cultivaron durante 16 hrs a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂, con medio DMEM suplementado con 10% SBF. Después de 16 hrs se agregó el tratamiento con la proteína recombinante (medio DMEM suplementado con 3% SBF con cada una de las diferentes concentraciones de rIL-10). Se incubaron durante 48 hrs, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio de cultivo DMEM con el reactivo con MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) y se incubó durante 2 hrs a 37°C. El compuesto MTS es reducido por una

enzima mitocondrial (succinato deshidrogenasa), generando una coloración la cual es proporcional al número de células. Finalmente, para medir la densidad óptica, se realizó la lectura a 492 nm y a 690 nm en un espectrofotómetro (Labsystems multiskan MS). Esta última es la longitud de referencia para corregir imperfecciones ópticas de la placa, por tanto los valores de absorbancia se expresan mediante las diferencias Abs 492 - Abs 690.

5.6 Ensayos de neutralización

Para analizar el efecto biológico de la neutralización de IL-10 sobre la proliferación de las líneas celulares, se sembraron 10×10^3 y 7.5×10^3 células de las líneas celulares SiHa, C33-A y HeLa respectivamente, en placas de 96 pozos. Se cultivaron durante 16 hrs a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ con medio DMEM suplementadas con 10% de SBF. Después de 16 horas se agregó el tratamiento con el anticuerpo neutralizante (medio DMEM suplementado con 3% SBF con cada una de las diferentes concentraciones de NA IL-10). De acuerdo a trabajos previos de neutralización exitosa de IL-10 con anticuerpos neutralizantes, se usaron concentraciones de 100 ng/ml, 1 y 10 µg/mL de NA IL-10. Se incubaron durante 48 hrs, posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio de cultivo DMEM con el reactivo con MTS y se incubó durante 2 hrs a 37°C. Para medir la densidad óptica, se realizó la lectura a 492 nm y a 690 nm en un espectrofotómetro (Labsystems multiskan MS). Los valores de absorbancia se expresan mediante las diferencias Abs 492 - Abs 690.

5.7 Extracción de ARN total a partir de las líneas celulares

A partir de los cultivos celulares se agregó 1 ml de Tripure (Roche) por cada 1×10^6 de células incubándose por 5 min a temperatura ambiente (TA). Después se añadieron 200 µl de cloroformo por cada mililitro de Tripure, se incubó por 4 min a TA. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa incolora para obtener el ARN. A la fase acuosa se le agregaron 500 µl de isopropanol por cada ml de Tripure y se incubó a -20 °C por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se lavó la pastilla

con etanol al 75% con DEPC (dietil-pirocarbonato). Nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min a 4 °C, la pastilla seca se resuspendió en 25 µl de agua con DEPC, finalmente se incubó a 65 °C por 10 min y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.8 Síntesis de la cadena complementaria de ADN (cADN)

La síntesis de la cadena complementaria del ADN (cADN) se realizó a partir de cinco µg de ARN total. Se realizó en dos fases: En la primera se colocó el ARN, oligo dT (0.5 µg) y agua con DEPC. Esta reacción se incubó en baño maría a 65 °C durante 10 min. La segunda fase se hizo en presencia de 2.5 U/µl de Transcriptasa Reversa MMLV (Invitrogen Life Technologies), 1 U/µl de inhibidor de RNase, 2.5 mM de dNTPs, en 1X de solución amortiguadora de reacción (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 MgCl₂ and 50 mM DTT) en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 1 h y posteriormente se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.9 RT-PCR punto final

La reacción de amplificación se llevó a cabo a partir del cADN en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf), en presencia de 0.5 U/µl de la enzima *Thermus aquaticus* (taq) polimerasa 0.5 U/µl (Invitrogen), dNTPs 2.5 mM, Buffer de PCR 1X (Invitrogen), 1 mM MgCl₂, 10 pmol de oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (AS), usados para la amplificación, los cuales se enlistan en la tabla 1. Las amplificaciones de los genes de interés se observaron en geles de poliacrilamida al 6%.

Nombre del gen	Primers	Tamaño de amplicon
Receptor IL-10Rα S	5' AGTCCCAGCCCAAGGGTAG 3'	
Receptor IL-10Rα AS	5' CTCTGTCCCATGAGCGTCTG 3'	149 pb
Receptor IL-10Rβ S	5' GGTCGTGTGCTTGGAGGA 3'	
Receptor IL-10Rβ AS	5' ACCATTCCCAATGCTGACAC 3'	106 pb

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos que se usaron para amplificar el ARNm de IL-10R. S: sentido, AS: antisentido.

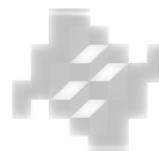
5.91 RT-PCR tiempo real

La reacción de RT-PCR tiempo real se realizó utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems) para amplificar una región del cADN GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), y de los cADNs E6 y E7 de VPH 16. La reacción se preparó utilizando 10 ul de Universal PCR Master Mix, 1ul de sonda, 2ul de templado con una concentración de 10 ng/ul y 7 ul de agua libre de DNAsas y RNAsas. La reacción se realizó en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50°C para activación de la polimerasa “HotStart” , un paso de desnaturalización de las hebras del ADN a 95°C 10 min, y 40 ciclos que contienen una fase de desnaturalización a 95°C por 15 seg, y una fase de alineamiento/extensión a 60 grados durante 1 min. La fluorescencia generada por los productos de amplificación se analizó utilizando el programa del equipo (SDS 2.3). Los niveles de ARNm de E6 y E7 fueron normalizados con el ARNm de GAPDH. El método usado para el análisis de la expresión génica fue el método comparativo del Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). El Ciclo umbral (Ct), es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral de detección. Se grafica en escala logarítmica. El Ct se emplea para la cuantificación relativa de la expresión génica. Las veces de incremento de la expresión (Media \pm DS) de E6 y E7, se obtuvieron con respecto al calibrador.

5.92 Análisis estadístico

La significancia estadística entre los grupos tratados y no tratados fue determinada por la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, para identificar diferencia entre los dos grupos. Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas si la $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados en el programa STATA/SE 10.0.

6. RESULTADOS



6.1 Expresión del receptor de IL-10 en la superficie de líneas celulares derivadas de CaCU

Se ha reportado un incremento en la expresión del ARNm de IL-10 en biopsias de pacientes con CaCU³¹, lo cual favorece un estado de inmunosupresión local. Sin embargo, el posible papel que presente el incremento de IL-10 sobre la proliferación de las líneas celulares transformadas por el VPH-AR, no se ha investigado. Para determinar si la citocina IL-10 puede tener un efecto como factor de crecimiento autocrino sobre las líneas celulares derivadas de CaCU, se identificó como primer paso, la presencia del ARNm de las subunidades Alfa (α) y Beta (β) del receptor de IL-10 (IL-10R) de las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A, así como la presencia del receptor de IL-10 en la superficie celular. Por medio de la técnica de RT-PCR punto final se identificó la expresión del ARNm de las subunidades del receptor de IL-10 (IL-10R α e IL-10R β) en líneas celulares derivadas de CaCU. En las tres líneas celulares analizadas, se identificó un fragmento de 149 pb y otro de 106 pb correspondientes a los fragmentos amplificados de las subunidades alfa (Fig. 4a) y beta (Fig. 4b) del receptor de IL-10, respectivamente. Estos resultados muestran una expresión del ARNm de las subunidades que forman el receptor de IL-10, lo que sugiere la expresión del receptor²⁹.

