

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

**PARTICIPACIÓN DEL IRS-1 E IRS-2 EN LA CASCADA DE
SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE IL-10 Y SUS EFECTOS EN
LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HeLa.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

P R E S E N T A

QBP DAVID MARTÍNEZ PASTOR

COMITÉ DE TESIS:

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO

ASESORES:

DRA. CINTHYA E. DÍAZ BENÍTEZ

DRA. MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL

DR. VÍCTOR H. BERMÚDEZ MORALES

DRA. MARÍA DE LOURDES RODRÍGUEZ FRAGOSO (UAEM)

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2014



Este trabajo es parte del proyecto “Análisis molecular de participación del adaptador de señalización de proteínas IRS-1 e IRS-2 en la progresión del cáncer cervico-uterino ”.



Además, agradezco el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el sistema de becas de posgrado con número de becario 423659.

ABREVIATURAS

CaCu	Cancer Cérvicouterino
AKT	Proteína Quinasa B
BSA	Proteína Albúmina Sérica Bovina
cDNA	Acido Desoxiribonucleico Complementario
DEPC	Dietil Piro Carbonato
DNA	Acido Desoxiribonucleico
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Receptor de Estrógeno
ERK	MAP Quinasa
FAK	Quinasa de Adhesión Focal
HCL	Acido Clorhídrico
HRP	Peroxidasa de Rábano
HSIL	Lesiones Intraepiteliales Escamosas Alto Grado
IGR-1R	Receptor De Crecimiento Parecido a Insulina
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de Interleucina 10
INF- γ	Interferón γ
IR	Receptor de Insulina
IRS1	Sustrato 1 del Receptor de Insulina
IRS2	Sustrato 2 del Receptor de Insulina
JAK	Janus Quinasa
KRLB	Dominio de Unión del "loop" Regulatorio de Cinasa
LCR	Región Larga de Control
LSIL	Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio MTT
NIC	Neoplasia Intraepitelial Crvical
ORF	Marco de Lectura Abierto
PBS	Solución de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

PH	Dominio Homología con Plecktrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3'cinasa
pRb	Proteína de Retinoblastoma
PTB	Dominio de unión a Fosfotirosina
RIPA	Buffer Radio-Immunoprecipitation Assay
RKT	Receptores Tirosina Quinasas
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcriptasa Reversa
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
SH2	Dominio de Homología con src-2
STAT	Señal del Transductor y Activador de la Transcripción
Sv40	Simian virus 40
TBS	Solución Tris-Base
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral
TyK2	Tirosina Quinasa 2
VPH	Virus de Papiloma Humano

RESUMEN

Las células tumorales desarrollan mecanismos de evasión de la respuesta inmune. En el caso del cáncer cérvicouterino (CaCu), se ha demostrado que la interleucina 10 (IL-10), que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, aumenta su expresión conforme avanza la enfermedad. IL-10 ejerce su función a través de su receptor (IL-10R) activando la vía de señalización IL-10R/Jak1/Tyk2/Stat-3 en células del sistema inmune. IL-10R también está presente en células epidermales y en células cancerosas, incluyendo algunas derivadas de CaCu, pero se desconoce si tiene alguna actividad en este tipo de células; sin embargo se sabe que participa en la supervivencia y proliferación de células mieloide a través de la activación de la vía activa Jak1/IRS2/ PI3K/Akt, incrementando la actividad antiapoptótica de ERK 1/2. La sobreexpresión de IRS1 e IRS2 están asociados al desarrollo de diferentes tipos de cáncer, debido a su papel sobre diferentes procesos celulares como motilidad, sobrevivencia y proliferación, así como con un pronóstico clínico negativo. **Objetivo:** Investigar la participación de IRS-1 e IRS-2 en la vía de señalización del IL-10R y su papel en la proliferación de células HeLa (VPH18⁺). **Metodología:** La expresión del mRNA de IRS-1, IRS-2 e IL10R en las líneas celulares HeLa, C33-A (VPH⁻) y MCF-7 (cáncer de mama) se midió por RT-PCR punto final. Los cambios en la proliferación celular ante el estímulo de IL-10 se evaluaron por MTT. La expresión y/o fosforilación de las proteínas, IRS-1, IRS-2, JAK1, TyK2, AKT1, ERK1/2 en las células estimuladas con IL-10 se analizó por Western Blot. Los cambios en la proliferación celular fueron representados como medias $\pm$ SD (desviación estándar). **Resultados:** El estímulo con 50 mg/ml de IL-10 ejerce un efecto inhibitorio de la proliferación de las células HeLa y C33A a las 48 hs de cultivo. Las células HeLa expresan mayormente IRS2 que IRS1. El estímulo con IL10 (50 mg/ml) no modifica la expresión de IRS1 pero si incrementó la expresión de IRS2 y la fosforilación de TyK2 y AKT de manera temporal. **Conclusiones:** IL10 es una citosina que además de su efecto inmunomodulador, puede activar diversas vías de señalización en las células HeLa, además de disminuir la proliferación celular.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO (CACU).	8
1.2. ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES EN CÉRVIX.....	9
1.3. FACTORES DE RIESGO PARA CACU.	9
1.4. GENERALIDADES DEL VPH.	10
1.5. CICLO VIRAL Y DESARROLLO DE CACU.	11
1.6. IMPLICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CACU.	13
1.7. CITOCINAS.	13
1.8. INTERLEUCINA 10 (IL-10).	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. IL-10 Y CÁNCER CERVICOUTERINO.	15
2.2. IRS-1 E IRS-2 Y VÍAS DE ACTIVACIÓN.	16
2.3. IRS Y CÁNCER.	19
5. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO GENERAL	22
6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MAPA CONCEPTUAL	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	24
7.1 CULTIVOS CELULARES.	24
7.2. ESTIMULACIÓN CON RIL10.....	24
7.3 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RNAM DE IRS-1, IRS-2 E IL-10R.....	24
7.3.1. Extracción y cuantificación de RNA total.	24
7.3.2. Tratamiento con DNAsa I.....	25
7.3.3 Transcripción reversa (RT)	25
7.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
7.3.5. Separación de los fragmentos en geles de agarosa.....	27
7.4 ENSAYOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	27
7.4.1. Medición indirecta de proliferación celular por MTT.	27
7.4.2. Curva Dosis-Respuesta a diferentes concentraciones de IL-10, en presencia ó ausencia de SBF. .	28
7.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE IL-10R, IRS-1, IRS-2, JAK1, PI3K/AKT, ERK1/2.....	28
7.5.1. Extracción de proteínas.....	28
7.4.2. Cuantificación de proteínas totales.....	28
7.4.3. Electroforesis de proteínas en geles poliacrilamida.	29
7.5.4. Western Blot	30
7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	31
8. RESULTADOS.....	32

9. DISCUSION	43
10. CONCLUSIONES.	47
11. PERSPECTIVAS.....	48
12. ASPECTOS ÉTICOS.	48
13. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD.	48
14. REFERENCIAS.....	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del Cáncer Cervicouterino (CaCu).

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es la tercera neoplasia con mayor incidencia y la cuarta causa de muerte por cáncer de mujeres en el mundo; representando el 8.8% (530,232) del total de nuevos casos y el 8.2% (275,008) del total de las muertes por cáncer en el 2008. Más del 85% de estos casos y muertes se producen en los países en desarrollo^{1,2} y es la causa más importante de años de vida perdidos entre las mujeres de América Latina y el Caribe, donde se concentra el 13% de los casos y 12% de las muertes anuales en el mundo.³

En México durante el 2008, el CaCu fue registrado como el segundo cáncer más frecuente en mujeres, reportándose una incidencia de 10,186 de casos nuevos y ocupando la segunda causa de muerte por tumor maligno (5,061 defunciones) en ellas (fig.1); ^{2,4} lo que representó más de tres veces la tasa de mortalidad que fue reportada en los Estados Unidos por esa misma enfermedad durante ese año.^{5,6}

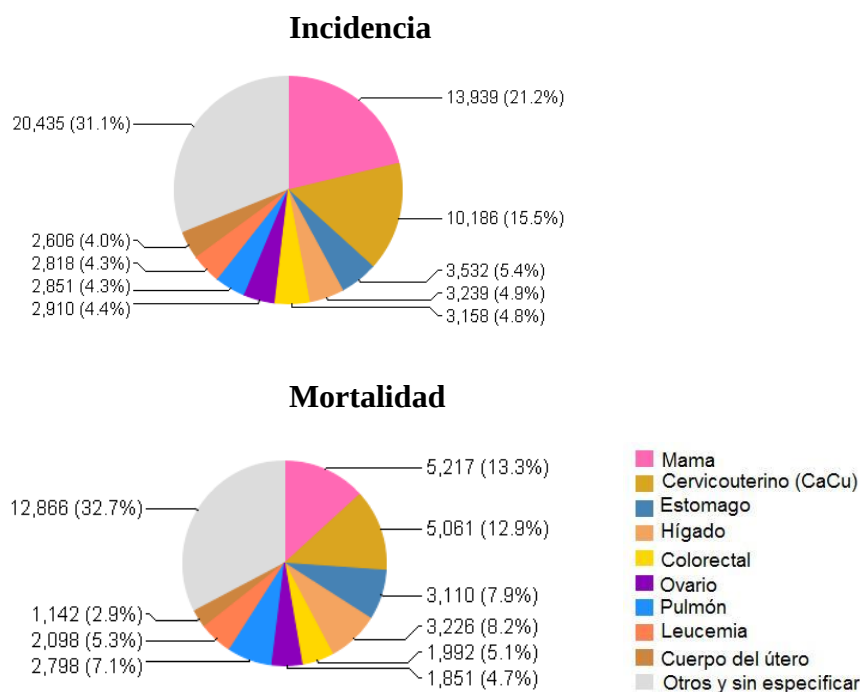


Fig. 1. Incidencia y

mortalidad por cáncer en mujeres en México. GLOBOCAN 2008 (IARC) Sección de Información sobre el Cáncer (07/10/2013).

1.2. Origen y clasificación de las lesiones en cérvix.

El cáncer es un desorden hiperproliferativo que involucra transformación de la morfología celular, desregulación de la apoptosis, proliferación celular descontrolada, invasión, angiogénesis y metástasis.⁷ El CaCu se origina en las células que cubren el cuello uterino.⁸ La unión celular escamosa-cilíndrica es una zona de transición activa conocida como la “zona de transformación” (ZT), que es el sitio de origen de la mayoría de las displasias cervicales (lesiones premalignas) que anteceden al cáncer invasor del cuello uterino.^{9,10}

Los tipos de lesión que se presentan en el cuello uterino se clasifican de acuerdo al estudio citológico, patológico, colposcópico. Sin embargo, el Sistema Bethesda,¹¹ clasifica a las lesiones premalignas como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) y alto grado (HSIL). Las LSIL incluyen a la displasia leve y Neoplasia Intraepitelial Cervical Grado 1 (NIC 1). En las HSIL se consideran la displasia moderada y severa, los NIC 2 y 3 así como el carcinoma *in situ*; además se pueden identificar las células escamosas atípicas de significado no determinado (ASC-US), o que no se pueden excluir de lesiones de alto grado (ASC-H)¹⁰.

1.3. Factores de riesgo para CaCu.

Diversos estudios han identificado a los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo como la causa principal del CaCu.¹² Sin embargo, la infección por el VPH oncogénico es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCu, ya que existen otros factores de riesgo asociados a esta patología.^{13,14} Algunos de estos factores asociados con la infección con el VPH incluyen una serie de variables relacionadas con el comportamiento sexual tales como el número de parejas sexuales a lo largo de su vida, inicio de actividad sexual a una edad temprana, múltiples parejas sexuales del conyugue; carencia del uso del condón, mala higiene genital y falta de la circuncisión masculina. Existen factores asociados con la progresión de las lesiones tales como: uso de anticonceptivos orales,¹⁵ multiparidad, exposición a carcinógenos como el tabaco y factores dietéticos¹³. Otros factores asociados con este cáncer son las infecciones de transmisión sexual como la del virus del herpes simple 2 (VHS-2), *Chlamydia trachomatis*, y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además, existen factores relacionados con la

respuesta inmune del huésped y las propiedades del VPH tales como genotipo, múltiples infecciones con VPH, variantes, carga viral, y la integración del DNA.^{10,13,16}

1.4. Generalidades del VPH.

Los VPH son pequeños virus sin envoltura que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*.¹⁷ Están formados por una cápside icosaédrica de 55 nm de diámetro compuesta por dos proteínas estructurales; la proteína mayor L1 y la proteína menor L2.¹⁸ Esta cápside contiene DNA circular de doble cadena con aproximadamente 8,000 pares de bases (fig. 2),^{18,19} el cual contiene una región larga de control (LCR) y 8 marcos de lectura abiertos (ORFs) tempranos codifican para las proteínas (E1, E2, E4, E5, E6, E7) y 2 ORFs tardíos para las proteínas L1 y L2.^{18,20}

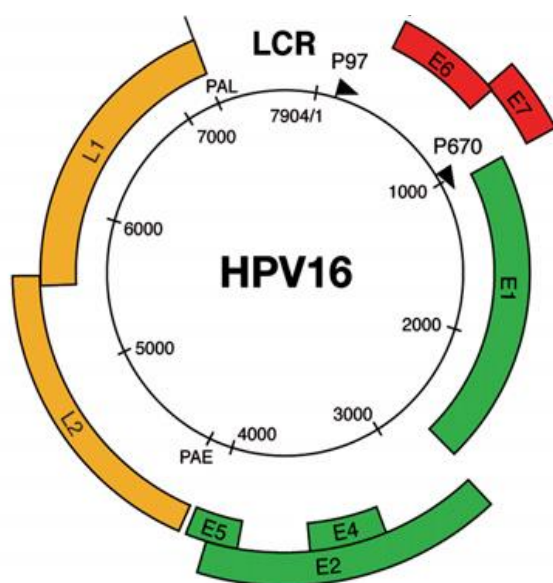


Fig. 2. Organización genómica del HPV-16. El genoma del HPV-16 de 7904pb, de doble cadena circular se muestra en un círculo negro. Los números indican la posición de nucleótidos. Los ORFs tempranos E1, E2, E4 y E5 (en verde), E6 y E7 (en rojo) son expresados a partir del promotor p97 o p670 en diferentes etapas durante la diferenciación de células epiteliales. Los ORFs tardíos L1 y L2 (en amarillo) son expresados por el promotor p670, después de un cambio en los patrones de corte y empalme, y un cambio en el sitio de poliadenilación, del sitio de poliadenilación temprana (PAE) al sitio de poliadenilación tardía (PAL). (Modificado de Doorbar, 2006. *Clinical Science*. 110(5): 525-41).¹⁸

