



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR PARA
ERITROPOYETINA (EpoR) Y DEL RECEPTOR c-Kit EN LA
MIGRACIÓN Y POTENCIAL METASTÁSICO DE CÉLULAS DE
CARCINOMA CÉRVICO UTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIA CRISTINA AGUILAR CALLES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALAETA.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MA. ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de mayo del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **MARÍA CRISTINA AGUILAR CALLES** con número de cuenta 504088773 con la tesis titulada "EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR PARA ERITROPOYETINA (EpoR) Y DEL RECEPTOR c-KIT EN LA MIGRACIÓN Y POTENCIAL METASTÁSICO DE LAS CÉLULAS DE CARCINOMA CÉRVICO UTERINO", realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Secretaria: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DRA. SARA HUERTA YEPEZ
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de junio del 2015.

M. del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- ≈ Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México por haber aceptado mi ingreso a pesar no haber sido egresada de esta casa de estudios, por permitirme ampliar mi campo de conocimiento y permitirme conocer personas tan agradables como el personal que amablemente nos atiende.

- ≈ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico en el desarrollo de este proyecto (152492) y por la beca que me otorgó durante mis estudios de posgrado (becario: 182636 CVU: 49102).

- ≈ Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de este proyecto (IN209613).

- ≈ Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), por la beca número B112-179 otorgada.

- ≈ Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT), por la beca número 12BCD-0052I.

- ≈ A los miembros de mi Comité Tutorial Dra. Ma. Isabel Soto Cruz y la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, por sus siempre acertadas intervenciones que me permitieron hacer un mejor análisis de mis resultados y el abordaje correcto del tema.

- ≈ A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por haberme mostrado el camino correcto, académica y personalmente hablando, por permitirme conocerle en los diferentes ámbitos de su vida, por su apoyo incondicional a pesar de mis largas ausencias acoguéndome siempre con paciencia y comprensión.
- ≈ A todos aquellos que compartieron su amplio conocimiento en temas involucrados con el tema de esta tesis y que hicieron que mi archivo creciera enormemente: Dr. Juan José Montesinos, Dr. Jorge Meléndez Zajgla, Dr. Alejandro García Carrancá y al Dr. Hector Mayani.
- ≈ A la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.
- ≈ A Lilia Jiménez por su orientación en trámites relacionados con CONACyT y por las carcajadas compartidas en esas charlas espontáneas cuando visitaba las oficinas de posgrado.
- ≈ A Lilia Estrada por su siempre amable atención y resolver mis múltiples dudas en el programa de posgrado con agrado.
- ≈ A la Dra. Ma. Eugenia Gonsbatt Bonaparte por su gestión para poder obtener el grado.
- ≈ A las Secretarías Bety y Adriana que fueron un puente importante de comunicación con el posgrado.

DEDICATORIA

Así como la célula no puede subsistir sin interacciones ni estímulos, permítome compararme con ellas por necesitar de mucha gente para obtener este logro. A través de múltiples mecanismos, por fin, se define tangiblemente este esfuerzo.

A los causantes de que yo vague en este mundo: “mis viejos” que con el esfuerzo diario y harto amor han forjado de mí dándome su apoyo incondicional en todas las aventuras y adversidades del camino.

A Roger por su protección y preocuparse por mí siempre y por ser un gran hermano menor del cual me siento infinitamente orgullosa por su madurez y responsabilidad precoz.

A quien amo profundamente pero que por ser tan Leo casi nunca se lo digo pero que siempre me ha brindado su apoyo en los momentos difíciles de este posgrado...gracias “hesmana”.

A mis enanos Dany y Xime que con su hermosa sonrisa y el amor que me demuestran me dan la fortaleza de seguir adelante permitiéndome realizarme como una gran tía.

A mi Papá Paco por la presión ejercida cuando preguntaba: “¿y para cuando hija?”, pues aquí está Papá ¡MISIÓN CUMPLIDA!

A mi “agüengüita Juana la loca” a quien amo con todo mi corazón.

A mis tíos y tías: Pipis, Peral, Roberto, Juan y Miguel porque de alguna u otra forma siguieron mis pasos y me acompañaron en este proceso y por supuesto a mi tío Chuchó por haberme dejado tantos recuerdos.

A mis primos y sobrinos Ana, Antonio, Monse, Lluvia, Sonia, Rodrigo, Faridy, Brandon y Bruno por dejarme sacar a “la loca” que hay en mí y hacer de esta vida algo divertido.

A “los Calles” que me han externado su admiración por este peldaño alcanzado y estar pendientes.

A quien ha sido parte fundamental de mi vida y el mejor oído que he podido encontrar y por haber compartido tanto: gracias especiales “chano”.

A Payons por darme su confianza y dejarme compartir por muchos años su bella amistad.

A las “chicas superpoderosas” (Irma, Olga, Vale, Eve e Idalia) con quienes desahogué mis molestias e infortunios en el laboratorio y que me han permitido ir más allá de una relación laboral.

A “Frodo” por dejarme compartir gran parte del doctorado y de nuestras vidas y soportar mi avidez por el orden en el depa: gracias Memín.

A “la runfla” que fueron la parte alocada de esta etapa por sus múltiples, constantes e interminables ocurrencias que me hacían aligerar la carga con tantas carcajadas: Elmo, Lala, Rodrí, JC, Joel, Boba, Churro, Vargas, Ita y Chivís.

Al club de “las casadas” (excepto dos) a las que agradezco el haber compartido todas esas reuniones en las que me hicieron satisfacer mi pasión reprimida por cantar: Bety, Angie, Kuco, Mely, Mony, Ofe, Vero, Paty, Karina y Toña.

A mis compañeros de clase de posgrado con quienes compartí el sufrimiento cuando algo no lo entendía: Brenda Irerí, Adri, Lillian, Vaníhamin y Brandiux.

A mi “alma mater” por quien hago mi mayor esfuerzo por no defraudar.

A la Dra. Laura Pérez, Dr. Pablo Matzumura que inspiraron el ímpetu y aspiración por hacer investigación.

A Lupita, Marco y demás compañeros de N. E. porque, sin saberlo, cambiaron mi perspectiva de vida.

Al Dr. Aguilera y Yaz que en el último esfuerzo me han apoyado y me han permitido conocer este nuevo mundo de la investigación clínica.

A todos ustedes no me queda más que decirles:

¡GRACIAS!

INDICE

Introducción	
Generalidades del cáncer	1
Cáncer cérvico uterino (CCU)	3
Migración celular	5
Eritropoyetina (Epo)	7
Receptor para eritropoyetina (EpoR)	8
Funcionalidad	8
Regulación	11
Expresión de EPO y EpoR en cáncer	14
Stem Cell Factor (SCF)	17
Receptor c-Kit	19
Funcionalidad	19
Regulación	24
Expresión de SCF y c-Kit en cáncer	25
Migración celular mediada por EPO/EpoR y SCF/c-Kit	27
EPO en migración celular	27
SCF en migración celular	27
Co-señalización entre EpoR y c-Kit	29
Justificación	30
Hipótesis	30
Objetivos	31
Material y métodos	32
Material Biológico	32
Análisis de Western Blot	32
Citometría de flujo	33
Análisis de supervivencia y proliferación	34
Ensayo de migración celular	34
Ensayo de clonogenicidad	34
Inhibición de receptores y moléculas de señalización	35
Aislamiento de células por expresión de c-Kit	35
Análisis estadístico	36
Resultados	37
Expresión de receptores en cultivos celulares.	37
Efecto de EPO en la proliferación	40
Efecto de SCF en la supervivencia de las células en ausencia de nutrientes	41
Efecto de EPO y SCF en la migración de células CaLo e InBI	42
Efecto de EPO y SCF en la capacidad clonogénica	45
Selección positiva de células que expresan c-Kit	46
Análisis de las vías de señalización involucradas en la migración	48
Discusión	51
Conclusión	55
Perspectivas	57
Bibliografía	

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Incidencia y mortalidad de cáncer en México.
- Fig. 2.** Representación esquemática de las etapas del cáncer.
- Fig. 3.** Estructura molecular de eritropoyetina.
- Fig. 4.** Receptor de eritropoyetina (EpoR).
- Fig. 5.** Activación de EpoR por su ligando (EPO).
- Fig. 6.** Representación de la expresión de SCF.
- Fig. 7.** Receptor c-Kit en su forma heterodimérica.
- Fig. 8.** Receptor c-Kit en su forma homodimérica.
- Fig. 9.** Activación del receptor c-Kit por su ligando (SCF).
- Fig. 10.** Expresión de EpoR y c-Kit en CaLo e InBl por inmunocitoquímica.
- Fig. 11.** Expresión membranal de EpoR y c-Kit en CaLo e InBl.
- Fig. 12.** Gráfica de proliferación de células CaLo e InBl estimuladas con EPO.
- Fig. 13.** Gráfica de supervivencia de cultivos CaLo e InBl estimuladas con SCF.
- Fig. 14.** Gráfica de potencial migratorio de CaLo e InBl al ser estimuladas con EPO y SCF.
- Fig. 15.** Gráfica de potencial migratorio de CaLo e InBl estimuladas con EPO y SCF en conjunto.
- Fig. 16.** Ensayo de clonogenicidad en cultivos CaLo e InBl estimuladas con EPO y SCF.
- Fig. 17.** Gráfica del ensayo de clonogenicidad.
- Fig. 18.** Separación de células InBl c-Kit⁺ y c-Kit⁻.
- Fig. 19.** Gráfica de potencial migratorio de InBl c-Kit⁺ y c-Kit⁻.
- Fig. 20.** Gráficas de inhibición de vías de señalización en células InBl.
- Fig. 21.** Activación de STAT5 y ERK1/2 en respuesta a la estimulación con EPO y SCF.

R E S U M E N

La eritropoyesis en los organismos sanos es regulada por la actividad cooperativa de la Eritropoyetina (EPO) y el Stem Cell Factor (SCF), acoplados a sus respectivos receptores, el EpoR y c-Kit. En estudios previos, nuestro grupo de trabajo demostró que células derivadas de tumores cervicales expresan los receptores EpoR y c-Kit. Así mismo se observó que el SCF es un factor de sobrevivencia para estas células, mientras que la EPO promueve la proliferación celular. Sin embargo, la cooperación entre el EpoR y c-Kit en cáncer cervical no ha sido estudiada, a pesar del hecho de que la migración y el crecimiento celular independiente al anclaje son considerados pasos iniciales en la formación de metástasis. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del SCF y EPO, tanto por separado como en combinación, sobre la migración y el crecimiento celular independiente al anclaje en dos líneas celulares derivadas de tumores cervicales.

Para lograr dicho objetivo, primeramente corroboramos la expresión de los receptores en ambas líneas celulares. Posteriormente, evaluamos el crecimiento independiente al anclaje e identificamos que EPO y SCF producen un número modesto de colonias cuando son administrados individualmente, mientras que cuando se administran en combinación inducen la formación de un número significativamente mayor de colonias. El fenómeno de migración celular fue evaluado en el modelo de cámaras de Boyden. La co-estimulación con EPO y SCF indujo la migración de un número significativamente mayor (2 veces) que el producido por cualquiera de las citosinas individuales. La migración inducida por EPO y SCF fue inhibida cuando las células fueron incubadas con un inhibidor de la fosforilación de la cinasa Janus 2 (JAK2). El análisis por Western blot mostró que la vía de señalización JAK2/STAT5 (signal transducer and activator of transcription-5) se activó por la presencia de la EPO y el SCF. En contraste, la inhibición de la cinasa ERK1/2 (extracellular signal-related kinase 1/2) solo tuvo un efecto negativo sobre la migración inducida por SCF. De acuerdo con esta observación, se encontró que el estímulo con SCF y con SCF en combinación con EPO indujeron una importante y sostenida fosforilación de ERK 1 / 2, comparada con un efecto modesto y transitorio producido por la EPO.

Los resultados de este trabajo revelan que la co-estimulación con EPO y SCF promueve la migración y el crecimiento celular independiente al anclaje, y que la co-señalización de los receptores EpoR y c-Kit convergen en la activación de la vía JAK2/STAT5. También demostramos que la migración inducida por SCF solo o en combinación con EPO depende de la activación sostenida de la cinasa ERK1/2. Estos datos indican que la co-señalización a partir de diferentes receptores inducen la migración celular y el crecimiento independiente al anclaje, y sugieren que la adquisición de un fenotipo metastásico podría estar regulada por la actividad cooperativa de EPO y SCF en células tumorales que expresen a sus respectivos receptores.