La expresión del receptor de IL-10 en la membrana celular fue determinada a través de citometría de flujo. La fluorescencia de las células incubadas con el anti-IL-10Ra-PE fue comparada con la fluorescencia obtenida a partir de células incubadas con el control de isotipo (IgG-PE). Las gráficas muestran una escasa expresión del receptor de IL-10 en la superficie de las líneas celulares SiHa y HeLa. A partir de la población celular total analizada se identificó el receptor en el 11.8% (Fig. 5a) en las células SiHa y un 7.9% (Fig. 5b) en las células HeLa. La mayor expresión del receptor se identificó en C33-A, con un porcentaje del 17.8% (Fig.5c). Estos resultados muestran que el receptor de IL-10 se expresa en la membrana celular de las líneas celulares derivadas de CaCU.

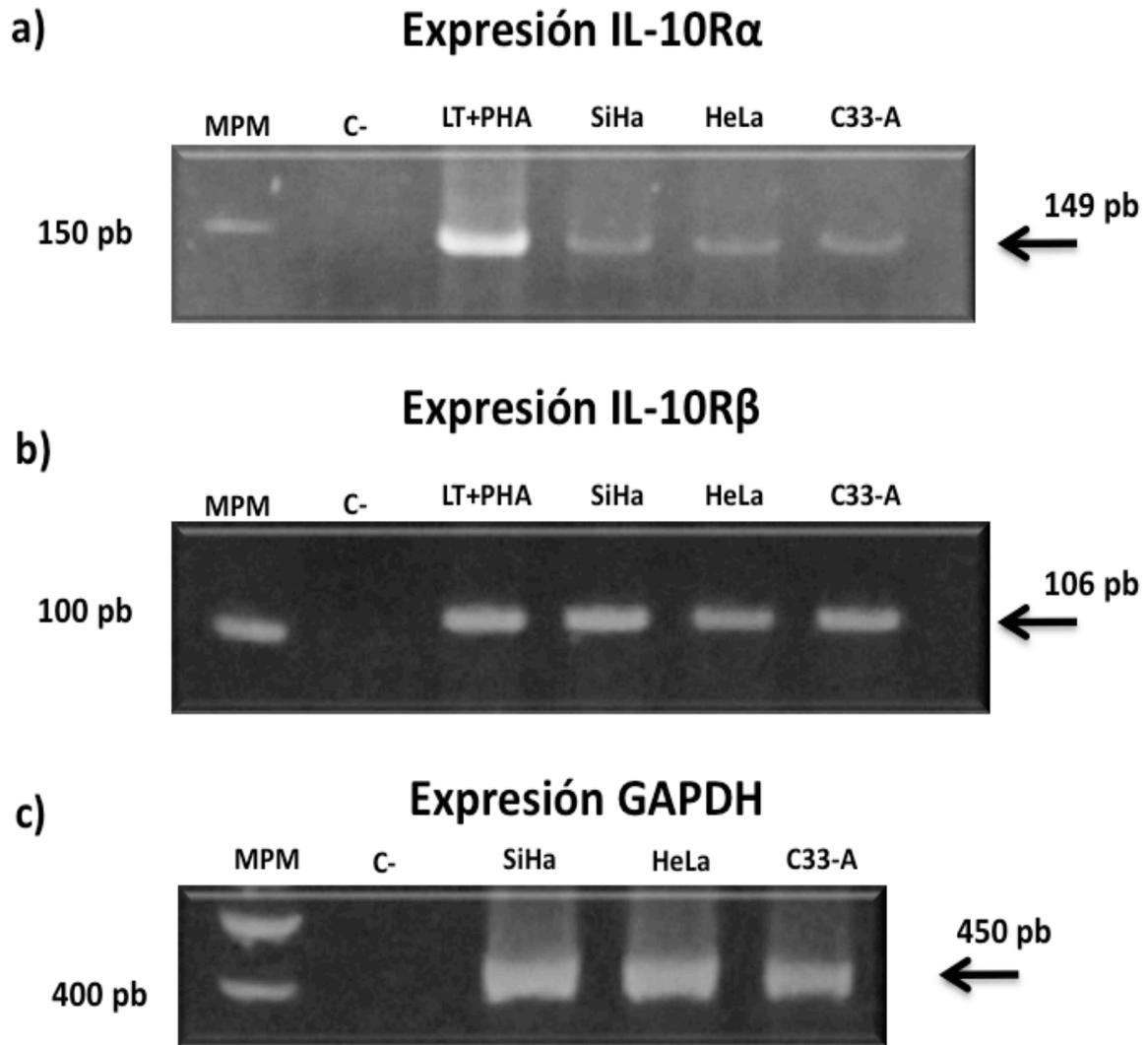


Figura 4. Análisis de expresión del ARNm de IL-10R α e IL-10R β por RT-PCR en las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A. A partir de 5 μ g de ARN total extraído de cada una de las líneas celulares se realizó una transcripción reversa y se amplificaron por PCR los fragmentos como se describe en Materiales y Métodos. **A)** Análisis de expresión de ARNm de IL-10R α **B)** Análisis de expresión de ARNm IL-10R β **C)** Análisis de expresión de ARNm del gen constitutivo GAPDH como control interno.