Los VPH infectan tejidos epiteliales cutáneos y de mucosas.²⁰ Existen más de 200 tipos de VPH¹⁷. Los tipos de alto riesgo cuyo DNA se encuentra en casi todos los cánceres cervicales (99,7%),^{21,22} incluyen al VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 82. Los de bajo riesgo comprenden al VPH-6, 11, 40, 42 – 44, 54, 61, 72, 81 y se han relacionado con la producción de verrugas benignas.^{19,20}

1.5. Ciclo viral y desarrollo de CaCu.

Los VPH genitales invaden el cuello uterino al infectar células basales posiblemente expuestas por abrasiones menores.²³ La infección transitoria con este virus no genera anomalías microscópicas en el epitelio.²⁴ Diferentes estudios realizados en mujeres han estimado el tiempo promedio de la duración y eliminación de los episodios individuales de infecciones con VPH (genitales), observando que el tiempo necesario para eliminar las infecciones por VPH de alto riesgo como el tipo 16 es entre 8 y 16 meses. Considerablemente más largo que el reportado para los VPH de bajo riesgo²⁵. Las mujeres con infección persistente tienen una mayor probabilidad de progresión a neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC 2/3) y carcinoma invasor.²⁶

La infección por el VPH conduce al establecimiento de su genoma como un episoma estable (sin integración al genoma celular) en las células de la capa basal.^{18,27} Los primeros genes virales en ser expresados son los factores de replicación E1 y E2 que forman un complejo que se une al origen de replicación y que ayuda a reclutar las polimerasas celulares y proteínas accesorias que median la replicación del DNA³⁴. E2 también puede actuar como un factor de transcripción y puede controlar la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. La expresión de los genes virales E5, E6 y E7 da como resultado una mayor proliferación de las células infectadas. Mientras que la función de E4 en el proceso de replicación no está bien entendida, sin embargo, se ha propuesto que esta proteína puede estar involucrada en la regulación de funciones finales del virus.^{18,34}.

Durante la división de las células basales infectadas, los genomas virales son repartidos en las células hijas. Una de ellas migra a la capa parabasal y se somete a la diferenciación, mientras que la otra continua dividiéndose, permitiendo la expansión lateral de la células infectadas. De manera normal, en las células no infectadas la diferenciación permite la salida del ciclo celular, sin embargo, en las células infectadas el ciclo celular permanece activo, debido a la acción de E7. En las capas parabasales existe un aumento en la replicación del genoma viral, mientras que se inicia la expresión de las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales se autoensamblan espontáneamente en cápsides icosaedricas conteniendo el genoma viral. Las partículas virales maduras son liberadas de

las capas superiores de la epidermis o la mucosa, cuando las células diferenciadas se desprenden al final de su vida útil.^{15,28,19,29}

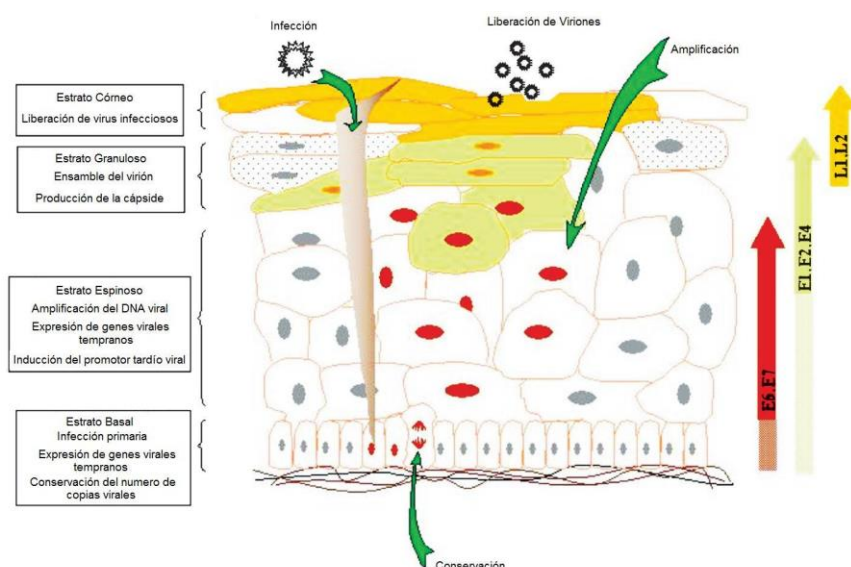


Fig. 3. Ciclo del HPV. Se muestra la expresión coordinada de las diferentes proteínas virales durante el curso de una infección productiva. (Modificado de Grm HS et al, 2009. *Indian J Med Res.* 130(3):277-85).³⁰

Durante el desarrollo del cáncer, el DNA viral se integra al genoma de la célula huésped. Esto ocurre por a la ruptura del marco de lectura abierto de E2, interrumpiendo marcos de lecturas adyacentes (E4, E5 y parte de la L2).³¹ De esta manera, la proteína E2 (represor transcripcional de los genes E6 y E7) deja de expresarse, y se expresan los oncogenes E6 y E7. Estas dos proteínas estimulan la progresión del ciclo celular a través de la transición G1/S a pesar de la presencia de varias señales de arresto en G1. E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 y a ciertas proteínas pro-apoptóticas como Bak, FADD, procaspasa-8 o c-Myc, conduciendo a su degradación mediante un mecanismo ubiquitina dependiente, que afecta la apoptosis de la célula infectada.³² E7 se asocia con pRb (proteína de retinoblastoma) e interrumpe la asociación entre pRb y los factores de transcripción de E2F, independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos. E7 también se asocia con otras proteínas involucradas en proliferación celular, incluidas histonas desacetilasas, componentes del complejo de transcripción AP1 y a los inhibidores de la

ciclinas dependientes de cinasas p21 y p27.¹⁸ Así, las oncoproteínas E6 y E7 son necesarias para mantener el fenotipo transformante³³.

1.6. Implicación de la respuesta inmune en CaCu.

La respuesta inmune es de importancia crítica en determinar la progresión o regresión de las NIC asociadas a la infección con VPH. Después de la infección, el hospedero monta una respuesta inmune celular específica para el virus, que en muchos casos permite la regresión. Así, los hospederos inmunosuprimidos tienen un incremento significativo en la prevalencia de infecciones con VPH. Por lo tanto, una respuesta inmune anormal puede permitir la persistencia de infecciones con progresión a NIC o inclusive hasta CaCu.^{26,34}

1.7. Citocinas.

Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, pero principalmente las producen los linfocitos T CD4+. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, que pueden secretarse o permanecer unidas a la membrana celular. Para realizar su función biológica se requieren en concentraciones de muy bajas (nanogramos a picogramos). Las citocinas actúan de manera autocrina al modular la actividad celular, o de manera paracrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune.³⁵ Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos como: estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación. En este contexto, las citocinas estimulan la respuesta del huésped al controlar el estrés y la homeostasis celular.^{36,37}

Hay dos mecanismos que pueden explicar la participación de éstas citocinas en el desarrollo del cáncer. Uno de ellos es favoreciendo el crecimiento del tumor al funcionar con factores de crecimiento; promoviendo la metástasis y/o aumentando la angiogénesis del tumor. El otro mecanismo es que estas moléculas estén actuando como mediadores de la respuesta inmune inhibiendo los mecanismos mediados por células que permiten la identificación y la destrucción de las células cancerosas.³⁸

Los linfocitos T CD4⁺ generan principalmente dos patrones de citocinas, las citocinas de tipo Th1, tales como: interferón γ (INF- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 2 (IL-2) e IL-12, las cuales inducen inmunidad mediada por células T y tienen una actividad proinflamatoria; y las citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10), las cuales son inmunoinhibitorias de la respuesta inmune mediada por células y de los procesos inflamatorios, predominantemente inducen inmunidad humoral.^{39,40,41}

1.8. Interleucina 10 (IL-10).

IL-10 es una proteína de 178 aminoácidos con un peso aproximado de 18 kDa, con una potente actividad antiinflamatoria e inmunosupresora, y clave en la regulación del sistema inmune.^{42,43} En el ser humano, el gen de IL-10 abarca cerca de 4.7 kb en el cromosoma 1q21-32 y contiene cinco exones que están separados por 4 intrones.⁴³

Además de los linfocitos CD4⁺, esta citocina puede ser secretada por algunos subconjuntos de linfocitos T regulatorios (células Th1, Tr1 Th17), células T CD8⁺, monocitos, macrófagos, células dendríticas entre otras células de la respuesta inmune;⁴² sin embargo esta citocina también es producida por queratinocitos, células epiteliales y células tumorales de linfoma, carcinoma de ovario, melanoma, linfoma/ mieloma,^{42,44,45} cáncer de mama⁴⁶ y cervicouterino.⁴⁷

Esta citocina ejerce su acción al unirse a su receptor (IL-10R) localizado en la membrana de las células. Es un complejo tetramérico compuesto de dos subunidades que unen al ligando (IL-10R α e IL-10R1) y dos subunidades de señalización accesorias (IL-10 β e IL-10R2). IL-10R1 es una proteína de 578 aminoácidos, con un peso molecular de 90-120 kDa. En el ser humano, el gen que codifica para esta proteína se encuentra localizado en el cromosoma 11q23.3. IL-10R2 es una proteína de 325 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 40 kDa y el gen que codifica para esta proteína se encuentra situado en el cromosoma 13q34.1.⁴² Se ha demostrado que la mayoría de las células hematopoyéticas, fibroblastos y células epiteliales expresan ambos receptores de IL-10.^{43,48,49}

IL-10 fue originalmente caracterizada por su habilidad para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, mediante la activación de cascadas de señalización que

involucran las moléculas Janus quinasa (JAK)/ Señal del Transductor y Activador de la Transcripción (STAT). Al unirse IL-10 a su receptor, Jak1 y Tyk2 (constitutivamente asociados con IL-10R1 e IL-10R2, respectivamente), son fosforilados en tirosinas. El complejo IL10R/Jak1/Tyk2 fosforilado sirve como un sitio de acoplamiento para el factor de transcripción Stat-1 y Stat-3. Estos factores de transcripción son fosforilados y pueden unirse formando homodímeros o heterodímeros, translocándose al núcleo para ayudar a la expresión de genes relacionados con la inhibición de citocinas proinflamatorias.^{42,43} Sin embargo, ahora se reconoce que IL-10 también puede regular el crecimiento y el desarrollo de una gran variedad de células. Por ejemplo, esta citocina puede promover por un lado, la muerte de algunas células inflamatorias (incluyendo macrófagos activados, neutrófilos y células T).^{50,51} ó puede incrementar la supervivencia de algunos tipos de células cancerosas en el humano, como linfoma de Burkitt. Además, diversos estudios le han conferido a IL-10 propiedades antiapoptóticas, ya que incrementa la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2^{52,53} y Bcl-x_L.⁵⁴ Estos hallazgos sugieren que aún cuando IL-10 puede promover la muerte de células inflamatorias activadas, también proporciona una señal de supervivencia para ciertas células no activadas, como en el caso de las células promieloides.⁴⁴

2. ANTECEDENTES

2.1. IL-10 y cáncer cervicouterino.

Diversos estudios clínicos y epidemiológicos han establecido una fuerte asociación entre infecciones crónicas, procesos inflamatorios y el desarrollo de cáncer.^{42,43,55,56,57} Así, la persistencia del VPH puede desencadenar un proceso inflamatorio que favorezca el desarrollo del CaCu, en el que IL-10 participe como proteína reguladora de la inflamación o apoptosis. En pacientes con esta enfermedad se han encontrado niveles séricos elevados de IL-10 y de IL-4.^{58,59,60,61} A nivel local, también se ha observado una mayor expresión de IL-10 en el tejido cervical con lesión premaligna o cáncer;^{47,62} así como en algunas líneas celulares como HeLa y SiHa.⁴⁷ En éstas últimas se ha demostrado la expresión del RNAm del receptor de IL-10 (IL-10R) a nivel de la membrana, el cual mantiene su capacidad para responder al estímulo con la propia citocina.^{63,64} sugiriendo que el efectos biológico de IL-

10 en esta neoplasia no está relacionada exclusivamente con el sistema inmune, sino que también puede estar ejerciendo un efecto directo sobre la misma célula tumoral.