A B S T R A C T

The cytokines erythropoietin (EPO) and stem cell factor (SCF), coupled with their receptors (EpoR and c-Kit), are essential components of normal physiological erythropoiesis. In earlier studies, we demonstrated the expression of c-Kit and EpoR in cervical cancer cells. It was identified that SCF is a survival factor, whereas EPO promotes cell proliferation. Cooperation between EpoR and c-Kit in cervical cancer has rarely been studied, despite the fact that cell migration and anchorage independent growth are considered initial steps in metastasis. Thus, the aim of this study was to analyse the effect of SCF and EPO alone, or in combination, on the migration and anchorage independent growth of two cervical cancer-derived cell lines.

First, we demonstrated the expression of EpoR and c-Kit in the cell lines. Next, we evaluated anchorage independent growth, and identified that EPO and SCF produced a modest number of colonies, whereas the combination EPO/SCF induced a significantly higher number of colonies. Migration was then evaluated in Boyden chambers. Co-stimulation with EPO/SCF induced a significantly higher number of migrating cells than either cytokine alone. SCF-, EPO- and EPO/SCF-induced migration was inhibited by blocking phosphorylation of Janus kinase 2 (JAK2). Accordingly, western blot analysis demonstrated that the JAK2/signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) axis was activated in all cases. By contrast, inhibition of extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2 abrogated migration induced by SCF and EPO/SCF only. Concurrently, EPO induced a modest, transient activation of ERK1/2, whereas SCF and EPO/SCF prompted a strong, sustained phosphorylation of ERK1/2.

The results from this study have revealed that co-stimulation with EPO/SCF promotes migration and anchorage independent cell growth, and that co-signalling from EpoR and c-Kit converge on JAK2/STAT5 activation. Furthermore, SCF- and EPO/SCF-induced migration depends on the sustained activation of ERK1/2. These results indicate that co-signalling from different cytokine receptors induces migration, and this suggests that migratory behaviour may be regulated by the cooperative activity of EPO and SCF in cells expressing their cognate receptors.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DEL CÁNCER

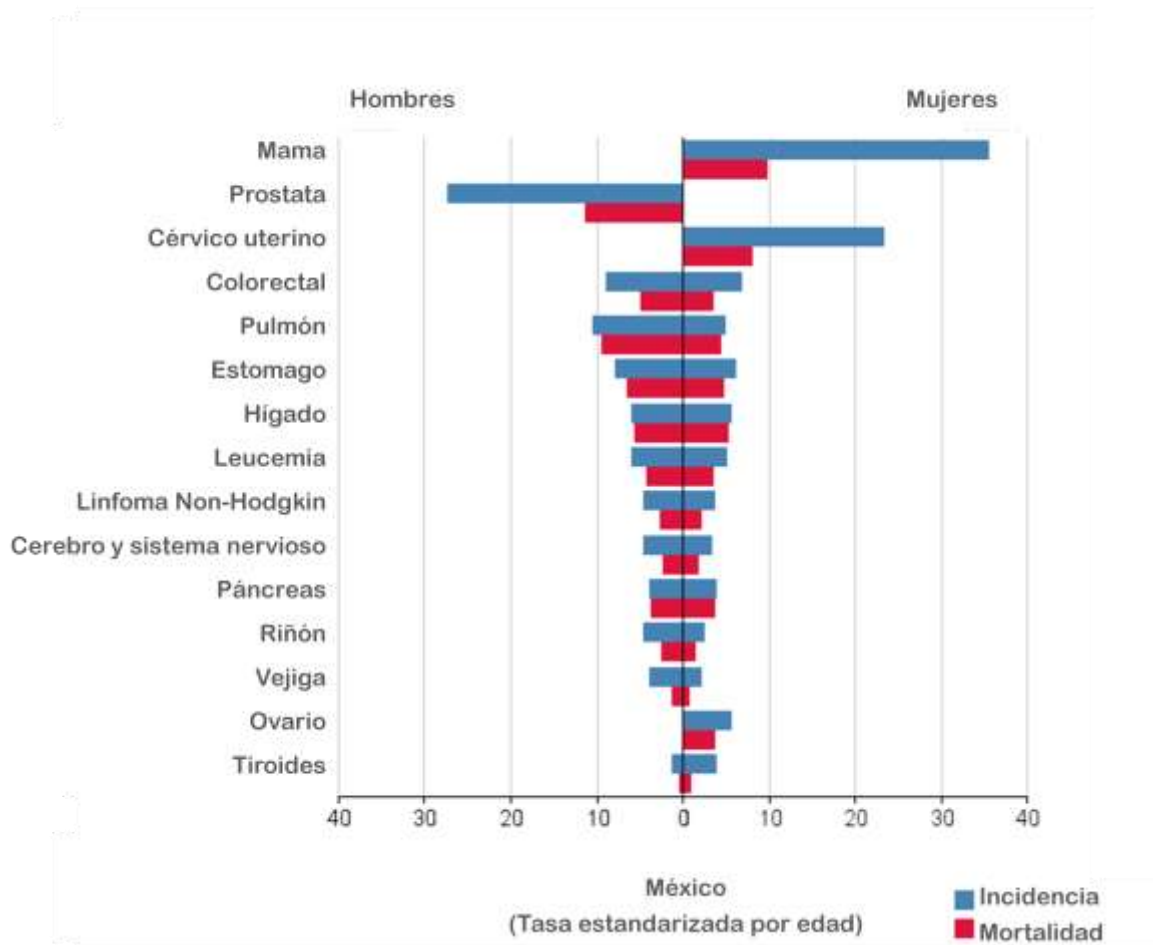
Los médicos de la antigüedad observaron que las venas entumecidas que aparecían sobre la piel cercana a los órganos atacados por tumores recordaban las patas de un cangrejo, por lo que en el siglo II de nuestra era, Galeno llamó a esos tumores *cáncer*, que significaba **cangrejo**, palabra derivada del griego *karkinos*, del mismo significado y con origen en el indoeuropeo *kar-* 'duro' ¹.

El cáncer es definido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo ², existiendo más de 200 tipos diferentes de cáncer y la mayor parte de ellos toman el nombre del órgano de origen ³.

La Organización Mundial de la Salud (2011) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama ⁴.

En América Latina, de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud [OPS] (2011) durante el periodo 2007-2009, la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de alguna neoplasia maligna fue de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes ⁵.

Hasta el año 2008, en México, el cáncer más común era el de próstata, seguido del cáncer de mama y en tercer lugar el cérvico uterino ⁶.



Grafica que muestra la incidencia y mortalidad por cáncer en México al 2012 ⁶.

De acuerdo con el INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática), durante 2009, el Distrito Federal, Chihuahua y Nayarit tuvieron las tasas más altas de morbilidad hospitalaria por cáncer cérvico uterino (48.28, 26.66 y 25.21 por cada 100 mil mujeres, respectivamente); mientras que en Guerrero, Tlaxcala y Estado de México se presentaron las más bajas (5.22, 3.08 y 2.23, respectivamente).

De igual manera, entre la población que padece cáncer cérvico uterino, el porcentaje más alto de morbilidad hospitalaria se concentra en la población de 35 a 59 años, principalmente en la población de 45 a 49 años (15.1%), seguido de las mujeres de 40 a 44 años y de las de 50 a 54 años (14% y 13.2%, respectivamente) ⁷.

Cáncer cérvico uterino (CCU)

El cáncer constituye un grupo de enfermedades crónico degenerativas, existen más de 200 tipos distintos de tumores, con un origen y características particulares. El cáncer cérvico uterino (CCU) ha sido asociado a la infección por virus del papiloma humano (VPH). Este virus se puede transmitir por contacto con la piel de genitales externos infectados, a través de membranas mucosas o fluidos corporales, y a través del coito y del sexo oral. Entre los factores que aumentan el riesgo de infectarse con esta enfermedad de transmisión sexual (ETS) se encuentra el tener múltiples parejas sexuales, mantener relaciones con parejas promiscuas y/o contacto sexual sin protección ⁸. Se piensa que la mayoría de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de VPH, ya que al tratarse de un virus latente que se mantiene asintomático por períodos largos de tiempo, y que en la mayoría de personas infectadas se presenta como una infección subclínica, su detección y tratamiento no se dan de forma oportuna y, por lo tanto, su contagio aumenta día con día ⁹.

Los virus del papiloma humano son un grupo de más de 100 tipos de virus. Algunos tipos del VPH pueden causar verrugas genitales. Otros tipos, sin embargo, causan cáncer del cuello uterino ¹⁰.

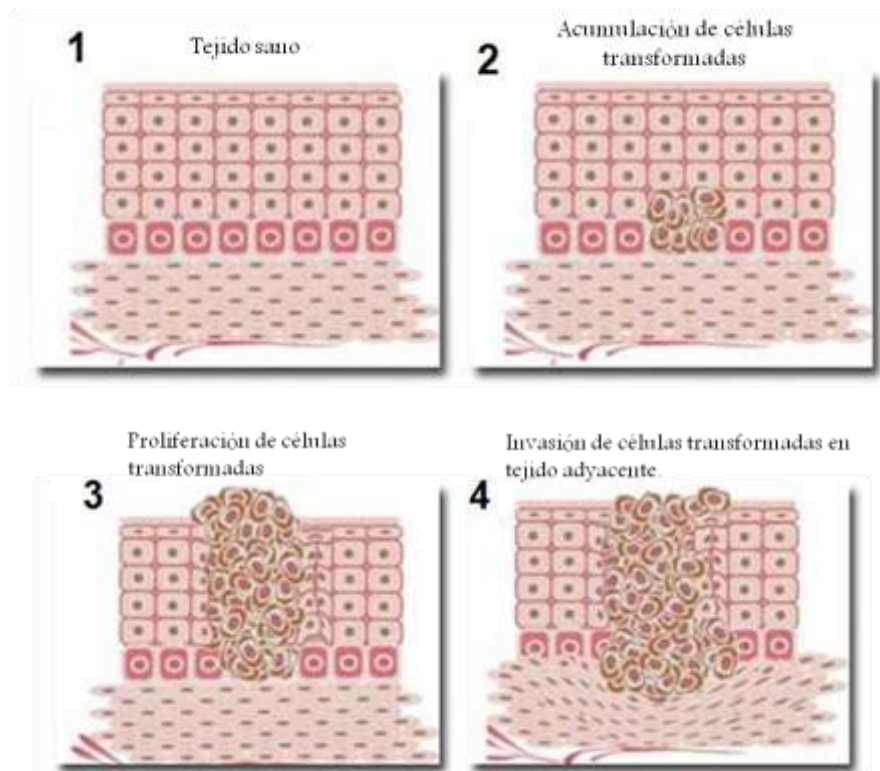
Estos pueden clasificarse en dos grupos principales, de acuerdo con el sitio de infección: cutáneos y mucosos, o bien, de acuerdo al tipo de lesiones que provocan: alto y bajo riesgo. Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (tipos 6 y 11 principalmente) son conocidos como tipos de "bajo riesgo", mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (tipos 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 y 52 principalmente) son conocidos como virus de "alto riesgo".

El ciclo de vida de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo replicativo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones o micro-heridas en el tejido.

Una vez ocurrida la infección, el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El DNA viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular.

Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo.

Para entender mejor el cáncer se debe tener en cuenta que los tejidos sanos producen células de manera constante, mismas que eventualmente mueren. En ocasiones, esta producción genera células transformadas, que no mueren y continúan generando nuevas células transformadas, formando un tumor maligno. Estas células tienen la capacidad de migrar a otros tejidos e implantarse en ellos el proceso es conocido como metástasis. Aunque la producción de nuevas células es un proceso normal en el cuerpo humano existen factores que favorecen el crecimiento de células malignas (Fig. 2).