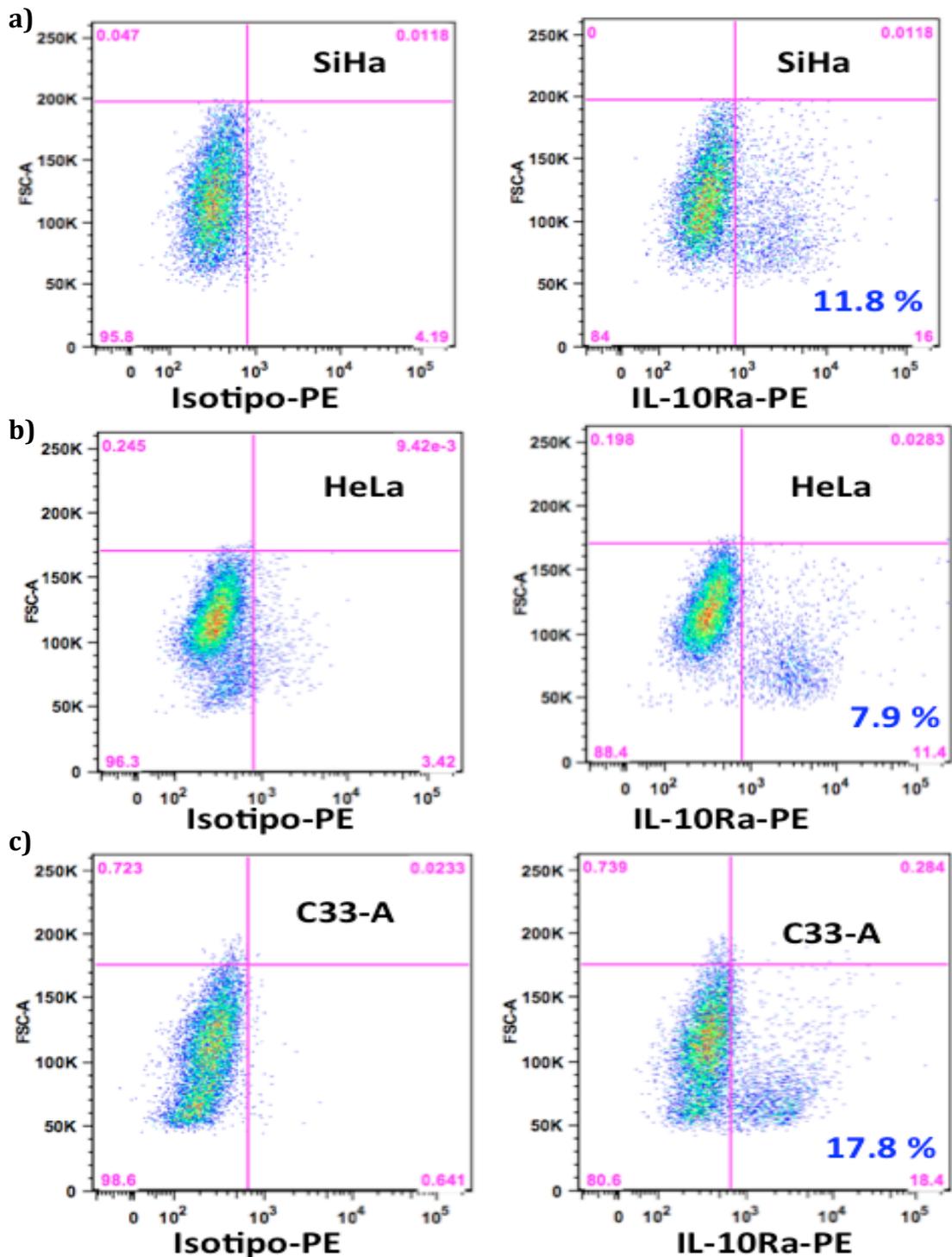


Figura 5. Expresión del receptor de IL-10 en líneas celulares derivadas de CaCU determinada por citometría de flujo después de marcar con el anti-IL-10Ra-PE. En el gráfico de la izquierda, se representan a las líneas celulares incubadas con el control de isotipo (IgG-PE). En el gráfico de la derecha se representa a las células incubadas con el anti-IL-10Ra-PE. Las células presentes en el cuadrante inferior derecho son las positivas a la presencia de la subunidad alfa del receptor de IL-10 en su superficie celular. Líneas celulares a) SiHa, b) HeLa y c) C33-A.

6.2 Efecto de IL-10 sobre la proliferación en líneas celulares derivadas de CaCU

Previamente se ha mostrado que IL-10 promueve o inhibe la proliferación de células tumorales dependiendo del tipo de tumor^{34,37}. Con el fin de evaluar el efecto de IL-10 sobre la proliferación de las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A, se realizaron ensayos de proliferación en estas líneas celulares. Para todos los casos, las células se cultivaron en presencia de 10, 100 y 200 ng/mL de la proteína recombinante de IL-10 (rIL-10), los porcentajes de proliferación obtenidos para cada línea celular se presentan en este orden 10, 100 y 200ng/mL, de acuerdo a la concentración aplicada. Inicialmente, se analizó la proliferación de la línea celular derivada de melanoma B16-0 como control positivo, con las condiciones antes mencionadas. En las células B16-0, de acuerdo a lo reportado, rIL-10 aumenta la proliferación en un 29%, 22% y 14% comparado con el grupo sin tratamiento (Fig. 6a), este aumento fue estadísticamente significativo, $p < 0.05$. Este ensayo demuestra que rIL-10 induce la proliferación en la línea celular B16-0.

Posteriormente se realizó el ensayo de proliferación para las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A. En la línea celular SiHa no se observó aumento en la proliferación celular comparado con el control. Los porcentajes de proliferación obtenidos disminuyeron en un -3% y -6% al aplicar 10 y 100 ng/mL, y aumentó un 3% con 200 ng/mL, comparados con el control. Estos pequeños cambios en la proliferación se consideran variaciones, ya que no fueron estadísticamente significativos, $p > 0.05$ (Fig. 6b). Un efecto similar se observó en la línea celular HeLa en donde se observó un aumento en la proliferación en un 13%, 12% y 10% comparados con el control sin tratamiento, resultados estadísticamente no significativos, $p > 0.05$ (Fig. 6c). Finalmente para la línea celular C33-A, posterior al tratamiento con las tres concentraciones de rIL-10, se observó un aumento en la proliferación en un 8%, 14% y 0% respectivamente (Fig.6d), comparados con el control, en donde solo el porcentaje obtenido aplicando 100 ng/mL de rIL-10 fue significativo (14%), $p < 0.05$. Estos resultados sugieren que rIL-10 no tiene efecto sobre la proliferación de las líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por el VPH-AR, SiHa y HeLa, al menos en este modelo *in vitro*. Sin embargo, para

C33-A aumenta moderada pero significativamente la proliferación en presencia de 100 ng/mL de rIL-10.

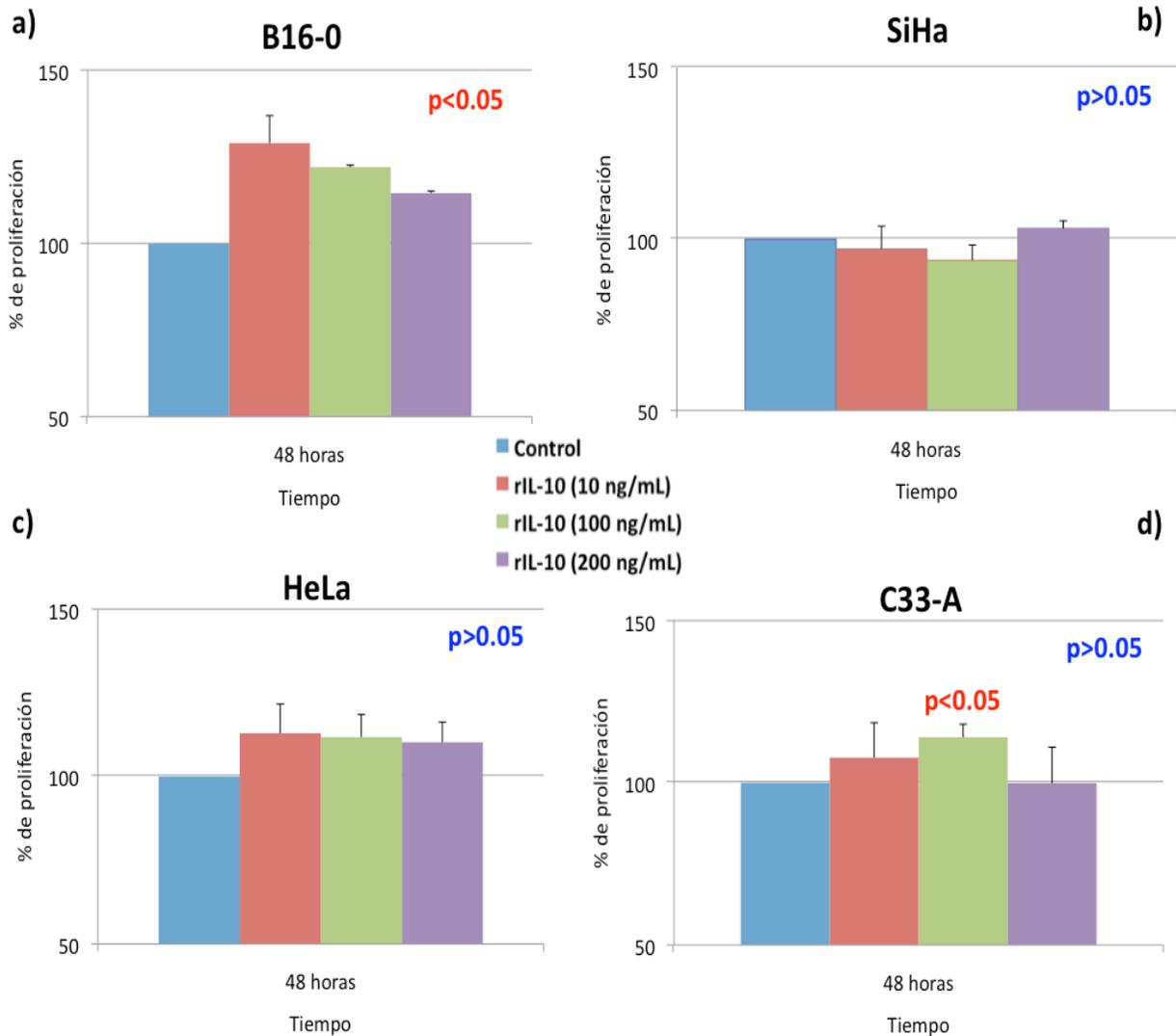


Figura 6. Proliferaci3n de las l3neas celulares SiHa, HeLa, C33-A y B16-0 (control positivo) en presencia de 10, 100 y 200 ng/mL de rIL-10, incubadas durante 48 hrs. Diez mil (SiHa y C33-A) y siete mil quinientas (HeLa) c3lulas derivadas de CaCU, fueron cultivadas en presencia de tres diferentes concentraciones de rIL-10 por triplicado, en el periodo de tiempo indicado. Los datos son expresados como medias \pm desviaciones est3ndar. La gr3fica es representativa de tres experimentos independientes. (Valores de p en rojo datos estad3sticamente significativos).