A la fecha no hay estudios en este tipo de cáncer que apoyen esta última hipótesis; sin embargo se ha demostrado que IL-10 en concentraciones mínimas es capaz de inhibir la apoptosis de células promieloides, cuando son privadas de factores de crecimiento. Esta actividad antiapoptótica en estas células fue se lleva a cabo por la activación de la vías TyK2/STAT-3 y JAK1/**IRS-2**/PI3K/AKT, las cuales se sabe desencadenan una serie de señales de supervivencia y de protección contra la apoptosis favoreciendo su proliferación.⁴⁴

Diversos estudios han establecido que Jak1, (requerido para la actividad biológica de IL-10) tiene la capacidad de fosforilar las moléculas adaptadoras conocidas como Sustrato de Receptor de Insulina-1(IRS-1),⁶⁵ e IRS-2.^{44,66} Estas moléculas que contienen sitios de fosfotirosina, reclutan a su vez la subunidad regulatoria p85 de la fosfatidilinositol 3' cinasa (PI3k) a la membrana plasmática mediante la unión a sus dos dominios SH2, lo cual conduce a la activación de enzimas de supervivencia tales como Akt. De esta manera se deduce que las IRS participan en el proceso de proliferación celular -mediado por IL-10- a través de la activación de PI3k.⁴⁴

Este mismo mecanismo de activación de las IRS's es utilizado por la IL-4 y el IFN- α , a través de la activación de Jak, el cual estimula la fosforilación de las tirosinas de las IRS's, sugiriendo que tal vez estas citocinas estén jugando un papel en la supervivencia y protección contra la apoptosis celular.⁶⁵

2.2. IRS-1 e IRS-2 y vías de activación.

Las IRS pertenecen a una familia de proteínas de seis integrantes. En el humano, IRS-1 e IRS-2 están ampliamente expresadas en los tejidos, incluyendo cerebro, musculo, hígado, corazón, adipocitos, riñón, ovario y glándula mamaria.^{67,68} IRS-1 es codificada por un exón localizado en el cromosoma humano 2q36-37. La proteína contiene 1243 residuos de aminoácidos y tiene un peso aproximado de 132kDa, pero debido a la fosforilación de serinas, ésta migra en geles de poliacrilamida-SDS con un peso molecular aparente de 185

kDa. IRS-2 es codificada por dos exones localizados en el cromosoma humano 13q34.1; constituida por 1322 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 145 kDa.^{69,70} IRS-3 se expresa solo en roedores y no se ha encontrado en humanos. IRS-4 se expresa solo en cerebro y timo, y por lo tanto es considerada tejido específico. IRS-5 e IRS-6 son totalmente diferentes al resto de la familia.⁷¹

Las IRS comparten dominios estructurales similares, incluyendo un dominio de homología con Pleckstrina (PH) en la región N-terminal y un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), que interactúan con motivos NPXY que se encuentran en la parte citosólica de receptores activados, como es el caso del receptor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1R) y del receptor de insulina (IR). Un dominio adicional que contribuye a la unión con el receptor, el dominio de unión del “loop” regulatorio de cinasa (KRLB) ha sido identificado solo en IRS2. El extremo carboxilo terminal contiene varios sitios de fosforilación de serinas y tirosinas necesarios para la unión con proteínas que contienen dominios PTB y dominios de homología con src-2 (SH2), incluyendo p85, Grb2, Nck, las proteínas fosfotirosina fosfatasas con dominio SHP2 entre otras. Aunque las IRS no son catalíticamente activas, son capaces de impactar numerosas cascadas de señalización a través de la interacción con proteínas con dominios SH2.⁷²

Las IRS son proteínas adaptadoras de señalización que funcionan como intermediarios de receptores de superficie, principalmente se activan por la vía de señalización a través del IR e IGF-1R (vías canónicas). Después de la unión el ligando a su receptor específico, estos son fosforilados y permiten la unión de IRS-1 ó IRS-2 a través de los dominios conservados PH y PTB. La fosforilación de las IRS's se lleva a cabo en su extremo carboxilo, exponiendo múltiples sitios de unión a proteínas con sitios SHP2, dando como resultado la activación de dos diferentes vías de señalización; la de PI3K^{73,69} y la de la cinasa ERK.⁷⁰

La vía de señalización PI3K participa en diferentes procesos celulares, tales como mitogénesis, motilidad celular, metabolismo, organización del citoesqueleto, proliferación, sobrevivencia y crecimiento celular. La vía ERK está asociada a procesos de crecimiento y

diferenciación celular. Mutaciones de moléculas relacionadas con esta última vía se han visto estrechamente asociadas a cáncer.⁷²

Recientemente, se ha demostrado que las IRS también participan en la señalización cascada abajo después de la activación de receptores de citocinas, hormonas esteroideas (estrógenos) y de algunas integrinas.⁶⁹ Entre ellas están la señalización por las citocinas IL-2, IL-4, IL-9, IL-10 IL-13, IL-15, interferón α , interferon β y oncostatina.^{65,44,66} También las IRS pueden unirse a proteínas citoplasmáticas (ejemplo: SV40, β -catenina, receptor de estrógenos α , y de esta manera se pueden translocar al núcleo y ejercer diferentes funciones (fig.4).⁶⁹ El mecanismo exacto de interacción con otras proteínas no se conoce pero sugiere que la acción de las IRS se ejerce por mecanismos diferentes a la vía canónica. Además, se ha demostrado que las IRS-1 son necesarias para la activación de otros sistemas de señalización como la hormona de crecimiento y diferentes interleucinas.⁷⁴

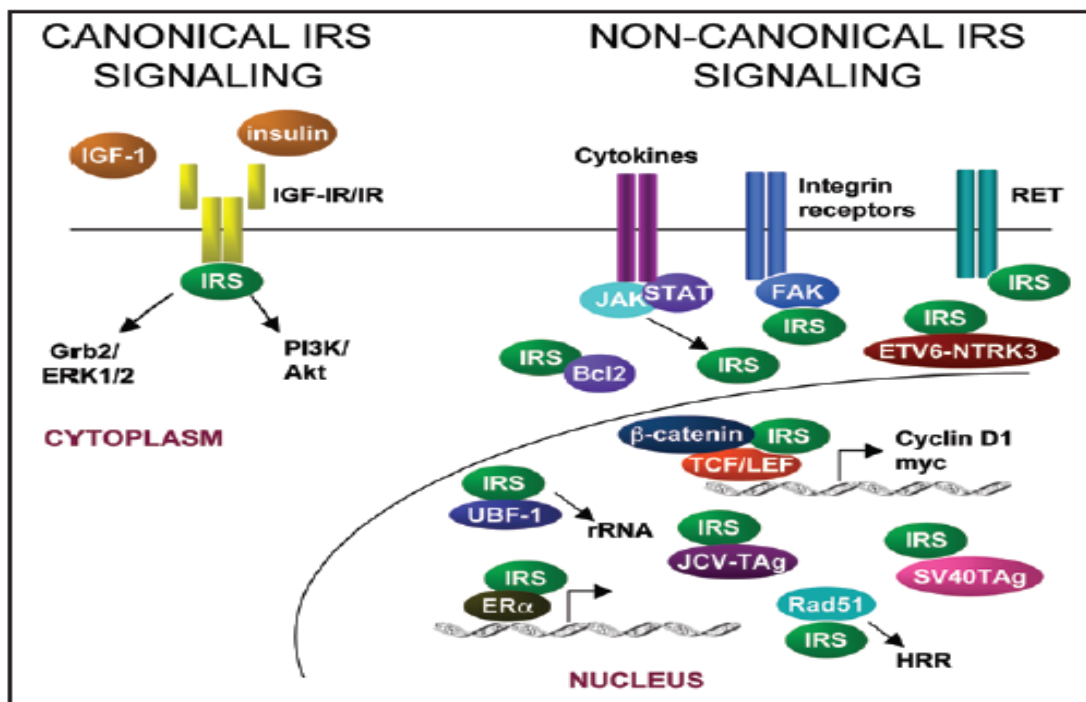


Figura 4. Esquema que indica la naturaleza diversa de señalización de los IRS. La vía canónica de las IRS representa la unión de IRS-1 o IRS-2, (a través de sus dominios conservados PH y PTB) a los receptores tirosina quinasa (RKTs) tales como el IR o el IGF1-R fosforilados resultando en la activación de las vías PI3-k y Erk. Las IRS también puede interactuar con receptores de citocinas, hormonas esteroideas (estrógenos) y de algunas integrinas de una manera no canónica por la unión a quinasa citoplasmáticas como JAK. También, los IRS se encuentran en el núcleo y tienen una

variedad de funciones nucleares, incluyendo la asociación con numerosos oncogenes (Dearth *et al*, 2007. *Cell Cycle*; 6: 705-13).⁶⁹

2.3. IRS y Cáncer.

La mayoría de los estudios relacionados con las IRS se han centrado en su efecto sobre el metabolismo. Sin embargo en los últimos años empezaron a aparecer reportes relacionados con su probable participación en el cáncer, principalmente en cáncer de mama.^{68,75}

Se ha demostrado que la sobreexpresión de las IRS en fibroblastos de embriones de ratón induce la transformación de células normales a malignas capaces de formar tumores en ratones desnudos. Esto es debido a la hiperactivación de las vías MEK/ERK y la activación del IGF-1R. Los fibroblastos IGF-1R^{-/-} son resistentes a dicha transformación, sugiriendo que los IRS pueden funcionar como moléculas oncogénicas transformantes. Esta actividad ha sido poco estudiada en diferentes tejidos, excepto mama y pulmón en donde se ha avanzado más en el conocimiento. El mecanismo a través del cual las IRS ejercen su acción transformante ha sido poco estudiado y no es claro a la fecha cuales son las señales que activan las IRS ó cuales son los factores involucrados en la señalización hacia la transformación celular.^{69,75} Si bien las IRS pueden funcionar como oncogenes, éstas también requieren de otras proteínas oncogénicas para ejercer su acción. Se ha demostrado que las IRS pueden unirse a otras proteínas como el antígeno JCV T, antígeno SV40T, oncoproteína RET y la proteína ETV6-NTRK3. Estas proteínas no solo se unen sino también dependen de la fosforilación en tirosina de las IRS para ejercer su acción mitogénica y transformante. En el caso del cáncer de mama, se ha demostrado que las IRS pueden unirse a otras proteínas asociadas a este cáncer tales como el receptor de estrógenos (ER alfa), β -catenina, FAK y Bcl-2.^{68,69}

Un ejemplo de la activación de estas vías “no canónicas” ha sido el pre-tratamiento con progestinas de células MCF-7 (una línea celular de cáncer de mama) que expresan la isoforma del receptor B (PR-B) de progesterona, las cuales al activar la receptor B de progesterona se activa una vía de señalización que regula la expresión de IRS-2. Asimismo, se ha sugerido que IRS-2 puede mediar la migración celular inducida por IGF mediante la vía PI3K. Esto conduce a un aumento en la migración de las células tumorales.⁷³ En el caso

de la glándula mamaria de ratón y en células de cáncer de mama, la transcripción del gen de IRS-1 esta aumentada tanto por estrógenos, como por progesterona. Los estrógenos regulan la expresión de IRS-1 promoviendo la proliferación de las células. No sólo el estrógeno sinergiza con el IGF-1 sobre la proliferación, sino que el receptor de estrógenos es requerido para la acción del IGF-1R y el IRS-1 para estimular la proliferación.^{67,76} Estos resultados sugieren que la regulación en la expresión de las IRS-1 e IRS-2 puede presentarse de manera diferente dependiendo del estímulo.

Estudios recientes relacionados con la participación de las IRS en cáncer de hígado⁷⁷ y páncreas,⁷⁸ han encontrado sobreexpresión de estas proteínas oncogénicas y una hiperactivación de las vías de señalización de IGF e insulina. Sin embargo, en cáncer de células escamosas de pulmón, la expresión de las IRS se encuentra disminuida,⁷⁹ sugiriendo que la capacidad transformante depende del tejido.⁷²

Por otro lado, algunos grupos enfocados en la actividad de las IRS han encontrado que éstas se encuentran constitutivamente fosforiladas (activas) en una amplia variedad de tumores como liposarcomas, miosarcomas, leiomiomas y cáncer de mama.⁸⁰ Así mismo, se ha demostrado que IRS-1 e IRS-2 pueden estar involucradas en diferentes procesos que son importantes para la proliferación, progresión y metástasis del cáncer. En el caso del cáncer de mama se ha encontrado que mientras IRS-1 está altamente relacionado con la progresión del cáncer, IRS-2 se asocia principalmente con la metástasis.⁶⁷

En el caso del cáncer cervicouterino no se conoce el perfil de expresión de IRS-1 e IRS-2 y si la vía de señalización utilizada por IL10 para activar la IRS-2 en células mieloides pudiera ser utilizada por esta citosina en las células derivadas de cáncer cervicouterino, como HeLa. De la misma manera, no se sabe si la activación de esta vía podría estar involucrada en la proliferación de éste tipo de células cancerosas.

5. JUSTIFICACIÓN

Además de la actividad inmunosupresora de IL-10 en el CaCu se ha sugerido que esta citosina pudiera ejercer otros efectos relacionados con el desarrollo del tumor. Los mecanismos moleculares a través de los cuales se lleva a cabo este efecto no se conocen; sin embargo, se ha demostrado que esta citosina puede ejercer un efecto antiapoptótico en células mieloides a través de la activación de la vía IRS-2/PI3K/Akt.

Dado que existen varios estudios de la relación entre la expresión de IRS-1 e IRS-2 y el mal pronóstico (aumentos en metástasis, supervivencia, crecimiento o proliferación celular) de diferentes tipos de cáncer, es necesario estudiar la participación de estas moléculas en la vía de señalización de IL-10R en CaCu; así como su efecto sobre la proliferación. Lo anterior permitirá profundizar en el conocimiento de la biología celular del CaCu.

3. HIPÓTESIS

Las proteínas IRS-1 e IRS-2 participan en la activación de la vía de señalización del receptor de IL-10 regulando procesos de proliferación en células HeLa.

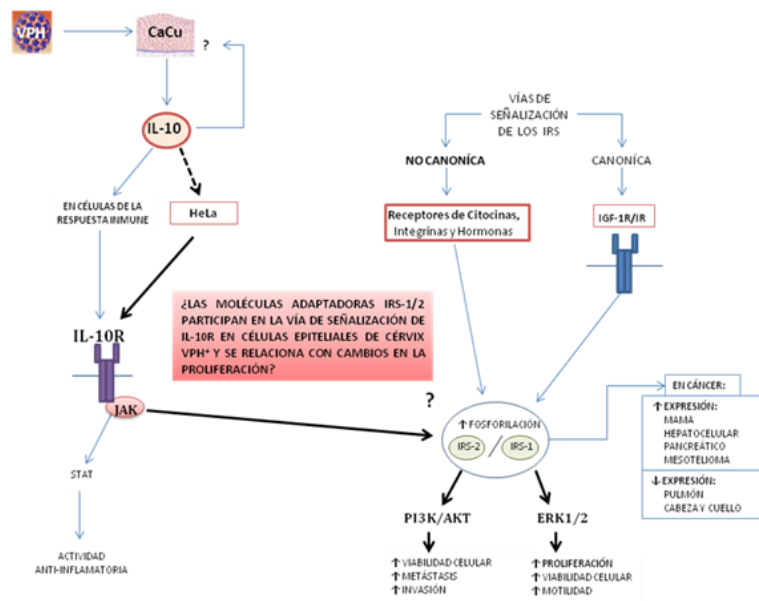
6. OBJETIVO GENERAL

Investigar la participación de las proteínas IRS-1 e IRS-2 en la vía de señalización de IL-10 R y en la proliferación de células HeLa.