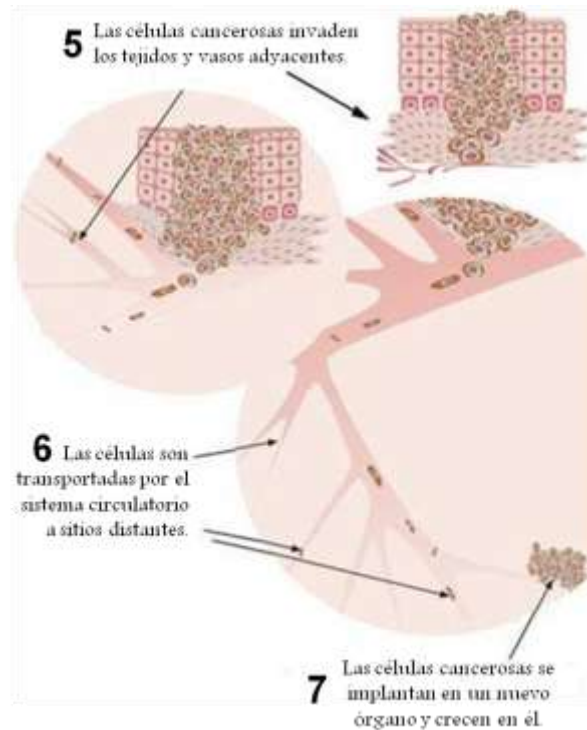


Fig. 2. Etapas que cursa una célula transformada hasta la generación de metástasis. Tejido sano (1) cuando las células han pasado por un proceso de transformación pueden, por un lado, inducir la producción de proteínas que favorecen al ciclo celular y, por el otro, estar inhibiendo la apoptosis (2), de tal forma que estas células comienzan a proliferar abarcando gran parte del tejido (3), inclusive, llega a invadir tejido circundante (4). Dentro de las transformaciones que la célula cancerosa puede presentar es la expresión de proteínas que contribuyan a la sobrevivencia y migración de las mismas en circulación (5 y 6), hasta llegar a implantarse en tejidos distantes del que formaron parte inicialmente además de inducir angiogénesis (7) este proceso es conocido como metástasis.

Se han determinado siete características de las células cancerosas para que puedan generar un tumor, como son: autosuficiencia para señales de crecimiento, evasión ante estímulos apoptóticos, potencial replicativo ilimitado, microambiente inflamatorio, insensibilidad a señales anti-crecimiento, angiogénesis sostenida y capacidad de invadir tejidos ¹¹.

Un paso crucial para la metástasis es la migración, ya que las células deben mantenerse vivas en condiciones adversas para viajar por el torrente sanguíneo evitando la apoptosis.

Migración celular.

La migración celular es esencial para el desarrollo de tejidos y la homeostasis en el sistema inmune, incluyendo la migración de neuronas en embriones desde etapas tempranas y migración de macrófagos y otras células en los tejidos^{9, 10}. Esta movilidad es modulada por las células con capacidad de censar gradientes de quimioatrayentes tales como quimiocinas y factores de crecimiento¹².

La motilidad celular y quimiotaxis puede contribuir de manera importante en la cascada metastásica. En general, las vías de migración celular juegan un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos que pueden ser “ejecutadas” por células cancerosas¹².

Los quimioatrayentes activan vías de transducción de señales que regulan el citoesqueleto y la motilidad. Algunos de estos son quimiocinas y ligandos de factores de crecimiento unidos a receptores de membrana específicos, incluyendo receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y receptores con actividad de cinasa de tirosinas (RTKs). Las quimiocinas pertenecen a una gran familia de péptidos pequeños secretados caracterizados por su capacidad para inducir la migración de leucocitos¹³.

Debido a la importancia de las quimiocinas se han realizado múltiples investigaciones en torno a éstas tratando de dilucidar como afectan en la progresión del cáncer.

Como se mencionó anteriormente, en diferentes tipos de cáncer existen modificaciones a nivel protéico. Es decir sobre-expresión o sub-expresión de proteínas que coadyuvan a la sobrevivencia, proliferación e incluso la migración de las células cancerosas. A este respecto se han reportado dos proteínas sobre- expresadas en muchos tipos de cáncer: la eritropoyetina (EPO) y el stem cell factor (SCF) aunque no se ha establecido la función que estas tienen en las células cancerosas.

ERITROPOYETINA (EPO)

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que actúa como primer regulador de la eritropoyesis, estimulando el crecimiento, previniendo la apoptosis e induciendo la diferenciación de precursores de glóbulos rojos¹⁴. En humanos, el ARNm de EPO codifica para una proteína de 193 aminoácidos^{15, 16}. La proteína sufre una modificación post-traduccional que comprende la escisión de 27 aminoácidos del extremo amino terminal (péptido señal) y pierde también una arginina del extremo carboxilo terminal dando como resultado una proteína madura de 165 aminoácidos (Fig. 3). La EPO contiene dos uniones bisulfuro entre los aminoácidos 7 y 161 y, 23 y 33 que estabilizan la estructura, sin los cuales la molécula tiene una actividad biológica baja. Adicionalmente, la EPO posee 3 azúcares: N-glicosilación en las posiciones 24, 38 y 83, y, O-glicosilación en la posición 126. Las O-glicosilaciones no tienen una función importante conocida, pero la N-glicosilación es necesaria para la estabilidad de EPO en la circulación sanguínea^{15, 16}. La EPO no glicosilada es biológicamente activa pero su vida media es extremadamente corta¹⁷.

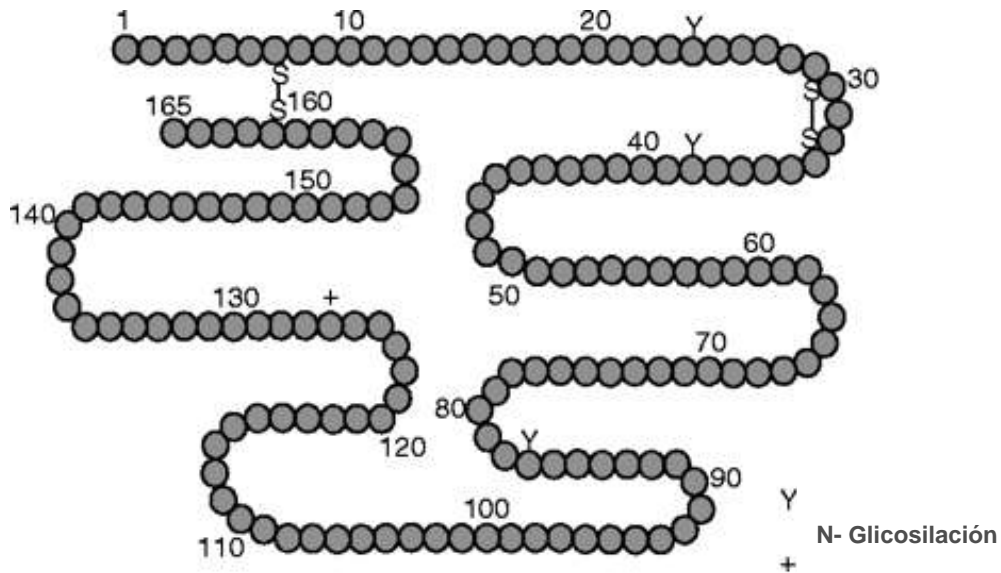


Fig. 3. Eritropoyetina. S-S representan los puentes disulfuro en la molécula que le dan estabilidad a la molécula. En Y es en donde se encuentran los sitios N-glicosilados y en + se representa la O-glicosilación.¹⁶

RECEPTOR PARA EPO (EpoR)

El receptor de eritropoyetina (EpoR) pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas¹⁸. Entre estos se encuentran los receptores de la hormona del crecimiento, prolactina, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, oncostatina M y varias interleucinas. Los receptores en esta familia comparten distintas características: un dominio extracelular de unión al ligando con dos pares conservados de residuos de cisteína y un motivo WSXWS localizado cerca del dominio transmembranal; un dominio transmembranal simple; y un dominio intracelular carente de actividad catalítica (Fig 4). El dominio extracelular contiene 230 aminoácidos al igual que el citosólico¹⁹.

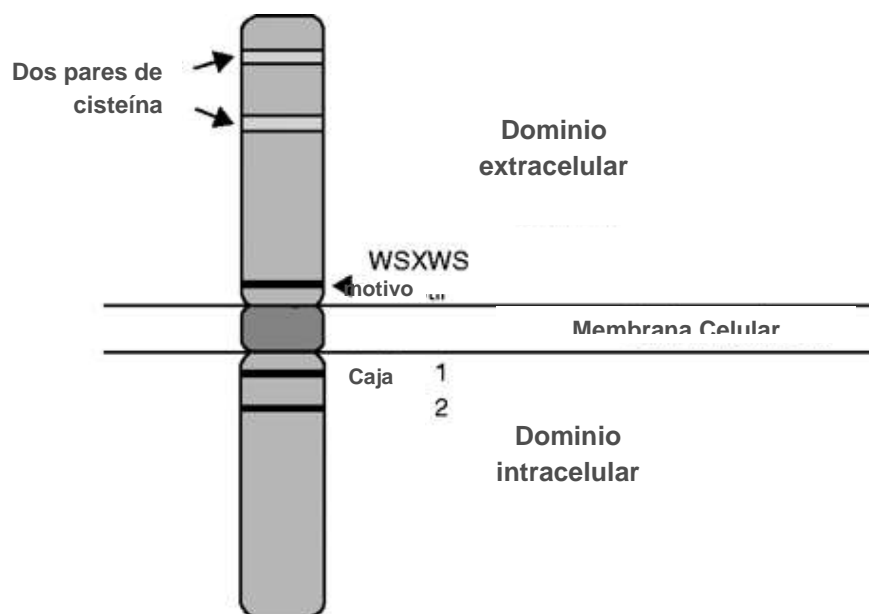


Fig. 4. Receptor de eritropoyetina (EpoR) es un receptor transmembranal con dos pares de cisteína en la superficie y en la parte interna que carece de actividad catalítica.¹⁶

Funcionalidad.

EPO ejerce su efecto induciendo la homodimerización de dos moléculas de EpoR en la superficie celular con lo cual se inicia la cascada de señalización que regula la diferenciación y

proliferación eritroide ^{15, 16, 18}. A diferencia de otros receptores, el EpoR no tiene actividad cinasa de tirosina intrínseca para activar la señalización del receptor. La señalización está mediada por JAK2, una de las proteínas de la familia JAK (cinasa Janus), una cinasa de tirosina constitutivamente asociada al dominio intracelular del EpoR, específicamente en la tirosina Y1007 ²⁰. JAK2 es una de las cuatro JAKs conocidas en mamíferos. Enseguida de la homodimerización del EpoR, las moléculas de JAK2 asociadas a cada uno de los receptores individuales se aproximan, induciendo así su transfosforilación y subsecuente activación (Fig 5). Una vez activada JAK2, se fosforilan varias proteínas intracelulares incluyendo al receptor mismo. Las tirosinas fosforiladas actúan como sitios de anclaje de diversas proteínas intracelulares que contienen dominios homólogos de Src como SHP, PI3K, STAT's ^{16, 18} Shc y CIS ²¹.