6.3 Expresión basal de la citocina IL-10 en la líneas celulares SiHa y HeLa

Una explicación del nulo efecto de rIL-10 sobre la proliferación de las líneas celulares transformadas por el VPH-AR, podría ser que el efecto generado por IL-10 endógena sea suficiente para inducir la proliferación. Trabajos previos han reportado la presencia de IL-10 en los sobrenadantes de algunas líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por el VPH¹⁰. Con el fin de confirmar la presencia de IL-10 en el sobrenadante de las líneas celulares derivadas de CaCU usadas en este trabajo, se realizó un ELISA de alta sensibilidad.

La proteína IL-10 fue identificada en las líneas celulares HeLa y SiHa en bajas concentraciones, 4.78 y 2.73 pg/mL respectivamente (Fig.7); a diferencia de C33-A, en la cual no se identificó la presencia de IL-10. Similar a los trabajos reportados, los resultados obtenidos demuestran que las líneas celulares HeLa y SiHa expresan IL-10 de manera basal¹⁰.

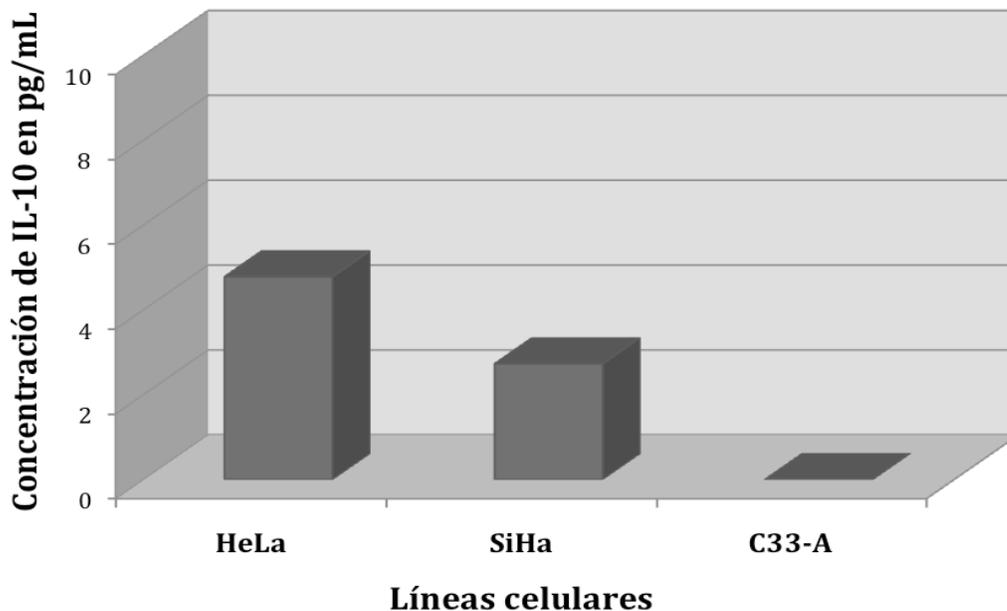


Figura 7. Proteína IL-10 soluble producida por las líneas celulares derivadas de CaCU. Niveles de IL-10 en sobrenadante de líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A detectados por ELISA. IL-10 se encuentra presente en el sobrenadante de las líneas celulares HeLa y SiHa derivadas de CaCU.

Para determinar si IL-10 presente en los sobrenadantes favorece la proliferación de las líneas celulares, se planteó el uso de un anticuerpo neutralizante dirigido contra IL-10 (NA IL-10), que fuera capaz de inhibir el efecto biológico de la citocina. Se incubaron las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A con tres diferentes concentraciones de NA IL-10, 100 ng/mL, 1 y 10 µg/mL durante 48 horas. Los porcentajes de inhibición de la proliferación obtenidos para la línea celular SiHa con las tres concentraciones fueron los siguientes, se observó una disminución de la proliferación en un -5%, -9% y -3% respectivamente comparados con el control, resultados estadísticamente no significativos, $p > 0.05$ (Fig.8a). Para la línea celular HeLa se observó un aumento en la proliferación de un 8%, al utilizar las concentraciones de 100 ng/mL y 1µg/mL; y un aumento en la proliferación del 1% al utilizar 10 µg/mL de NA IL-10, estos datos fueron estadísticamente no significativos, $p > 0.05$ (Fig.8b). Finalmente, para C33-A, se obtuvo un aumento en los porcentajes de proliferación de un 6%, 9% y 1% respectivamente, comparados con el control, datos estadísticamente no significativos, $p > 0.05$ (Fig.8c). Estos resultados sugieren que la inactivación biológica de IL-10, no tiene un efecto evidente sobre la proliferación celular en ninguna de las líneas celulares analizadas.