6.1. Objetivos Específicos.

- Investigar la presencia del RNA mensajero de IRS-1 e IRS-2 y sus proteínas en las líneas celulares HeLa y C33-A.
- Investigar el efecto de IL-10 sobre la fosforilación de las proteínas IL-10 R 1/2, IRS-1, IRS-2, JAK1, PI3K/AKT, en células HeLa y C33-A.
- Investigar el efecto de IL-10 sobre los cambios en la proliferación de estas líneas celulares.

4. MAPA CONCEPTUAL



7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 Cultivos celulares.

Este trabajo se llevó a cabo con las líneas celulares HeLa (VPH 18⁺) y C33-A (VPH), ambas derivadas de CaCu. La línea celular derivada de cáncer de mama MCF7 se usó como control positivo de expresión de los IRS. Todas las líneas celulares fueron compradas a la compañía American Type Culture Collection (ATCC) para asegurar que se conservaran sus características originales.

Las células se cultivaron en cajas de 25 cm² con medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), (100 IU/mL) penicilina-estreptomicina (100 µg/mL) y se mantuvieron a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂.

7.2. Estimulación con rIL10.

Todos los experimentos se realizaron con IL-10 de origen humano (IL-10 recombinante humana (rIL10), R&D Systems). Antes de la estimulación con la rIL-10, las células fueron cultivadas en ausencia de suero durante 24 hs, se cambió por medio nuevo sin SFB y se adicionó la rIL10. La dosis y tiempos de exposición a la citocina se describen más adelante.

7.3 Medición de la expresión del RNAm de IRS-1, IRS-2 e IL-10R.

7.3.1. Extracción y cuantificación de RNA total.

La extracción del RNA total se realizó con el método de Chomczynski⁸¹, usando el reactivo comercial TRIzol (Ambion, USA). Un total de 1 x 10⁶ células HeLa ó C33-A fueron cultivadas en cajas de 25 cm² con medio EMEM suplementado con 10% de SFB durante 24 hrs. Las células se despegaron con tripsina/EDTA (Tripsina 0.25%/EDTA 0.5 mM, ATCC, USA) y se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min a temperatura ambiente en tubos Falcón de 15 ml. Posteriormente se realizó un lavado con solución de fosfatos (PBS), se centrifugó y el pellet celular se re suspendió en 1 ml de Trizol (para lisar las células) e incubaron en hielo por cinco minutos. Transcurrido este tiempo se agregó 200 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIzol, se homogenizó y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase

acuosa incolora (RNA) se transfirió a un tubo Eppendorf estéril se agregó 500 µl de isopropanol y se mantuvo a -20°C por 10 min. Posteriormente se centrifugó y la pastilla se re suspendió en 75% etanol/H₂O/-DEPC (Dietil piro carbonato). Después de centrifugar a 10,000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Por último, se re suspendió el RNA en 15 µl de H₂O/-DEPC y se almacenó a -70°C hasta su uso.

La absorbancia en cada una de las muestras fue medida en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop Lite, a una longitud de onda de 260 nm y el cálculo de la concentración de RNA total se hizo con la siguiente fórmula:

$$\text{RNA total} = 40 (\text{valor constante}) \times \text{Abs } 260\text{nm} \times \text{factor de dilución} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{L}$$

La pureza del RNA se calculó con el cociente de las absorbancias: (A₂₆₀/A₂₈₀=2).

7.3.2. Tratamiento con DNAsa I.

Para eliminar el DNA genómico, la muestra de RNA fue tratada con DNAsa I (Invitrogen, USA). Para un volumen final de 10 µl, se añadió 1.5 µg de RNA total, 1µl de DNAsa I y agua tratada con DEPC estéril a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min y se adicionó 1µl de EDTA (25 mM) para detener la reacción. Se incubó en baño María a 65°C por 10 min y se procedió con la síntesis de la cadena complementaria de DNA.

7.3.3 Transcripción reversa (RT)

Una vez tratado el RNA con DNAsa I se adicionó 1µl de oligo dT (0.025µg), se homogenizó con vórtex por 15 s y se mantuvo la reacción en baño maría a 70°C por 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en hielo y se agregaron 8 µl de la mezcla de reacción (0.5µl de RNAsin (5000/µl) (Invitrogen), 4µl Buffer de Transcriptasa Reversa 5x, 2µl DTT (0.1M), 1µl dNTPs (10nM) (Promega), 0.5µl de enzima RT (200 U/µl) (Invitrogen, USA). Los tubos se colocaron en baño María a 37°C por una 1 h. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó el cDNA como template para amplificar los genes de interés, con oligonucleótidos previamente reportados (Tabla 1).

La mezcla de reacción de PCR consistió de: 2 µl de cDNA, 2.5 µl de buffer de reacción 10X, 0.5 µl de deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM), 1.5 µl de cada oligonucleótido (15 pmol), 1 µl MgCl₂ (2 mM), 0.1 µl Taq DNA polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen, USA) y agua miliQ estéril (volumen final de 25 µl).

La amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: IRS1 (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min por 30 ciclos) y el fragmento esperado es de 763 pb. IRS2 (95 por 1 min, 54 por 1 min, 72°C por 1 min 30 ciclos) con fragmento de 384 pb. GAPDH (, 95 por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min por 35 ciclos) con un producto de amplificación de 452 pb. Todas las reacciones tuvieron un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min.

TABLA 1. Oligonucleótidos específicos.

Gen	Oligo	Secuencia
<i>IRS-1</i> ⁸²	S	5'-TCCACTGTGACACCAGAATAAT-3'
	As	5'-CGCCAACATTGTTTCATTCCAA-3'
<i>IRS-2</i> ⁸²	S	5'- GCTGCTGCTACAGCTCCT-3'
	As	5'-GGCTCGCCAAAGTCGATGT-3'
<i>IL-10R2</i> ⁶³	S	5-TATTGGACCCCCTGGAATG-3
	As	5-GTAAACGCACCACAGCAAG-3
<i>GAPDH</i> ⁶²	S	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	As	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
⁸² Morelli C et al., 2003; ⁶³ Hör S, et al., 2004; ⁶² Bermúdez-Morales et al., 2008. Sentido (S) ; Antisentido (AS)		

7.3.5. Separación de los fragmentos en geles de agarosa.

Los productos de PCR amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1.2%. Se colocaron en los pozos del gel 12.5 µl de la reacción de PCR y 4 µl de buffer de carga (0.025% Azul de Bromofenol, 70% Glicerol, EDTA 12 mM). Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se usaron dos marcadores; 1kb plus DNA ladder (Invitrogen) y 50pb DNA ladder (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (6mg/L) durante 5 min. Posteriormente se lavaron dos veces con agua desionizada y se visualizaron con una lámpara de UV.

7.4 Ensayos de la proliferación celular

Antes de iniciar los experimentos de estimulación con la interlucina se evaluó la pertinencia de reducir el porcentaje de suero bovino fetal al medio de cultivo, ya que se sabe que éste contiene una gran variedad de proteínas, factores de crecimiento, hormonas y citosinas involucradas a los procesos de proliferación, diferenciación y metabolismo celular. Para ello se sembraron 5×10^3 células (HeLa) y 1×10^4 (C33-A) en placas de 96 pozos durante 24 horas en medio EMEM suplementado con 10% de SFB, una vez conformada la monocapa las células se lavaron dos veces con PBS y se adicionó medio fresco suplementado con diferentes concentraciones de SFB (0.2%, 10%, y sin suero) y se mantuvieron en incubación a 37°C durante 24, 48 y 72 horas. Los cambios en la proliferación celular se midieron con la técnica de MTT

7.4.1. Medición indirecta de proliferación celular por MTT.

Esta técnica permite analizar la proliferación celular a través de medición de la actividad de la enzima Succinato Deshidrogenasa Mitocondrial que reduce metabólicamente el bromuro [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio MTT] a Formazán (compuesto púrpura insoluble). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de Formazán producido. Cuatro horas antes de finalizar el tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas) se agregaron 10 µl de MTT. Una vez concluido este tiempo se añadieron 90 µl de Isopropanol con 0.04N de ácido clorhídrico (HCl). La cantidad de Formazán producido por las células fue medido en un lector de placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader,

BioRad) a una longitud de onda de 595 nm. A estos valores se les resta el valor de referencia obtenido a una longitud de onda de 650 nm.

7.4.2. Curva Dosis-Respuesta a diferentes concentraciones de IL-10, en presencia ó ausencia de SFB.

Se cultivaron las células como se describió anteriormente. Posterior a las 24 horas se lavaron las células dos veces con PBS y se cambió el medio por EMEM fresco suplementado con 10% SFB ó sin suero y con diferentes concentraciones de IL-10 recombinante humana (rIL10, R&D Systems) (5, 10 y 50 ng/ml) y se incubó a un tiempo fijo de 48 y 72 horas. Los cambios en la proliferación celular fueron evaluados por la técnica de MTT como se describió anteriormente..

7.5. Análisis de la expresión y fosforilación de IL-10R, IRS-1, IRS-2, JAK1, PI3k/AKT, ERK1/2..

La expresión y fosforilación de proteínas claves en la señalización a través de IL-10 que han sido involucradas con la activación de las IRS en presencia y ausencia de IL-10 se evaluaron por Western Blot, usando anticuerpos específicos para cada una de ellas. .

7.5.1. Extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas, se sembraron en placas de 6 pozos 1×10^5 células (HeLa y C33-A). Las células fueron estimuladas con 50 ng/ml de rIL10 en tiempos de 5, 15, 30, 60 min y 6 hrs. Una vez concluido el tiempo de estímulo con IL-10, las placas se colocaron en hielo y se lavó la monocapa con PBS 1X frío. Se agregó 100 μ l de Buffer de Lisis (RIPA) (150 mM Cloruro de Sodio, 1.0% Tritón X-100, 0.5% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS), y las células se recolectaron con un “scraper”. La suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se mantuvo en agitación constante por 30 min a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min. a 4°C. Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo y el sobrenadante se pasó a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -70°C hasta su uso.

7.4.2. Cuantificación de proteínas totales.

La cantidad de proteína en cada muestra se midió utilizando el kit comercial 2-D Quant (Amaersham Biosciences, USA). Brevemente, para cada ensayo se realizó una curva

estándar con duplicados de concentraciones crecientes de proteína albúmina sérica bovina (BSA) de acuerdo a la tabla 2. Al mismo tiempo se prepararon los tubos que contenían 10 µl de cada muestra problema (por duplicado). A cada tubo se añadió 500 µl de la solución precipitante, se agitó brevemente y se incubó de 2-3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a cada tubo se añadió 500 µl del co-precipitador y se mezcló brevemente con vórtex. Para sedimentar las proteínas los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes se decantaron y se realizó una segunda centrifugación, para llevar todo el líquido restante a la parte inferior del tubo. Utilizando una micropipeta se eliminó el sobrenadante restante. Se Añadió a cada tubo 100 µl de solución de cobre y 400 µl de agua destilada. Se agregó 1 ml de reactivo de “working color” y se mezcló por inversión. Se incubó a temperatura ambiente durante 15-20 min. Se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, BioRad) a una longitud de onda de 480 nm. Con los datos obtenidos se hizo una curva estándar trazando la absorbancia de los estándares contra la cantidad de proteína. Se utilizó esta curva estándar para determinar la concentración de proteína de las muestras.

Tabla 2: Preparación de la curva estándar

Número de tubo	1	2	3	4	5	6
Volumen BSA(2mg/ml)	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
Concentración de Proteína (BSA)	0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg

7.4.3. Electroforesis de proteínas en geles poliacrilamida.

En todos los ensayos se usaron 40 µg de proteína por pozo, las cuales se mezclaron con buffer de carga 1:1 [Tris-HCl .125M (pH 6.8), SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004%] y se incubaron por 5 min a 95°C. Las proteínas se separaron de acuerdo a su masa en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS al 7.5 %

de acuerdo al método descrito por Laemmli, 1970.⁸³ El peso molecular de las proteínas fue corroborado con marcadores de peso molecular estándares (Novex® Sharp Protein Standard; Life Technologies).

7.5.4. Western Blot

La identificación de las proteínas se llevó a cabo por el método conocido como Western Blot. Las proteínas que fueron previamente separadas en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de PVDF (Thermo Scientific, USA) con una cámara de transferencia (BioRad), durante 90 min, a 40 Volts y usando un buffer de transferencia (25 mM tris-base, 190 mM Glicina, 20 %] Metanol).

Una vez transferidas las proteínas a las membranas y para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (0.25 g leche baja en grasa diluida en 5 ml de TBS-Tween [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, Tween-20 0.1%]) durante 1hr con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-tween por 5 min c/u. Se adicionó el anticuerpo primario específico para cada proteína (ver tabla no. 3) y se incubó toda noche en un agitador de placas a 4°C. Todos los anticuerpos fueron diluidos en una solución de 0.25% BSA -TBS-Tween.

Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween durante 10 min y se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (diluido previamente en solución de bloqueo) específico para cada anticuerpo primario (ver tabla no. 3) y se incubó durante 2 horas en agitación constante. Transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente tres veces con TBS/Tween y se procedió a revelar las bandas. Para ello se adicionó a cada membrana 200µl solución de inmunofijación para quimioluminiscencia SuperSignal® West Femto Maximun Sensity Substrate (Thermo Scientific). La intensidad relativa de las bandas se determinó por medio de análisis densitométrico.