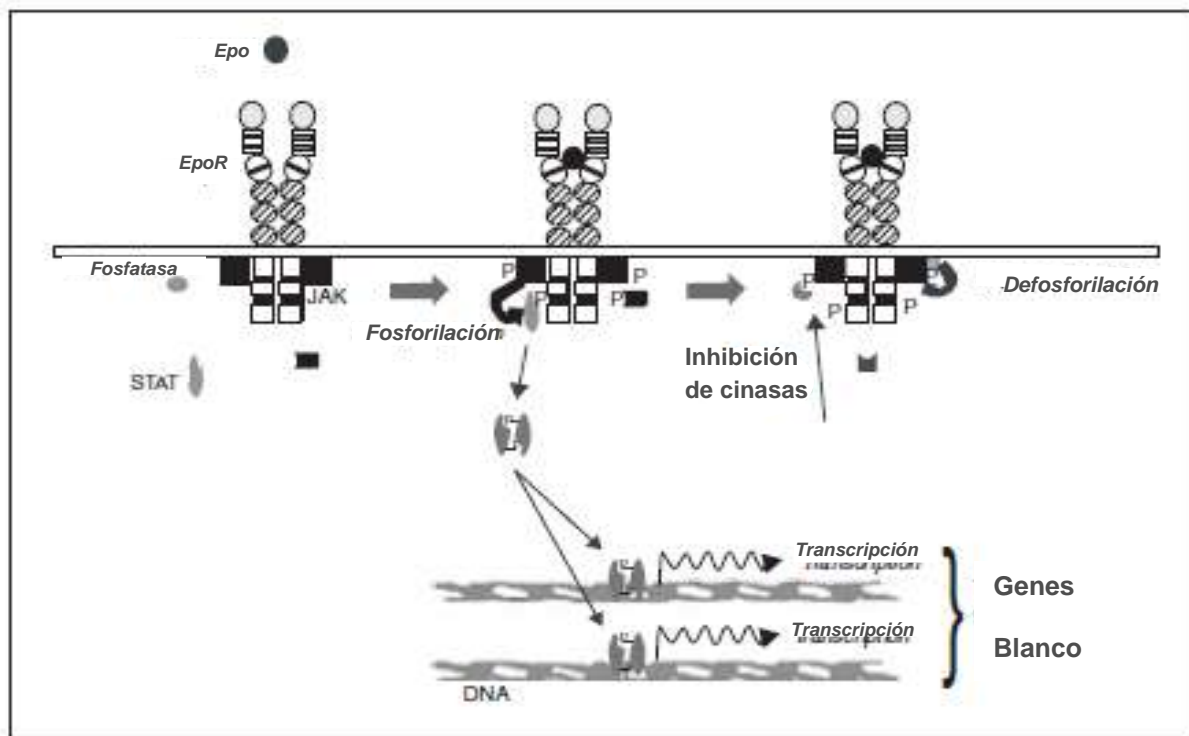


Fig. 5. La estimulación con eritropoyetina (Epo) a su receptor (EpoR), induce la asociación de proteínas intracelulares ancladas al receptor que promueven la activación de la vía JAK/STAT. La inhibición de esta vía se da por defosforilación. ²².

Vía canónica de señalización mediada por EPO (JAK/STAT)

Como ya se ha dicho la interacción de EPO induce la transfosforilación de JAK creando sitios de unión para dominios SH2 de STAT (proteínas transductoras y activadoras de la transcripción). Las proteínas STAT reclutadas pueden ser fosforiladas en un residuo de tirosina en su carboxilo terminal que permite la disociación del complejo JAK-receptor y la dimerización de STATs mediada por interacciones recíprocas entre sus dominios SH2 y sus residuos de tirosina fosforilados. Las STATs diméricas activadas se internalizan al núcleo y se unen directamente al ADN para activar la transcripción. Entre los blancos transcripcionales conocidos para STAT se encuentran cyclina D y myc. Esta vía controla tanto la retroalimentación negativa de la señal así como interacciones con proteínas que activan vías de señalización mediadas por cinasas de tirosina^{23, 24, 25}. Por otro lado, se sabe que EPO mantiene vivas a las células eritroides al prevenir su muerte por apoptosis²⁶. La adición de EPO en células dependientes de EPO incrementan los niveles de Bcl-X, un miembro de la familia Bcl-2 que actúa como una proteína anti-apoptótica²³.

Evidencias experimentales sugieren que esta vía es vital para el desarrollo embrionario, por ejemplo, se ha demostrado que ratones deficientes genéticamente de JAK2 mueren siendo embriones entre los días 13 y 15 debido a anemia severa, con un fenotipo similar a ratones deficientes de EpoR. Sin embargo, tanto el número total de células fetales de hígado y el número de progenitores eritroides están considerablemente disminuidos^{24, 25}. Esto sugiere que JAK2 es requerido en etapas tempranas del desarrollo eritropoyético mediado por EpoR.

JAK2 no es la única cinasa involucrada en la señalización de EpoR, también Lyn un miembro de la familia de cinasa de tirosinas Src está involucrada en la diferenciación inducida por EPO. La línea celular J2E que expresa bajos niveles de Lyn no se diferencia en respuesta a EPO, pero, si la expresión de esta cinasa por infección retroviral se lleva a cabo, entonces se revierte este efecto²¹. La proteína Lyn está asociada con el EpoR en dos vías: su dominio SH2 se une a las tirosinas fosforiladas 464 y 479 y el dominio cinasa se une al EpoR en el aminoácido 92 que se encuentra próximo a la membrana. Los ratones knockout deficientes de esta proteína no tienen

defectos hematopoyéticos por lo que no es claro si Lyn u otras cinasas Src son esenciales para la señalización mediada por EpoR.

Otras vías

La unión de EPO a su receptor induce la fosforilación del producto del proto-oncogene Vav ²⁶. Se ha demostrado que la tirosina fosforilada de Vav cataliza el intercambio de GDP/GTP de Rac-1, una proteína implicada en la proliferación celular y organización del citoesqueleto ²⁷. La fosforilación de Vav inducida por EPO podría estar correlacionada con la señalización de crecimiento del EpoR incluyendo la activación de JAK2 ²⁶. También se ha mostrado que Vav fosforilada interactúa con la fosfotirosina p85, una subunidad reguladora de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) ²⁸ para inhibir la apoptosis.

En respuesta a EPO, los residuos de tirosina en el dominio distal a la membrana del EpoR son fosforilados. Las tirosinas fosforiladas reclutan moléculas de señalización a través de sus dominios SH2 y las moléculas reclutadas son activadas por la subsecuente fosforilación de sus tirosinas, tales moléculas de señalización incluyen una proteína adaptadora conocida como SHC, la subunidad p85 (reguladora de PI3K), PLC γ 1 y la fosfatasa Syp (también llamada SH-PTP2 o PTP-1D). Muchas citocinas activan Ras por inducir la fosforilación de SHC. Otras cinasas transductoras de señal que son fosforiladas en tirosina en respuesta a EPO incluyen GAP ²⁹, c-fps/fes ³⁰, Lyn ³¹ y c-Cbl ³².

Regulación.

La producción de eritropoyetina es regulada a nivel de la transcripción génica ³³ y la hipoxia es el único regulador fisiológico de la expresión del gen de eritropoyetina ³⁴. Aunque la inducción hipóxica de la transcripción del gen de eritropoyetina es una propiedad fundamental de todas las células, los riñones y, hasta cierto punto, el hígado, son los sitios principales de su producción en el adulto. La producción de eritropoyetina en los riñones es máxima y constitutiva; por lo tanto, un incremento en la producción de eritropoyetina renal requiere la transcripción del gen de eritropoyetina en células adicionales ³⁵. Semejante a lo que ocurre en el

riñón, la producción de eritropoyetina en hepatocitos parece ser proporcional al estímulo hipóxico³⁶. El umbral de la producción de la eritropoyetina durante la hipoxia es también alto, pero a pesar de ello, el hígado no puede compensar la producción de eritropoyetina renal, aunque en estado de hipoxia profunda es capaz de hacer una contribución significativa³⁷. No existe almacenamiento de eritropoyetina preformada y un incremento de eritropoyetina plasmática representa la entrada a la circulación de proteína sintetizada *de novo*. Al comenzar la hipoxia en el tejido, HIF1 α entra al núcleo en 2 minutos, dimerizando con HIF1 β y transactivando al gen de eritropoyetina, entre muchos otros³⁸.

Semejante a otros factores de crecimiento hematopoyéticos, la eritropoyetina es también metabolizada por su célula blanco por lo que, posterior a la unión con su receptor, ambos son internalizados³⁹. Con respecto a la eritropoyetina circulante, las células progenitoras eritroides constituyen la más importante población celular en condiciones hipóxicas, no solo en número sino también en densidad de receptores de eritropoyetina. Este comportamiento explica en parte la rápida desregulación de eritropoyetina en plasma⁴⁰. La producción de eritropoyetina puede estar también desregulada ya que el incremento en número de células rojas es compensado y alivia la hipoxia del tejido o incrementa la viscosidad de la sangre⁴¹.

El complejo mecanismo involucrado en la expresión de eritropoyetina inducido por hipoxia está también sujeto a supresión no fisiológica. Individuos con enfermedad renal del parénquima de cualquier tipo, característicamente exhiben alteración en la producción de eritropoyetina renal en proporción al déficit en la función excretora renal. Pacientes con inflamación, infecciones o cáncer tienen una respuesta debilitada para la hipoxia del tumor y el nivel de eritropoyetina en plasma es inapropiadamente bajo para su grado de anemia en ausencia de enfermedad renal intrínseca⁴².

Se ha demostrado que citocinas inflamatorias tales como interferón gamma (IFN γ), IL-1 (α y β), IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) suprimen la producción de EPO tanto *in vitro* como *in vivo*^{43, 44, 45}. El mecanismo de supresión por IL-1 y TNF- α parece no estar involucrado

directamente con HIF1 α ⁴⁶, pero, sin embargo, involucra la activación de los factores de transcripción GATA2 y el factor nuclear κ B, los cuales regulan negativamente la expresión de HIF1 α ⁴⁷.

El requerimiento específico de hierro para la proli hidroxilación de HIF1 α como blanco para su ubiquitinación y degradación proteosomal ³⁴ provee un mecanismo adicional para la supresión de la producción de eritropoyetina. El incremento intracelular de hierro podría promover la degradación de HIF1 α y reducir así la producción de eritropoyetina; la deficiencia de hierro, semejante a hipoxia, tiene el efecto opuesto ⁴⁸.

EXPRESIÓN DE EPO y EpoR EN CÁNCER

Datos recientes han demostrado que el receptor de eritropoyetina no solo está presente en muchos tipos celulares no eritroides tales como células endoteliales ^{49, 50}, células neuronales ⁵¹, células de Leydig ⁵², mieloblastos⁵³ y megacariocitos ⁵⁴, sino también en células tumorales no eritroides y líneas de células tumorales. La expresión del EpoR ha sido reportada, por ejemplo, en carcinoma de células renales humanas ⁵⁵ y carcinoma de células mamarias ⁵⁶, así como en melanoma ⁵⁷, carcinoma renal ⁵⁵, hepatoma HEP3B, carcinoma cervical HeLa, neuroblastoma SHSY5Y, glioblastoma U87, y líneas celulares de glioma U251 y U373 ⁵⁶. La observación de la expresión del EpoR en células cancerosas, acorde a lo reportado, en donde EPO tiene la capacidad de soportar el crecimiento celular, corresponden a la administración de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) en pacientes con cáncer y anemia, esto podría estar ligado a la proliferación o supervivencia de las células cancerosas o estimular la angiogénesis y con ello promover el crecimiento del tumor.

Por otro lado, se ha sugerido al EpoR como marcador de progresión en melanoma. Se ha demostrado que el EpoR está expresado en líneas celulares humanas transformadas derivadas de melanocitos normales y en líneas celulares de melanoma humano derivadas de la metástasis de melanoma, pero no es expresado en melanocitos humanos primarios ⁵⁷. El análisis de subclonas de una línea celular transformada mostró que no todas las subclonas expresan al receptor de EPO y que la expresión del receptor no afecta el crecimiento celular. A raíz de esto se ha concluido que la expresión del EpoR parece estar asociada, pero no absolutamente requerida, para la transformación de melanocitos hacia melanoma maligno y, por ende, el EpoR puede ser un marcador de progresión de melanoma. En otro estudio, se investigaron los efectos de EPO en más de 25 diferentes líneas celulares de tumor malignas y benignas demostrando que el ARNm de EPO y la proteína estaban presentes en la mayoría de las líneas de células tumorales evaluadas, incluyendo líneas de origen no hematopoyético ⁵⁸.

En cuanto al efecto proliferativo dado al estimular al EpoR aún tiene gran controversia, ya que al estimular el receptor con rHuEPO y estudiar la capacidad proliferativa de las células se

encontró que la activación del receptor no es esencial para el crecimiento del tumor. En contraste, existen varios trabajos en los que se asocia dicha activación con la capacidad proliferativa, por ejemplo: en un estudio analizando biopsias de nefrectomía de pacientes con carcinoma de células renales, así como líneas celulares humanas y adenocarcinomas renales de ratón, encontraron que tanto los carcinomas renales de humano como las líneas celulares expresaron el ARNm y la proteína de EpoR y que la activación del receptor con EPO induce la proliferación de las líneas celulares de adenocarcinoma renal de humano y ratón ⁵⁵. Este hallazgo sugiere que la administración de rHuEPO a pacientes con carcinoma renal podría tener el potencial de modificar el crecimiento del tumor al estimular la proliferación celular, y posiblemente al inducir la angiogénesis.