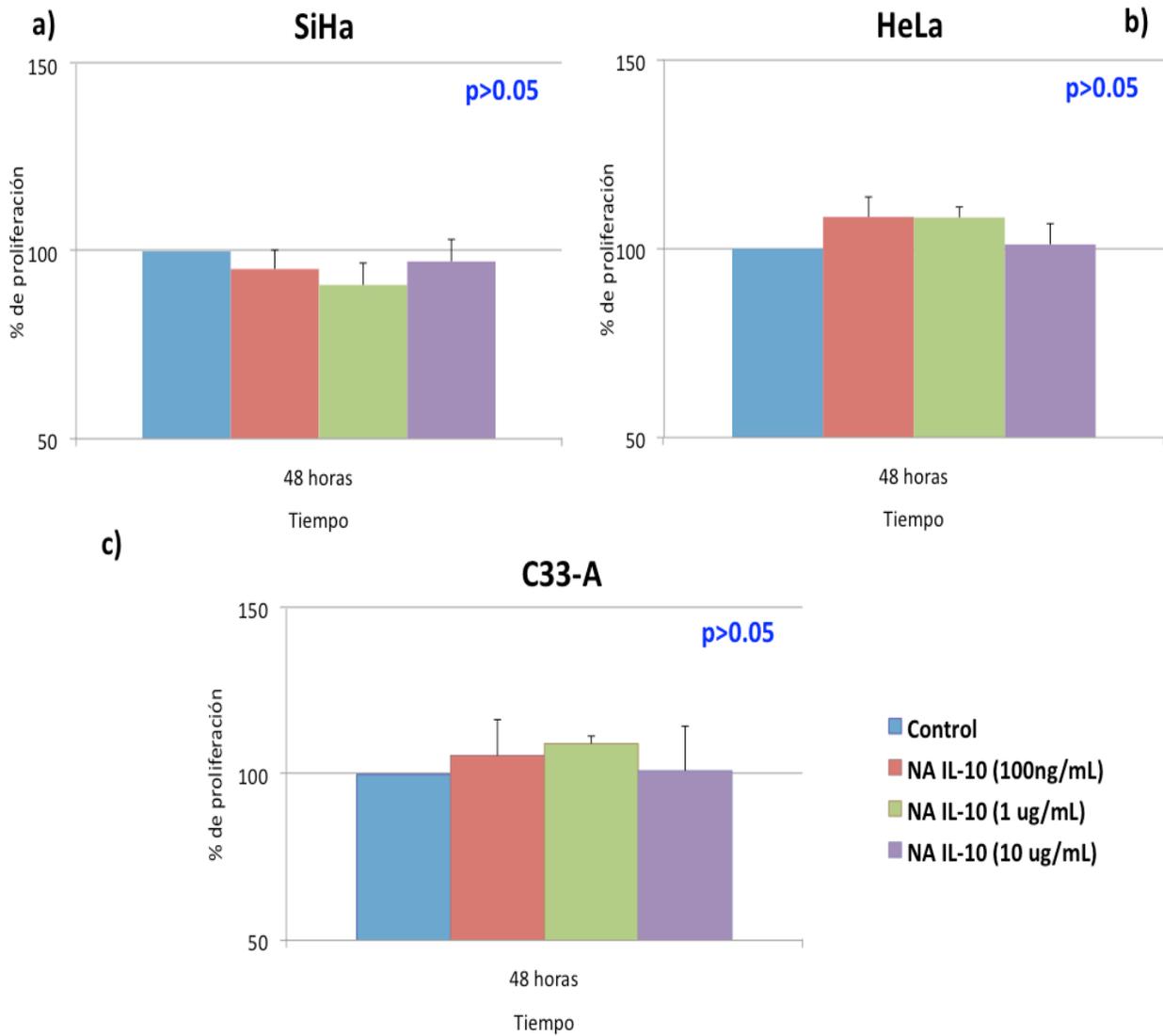


Figura 8. Proliferación de las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A en presencia de 100 ng/mL, 1 y 10 μ g/mL de anticuerpo neutralizante de IL-10 (NA IL-10), incubadas durante 48 horas. Diez mil (SiHa y C33-A) y siete mil quinientas (HeLa) células derivadas de CaCU, fueron cultivadas en presencia de tres diferentes concentraciones de NA IL-10 por triplicado, en el periodo de tiempo indicado. Los datos son expresados como medias \pm desviaciones estándar, $p > 0.05$. La gráfica es representativa de tres experimentos independientes.

6.4 Efecto de IL-10 sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16

Existe evidencia de que algunas células tumorales usan a IL-10 como un factor de crecimiento o supervivencia³⁴. Se ha propuesto que IL-10 como factor de crecimiento para células tumorales, puede inducir la proliferación celular de forma directa a través de la activación de su cascada de señalización e inducción de sus genes blanco que participan en el control del ciclo celular. Sin embargo, para células derivadas de CaCU Arany y cols., propusieron una forma indirecta de inducción de proliferación celular por parte de IL-10, a través de la activación de la transcripción del promotor temprano del virus del papiloma humano 16, e inducción de la expresión del oncogen viral E7³⁸, el cual induce la proliferación a través de la liberación del factor de transcripción E2F⁶.

Para determinar si rIL-10 induce la expresión de los oncogenes E6 y E7 en nuestro modelo, la expresión de estos oncogenes fue determinada por RT-PCR tiempo real, usando el método comparativo delta Ct. Se analizó la expresión de los oncogenes virales en la línea celular SiHa, cultivada en presencia 50 y 100 ng/mL de rIL-10 durante 24 horas. Se obtuvieron las eficiencias de amplificación para cada gen, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), E6 y E7 de VPH16, los cuales tuvieron una pendiente de -3.40, -3.45 y -3.43, con eficiencias de amplificación de 97%, 95%, 96% respectivamente, para cada ARNm amplificado (Fig. 9). Los niveles de expresión de los oncogenes E6 y E7 con cada concentración de rIL-10, fueron comparados con el control. Los resultados sugieren que IL-10 no incrementa los niveles de expresión del ARNm E7 de VPH 16 en la línea celular SiHa, $p > 0.05$ (Fig. 10a y b). Un efecto similar se observó en la expresión del ARNm E6 de VPH 16, $p > 0.05$ (Fig. 10c y d). Indirectamente, estos resultados nos confirman que IL-10 no tiene efecto sobre la proliferación en células derivadas de CaCU, debido a que no hay incremento en la expresión de los oncogenes E6 y E7, los cuales son inductores de proliferación celular.

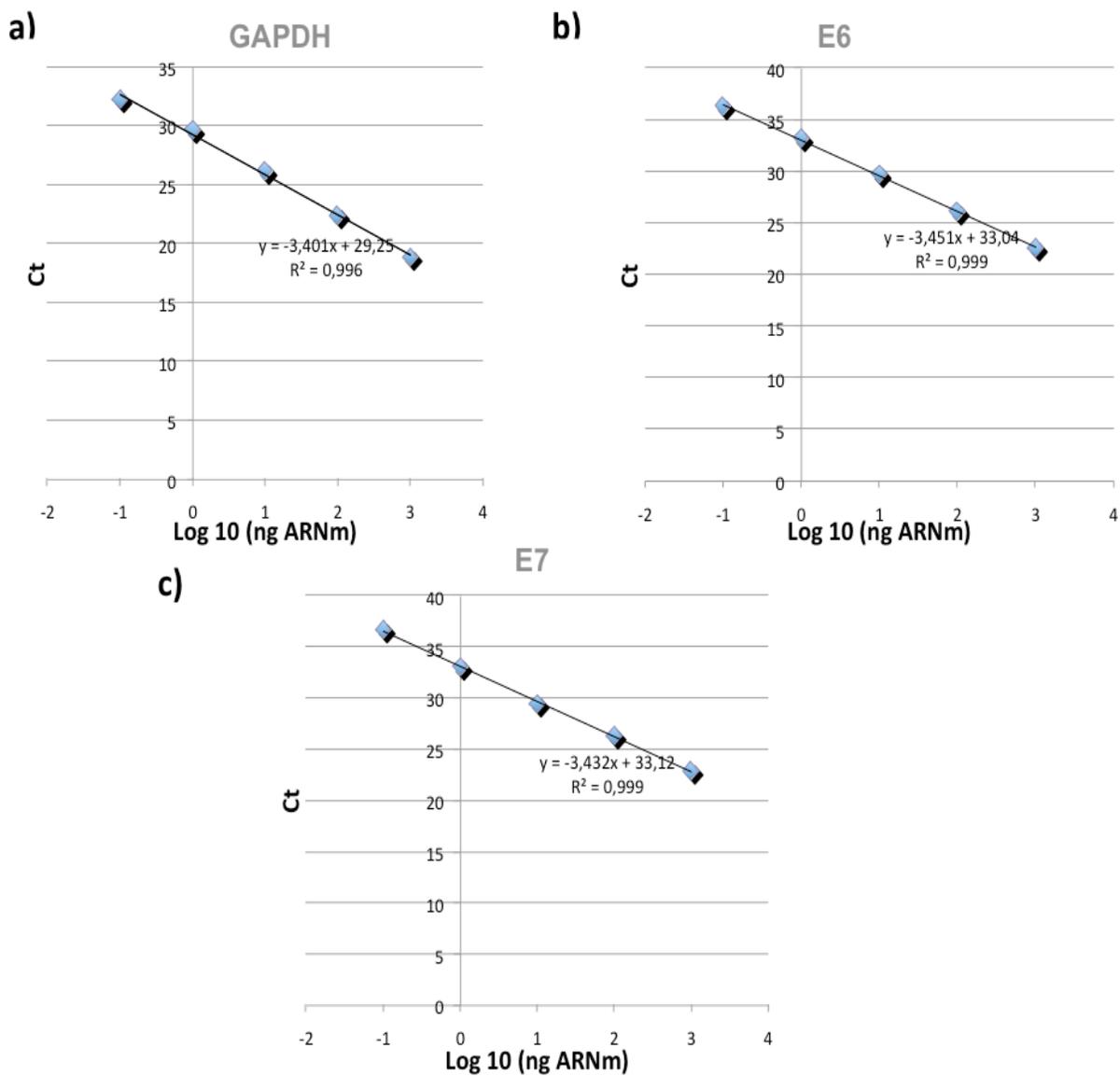
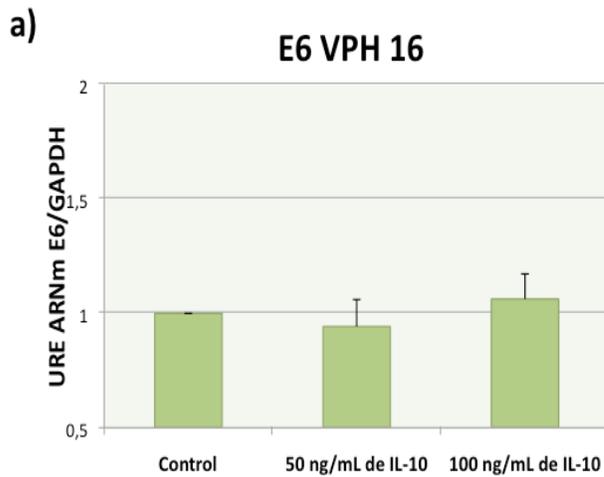
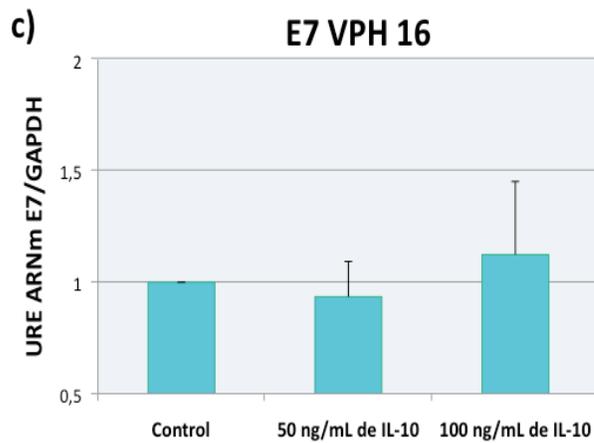