Tabla No. 3. Lista de anticuerpos		
Anticuerpo Primario	Dilución	Casa comercial
Akt1 (B-1)	1:500	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Tyk 2 (C-20)	1:500	
PI 3-kinase p85 α (Z-8)	1:500	
JAK1 (HR-785)	1:500	
IRS-1 (C-20)	1:500	
IRS-2 (H-205)	1:500	
ERK 1 (C-16)	1:500	
p-IRS-1 (Tyr 989)	1:500	
p-JAK1 (Tyr 1022/Tyr 1023)	1:500	
p-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204)	1:500	
p-Akt1 (Thr 308)	1:500	
p-PI 3-kinase p85 α (Tyr 508)	1:500	
p-Tyk 2 (Tyr 1054/1055)	1:500	
p-IRS-1 (Tyr 989)	1:500	
α -actina	1:500	Regalo del Dr. Jose Manuel Hernández Hernández, CINVESTAV-IPN
Anticuerpo Secundario	Dilución	Casa comercial
Rabbit anti-goat IgG-HRP	1:2500	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:2500	
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:2500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC.

7.6. Análisis estadístico.

Los cambios en la proliferación celular así como los cambios en la expresión y fosforilación de las proteínas están representados como medias $\pm$ SD (desviación estándar) de tres experimentos. El análisis estadístico se realizó por medio de ANOVA de una vía y la comparación entre grupos se realizó usando la prueba de comparación múltiple de Tukey's HSD. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS

Expresión basal del RNAm de la subunidad beta (IL-10R2) del receptor de IL-10 en células HeLa.

Las células Hela (7×10^5) y C33-A (1×10^6) se cultivaron en medio EMEM suplementado con 10% de SFB se dejaron incubar durante 24 horas. Transcurridos estos tiempos, las células se cosecharon y se hizo extracción de RNA y el RT-PCR. En la fig. 1 se muestra el fragmento de amplificación de aproximadamente 384 pb que corresponde a IL-10R2 tanto en las células HeLa como en C33-A derivadas de cáncer cervicouterino y MCF-7 de cáncer de mama.

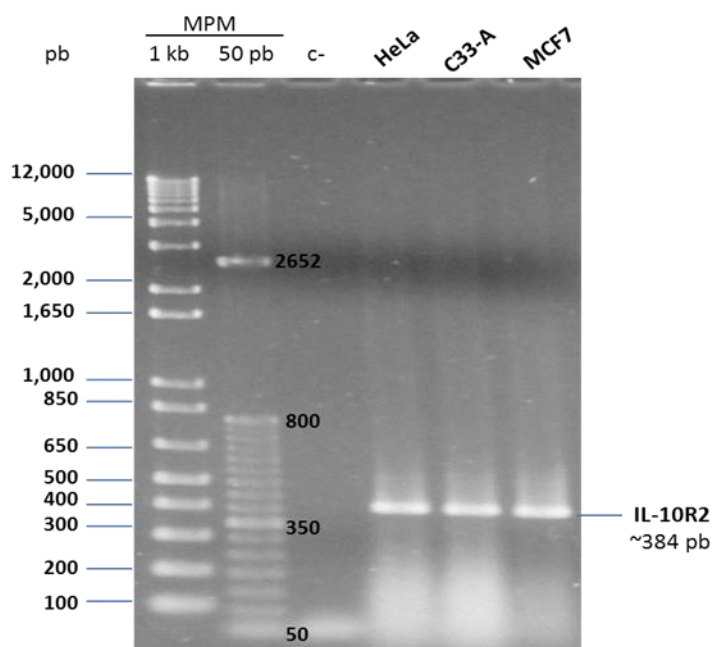


Fig.1 RNAm del IL-10R2 en células HeLa, C33-A y MCF-7. Producto de amplificación por PCR (384pb). Marcador de peso molecular (MPM). Control negativo (c-). Gen constitutivo (GAPDH).

Expresión del RNAm de IRS-1 e IRS-2 condiciones basales de crecimiento

Las células Hela (7 x 10⁵) y C33-A (1 x 10⁶) se sembraron en medio EMEM suplementado con 10% de SFB se dejaron incubar durante 24 horas. Transcurridos estos tiempos, las células se cosecharon, se hizo extracción de RNA y se hizo el RT-PCR. En la figura 2 se muestran los resultados de la amplificación de un fragmento de 763 pares de bases correspondiente a IRS-1 en las células HeLa, C33-A y MCF-7. En el caso del IRS2, el fragmento que se amplifico en las tres líneas celulares fue de 280 pb aproximadamente el cual no corresponde con el tamaño del fragmento amplificado de 386 pb que reporta *Morelli et al, 2003 con estos oligos*, por lo que se diseñaron otros (aún estamos probando).

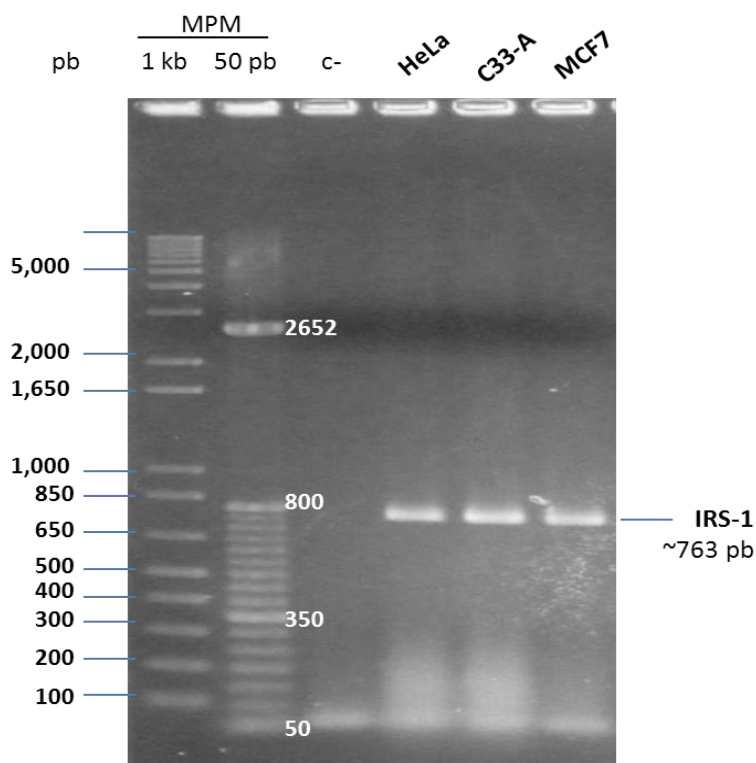


Fig.2 Expresión basal de RNAm de IRS1 en células HeLa, C33-A y MCF-7. Producto de amplificación por PCR (763pb) de IRS1. Marcador de peso molecular (MPM). Control negativo (c-). Gen constitutivo (GAPDH).

Proliferación de las células HeLa y C33-A en ausencia y presencia de suero Bovino fetal (SBF) evaluada por la técnica de MTT.

En la fig. 3 se muestran los resultados de la proliferación de las células HeLa y C33-A incubadas en medio de cultivo EMEM sin SBF ó suplementado con 10% de SBF. Se observa que tanto las células HeLa, como C33-A presentan un incremento lineal de formación de formarán a lo largo del tiempo tanto en ausencia de suero como suplementado con 10%, lo cual nos indica que la eliminación del SBF no disminuye la proliferación de éste tipo de células.

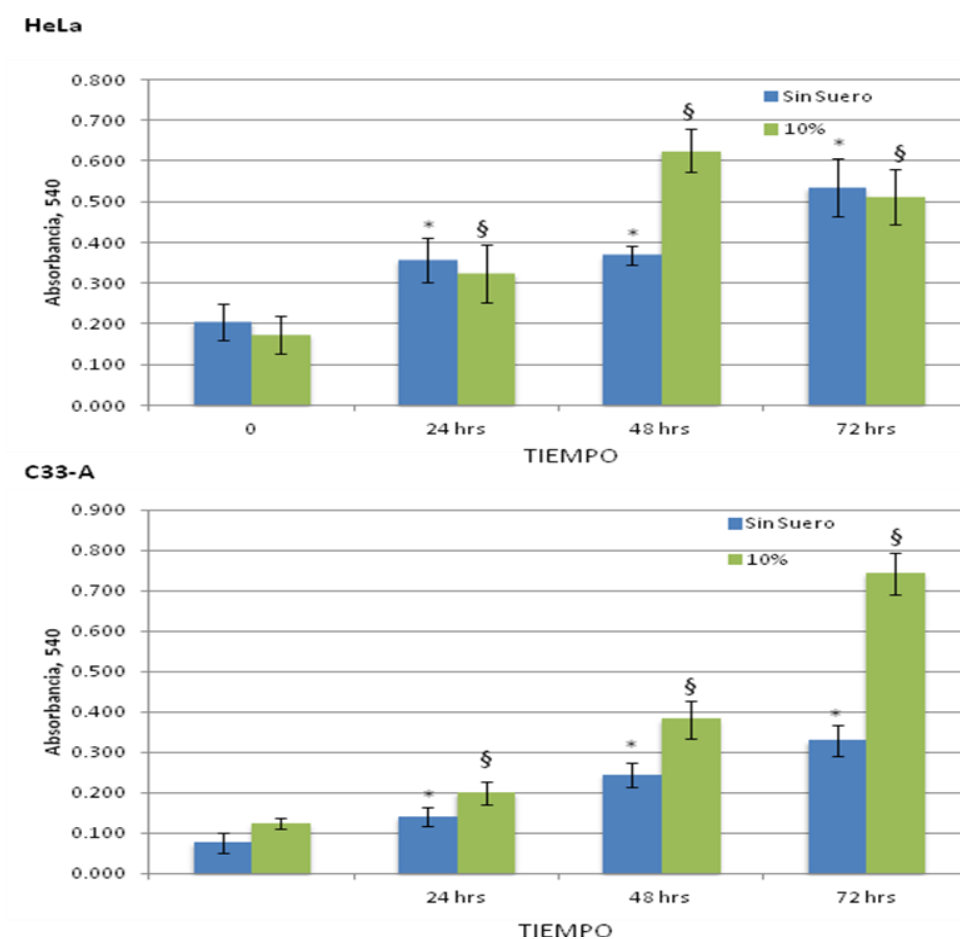


Fig. 3 Proliferación de las células HeLa y C33-A en ausencia ó presencia de 10% SBF en el medio de cultivo. Las células fueron incubadas durante 24, 48 y 72 hs. La gráfica es el resultado de un experimento por quintuplicado expresado como medias $\pm$ SD. * $p < 0.05$; $\$p < 0.05$.

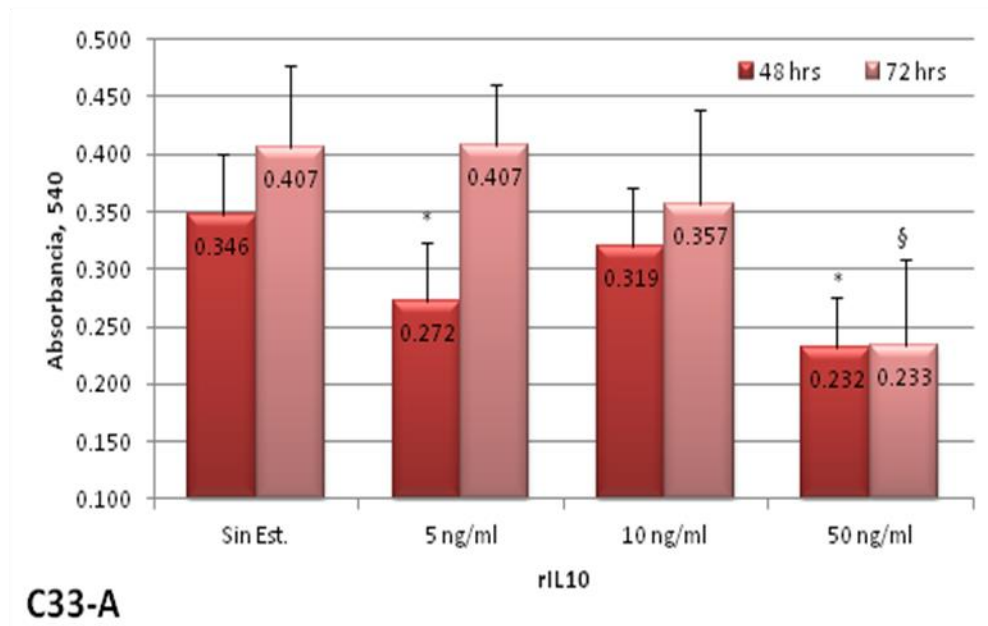
Efecto de IL-10 sobre la proliferación de las células HeLa y C33-A evaluada por la técnica de MTT.

En la figura 4 se muestra el resultado del efecto de rhIL10 utilizando las concentraciones de 5, 10 y 50 ng/ml en células HeLa y C33-A en un periodo de incubación de 48 y 72 hs. En la línea celular HeLa se observa, que después de las 48 hs de estímulo con rhIL10 hay una disminución estadísticamente significativa de la proliferación celular cuando se utilizan las dosis de 5 y 50 ng/ml con respecto al grupo sin estímulo. Sin embargo en esta misma línea celular pero incubada durante 72 horas con rhIL10 no se observan cambios significativos en la proliferación con las dosis menores en comparación al grupo control, en contraste, con la dosis más alta de rhIL10 hay una disminución en la proliferación celular con respecto a las células sin estimular.

En el caso de las células C33-A, después de estimular con rhIL10 durante 48 hs se presenta una disminución significativa en la proliferación celular con la dosis de 10 y 50 ng/ml en comparación al grupo control. Una tendencia similar se observa a las 72 horas de incubación con IL-10, en la que se muestra una disminución de la proliferación; sin embargo solo se presenta un cambio significativo con la dosis más alta cuando esta se compara con el grupo sin estímulo.

Estos resultados indican claramente que ambas líneas celulares responden al estímulo con la Interleucina 10 y que esta ejerce un efecto de inhibición de la proliferación cuando son incubadas (ya sea a las 48 o 72 hs) con la dosis de 50 ng/ml.