Como ya se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el receptor para eritropoyetina está expresado en muchos tipos tumorales, incluyendo cáncer de mama, el tracto reproductor femenino, cabeza y cuello, y del sistema nervioso central. Con base en análisis por Western blot y hallazgos inmunohistoquímicos, se han reportado altos niveles de expresión tanto de EPO y su receptor en células de cáncer de mama ⁵⁶. Aunque el papel exacto que tiene la eritropoyetina en cáncer no está bien definido, se tiene idea de que la expresión de EpoR en células cancerosas podría contribuir a la proliferación, migración y resistencia a la muerte inducida por quimiofármacos.

En lo que respecta a los carcinomas de los órganos reproductores femeninos se ha observado la expresión del EpoR en biopsias de adenocarcinomas de ovario y endometrio, así como en biopsias de carcinoma invasor de células escamosas del cérvix mediante RT-PCR ⁵⁹. Interesantemente en estudios inmunohistoquímicos se observó que la tinción del EpoR en las biopsias de tumores de endometrio y cérvix era heterogénea ^{60, 61}. También se observó positividad del EpoR en células endoteliales y células del músculo liso del tejido cervical y endometrial ^{60, 61}. También se han analizado biopsias de tumores de ovario y endometrio y se ha determinado la cantidad de EPO producida por cada tumor, encontrando que los adenocarcinomas de ovario y endometrio producen una mayor cantidad de EPO en comparación con los tejidos sanos ⁶².

Como se ha mencionado, la eritropoyesis en los organismos sanos es regulada por la actividad cooperativa de la Eritropoyetina (EPO) y el Stem Cell Factor (SCF), acoplados a sus respectivos receptores, el EpoR y c-Kit.

STEM CELL FACTOR (SCF)

El gen que codifica para la proteína SCF se encuentra en el locus steel (*Sl*) en el cromosoma humano 12q22-q24 y el cromosoma murino 10. SCF también es conocido como ligando de c-Kit y es expresado en dos isoformas después de edición alternativa del exón 6^{63, 64}. La primera isoforma es una glicoproteína de 248 aminoácidos (SCF²⁴⁸) con un peso molecular de 45kD expresada en la membrana celular la cual es escindida por proteasas para generar una proteína soluble de 165 aminoácidos de 31 kD (sSCF o SCF¹⁶⁵)^{65, 66}. La concentración de Stem Cell Factor soluble (sSCF) es de alrededor de 3.3 ng/ml (177 pmol/L) en suero humano⁶⁷. El sSCF se encuentra como homodímero ligado no covalentemente⁶⁸, el cual se disocia espontáneamente y se reasocia en solución⁶⁹. En estudios *in vitro* se observa que más del 50% del sSCF puede ser monomérico bajo condiciones fisiológicas⁷⁰. La segunda isoforma es una glicoproteína de 220 aminoácidos (32kD) también expresada en la membrana celular. Esta forma permanece unida a la membrana (mSCF o SCF²²⁰) pero puede también ser escindida por proteasas para generar la forma soluble^{65, 71} (Fig. 6). La proporción sSCF/mSCF varía considerablemente entre células y tejidos⁷¹, por ejemplo, células cebadas humanas producen más mSCF que sSCF⁷², mientras que en fibroblastos de pulmón y en células de músculo liso bronquial se produce más sSCF que mSCF^{73, 74}.

SCF presenta un centro compuesto de cuatro hélices alfa y dos cadenas beta. El dímero de SCF asociado tiene una estructura simétrica^{75, 76}. mSCF también se encuentra como homodímeros en la superficie celular, y la dimerización puede ser esencial en la etapa de señalización yuxtácrina mediada por mSCF/c-Kit⁷⁷.

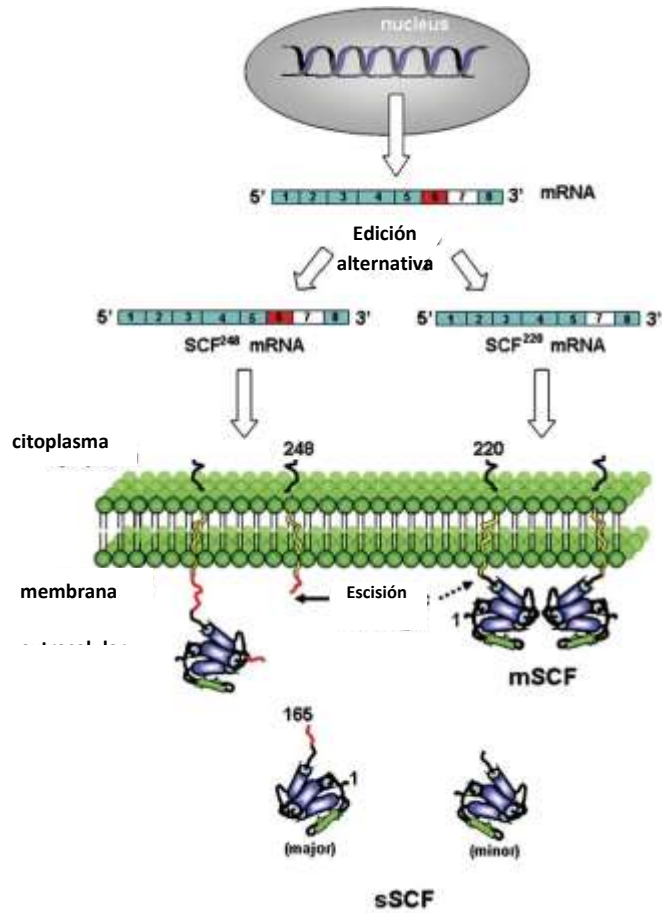


Fig. 6. Traducción y post-traducción del gen que codifica para SCR. Nótese que esta molécula puede concluir en su forma membranaral o soluble. Representación esquemática del producto de la escisión de SCF.

RECEPTOR c-Kit

El receptor c-Kit, con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas, está codificado por el locus *white (W)* en el cromosoma humano 4q11-q12 y el cromosoma murino 5⁷⁸.

Han sido reportadas cuatro diferentes isoformas de c-Kit resultado de edición alternativa. Como se describió para SCF. El receptor c-Kit puede también ser escindido proteolíticamente, permitiendo su desprendimiento de la superficie de células hematopoyéticas, células cebadas y células endoteliales^{79, 80, 81, 82}. La forma soluble de c-Kit se encuentra en el suero humano en una concentración de 324 ng/ml (5.8nmol/L), el cual es alrededor de 33 veces más que la concentración reportada para sSCF⁸³. Este desprendimiento ocurre en el quinto dominio semejante a inmunoglobulina de c-Kit⁸⁴, pero el sitio de corte se desconoce.

El receptor c-Kit pertenece a la subclase III de la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosinas, entre los cuales se encuentra el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGFR y el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR)^{78, 85, 86}.

Funcionalidad

El homodímero de SCF se une a los primeros tres dominios semejantes a inmunoglobulinas de c-Kit (Fig. 8) y media la dimerización del receptor^{87, 88}. Se ha reportado que el sitio de unión al receptor para SCF puede incluir los primeros residuos en el extremo amino terminal⁸⁹, la región entre los aminoácidos 79 y 95^{90, 91} y la región alrededor de la lisina 127⁹⁰.

El dominio intracelular de c-Kit está compuesto de un dominio partido en dos por una región inserto. La dimerización del receptor lleva a una autofosforilación en varias tirosinas en el dominio citoplásmico (Fig. 7). La estructura cristal del dominio cinasa activo de c-Kit ha sido reportado, por lo que podría facilitar el diseño de inhibidores de cinasa potentes y específicos de c-Kit⁹².

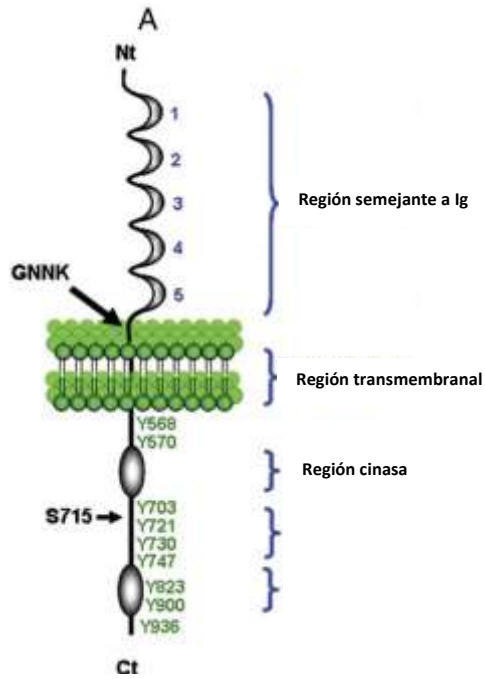


Fig. 7. Receptor c-Kit en su forma heterodimérica. Contiene un dominio extracelular semejante a inmunoglobulina, un dominio transmembranal y una región intracelular con múltiples sitios de tirosina (Y).

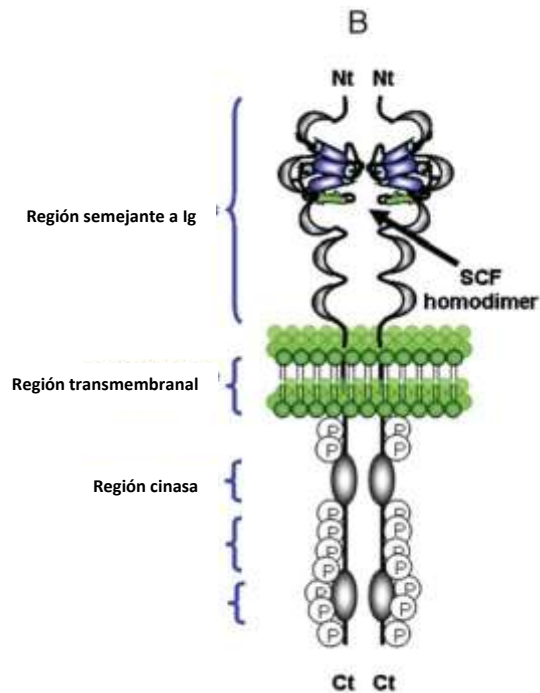


Fig. 8. Receptor c-Kit como homodimero que muestra la interacción en la región extracelular cuando es estimulado por su ligando (SCF).

La unión de homodímeros de SCF induce la homodimerización de c-Kit y la fosforilación intermolecular de tirosinas del receptor, creando sitios de anclaje para diversas moléculas transductoras de señal que contienen dominios de homología Src 2 (SH2), desencadenando así una serie de cascadas de señalización (Fig. 9).