Figura 9. Graficas de eficiencias de amplificación para los ARNm **A)** GAPDH, **B)** E6 y **C)** E7 de VPH 16 para comparar y realizar el análisis de expresión.



b)

E6 VPH 16	Media	DS
50 ng/mL	0.942	0.118
100 ng/mL	1.062	0.110

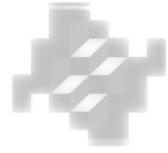


d)

E7 VPH 16	Media	DS
50 ng/mL	0.935	0.158
100 ng/mL	1.124	0.328

Figura 10. Efecto de IL-10 sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 en la línea celular SiHa, incubadas en presencia de 50 y 100 ng/mL de rIL-10 durante 24 horas. Los datos son expresados como medias \pm desviaciones estándar, $p > 0.05$. La grafica es representativa de tres experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN



Actualmente el CaCU es un grave problema de Salud Pública. Se ha establecido que la infección persistente por el VPH está asociada con el desarrollo del CaCU, ésta infección se ve favorecida por un estado de inmunosupresión local, que es explicado en parte por la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10.

Se ha relacionado la infección por el VPH con la expresión de niveles elevados de IL-10 en el cérvix y con el grado de lesiones cervicales^{31,39}. Además, se ha comprobado que la proteína E2 del VPH 16 es capaz de regular la expresión de IL-10 en células de CaCU, favoreciendo de este modo la generación de un ambiente de inmunosupresión local *in vivo*, que inhibe la activación de células que participan en la inmunidad anti-tumor y la consecuente evolución del cáncer. La inducción de IL-10 por parte de E2 de VPH favorece la evasión de la respuesta inmune por parte del virus³³.

IL-10 además de tener efectos inmunomoduladores, posee efectos no inmunes, los cuales promueven el crecimiento o sobrevivencia celular. Por ejemplo se ha demostrado que IL-10 induce la proliferación y diferenciación de células B humanas⁴⁰. Adicionalmente, existe evidencia de que algunas células tumorales son capaces de usar a IL-10 como un factor de crecimiento o sobrevivencia autocrino, promoviendo el crecimiento del tumor³⁴.

IL-10 ha demostrado que promueve la proliferación y/o sobrevivencia de un gran número de diferentes tipos de células tumorales incluyendo melanoma¹², tiroidoma⁴¹, mieloma³⁷ y de leucemia linfocítica crónica¹³.

Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de IL-10 sobre la proliferación de células transformadas por el VPH derivadas de CaCU, debido a que se ha observado que la expresión de IL-10 aumenta conforme aumenta el grado de lesión.

Para contestar esta pregunta, inicialmente se determinó la presencia del receptor de IL-10 en las líneas celulares SiHa, HeLa y C33-A, dado que la presencia del complejo receptor debe estar completo en la célula blanco para que IL-10 active su cascada de señalización. Los resultados revelaron que las tres líneas celulares expresan el ARNm correspondiente a las subunidades alfa y beta del receptor de IL-10, por RT-PCR punto final. Además, se identificó la presencia de la subunidad alfa del receptor de IL-10 en la superficie celular de HeLa (7.9%), SiHa (11.8%) y C33-A (17.8%) a través de citometría de flujo. Esto es similar a lo encontrado por el grupo de Yun Yue y col., en donde identificaron la presencia del receptor de IL-10 en cultivos celulares de melanoma humano que respondieron a IL-10. Ellos determinaron que únicamente las células que expresaban IL-10R respondían a IL-10¹². Existe evidencia de que algunas células pueden ser capaces de usar a IL-10 como un factor de crecimiento o sobrevida, como inhibidor de muerte celular por apoptosis⁴². Otros resultados al respecto publicados por Zeng y cols, identificaron la expresión constitutiva del ARNm de las subunidades alfa y beta del receptor de IL-10 por RT-PCR en tiempo real, en líneas celulares de carcinoma pulmonar de Lewis (LL2), las cuales presentaron resistencia a apoptosis inducida por IL-10³⁵. Con los resultados obtenidos se demuestra que las líneas celulares analizadas (SiHa, HeLa y C33-A) presentan el receptor de IL-10 en su superficie, lo que nos sugiere que las células pueden ser capaces de responder a IL-10.

En este trabajo, analizamos la proliferación de las células SiHa, HeLa y C33-A en presencia de diferentes concentraciones de rIL-10 (10, 100 y 200 ng/mL). Los resultados demostraron que IL-10 no afecta la proliferación en estas células *in vitro*, a pesar de la expresión de los receptores de IL-10. Estos resultados contrastan con los publicados en 1997 por Yun Yue y colaboradores, en los cuales la aplicación de diferentes concentraciones de rIL-10 (50, 100 y 500 U/mL) estimula y aumenta la proliferación de células derivadas de melanoma humano¹². En apoyo a los resultados de Yun Yue, García Hernández y cols, reportaron que la línea celular B16 de melanoma de ratón transfectada con un vector que expresa IL-10, crece más rápido que la línea celular no transfectada³⁴.