HeLa



C33-A

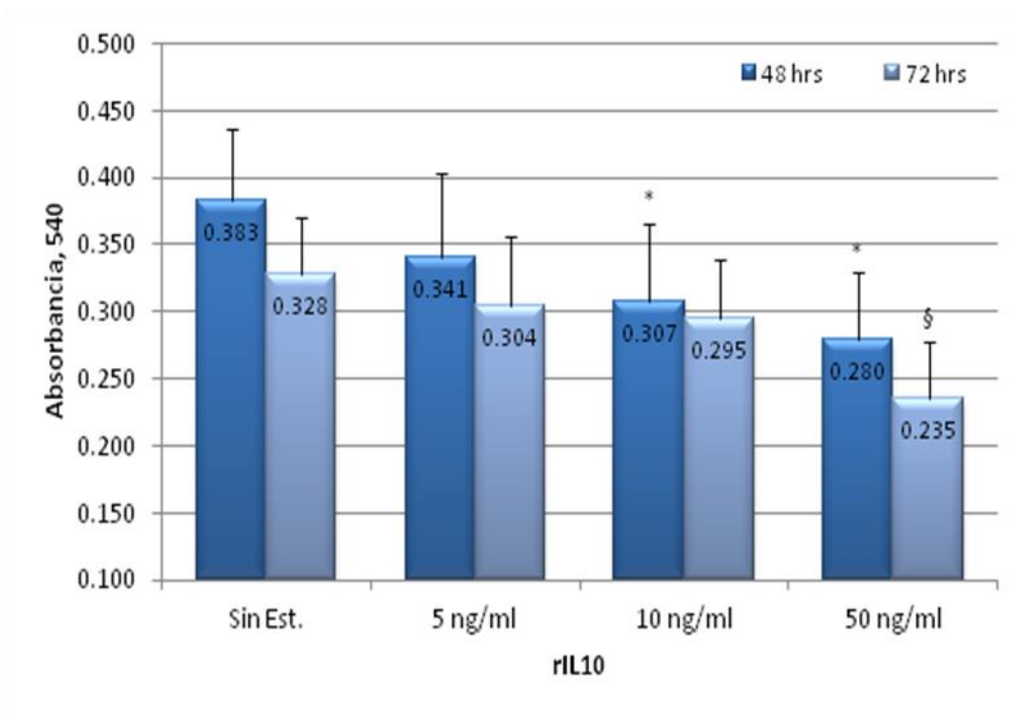


Fig. 4 Proliferación de las células HeLa y C33-A en presencia de rIL10 humana por MTT. Las células fueron incubadas en ausencia y presencia de diferentes dosis de rIL10 (0, 5, 10, 50 ng/ml) durante 48 y 72 hs. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ DS de 3 experimentos independientes. *p<0.05; §p<0.05

ANALISIS DE LA VIA DE SEÑALIZACION DEL ESTIMULO CON INTERLEUCINA 10 RECOMBINANTE HUMANA.

Modificaciones en la expresión de IRS-1, p-IRS-1 e IRS-2

Células HeLa se estimularon con rhIL10 50 ng/ml a diferentes tiempos, para posteriormente medir la expresión de IRS-1 tanto en su forma no fosforilada, p-IRS1, así como IRS2. p-IRS2 no fue posible analizarlo debido a que no nos llegó el anticuerpo en tiempo, sin embargo se tiene contemplado para la publicación de los datos. Se utilizaron como controles positivos las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-321. Se observó que la expresión de IRS-1 en su forma no fosforilada no se modifica lo largo del tiempo, comparado con el control. Este mismo patrón se observa en la proteína fosforilada; sin embargo se puede ver un incremento ligero a las 6hs post estímulo con rhIL10. Contrariamente, en el caso de la proteína IRS2, la presencia de la interleucina 10 incrementó de una manera dependiente del tiempo la expresión de este sustrato alcanzado su nivel más alto a las 6 hs post-tratamiento. Así mismo se puede ver que los niveles de expresión de IRS2 en esta línea celular son más altos, comparados con IRS1; considerando que en ambos casos se usó la misma concentración de proteína (30 µg/pozo) en los geles. (Figura 5).

Modificaciones en la expresión de JAK1

En la figura 6 se muestran los resultados de la expresión de la proteína JAK1 después del estímulo de las células HeLa con 50 ug/ml de rhIL10. Como se puede ver, la expresión de la proteína se incrementa a los 5 minutos después estímulo con la interleucina y alcanza niveles basales a los 15, 30 y 60 minutos. Así mismo se observa que a las 6 hs post-tratamiento se alcanzan valores más altos que el control sin estímulo.

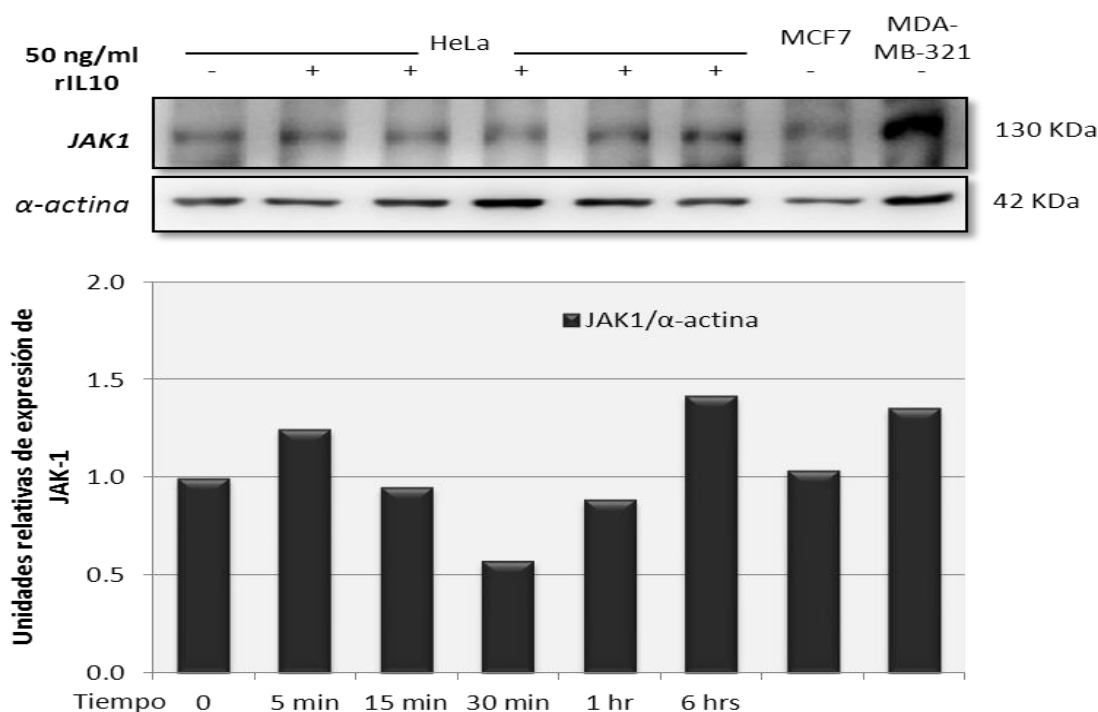


Fig. 6 Expresión de JAK1 en células HeLa por Western Blot. Las células fueron estimuladas con rhIL10 (50ug/ml) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina. Resultado de dos experimentos.

Modificaciones en la expresión de TyK2 y p-TyK2

En la figura 7 se muestran los resultados de la expresión de la proteína total TyK2 y p-TyK2 después del estímulo de las células HeLa con 50 ug/ml de rHIL10. Como se puede ver, cuando los valores tanto de la proteína total como de la proteína fosforilada fueron normalizados con la expresión α -actina se observa que hay una disminución tanto de la proteína fosforilada, como de la no fosforilada a lo largo del tiempo. Sin embargo cuando la forma fosforilada se normalizó contra la proteína total, se observa que únicamente a las 6 hs post-tratamiento se alcanzan un valor más alto de la proteína fosforilada comparada con el control sin estímulo.

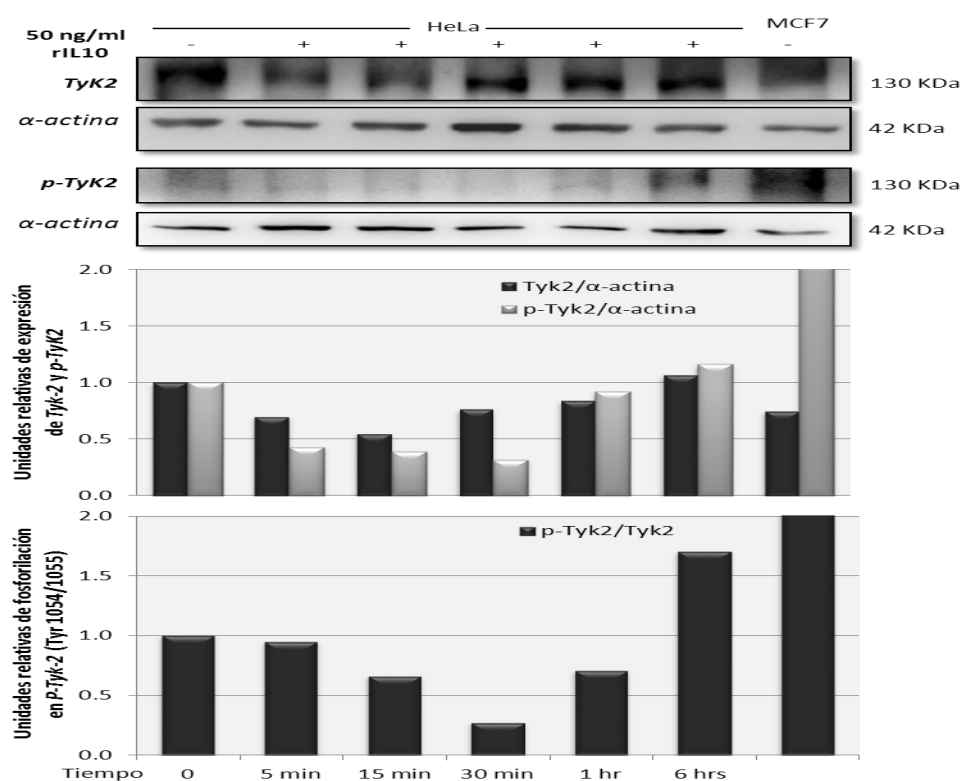


Fig. 7 Expresión de TyK2 y p-TyK2 en células HeLa por Western Blot. Las células fueron estimuladas con rHIL10 (50ug/ml) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina ó de la TyK2 (proteína total). Resultado de dos experimentos.

Modificaciones en la expresión de Akt1 y p-Akt1

En la figura 8 se muestran los resultados de la expresión de la proteína total Akt1 y p-Akt1 después del estímulo de las células HeLa con 50 ug/ml de rHIL10. Como se puede ver, cuando los valores tanto de la proteína total como de la proteína fosforilada fueron normalizados con la expresión α -actina se observa que hay un incremento en la expresión de la proteína fosforilada a partir de los 5 minutos post-tratamiento el cual se mantiene hasta los 30 minutos y llega a niveles menores al basal no estimulado a los 60 minutos. Sin embargo cuando la forma fosforilada (p-Akt1) se normalizó contra la proteína total (Akt1), se observa que el pico mayor de expresión es a los 15 minutos, para después caer a niveles basales a los 30 min.

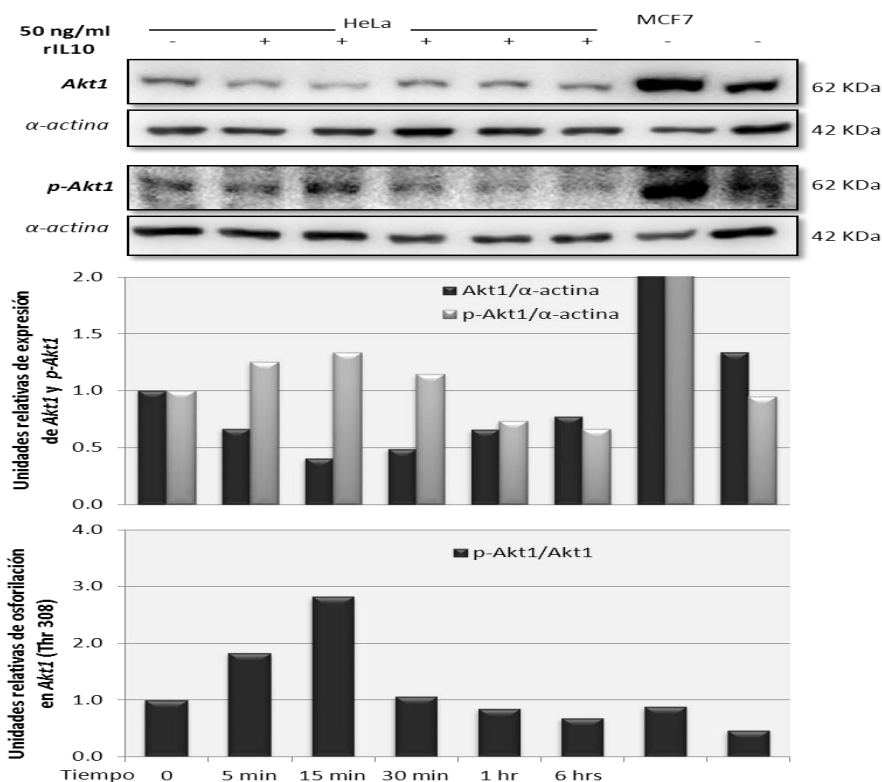


Fig. 8 Expresión de Akt1 y p-Akt1 en células HeLa por Western Blot. Las células fueron estimuladas con rhIL10 (50ug/ml) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina ó de la TyK2 (proteína total). Resultado de dos experimentos.