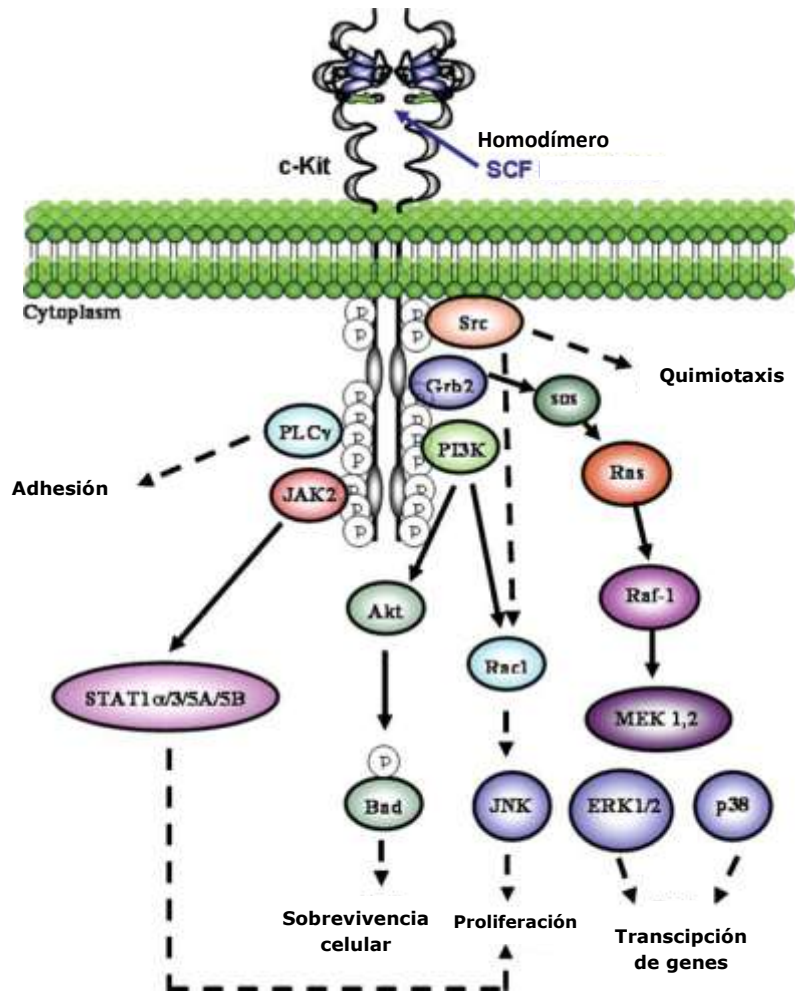


Fig. 9. Cascadas de señalización mediada por la unión de SCF al receptor c-Kit.

Vía MAPK

La proteína 2 de unión a receptores de crecimiento (Grb2) es una proteína adaptadora que se une a las tirosinas fosforiladas Y703 y Y936 de c-Kit⁹³. Grb2 se asocia con al menos siete proteínas *sos*, formando un complejo que interactúa y activa a la proteína G pequeña Ras⁹⁴, lo cual lleva a la activación de Raf-1⁹⁵ y finalmente a la subunidad p38 de la cinasa MAP^{96,97}, ERK ½^{95,96,98}, y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK)⁹⁷. Se ha mostrado que estas cinasas MAP actúan activando factores de transcripción y con ello en la transcripción de genes asociados a la proliferación y diferenciación celular⁹⁹. La transcripción de genes inducido por SCF está también mediada por la activación de la vía Ras/MAPK^{100,101}.

Vía PI3K

El fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3K) interactúa con la tirosina fosforilada Y721 de c-Kit¹⁰². El reclutamiento de PI3K inducido por SCF lleva a la activación de Akt y a la subsecuente fosforilación del factor pro-apoptótico Bad. Esta fosforilación inhibe la actividad de Bad y de este modo promueve la supervivencia celular¹⁰³. Recientemente, en células hematopoyéticas inmortalizadas Myb (MIHC) que expresaban a una mutante de c-Kit en la tirosina Y721, la señalización inducida por SCF fue deficiente para inducir crecimiento celular en dicha línea, en este mismo estudio, el inhibidor Y294002 de PI3K inhibió la supervivencia inducida por SCF en las células transfectadas con c-Kit, de manera dosis dependiente¹⁰⁴. PI3K también media la proliferación inducida por SCF de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC), al activar a la proteína de unión a guanosina trifosfato (GTP) Rac1 y la vía JNK¹⁰⁵. Estos resultados fueron confirmados en células mononucleares de médula ósea (BMMCs) I3K^{-/-}, donde la fosforilación de JNK inducida por SCF y la proliferación celular fue desregulada negativamente¹⁰⁶.

Vía PLC-γ

Estudios previos, utilizando sSCF reportaron que este factor no activa a la fosfolipasa C-γ (PLC-γ)^{107, 108}. Sin embargo, un estudio comparativo usando sSCF y mSCF mostró que la activación de PLC-γ es inducido por el mSCF pero no por el sSCF¹⁰⁸, sugiriendo un efecto diferencial para

ambas formas de SCF en la señalización de c-Kit. PLC- γ se asocia con c-Kit en ausencia de ligando en células murinas transformadas P815, donde c-Kit está constitutivamente fosforilado¹⁰⁹. Usando formas truncadas del receptor c-Kit se observó que PLC- γ se asocia con c-Kit después de la estimulación con el factor de crecimiento epidermal (EGF) en células HEK293 que sobre-expresan un receptor quimera c-Kit-EGF¹¹⁰. Además la transfección de células COS con una forma truncada de c-Kit (tr-Kit) demostró que el dominio cinasa de Kit lleva a la activación de PLC- γ ¹¹¹. El sitio de asociación para PLC- γ es la tirosina Y730 en la región citoplásmica de c-Kit¹⁰⁸. Otros estudios han demostrado, que la activación de PLC- por c-Kit en la protección mediada por SCF contra la apoptosis inducida por radiación o quimioterapia^{112, 113}.

Vía Src

SCF induce la activación de múltiples miembros de la familia Src (oncogene viral [Schmidt-Sruppin A-2] de sarcoma aviar v-src), incluyendo Src, Tec, Lyn y Fyn^{114, 115, 116}. La familia Src se asocia con las tirosinas Y568 y Y570 en el dominio yuxtamembranal de c-Kit^{117, 118}. Las vías de señalización Src y PI3K convergen para activar Rac1 y JNK después de la estimulación con SCF en células BMMC, promoviendo la proliferación celular¹⁰⁵. La reducción en la expresión de la cinasa Lyn (usando oligonucleótidos antisentido) es acompañada por la inhibición de la proliferación inducida por SCF¹¹⁶. En este sentido se ha observado que en células cebadas deficientes de Lyn, la proliferación inducida por SCF es defectuosa, y la transfección de células cebadas murinas con una mutante inhibitoria dominante de Lyn, inhibe el crecimiento inducido por SCF¹¹⁹.

Vía JAK/STAT

SCF induce la activación de JAK/STAT. JAK2 se asocia con c-Kit y es fosforilada después de la estimulación con SCF¹²⁰. La activación de JAK2 da como resultado la fosforilación de varias isoformas de STAT (STAT1 α , 3, 5^a Y 5b)^{121, 122, 123, 124, 125}. Dicha activación está asociada con la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en hígado fetal^{126, 127}.

Regulación.

La proteína cinasa C (PKC) también interactúa con c-Kit fosforilándolo en los residuos S741 y S746. Esta fosforilación lleva a la inhibición de la actividad cinasa de c-Kit^{114, 128}. PKC también media la desregulación de c-Kit induciendo el desprendimiento del dominio extracelular de c-Kit^{90, 129}. La proteína fosfatasa SHP-1 regula negativamente la señalización de c-Kit ya que se une a la tirosina Y570 fosforilada en el dominio yuxtamembranal¹³⁰. Los supresores de señalización de citocinas (SOCS)-1 y 6 también regulan negativamente la señalización de c-Kit. SOCS-1 se une a Grb2 y la proteína vav (oncogen homólogo del virus de vaccinia humano), esto lleva a la inhibición de la proliferación inducida por SCF¹³¹. SOCS-6 interactúa con la tirosina Y568 fosforilada en el dominio yuxtamembranal de c-Kit con ello se inhibe la proliferación y fosforilaciones de p38 y ERK1/2 inducida por SCF¹³². Miembros de la familia Cbl han sido recientemente establecidos como componentes de la maquinaria ligada a ubiquitina involucrada en la degradación de proteínas fosforiladas. Bajo la estimulación de SCF, el reclutamiento de cinasas Src o bien, otras proteínas fosforiladas llevan al reclutamiento de proteínas Cbl para ser fosforiladas¹³³. Una vez fosforiladas, las proteínas Cbl median la ubiquitinación de c-Kit y la degradación a través del proteosoma y/o vía del lisosoma¹³³.

Por otro lado, la internalización del receptor puede ser un mecanismo para atenuar la respuesta celular de SCF. c-Kit es rápidamente internalizado después de la unión a SCF^{81, 129, 134, 135}. La internalización de c-Kit requiere de actividad cinasa intrínseca del mismo, activación de PI3K e influjo de calcio⁸¹. El inhibidor PP1 de la familia Src bloquea la internalización de c-Kit inducida por SCF¹³⁶. Este resultado fue confirmado analizando la internalización de c-Kit usando una quimera funcional c-Kit-EGFP (c-Kit ligado a la proteína verde fluorescente), donde la internalización fue dependiente de Src pero no de PI3K¹³⁷.

Una vez conociendo las generalidades de cada uno de estos receptores y sus respectivos ligandos, podemos introducirnos al efecto que puede tener la estimulación de los mismos en enfermedades como el cáncer.

EXPRESIÓN SCF Y c-Kit EN CÁNCER

SCF es expresado in vitro por varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales bronquiales¹³⁸, miofibroblastos subepiteliales bronquiales¹³⁹, fibroblastos de pulmón^{140, 141, 142}, células del músculo liso bronquial⁷³, células endoteliales¹⁴³, eosinófilos de sangre periférica¹⁴⁴ y células cebadas aisladas de pulmón humano^{145, 146}.

El receptor c-Kit está principalmente expresado en células madre hematopoyéticas y en células cebadas humanas de las vías aéreas¹⁴⁷. Éste también ha sido descrito en eosinófilos de sangre periférica¹⁴⁸ y basófilos circulantes¹⁴⁹. La expresión de c-Kit ha sido reportada en algunas células estructurales, como son células del músculo liso vascular humano¹⁵⁰, células epiteliales¹⁵¹ y en células endoteliales de la vena umbilical^{152, 79}. Estas diversas estirpes celulares que expresan al receptor c-Kit también producen SCF, lo cual estaría hablando de una estimulación autócrina.

Se ha observado la expresión de c-Kit en varios tumores como son: testicular¹⁵³, de tiroides¹⁵⁴, mama¹⁵⁵, colon¹⁵⁶, vejiga¹⁵⁷, renal¹⁵⁸ y cervical¹⁵⁹. Debido a esto, c-Kit ha sido asociado con varias enfermedades malignas. Existen mecanismos que provocan la activación descontrolada de c-Kit tales como loops autócrinos y/o activación mutacional. La activación mutacional ha sido encontrada en pacientes con mastocitosis, tumores de estroma gastrointestinal (GIST) y en leucemia mieloide aguda (AML). Estas mutaciones están localizadas predominantemente en el dominio cinasa o en la región yuxtamembranal de c-Kit, mientras que la activación de c-Kit por loops autócrinos (una misma célula produce tanto a c-Kit como a SCF) han sido identificados en cáncer de células pequeñas de pulmón (SCLC)¹⁶⁰ y neuroblastomas¹⁶¹.

En este contexto, se sabe que c-Kit y SCF también están expresados en tumores ginecológicos. Existe un reporte en donde se analiza la expresión de c-Kit y SCF en líneas celulares de cáncer vulvar (A431), cáncer endometrial (HOUA, RIM 3, RIM 4, HGCM, HHUA, KCC1a, KCC 1b y KMC) y cáncer cérvico uterino (HeLa, CaSKI, SiHa, SKG IIIa, ME180, C33a, y HT 3) y en tejido neoplásico.

En este estudio observaron que c-Kit y SCF se encuentran expresados tanto en líneas celulares como en tejidos tumorales ginecológicos, lo cual sugiere una posible participación del mecanismo autócrino¹⁵⁹.

Ya se ha dicho que para generarse metástasis es necesario que las células curse por varias etapas para poder salir del tejido primario e implantarse en tejidos secundarios tal es el caso de la migración celular.

MIGRACIÓN CELULAR MEDIADA POR EPO/EpoR Y SCF/c-Kit.

Existen evidencias de que los binomios SCF/c-Kit y EPO/EpoR pueden inducir la migración celular.

EPO en migración celular.

Por un lado, se ha observado que la administración exógena de EPO recombinante (rEPO) ha sido asociada con diversos efectos en tejido no hematopoyético. Se ha observado que EPO funciona como citocina proangiogénica en una gran variedad de sistemas experimentales, además rEPO estimula la proliferación y migración de células endoteliales ¹⁶².

Raymond J. Hohl y cols. (2007) demostraron que EPO actúa como quimioatrayente que induce quimiotaxis en células de cáncer cérvico uterino y que este efecto es dependiente de la activación de dos vías de señalización dadas por EPO, la MAPK/Erk y la vía RhoA/RhoA ¹⁶³.