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los publicados por Zeng y cols, quienes encuentran que la aplicación de diferentes concentraciones de IL-10 (10-50 ng/mL), no afecta la proliferación en células derivadas de carcinoma pulmonar murino de Lewis a pesar de la expresión constitutiva de los receptores de IL-10³⁵. Estos resultados sugieren que IL-10 induce la proliferación de forma considerable en algunas células epiteliales (melanoma), pero induce la proliferación de manera discreta en las células epiteliales SiHa y HeLa (resultados estadísticamente no significativos). Sin embargo, el aumento moderado pero significativo de la proliferación que se observa en C33-A en presencia de 100 ng/mL de rIL-10, es consistente con la presencia del receptor en su superficie, ya que es la línea celular en la que se encontró mayor presencia del receptor. Datos publicados al respecto establecen que una mayor presencia del receptor de IL-10 se asocia con una mejor respuesta¹².

Posteriormente, identificamos la presencia de IL-10 solamente en el sobrenadante de las líneas celulares HeLa (4.78 pg/mL) y SiHa (2.73 pg/mL). Una explicación al nulo efecto de IL-10 sobre la proliferación de células derivadas de CaCU, podría ser que este efecto sólo requiera la presencia de la proteína IL-10 secretada por ellas mismas. Para responder esta pregunta se analizó la proliferación de las células SiHa, HeLa y C33-A, aplicando diferentes concentraciones de anticuerpo neutralizante contra IL-10. Contrario a los resultados obtenidos, otros trabajos reportaron que en concentraciones similares de NA IL-10, disminuye la proliferación en células de melanoma¹². García-Hernández y cols, también encontraron disminución en la proliferación en presencia del anticuerpo neutralizante³⁴, aún en concentraciones menores (3 µg/mL) a la mayor concentración (10 µg/mL) utilizada en este trabajo. Estos resultados demuestran que la inactivación biológica de IL-10 presente en el sobrenadante de las líneas celulares (SiHa y HeLa), no afecta la proliferación de las líneas celulares derivadas de CaCU. Sin embargo, cabe mencionar que en las líneas celulares de estos dos últimos trabajos, hay una mayor expresión de IL-10 basal en el sobrenadante de las líneas celulares de melanoma que oscilan entre 12 pg/mL - 95 pg/mL, concentración mayor a la encontrada en las células

analizadas en este trabajo. Esto indica que al haber una mayor expresión de la proteína en el sobrenadante de las líneas celulares, el efecto sobre la proliferación puede ser más evidente, por lo que al agregar el anticuerpo neutralizante para inhibir su actividad biológica, el resultado de la inhibición de la proliferación sería más clara.

El incremento en la proliferación celular por IL-10 puede darse al menos por dos formas, una es a través de la activación de su cascada de señalización e inducción de genes blanco, como los implicados en el control del ciclo celular (ciclinas e inhibidores de complejos ciclinas-cinasa). Otra forma es la propuesta por Arany y cols, a través de la activación de la transcripción del promotor temprano del virus del papiloma humano 16, y consecuente expresión del oncogén viral (E7) el cual induce la proliferación a través del factor de transcripción E2F³⁸. Para evaluar esta última propuesta se analizó el efecto de IL-10 sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH 16 en la línea celular SiHa. A diferencia de lo encontrado por Arany, nuestros resultados demuestran que IL-10 no afecta la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH 16, en presencia de dos diferentes concentraciones de rIL-10 (50 y 100 ng/mL). Arany reporta que IL-10 aumenta moderada pero significativamente la expresión del ARNm de E7, en las líneas celulares SiHa y Caski transformadas por el VPH 16, en presencia de 50 ng/mL de rIL-10 (Media 2.3 y 2.5, respectivamente); sin embargo, se observaron grandes variaciones entre los diferentes ensayos, (Desv. Std. 0.5 y 0.65, respectivamente), lo cual sugiere que hay una mayor variación biológica. Los resultados obtenidos en este trabajo no evidenciaron cambios estadísticamente significativos en la expresión del oncogén E7 en la línea celular SiHa, en las mismas concentraciones de rIL-10 utilizadas por Arany (Media 0.935 y 1.124, respectivamente), además de que la variación entre experimentos es menor que la de Arany (Desv. Std. 0.158 y 0.328, respectivamente), al usar el mismo método de análisis de expresión (método del Ct comparativo ó $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Además, se analizó la expresión del oncogén E6, y de forma similar al resultado obtenido con el oncogén E7, la expresión de E6 no se modificó en las mismas concentraciones antes mencionadas (Media 0.942 y 1.062, respectivamente), la

variación se observó nuevamente baja (Desv. Std. 0.118 y 0.110, respectivamente).

En conclusión, los resultados revelan que las líneas celulares derivadas de CaCU expresan el receptor de IL-10; sin embargo, aunque en este trabajo no comprobamos la funcionalidad del receptor, existen evidencias de que IL-10 activa su cascada de señalización en SiHa³⁸. Además comprobamos que bajo nuestras condiciones de trabajo, IL-10 no tiene efecto estadísticamente significativo sobre la proliferación de las líneas celulares SiHa y HeLa, así como no afecta la expresión de los oncogenes E6 y E7.

Cabe mencionar que los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales realizadas en cada trabajo, manipulación, reactivos, así como de las líneas celulares usadas, las cuales son líneas obtenidas de un stock común (ATCC), pero al presentar alteraciones en genes que participan en reparación del ADN, podrían presentar heterogeneidad en los diversos cultivos, lo que explicaría la variación de los resultados en los diferentes trabajos.

Con base en estos resultados, sugerimos posibles causas del efecto observado:

1) IL-10 es una citocina que tiene múltiples efectos biológicos²⁹. Con respecto a proliferación celular, IL-10 ha demostrado tener efectos diferentes en diversas células, por un lado promueve la proliferación en células B humanas⁴⁰, por otro lado inhibe la proliferación en macrófagos¹¹. Este aumento en la proliferación también se observa en células de melanoma. Sin embargo, en células derivadas de carcinoma pulmonar de Lewis no tiene efecto sobre la proliferación³⁵.

2) Existe evidencia de que en la estimulación de proliferación en respuesta a IL-10, los aminoácidos Y427 y Y477 presentes en la región intracelular del receptor de IL-10, deben sufrir fosforilación. Mutaciones en esas regiones específicas impiden este efecto⁴³. Se desconoce como se encuentra el receptor en las líneas celulares utilizadas; y si esas regiones específicas se encuentran sin mutaciones. Tomando en cuenta que las células usadas en este trabajo son células en constante proliferación y propensas a mutar, ésta podría ser una posible causa.

Sin embargo, se sugiere que estos resultados *in vitro* pueden no extrapolarse a procesos biológicos, es decir, los resultados obtenidos con las líneas celulares pueden no ser iguales a lo que podría ocurrir en procesos *in vivo*, debido a las diferencias en las características celulares, la presencia de la proteína natural o de otros factores que influyen en el microambiente tumoral.

Como resultado de nuestras limitaciones experimentales, proponemos otras estrategias para analizar este efecto, como la transfección de plásmidos que favorecen la expresión de IL-10 dentro de la célula de interés, que sea secretada al exterior con las modificaciones postraduccionales generadas por la propia célula e interactúe con su receptor específico y active su cascada de señalización³⁴.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

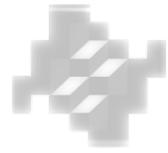


- Las líneas celulares SiHa y HeLa expresan el ARNm del receptor de IL-10.
- Las líneas celulares SiHa y HeLa expresan el IL-10R α en la superficie celular.
- IL-10 no tuvo efecto sobre la proliferación de las líneas celulares SiHa y HeLa.
- La inactivación biológica de IL-10 no tuvo efecto sobre la proliferación de las líneas celulares SiHa y HeLa.
- La expresión del ARNm de E6 y E7 de VPH 16 no se modificó en presencia de IL-10.