Modificaciones en la expresión de ERK1/2 y p-ERK1/2

En la figura 9 se muestran los resultados de la expresión de la proteína total ERK1/2 y p-ERK1/2 después del estímulo de las células HeLa con 50 ug/ml de rHIL10. Como se puede ver, cuando los valores tanto de la proteína total como de la proteína fosforilada fueron normalizados con la expresión α -actina se observa que hay una disminución tanto de la proteína fosforilada, como de la no fosforilada a lo largo del tiempo. Sin embargo cuando la forma fosforilada se normalizó contra la proteína total, se observa que únicamente p-ERK2 se incrementa ligeramente a las 5 minutos post-tratamiento y disminuye a lo largo del tiempo.

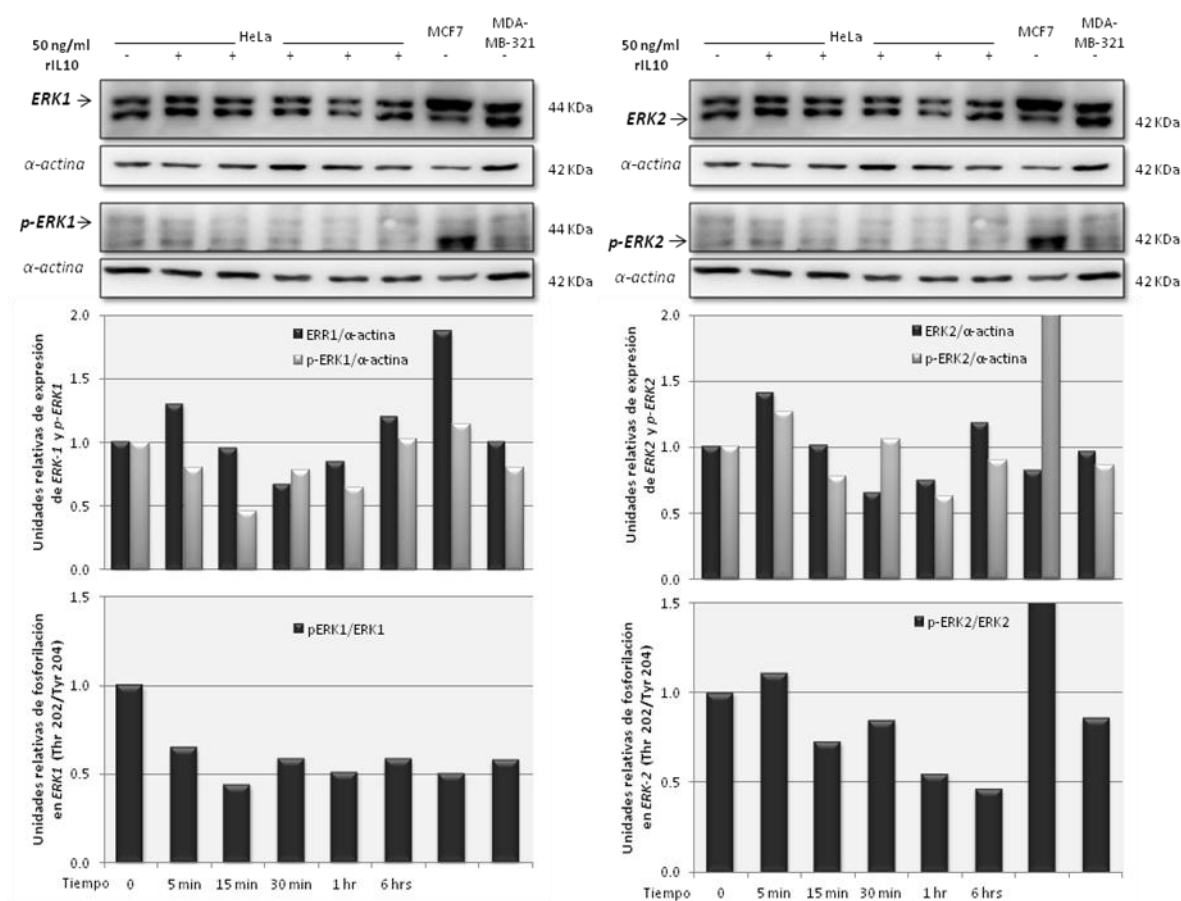


Fig. 9 Expresión de ERK1/2 y p-ERK1/2 en células HeLa por Western Blot. Las células fueron estimuladas con rHIL10 (50ug/ml) e incubadas a diferentes tiempos. Los valores fueron normalizados con los valores de α -actina ó de la ERK1 ó ERK2 (proteína total). Resultado de dos experimentos.

9. DISCUSION

En los últimos años se han generado una serie de evidencias que sugieren que en el cuello uterino de las mujeres con cáncer cérvico uterino se genera un microambiente adverso para la respuesta inmune celular. Esta hipótesis se basa en el hecho de que han detectado niveles altos de IL-10 en el tejido de lesiones precancerosas de bajo y alto grado y cáncer,⁸⁴ su expresión se asocia directamente con el grado de las lesiones cervicales⁸⁵ y con la presencia de infección por VPH.⁴¹ Así mismo se ha demostrado niveles más altos de IL10 en el sobrenadante de las células VPH-positivas (HeLa y SiHa),⁴⁷, sugiriendo que la actividad inmunosupresora de la IL10 contribuye al establecimiento de las lesiones y cáncer.

*Bermudez y cols, 2011,*⁸⁵ demostraron que la expresión de IL10 está regulada por la proteína E2 del VPH 16 en células derivadas del cáncer cervicouterino, favoreciendo es capaz de regular el 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 virus.

Por otro lado se ha demostrado que en las células HeLa la presencia de los receptores para interleucina 10 (IL-10R1 e IL-10R2), los cuales forman un dímero ante el estímulo con IL10, mantienen su capacidad para responder al estímulo con la propia citocina, sugiriendo que el efectos biológico de IL-10 en esta neoplasia no está relacionada exclusivamente con el sistema inmune, sino que también puede estar ejerciendo un efecto directo sobre la misma célula tumoral;⁶⁴ sin embargo existen pocos estudios en células derivadas de cáncer cervicouterino que estudien dicho efecto. Los datos existentes a la fecha han sido realizados principalmente en melanoma, leucemias y mielomas^{86,87,88} en los cuales se demostró que IL-10 promueve la proliferación y/o sobrevivencia celular.

Recientemente *Meda Monzon y cols*⁸⁹ demostró que tanto las células HeLa, como SiHa y C33-A expresan la subunidad alfa y beta del receptor de interleucina10 y demostraron la presencia de la subunidad alfa en la superficie celular de todas las líneas; sin embargo no pudieron demostrar la funcionalidad del receptor. En nuestro estudio, únicamente

amplificamos la subunidad beta del receptor (IL10-R2) tanto en HeLa como en C33-A y nos apoyamos en los resultados obtenidos en el trabajo anterior respecto a la subunidad alfa para investigar el efecto de la interleucina 10 exógena sobre la proliferación celular de las células HeLa e investigar la activación de la cascada de señalización mediada por los sustratos del receptor de insulina (IRS).

Dado que la expresión de los sustratos del receptor de insulina varía entre diferentes neoplasias, consideramos necesario investigar si las células HeLa mantenían la expresión tanto de IRS1 como de IRS2.

Con respecto a IRS1 encontramos que este sustrato se expresa tanto en las células HeLa como en C33-A y MCF-7 (Fig. 2) y que la expresión de la proteína en las células HeLa no está regulada por la adición de IL-10 (Fig 5). Sin embargo, en el caso de IRS2, observamos que el estímulo con 50 ung/ml de IL10 produce un incremento significativo de la proteína a partir de los 5 minutos de estimulación, el cual se mantiene hasta las 6 hs, comparado con el grupo control. Los mecanismos que conducen a la activación transcripcional del gen IRS2 aún no son muy claros y solo se sabe que hormonas esteroides tales como la progesterona y dexametasona incrementan la expresión del RNAm de esta proteína. Sin embargo el potencial de señalización y los efectos fisiológicos de las IRS no solo depende de los sitios de unión dependientes de la fosforilación en tirosinas, sino también por la abundancia de la proteína específica en cada tejido.

A la fecha se sabe que en la mayoría de los cánceres las IRS se encuentran sobreexpresadas y que específicamente IRS2 se asocia con metástasis⁹⁰. En el caso del cáncer cervicouterino, específicamente en células HeLa nosotros pudimos observar en los ensayos de Western Blot que las células expresan mayormente IRS2, en comparación con IRS1, si consideramos que en todos los geles se usó la misma cantidad de proteína total (40ug). Además observamos que la expresión de esta proteína es inducida por la presencia de la IL10.

El mecanismo a través del cual esta citocina incrementa la expresión de este sustrato en células HeLa no se conoce; sin embargo en células de hepatoma HepG2 se demostró que la

interleucina 1beta (IL1 β) incrementa la actividad del promotor de IRS2, a través de la unión del factor de transcripción SP1 a la región del promotor de IRS2, mediada por la activación de ERK, especialmente ERK2.⁹¹ En este trabajo nosotros encontramos que tanto la expresión de ERK1/2, como de ERK1/2 fosforiladas se incrementa a los 5 minutos pos tratamiento con 50 ng/ml de IL10. (Figura 9). Es posible entonces sugerir que el incremento de IRS2 después del estímulo con IL10 pudiera estarse llevando cabo a través de la activación de ERK y el reclutamiento de SP1 al promotor del gen de IRS2, como se demostró para las células HepG2; sin embargo esto deberá de ser demostrado.

Como señalamos en los antecedentes de esta tesis, existen diversos estudios que demuestran que la sobre expresión de IRS1 ó IRS2 pueden estar involucrados en la tumorigenesis of diferentes tipos de cáncer; en tanto que IRS2 se asocia más con el desarrollo de metástasis; sin embargo esto no se cumple para todos los canceres. Uno de los objetivos de esta tesis fue el investigar el efecto de la IL10 sobre la proliferación de las células HeLa y analizar si las IRS podrían estar participando en la acción de esta citocina en éstas células.

Para ello incubamos la monocapa de células en medio EMEM sin suero con diferentes dosis de IL10 (0, 5, 10 y 50 ng/ml) durante 48 y 72 hs. Observamos que la proliferación de las células HeLa y C33-A disminuye en forma significativa conforme se incrementa la dosis de IL10, siendo más importante a la dosis mayor de 50 ng. Contrariamente, *Meda Monzon y cols, 2013*,⁸⁹ usando esta mismas líneas celulares no encontraron cambios significativos en la proliferación celular a las dosis de 10, 100 y 200 ng/ml. Una posible explicación es que la incubación de las células se realizó en un medio de cultivo suplementado con 3% de suero bovino fetal (el cual se sabe contiene varias citocinas, hormonas y diferentes factores de crecimiento) y nosotros usamos un medio sin suero.

Arany y cols, 2001,⁶⁴ demostraron que la IL10 es capaz de activar la transcripción del promotor temprano del virus del papiloma humano 16, induciendo la expresión E7 , favoreciendo de esta manera la proliferación de las células; sin embargo *Meda Monzon y*

cols, 2013⁸⁹ no encontraron un incremento de E6 y E7 del VPH 16 en células HeLa. Es posible entonces especular que la IL10 este ejerciendo un efecto apoptótico, más que proliferativo en este tipo de células; sin embargo esto deberá de ser demostrado.

Por último y con el fin de profundizar en el conocimiento de la(s) vía(s) de señalización involucradas con la acción de la IL10, decidimos investigar una de las vías previamente reportadas para la IL10 en células promieloides,⁴⁴ ya que no hay reportes en la literatura en células cancerosas derivadas de cáncer cérvicouterino. Desafortunadamente no pudimos contar con algunos anticuerpos para la realización de esta tesis, por lo que solo presentamos algunos de los resultados preliminares en esta parte del proyecto.

En células promieloides se ha demostrado que la IL10 se une a su receptor conformado por IL10R1/IL10R2 el cual al fosforilarse se une a JAK1 y TYK2. Por un lado la activación de TyK2/JAK1 fosforila a STAT 3 y la activación de JAK1 recluta a IRS2 activando dos vías de señalización: PI3K /Akt y MAPK.

Los resultados de Western Blot nos muestran que la presencia de IL10 (50ng/ml) activa a TyK2 a los 5 minutos; sin embargo la activación mayor se observó a la 6hs de incubación. Este resultado sugiere que la IL10 podría estar activando la vía IL10/IL10R/TyK2/JAK1/STAT3 la cual está relacionada con la proliferación de las células promieloides; sin embargo también se sabe que puede STAT3 al trasladarse al núcleo puede activar genes como Bcl2 y Bcl-XL relacionados con apoptosis. Por lo anterior queda por definir si STAT3 se activa en células HeLa y si es capaz de activar genes asociados con apoptosis, lo cual nos ayudaría a explicar la reducción en la proliferación de estas células por la IL10.

Respecto a la vía de activación IL10/IL10R/JAK1/IRS2/PI3K/Akt encontramos que la IL10 induce un incremento de JAK1 a los 5 minutos, siendo el incremento mayor a las 6 hs post tratamiento. Sin embargo no sabemos si también se incrementa la forma fosforilada. Suponemos que si ya que encontramos que la proteína final de la cascada Akt1 se incrementa desde los 5 minutos hasta alcanzar un pico a los 15 minutos, tanto la proteína total como la forma fosforilada activa. Se ha demostrado que la vía PI3K/Akt está

relacionada con la protección de las células por apoptosis y que la desregulación de esta vía se asocia con la carcinogénesis.⁹² Nuestros resultados muestran que IRS1 no se modifica bajo el estímulo con la IL10; sin embargo IRS2, Akt y p-Akt si se incrementan en presencia de IL10, esto sugiere que es posible que esta vía se active como un mecanismo compensatorio de protección de las células contra la muerte por apoptosis inducida por la IL10.

10. CONCLUSIONES.

Con este trabajo podemos concluir que la IL10 es una citocina que además de su efecto inmunomodulador, puede activar diversas vías de señalización en las células HeLa, además de inducir la muerte celular a dosis mayores de 10 ng/ml. El hecho de que IRS1 está presente en esta línea celular y que la IL10 no modifica la expresión de la proteína total, ni fosforilada nos hace suponer que esta proteína no está involucrada con el mecanismo de acción de esta citocina y nos permite suponer que IRS2 está involucrada con los efectos encontrados sobre las vías de señalización analizadas.