SCF en migración celular

Se ha observado que la movilización de células troncales hematopoyéticas (HSC) involucra la interacción de SCF con c-Kit. Además, la combinación de la citocina G-CSF con SCF es particularmente potente para movilizar células progenitoras tanto en humano como en ratón ^{164, 165}.

Asimismo, se tiene evidencia de que SCF es un factor quimiotáctico de células cebadas in vitro ^{166, 167}. Esto ha sido confirmado por estudios en pacientes asmáticos durante la exposición a polen donde los fluidos bronqueoalveolares presentes tenían una actividad quimioatrayente de células cebadas, la cual fue parcialmente bloqueada por un anticuerpo anti-SCF ¹⁶⁸.

La transducción de señales involucradas en la migración de células cebadas inducidas por SCF incluye la activación de la MAP cinasa p38 ^{169, 170}, y PI3K ¹⁶⁹. Adicionalmente Tan et al, (2003) demostraron que la vía SCF/c-Kit también regula la migración de mastocitos primarios inducida por fibronectina, involucrando a PI3K clase 1A y la vía Rac ¹⁷¹. Además, Takeyama y Manabe 2006 demostraron que la vía SCF/c-Kit está ligada a proliferación e invasión en líneas celulares de cáncer pancreático ¹⁷². Por ejemplo, se ha observado que c-Kit y su ligando (SCF) promueven

la sobrevivencia y la migración de células endoteliales, así como la formación del tubo capilar del cordón umbilical en células HUVEC (Células Endoteliales de la vena umbilical Humanas) y que este efecto es mediado por abajo de la señalización inducida por SCF en su receptor c-kit a través de Akt y Erk 1/2 ¹⁷³. Otro grupo de investigación trabajando con mutantes para c-Kit, (sustituyendo residuos de tirosina por fenilalanina en el dominio citoplásmico), mostraron que ante la estimulación con SCF la migración y movilización de calcio se reduce en comparación con células que no habían sido modificadas, y que la señalización implicada en este proceso de movilización de calcio era la vía MAPK/ERK, mientras que para la migración estaba involucrada la vía PI3K ¹⁷⁴.

CO-SEÑALIZACIÓN ENTRE EpoR Y c-Kit.

Se ha observado que el crecimiento y expansión de progenitores eritroides comprometidos requieren de la transducción de señales dadas tanto por c-Kit como de EpoR. Así mismo, SCF induce tanto crecimiento como supervivencia de progenitores eritroides y esta respuesta es profundamente amplificada en combinación con EPO. Este tipo de cooperación entre c-Kit y EpoR ha sido descrita *in vitro* con respecto a la generación de unidades formadoras de blastos eritroides (BFU-e) y unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-e) *in vivo* bajo la co-administración de SCF y EPO. Sin embargo, las bases de esta co-señalización son pobremente conocidas. Con este fin, estudios bioquímicos han provisto evidencia de una asociación física entre c-Kit y EpoR vía la caja 2 del dominio citoplásmico del receptor de eritropoyetina. Sin embargo, la co-estimulación de una línea celular de progenitores eritroides con SCF y EPO mostró la fosforilación de EpoR en residuos de tirosina ⁴¹.

Wu y cols. utilizando varias mutantes truncadas de EpoR han mostrado que la estimulación de c-Kit por SCF no activa a EpoR por inducir su dimerización, sino por la fosforilación en residuos de tirosina en el dominio citoplásmico de EpoR ⁴². Estas evidencias sugieren que hay cooperatividad entre estos dos receptores, por lo que es probable que también haya participación de ambos en el evento de migración celular.

JUSTIFICACIÓN

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que células derivadas de tumores cérvico uterinos expresan en su membrana tanto al EpoR como a c-Kit, y que son capaces de responder al estímulo producido tanto por EPO como por SCF exógenos. Por lo tanto, en el presente trabajo hemos decidido estudiar si la activación de estos receptores de manera individual y en conjunto pueden estimular la migración de células de carcinoma cérvico uterino, incrementando así su potencial metastásico.

HIPÓTESIS

Dado que las células derivadas de tumores cérvico uterinos expresan tanto a EpoR como a c-Kit, la presencia de EPO y SCF exógenos, estimulará la capacidad migratoria de dichas células, incrementando así su potencial metastático.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la activación de los receptores EpoR y c-Kit en el potencial migratorio y de crecimiento independiente al anclaje de células derivadas de tumores cérvico uterinos en cultivo.

Objetivos particulares.

- Determinar si los receptores c-Kit y EpoR se encuentran expresados en líneas celulares derivadas de tumores cérvico uterinos CaLo e InBl.
- Determinar el efecto de EPO recombinante humana (rHuEPO) y SCF exógenos, administrados individualmente o en conjunto, sobre la capacidad migratoria de células CaLo e InBl.
- Determinar el efecto de EPO recombinante humana (rHuEPO) y SCF exógenos, administrados individualmente o en conjunto, sobre la capacidad de crecimiento independiente al anclaje de las células en cultivo.
- Evaluar las vías de señalización que se activan en las células estimuladas y que inciden en su capacidad migratoria.

M A T E R I A L Y M É T O D O S

Material biológico

En el presente trabajo se estudiaron dos líneas celulares llamadas CaLo e InBl. Dichas líneas celulares fueron donadas de la FES-Zaragoza. Ambas, son líneas celulares desarrolladas a partir de carcinoma cervical epidermoide de células grandes no keratinizadas. La particularidad entre ellas es que las células CaLo se obtuvieron a partir de una paciente que no había desarrollado metástasis (FIGO, etapa IIB) y las células InBl de otra paciente que fue diagnosticada con metástasis (FIGO, etapa IVB).

La línea celular CaLo fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (InVitro) suplementado con 2% de suero fetal bovino (Invitrogen Life Technologies) y antibióticos 10,000 U/ μ g/ μ l (penicilina-estreptomicina, InVitro). Por otro lado, la línea celular InBl, se mantuvo en medio RPMI 1640 (InVitrogen) suplementado de igual forma.

Las células leucémicas, K562 utilizadas en algunos ensayos como control positivo para la expresión de EpoR, fueron mantenidas en RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) conteniendo 10% de suero fetal bovino.

Cabe señalar que todas las líneas se mantuvieron en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y humedad constante.

Análisis de Western Blot.

Las células fueron resuspendidas en solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; 0.25% deoxicolato de sodio), conteniendo 100 μ l/ml de coctel inhibidor de proteases completo (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and 10 μ l/ml de inhibidores de fosfatas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para el aislamiento de proteínas de membrana, las células fueron resuspendidas en una solución de lisis que conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 0.05% SDS. La cantidad de proteína total obtenida fue determinada usando el "DC protein assay kit" (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). 30 μ g de protein fue resuelta en 10% SDS-PAGE y transferida en membranas "PVDF" (Millipore, Billerica, MA, USA). Las membranas fueron incubadas a 4°C,

toda la noche con anticuerpos específicos diluídos 1:1,000, posteriormente lavados e incubados con e apropiado anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluído 1:5,000 (Zymed Laboratories, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para la detección de c-Kit, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo polyclonal anticabra biotinilado (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) diluído 1:2,000 durante 2 hrs. a temperatura ambiente, seguido de la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a estreptavidina (DakoCytomation) diluído 1:3,000 por 2 h a temperatura ambiente. Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia usando el "Amersham ECL plus Western Blotting Detection System" (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA). Para la detección de EpoR humano, un anticuerpo anti EpoR humano de cabra (Sigma-Aldrich). Para estudiar las cascadas de señalización, se usaron: anti-STAT5 de conejo, anti- fosfoTyr694 de STAT5 de conejo, anti ERK1 de conejo y anti ERK1 y 2 fosforilado en diferentes posiciones (Thr185 + Thr202 + Tyr204 + Tyr187); todos de GeneTex Inc. (Irvine, CA, USA). Como control interno se incluyó anti-GAPDH de conejo (GeneTex Inc.).

Citometría de Flujo.

Las células fueron cosechadas, fijadas en 2% de paraformaldehído y teñidas con anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluoróforos: anti-EpoR conjugado a carboxyfluorescein y c-Kit CD117 conjugado a ficoeritrina. Ambos adquiridos a R&D Systems y diluídos 1:4 en PBS por una hora. Las células fueron lavadas con PB y analizadas usando un FACScalibur con software Cell Quest (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Ensayos de proliferación y sobrevivencia celular.

Para evaluar la proliferación celular, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) (1, 10, 20, 30 y 50 U/ml; Sigma Aldrich). La proliferación fue determinada por el ensayo colorimétrico de MTT. Para evaluar el efecto de SCF en la sobrevivencia, las células fueron incubadas in medio de cultivo sin

SFB y tratadas con 15U/ml de Stem Cell Factor (SCF) o no tratadas durante 14 días. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo MTT.

Ensayo de migración celular.

El efecto de EPO y SCF en la migración fue evaluada usando el ensayo colorimétrico de migración de 24 pozos "QCM™" (Chemicon International, Millipore, Temecula, CA, USA), el cual está basado en el uso de cámaras de Boyden.

Las células fueron cultivadas e incubadas 12 hrs. para cada ensayo en medio libre de suero. 1×10^5 células fueron sembradas dentro de la cámara superior en 300 μ l de medio libre de SFB y entonces suplementadas con 5% de albúmina de suero bovino (BSA). En 500 μ l libres de suero que contenían 5, 10, 20 y 30 U/ml de EPO o SCF, o combinaciones de 10/20, 10/10 y 30/30 U/ml de EPO/SCF fueron depositados en la cámara inferior. Como control negativo, fue usado medio libre de suero y como control positivo, medio suplementado con 10% de SFB. Los platos fueron incubados por 24 hrs. La migración celular fue determinada por medición colorimétrica a 560 nm.

Ensayo de clonogenicidad.

1×10^3 células fueron sembradas en 0.3% de agar en medio de cultivo con 5% de SFB y 30U/ml de EPO o 15U/ml de SCF, o bien por la combinación de 30 U/ml de EPO y 15 U/ml de SCF, sobre una capa de 0.6% de agar en placas de 24 pozos. Pasados 7 días de incubación, las colonias fueron teñidas con una solución que contenía 1% de colorante cristal violeta en 20% de metanol, y las colonias fueron contadas.

Inhibición de receptores.

Para inhibir la expresión de EpoR en la membrana celular, las células fueron incubadas con 20 μ M de lovastatina (Sigma-Aldrich), la cual es un inhibidor selectivo de la 3-hidroxy3-metilglutaril coenzima A reductasa, por 20 hrs. a 37°C. La inhibición de la expresión fue evaluada mediante

western blotting de extractos de proteína membranal. Para la inhibición transiente de la expresión del gen c-Kit, fue usado un siRNA comercial (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Como control negative, las células fueron transfectadas con “scrambled RNA”. Las células fueron preincubadas en medio libre de antibiótico durante 24 hrs. Los siRNAs fueron diluídos en medio de transfectio, mezclados con el reactivo de transfección e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. La mezcla fue puesta en las células e incubada por 7 hrs. a 37°C. El medio de cultivo que contenía una doble concentración de SFB y antibióticos fue adicionado sin remover la mezcla de transfección e incubado por 24 hrs. El medio fue reemplazado con medio de cultivo nuevo y suplementado con 10% de SFB y las células fueron sometids al ensayo 48 hrs después. La expresión de c-Kit fue evaluada por western blottin. Para inhibir la fosforilación de JAK2, las células fueron incubadas con 10 μ M de Tirfostina AG490 (Sigma-Aldrich) diluída en etanol por 24 hrs. La vía PI3K fue inhibida mediante la incubación de las células con 100 nM de Wortmanina (Sigma-Aldrich) diluída en DMSO por 24 hrs. Para inhibir la cinasa ERK1/2 las células fueron incubadas con 20 μ M de etanolado U0126 (Sigma-Aldrich) diluído en DMSO por 24 hrs.

Aislamiento de células que expresan c-Kit.