CONCLUSIÓN

IL-10 no tiene efecto estadísticamente significativo sobre la proliferación de las líneas celulares derivadas de CaCU transformadas por VPH-AR.

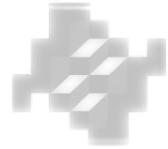
9. LIMITACIONES



- Las líneas celulares usadas en este trabajo son células en proceso proliferativo constante, propensas a cambios y mutaciones.
- Uso de una estrategia de aplicación de IL-10

PERSPECTIVAS

- Evaluar la funcionalidad de la cascada de señalización activada por IL-10 y la integridad de regiones en el receptor de IL-10 que participan en inducción de proliferación.
- En ensayos in vitro, plantear la transfección de plásmidos que expresen IL-10 de forma endógena y analizar el efecto sobre la proliferación.
- Evaluar el efecto de IL-10 sobre la apoptosis en líneas celulares transformadas por VPH
- Evaluar el efecto de IL-10 sobre la proliferación celular en un modelo experimental tumoral murino.
- Relacionar la presencia de IL-10 con la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 y 18 en biopsias de pacientes con lesiones de bajo grado.



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). Cáncer. Nota descriptiva No. 297. (Documento revisado el 7 de enero 2011), Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- ² Jemal A ,Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cáncer Statistics. *A Cáncer Journal for Clinicians* 2011;61:69–90.
- ³ WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cáncer. Human Papillomavirus and Related Cancers 2010; *Fact Sheet*.
- ⁴ Burk Robert et Al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 679-689.
- ⁵ Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis—Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2003: 20-28
- ⁶ Lopez A, Lizano M. Cáncer Cérvicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología 1* 2006: 31-55.
- ⁷ Benuto R E, Berumen J. Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología Revista Mexicana* 2009; 53(5):234-42.
- ⁸ Hu Bernard et Al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401: 70-9.
- ⁹ Torres KJ, Peralta O, Bermúdez VH, Madrid V. Suppressive immune response in cervical cancer patients. *Clinical & Developmental Immunology* 2011. (En revisión)
- ¹⁰ Alcocer JM et Al. In Vivo Expression of Immunosuppressive Cytokines in Human Papillomavirus-Transformed Cervical Cancer Cells. *Viral Immunology* 2006; 481-491.
- ¹¹ O'farrell AM, Lui Y, Moore K, Mui A. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal* 1998; 1006-1018.
- ¹² Yun F et Al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-I molecules. *International Journal of Cáncer* 1997; 71: 630-637.

-
- ¹³ Chong S, Lin Y, Czarneski J, Zhang M, Coffman F, Kashanchi, Raveche E. Cell cycle effects of IL-10 on malignant B-1 cells. *Genes and Immunity* 2001; 2, 239-247.
- ¹⁴ Lewis M. Análisis de la situación del Cáncer cervicouterino. *Organización Panamericana de la Salud* 2004.
- ¹⁵ Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta cytologic* 1976; 6: 505-9.
- ¹⁶ Muñoz N, et Al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cáncer. *The New England Journal of Medicine* 2003; 518-527.
- ¹⁷ Baseman J, Koutsky L. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* 2004; S16-S24.
- ¹⁸ Roden R, Kirnbauer R, Jenson A, Lowy D, Schiller J. Interaction of Papillomaviruses with the Cell Surface. *Journal of virology* 1994; 7260-7266.
- ¹⁹ Giroglou, T, Florin L, Schäfer F, Streeck R, Sapp M. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology* 2001; 1565-1570.
- ²⁰ Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS journal* 2009; 7206-7216.
- ²¹ Lizano M, Carrillo A, Contreras A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología 4* 2009: 205-216.
- ²² Rivera, Z, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larraín A. Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 2006; 135-140.
- ²³ Betancour L, Ossa J. Asociación molecular entre los papilomavirus y el cáncer de cérvix. *IATREIA* 1996; 177 – 183.
- ²⁴ Gariglio P, Genes implicados en el desarrollo del cáncer cervicouterino en etapas múltiples. *Mensaje Bioquímico, Vol XXI* 2007; 92-111.
- ²⁵ Woodworth C. HPV innate immunity. *Frontiers in Bioscience* 2002; 2058-2071.
- ²⁶ Tindle R. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cáncer. *Nature Reviews* 2002; 2: 1-7.

-
- ²⁷ Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 2010; 170-181.
- ²⁸ Vinuselvi, P, AbiramiVeena R, Vani V, Sanjay P. YING YANG Effect of IL-10 in the incidente of Cervical Cáncer. *Advanced Biotech* 2008; 26-29.
- ²⁹ Moore K, Waal R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin 10 and the Interleukin 10 Receptor. *Annual Reviews Immunology* 2001; 683-765.
- ³⁰ Yoon S et Al. Structure and Mechanism of Receptor Sharing by the IL-10R2 Common chain. *Cell Press* 2010; 638-348.
- ³¹ Bermúdez VH. et Al. Correlation Between IL-10 Gene Expression and HPV Infection in Cervical Cancer: A Mechanism for Immune Response Escape. *Cáncer Investigation* 2008; 26: 1037- 1043.
- ³² Peralta O, Bermúdez VH, Gutiérrez L, Alcocer J, Recillas F, Madrid V. E6 y E7 Oncoproteins from Human Papillomavirus Type 16 Induce Activation of Human Transforming Growth Factor β 1 Promoter throughout Sp1 Recognition Sequence. *Viral Immunology* 2006; 468-480.
- ³³ Bermúdez VH, Peralta O, Alcocer JM, Moreno J, Madrid V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cáncer cells. *Molecular Medicine Reports* 2011; 369-375.
- ³⁴ García M, Hernández R, Gariglio P, Berumen J. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* 2002; 105: 231-243
- ³⁵ Zeng L, O'Connor C, Zhang J, Kaplan A, Cohen D. IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines. *Cytokine* 2010; 49: 294-302.
- ³⁶ Lodish B et Al. Molecular cell biology. Sixth Edition 2008. Cap. 21.
- ³⁷ Lu ZY et Al. Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Journal of the American Society of Hematology* 1995; 85: 2521-2527.
- ³⁸ Arany I, Kenneth G. Grattendick, Stephen K. Tying. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5- segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Research* 2002; 331-339

³⁹ Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Cruz M, Martínez-Nava GA, Bahena-Román M, Ortiz-Flores E, Ramírez-González A, López-Estrada G, Delgado-Romero K, Madrid-Marina V. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Infect Agent Cancer* 2012; 7(1):32.

⁴⁰ Itoh K and Hirohata S. The Role of IL-10 in Human B Cell Activation, Proliferation, and Differentiation. *The Journal of Immunology* 1995; 4341-4350.

⁴¹ Todaro M et Al. Autocrine Production of Interleukin-4 and Interleukin-10 Is Required for Survival and Growth of Thyroid Cancer Cells. *Cáncer Research* 2006; 1491-1499

⁴² Taga K et Al. Interleukin-10 inhibits apoptotic cell death in infectious mononucleosis T cells. *The Journal of Clinical Investigation* 1994; 251-260.

⁴³ Ho A, Sherry H, Alice L, Miyajima A and Moore K. Functional Regions of the Mouse Interleukin-10 Receptor Cytoplasmic Domain. *Molecular and Cellular Biology* 1995; 5043-5053.