Consideramos que los datos preliminares reportados en este estudio aporta información valiosa para el proyecto general y que es necesario continuar analizando las diferentes vías.

11. PERSPECTIVAS

- Investigar la expresión del RNAm de IRS2 en las líneas células HeLa y C33-A.
- Investigar posibles cambios en la expresión del RNAm de IRS1, IRS2, IL-10 y el receptor de IL10 en las líneas células HeLa y C33-A en presencia y ausencia de rhIL-10.
- Investigar la presencia y/o los cambios de la fosforilación de las proteínas IRS2, JAK1 y STAT3 en células HeLa y C33-A en presencia y ausencia de rhIL10.
- Investigar posibles cambios en la migración celular de las líneas celulares HeLa y C33-A en presencia y ausencia de rhIL10.

12. ASPECTOS ÉTICOS.

El trabajo es considerado como sin riesgo, ya que todos los experimentos se hicieron con líneas celulares humanas derivadas de CaCu (HeLa, C33-A) y de cáncer de mama (MCF7). Estas líneas celulares fueron adquiridas de la empresa American Type Culture Collection (ATCC), compañía con autorizaciones y normas éticas para la venta de estas líneas celulares.

13. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD.

Los desechos de residuos peligrosos que se generaron en el laboratorio para la realización de este trabajo están considerados como: corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables y biológico infecciosos (CRETIB). Por lo que estos desechos se envasaron en recipientes especiales y de acuerdo a su contenido fueron debidamente clasificados e identificados por medio de un sello adhesivo o etiqueta de identificación. Estos recipientes se llenaron hasta el 80% de su capacidad, asegurando los dispositivos de cierre. Posteriormente, los recipientes cerrados fueron transportados al sitio de almacenamiento temporal ubicado en un área específica dentro del edificio del CISEI hasta que se entregaron a una empresa especializada en el manejo y tratamiento de residuos. Los CRETIB fueron manipulados dentro de campanas de extracción y/o flujo laminar.

Todo el material biológico utilizado para el desarrollo de este proyecto, por ejemplo, células o material que haya estado en contacto con éstas fueron considerados como Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI), los cuales fueron eliminados en bolsas de polietileno color rojo traslúcido y son debidamente etiquetados y marcados con la leyenda “Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos”. El desecho de residuos peligrosos punzocortantes fueron colocados en recipientes rígidos de polipropileno color rojo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse; solo destructibles por métodos físicos. A estos se les etiqueto como "Residuos Peligrosos Punzocortantes Biológico-Infecciosos”.

14. REFERENCIAS.

- ¹ Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (2):69-90.
- ² GLOBOCAN. *GLOBOCAN 2008 CANCER FACT SHEET.* 2008. <http://globocan.iarc.fr/> (último acceso: 10/07/2013).
- ³ Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, Lazcano-Ponce E, Herrero R. Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino. *Salud Publica Mex*, 2010; 52(6): 544-59.
- ⁴ SECRETARÍA DE SALUD. *Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México.* 2011.
- ⁵ SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México (último acceso: 16/07/2013).
- ⁶ National Cancer Institute. *Surveillance Epidemiology and End Results.* 27 de 03 de 2008. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/browse_csr.php?section=5&page=sect_05_table.06.html (último acceso: 16/07/ 2013).
- ⁷ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1): 57-70.
- ⁸ American Cancer Society. *Cervical Cancer.* 2012. <http://www.cancer.org/cancer/cervicalcancer/index> (último acceso: 02 de 04 de 2012).
- ⁹ World Health Organization. *Internacional Agency for Research on Cancer.* 2012. <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=2> (ultimo acceso: 04 17, 2012).
- ¹⁰ Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cevircal cancer. *Cancer Biol Ther*, 2011; 11(3): 295-306.
- ¹¹ Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JMMA*, 2002; 287(16): 2114 - 9.
- ¹² zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009; 384(2): 260-5.
- ¹³ Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*, 2002; 89(2): 191-9.
- ¹⁴ Behtash N, Mehrdad N. Cervical Cancer: Screening and Prevention. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2006;7(4): 683-6.
- ¹⁵ Castro Romero JI, Hernández Girón C, Madrid Marina V. Hormonal contraception as a risk factor for developing cervical cancer: biological, epidemiological and immunological evidence. *Ginecol Obstet Mex*, 2011; 79(9):533-9.

-
- ¹⁶ International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical Carcinoma and Sexual Behavior: Collaborative Reanalysis of Individual Data on 15,461 Women, with Cervical Carcinoma and 29,164 Women without Cervical Carcinoma from 21 Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009;18 (4): 1060-9.
- ¹⁷ Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S1-6
- ¹⁸ Doorbar J. Molecular. Biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 2006; 110(5): 525-41.
- ¹⁹ zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(5): 342-50.
- ²⁰ Longworth MS, Laiminis LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(2): 362-72.
- ²¹ Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 518-27.
- ²² Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*. 1999; 189(1): 12-19.
- ²³ Vinther J, Norrild B. Clearance of Cervical Human Papillomavirus Infections. *Int J Cancer*. 2003; 104(2): 255 – 66.
- ²⁴ Feichter G and Meisels A. Task force report on HPV-related changes of the lower female genital tract. *Acta Cytol*. 2002; 46(4):630-2.
- ²⁵ Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 30;24 Suppl 1:S1-15.
- ²⁶ Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009; 130 (3): 266-76.
- ²⁷ Dell G, Wilkinson KW, Tranter R, Parish J, Leo Brady R, Gaston K. Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol*. 2003; 334(5): 979-91.
- ²⁸ zur Hausen H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host Cell Control in Early Events in Carcinogenesis . *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9): 690-69.
- ²⁹ Robboy SJ, Mutter G, Prat J, Bentley R, Russell P and Anderson MC. Cervical precancer (intraepithelial neoplasia). In: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P, eds. Pathology of the female reproductive tract. London: Churchill Livigstone. 2002; 165-93.

-
- ³⁰ Grm HS, Bergant M, Banks L. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian J Med Res.* 2009;130(3):277-85.
- ³¹ Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* 1987; 61(4): 962-71.
- ³² Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1805(1): 6-16.
- ³³ Münger K, Phelps W C, Bubbs V, Howley P M, and Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 1989; 63(10): 4417–4421.
- ³⁴ Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007; 7(1): 79-89.
- ³⁵ Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Gene therapy with cytokines against cervical cancer. *Salud Publica Mex.* 2005; 47(6): 458-68.
- ³⁶ Whicher, J. T., and Evans, S. W. Cytokines in disease. *Clinical Chemistry.* 1990; 36(7): 1269-81.
- ³⁷ Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(1): 11-22.
- ³⁸ Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr Relat Cancer.* 1999; 6(1):93-107.
- ³⁹ Jankovic D, Kugler DG, Sher A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol.* 2010; 3(3): 239-46.
- ⁴⁰ Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Snijders PJ, Helmerhorst TJ. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol.* 2005; 58(10): 1096-100.
- ⁴¹ Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(3): 245-50.
- ⁴² Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 683-765.
- ⁴³ Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008; 226: 205-18.

-
- ⁴⁴ Zhou JH, Broussard SR, Strle K, Freund GG, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Immunol.* 2001; 167(8): 4436-42.
- ⁴⁵ Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* 2001; 61(13): 5137-44.
- ⁴⁶ Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer.* 1997; 75(12): 1826-30.
- ⁴⁷ Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol.* 2006; 19(3): 481-91.
- ⁴⁸ Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E, Jarzebska-Deussen B, Müschen A, Kemény L, Abts HF, Ruzicka T. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. *J Immunol.* 1997; 159(12): 6291-7.
- ⁴⁹ Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *The FASEB Journal.* 1994; 8(13): 1041-47
- ⁵⁰ Wang ZQ, Bapat AS, Rayanade RJ, Dagtas AS, Hoffmann MK. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology.* 2001; 102(3): 331-7.
- ⁵¹ Matsuda T, Saito H, Fukatsu K, Han I, Inoue T, Furukawa S, Ikeda S, Hidemura A. Cytokine-modulated inhibition of neutrophil apoptosis at local site augments exudative neutrophil functions and reflects inflammatory response after surgery. *Surgery.* 2001; 129(1): 76-85.
- ⁵² Weber-Nordt RM, Henschler R, Schott E, Wehinger J, Behringer D, Mertelsmann R, Finke J. Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1996; 88(7): 2549-58.
- ⁵³ Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest.* 1994; 93(1): 424-8.
- ⁵⁴ Stassi G, Di Liberto D, Todaro M, Zeuner A, Ricci-Vitiani L, Stoppacciaro A, Ruco L, Farina F, Zummo G, De Maria R. Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nat Immunol.* 2000; 1(6): 483-8.

-
- ⁵⁵ Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5):1175-83.
- ⁵⁶ Ishiji T. Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol.* 2000; 27(2): 73-86.
- ⁵⁷ Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot MC. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood.* 1993; 82(7): 2169-74
- ⁵⁸ Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilini O, Braga M. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett.* 1996; 104(1): 1-5.
- ⁵⁹ De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, Catalano G. Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest.* 2000; 117(2): 365-73
- ⁶⁰ Sredni B, Weil M, Khomenok G, Lebenthal I, Teitz S, Mardor Y, Ram Z, Orenstein A, Kershenovich A, Michowiz S, Cohen YI, Rappaport ZH, Freidkin I, Albeck M, Longo DL, Kalechman Y. Ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop. *Cancer Res.* 2004; 64(5): 1843-52.
- ⁶¹ Heckel MC, Wolfson A, Slachta CA, Schwarting R, Salgame P, Katsetos CD, Platsoucas CD. Human breast tumor cells express IL-10 and IL-12p40 transcripts and proteins, but do not produce IL-12p70. *Cell Immunol.* 2011; 266(2): 143-53.
- ⁶² Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, Burguete A, Madrid-Marina V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest.* 2008; 26(10): 1037-43.
- ⁶³ Hör S, Pirzer H, Dumoutier L, Bauer F, Wittmann S, Sticht H, Renauld JC, de Waal Malefyt R, Fickenscher H. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem.* 2004; 279(32): 33343-51.
- ⁶⁴ Arany I, Grattendick KG, Tying SK. 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 Res.* 2002; 55(2): 331-9.
- ⁶⁵ Burfoot MS, Rogers NC, Watling D, Smith JM, Pons S, Paonessaw G, Pellegrini S, White MF, Kerr IM. Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *J Biol Chem.* 1997; 272(39): 24183-90.
- ⁶⁶ Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology.* 2004; 113(3): 281-92.
- ⁶⁷ Chan BT, Lee AV. Insulin receptor substrates (IRSs) and breast tumorigenesis. *J Mammary Biol Neoplasia.* 2008; 13(4): 415-22.

-
- ⁶⁸ Gibson SL, Ma Z, Shaw LM. Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2007; 6: 631-7
- ⁶⁹ Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Hadsell DL, Lee AV.. Oncogenic transformation by signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Cell Cycle*. 2007; 6: 705-13.
- ⁷⁰ Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(2): 85-96.
- ⁷¹ Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem*. 2003; 278(28): 25323-30.
- ⁷² Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Commun Signal*. 2009; 7:14.
- ⁷³ Ibrahim YH, Byron SA, Cui X, Lee AV, Yee D. Progesterone receptor-B regulation of insulin-like growth factor – stimulated cell migration in breast cancer cells via insulin receptor substrate-2. *Mol Cancer Res*. 2008; 6: 1491-98.
- ⁷⁴ Ma Z, Gibson SL, Byrne MA, Zhang J, White MF, Shaw LM. Et al. Suppression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) promotes mammary Tumor Metastasis. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 9338-51.
- ⁷⁵ Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 2011; 10(11): 1750-6.
- ⁷⁶ Lee AV, James GJ, Jennifer LG et al. Enhancement of the insulin-like growth factor pathway by estrogen in human breast cancer. *Mol endocrinol*. 1999; 13: 787-96.
- ⁷⁷ Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lécluse Y, Housset C, Lacombe ML, Desbois-Mouthon C. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 2005; 167(3): 869-77
- ⁷⁸ Kornmann M, Maruyama H, Bergmann U, Tangvoranuntakul P, Beger HG, White MF, Korc M. Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1998; 58(19): 4250-4.
- ⁷⁹ Han CH, Cho JY, Moon JT, Kim HJ, Kim SK, Shin DH, Chang J, Ahn CM, Kim SK, Chang YS. Clinical significance of insulin receptor substrate-I down-regulation in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2006; 16(6): 1205-10.
- ⁸⁰ Chang Q, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S. Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer Res*. 2002; 62(21):6035-8
- ⁸¹ Chomczynski P, Sacchi N Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.

-
- ⁸² Morelli C, Garofalo C, Bartucci M, Surmacz E. Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells. *Oncogene*. 2003; 22(26): 4007-16.
- ⁸³ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.1970; 227(5259):680-5.
- ⁸⁴ El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ and Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol*. 2001. 195: 179-185,
- ⁸⁵ Bermúdez-Morales VH, Burguete AI, Gutierrez ML, Alcocer-González JM and Madrid-Marina V: Correlation between IL-10 expression and human papillomavirus infection in cervical cancer. A mechanism for immune response escape. *Cancer Invest*. 2008;26: 1037-1043.
- ⁸⁶ 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.}
- ⁸⁷ 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.
- ⁸⁸ 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.
- ⁸⁹ Elizabeth Meda Monzon. Evaluación del efecto de la interleucina 10 sobre la proliferación de células transformadas por el virus de papiloma humano. Tesis de Mestría. INSP, 2013
- ⁹⁰ Jackson JG, Zhang X, Yoneda T, Yee D. Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2001; 20(50):7318-25.
- ⁹¹ Udelhoven M, Leeser U, Freude S, Hettich MM, Laudes M, Schnitker J, Krone W, Schubert M. Identification of a region in the human IRS2 promoter essential for stress induced transcription depending on SP1, NFI binding and ERK activation in HepG2 cells. *J Mol Endocrinol*. 2010; 44(2):99-113.
- ⁹² Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003;17(3):590-603.