Las columnas y reactivos para este ensayo fueron abastecidos por Miltenyi Biotec (Teterow, Germany). Para el aislamiento de células positivas a c-Kit, el kit MicroBead CD117 incluyendo el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD117 humano conjugado a microperlas paramagnéticas fue usado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Suavemente, 1×10^8 células fueron resuspendidas en 300 μ l de solución para columna, luego 100 μ l of solución bloqueadora “FcR” y 100 μ l of Micro perlas CD117 fueron agregados; las células fueron incubadas durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, lavadas las células, fueron resuspendidas en 500 μ l of buffer. Las columnas LS fueron colocadas en el magneto y lavadas con 3 ml de buffer, entonces la suspensión celular fue depositada dentro de la columna. La columna fue lavada tres veces y las células no marcadas salían del flujo y fueron colectadas para su análisis. La columan fue

separada del magneto y se adicionaron 5 ml de buffer y las células magnéticamente marcadas fueron fluyendo y despegándose de la columna.

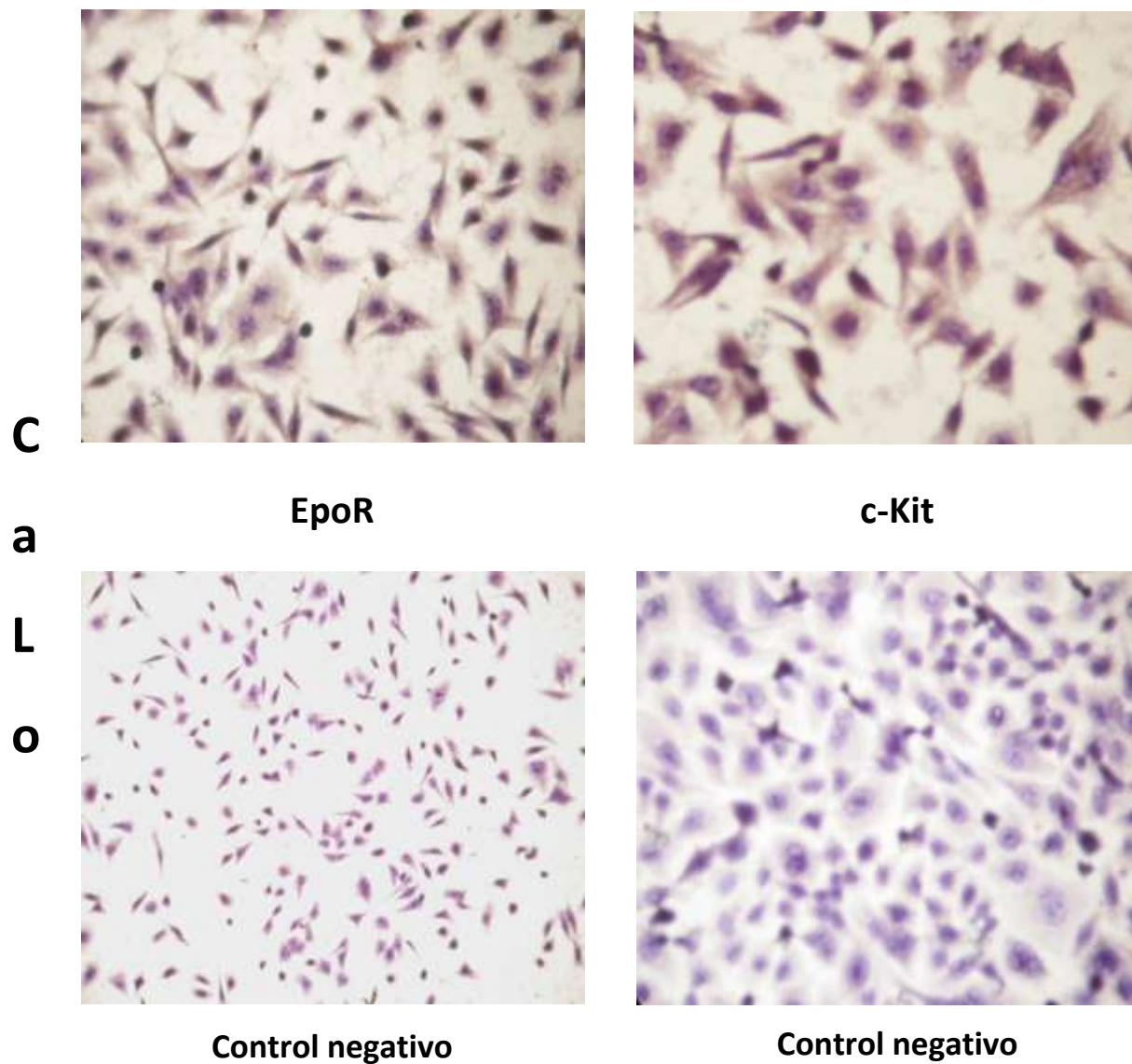
Análisis estadístico.

Los resultados son presentados como la media de error estandar \pm (SEM). Fue usada la prueba t para la comparación entre grupos de tratamiento y entre líneas celulares. Los intervalos de confianza (CI;95%) y valores P fueron calculados. Las pruebas fueron de dos colas y una $p < 0.05$ fue considerada para indicasr un resultado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Expresión de receptores en cultivos celulares.

Primeramente se evaluó la presencia de los receptores EpoR y c-Kit en cultivos de células CaLo e InBl mediante inmunocitoquímica. Los resultados se muestran en la Fig. 10, donde es posible apreciar que en ambas líneas celulares existe una tinción positiva (color marrón) tanto para el receptor de EPO como para el receptor de SCF.



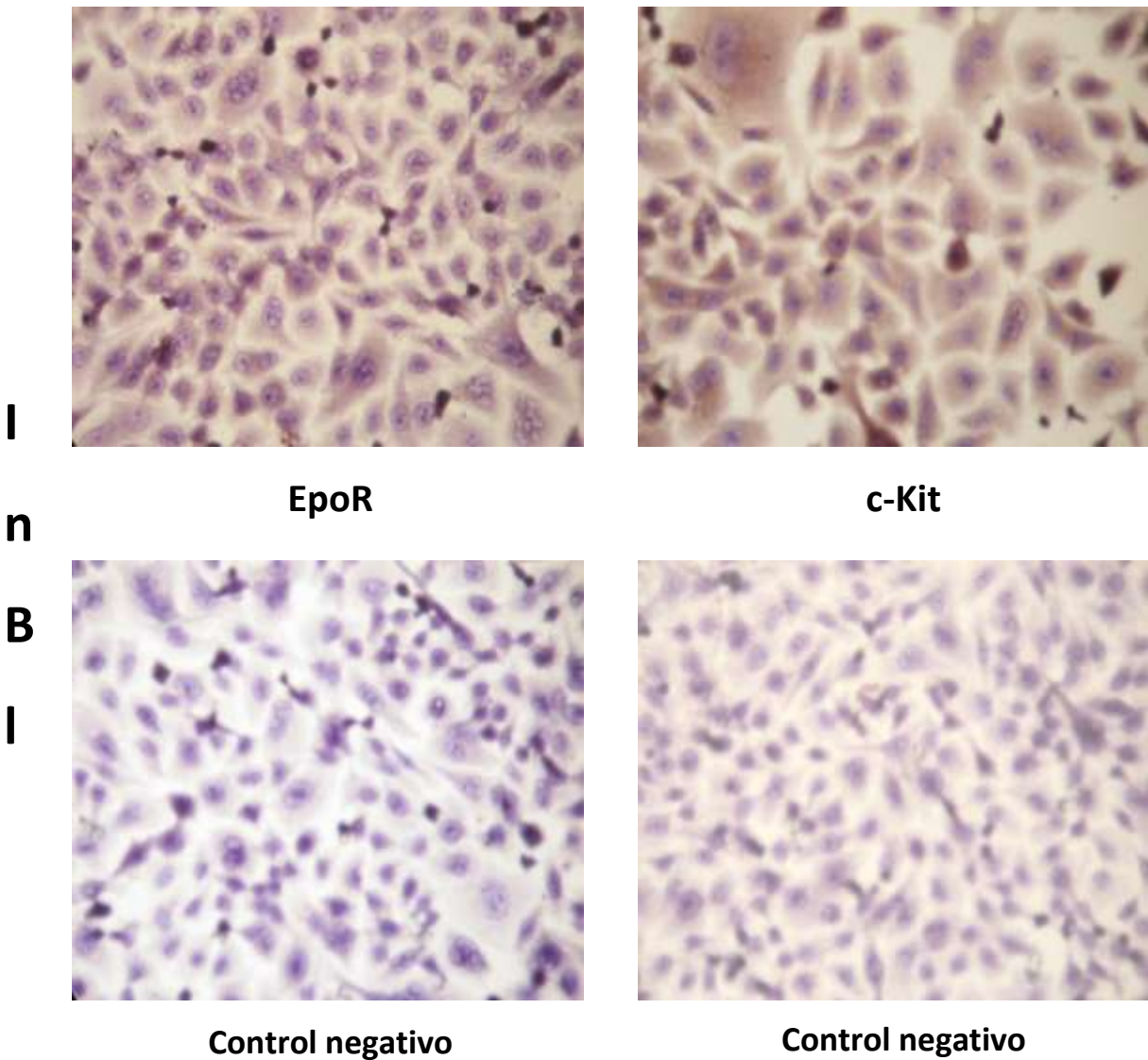


Fig. 10. Tinción inmunocitoquímica en los cultivos celulares CaLo e InBI. En estas células se aprecia la tinción marrón citoplásmica que indica la expresión de EpoR y c-Kit. Como control negativo se incluyeron células que fueron incubadas solamente con el anticuerpo secundario.

Una vez que se determinó la presencia de los receptores por inmunocitoquímica en las líneas celulares en estudio procedimos a analizar la expresión del EpoR y de c-Kit mediante Western blot y citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos marcados con fluoresceína y

rodamina respectivamente, para poder hacer un estudio cuantitativo del porcentaje de células que presentan a uno u otro receptor. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

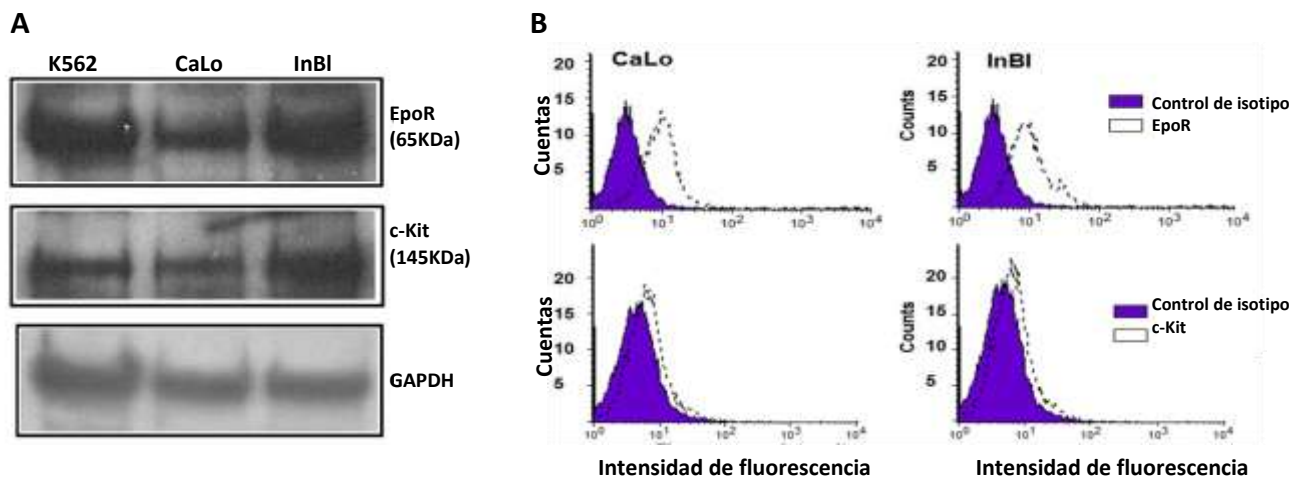


Fig. 11. Expresión de EpoR y c-Kit en líneas celulares de cáncer cervical. (A) Expresión de EpoR y c-Kit analizada en extractos de proteínas membranales de células CaLo e InBl por western blot. (B) Expresión de EpoR y c-Kit en la superficie celular de CaLo e InBl evaluada por citometría de flujo.

El análisis por Western blot demostró la presencia de una banda del peso molecular esperado para EpoR (65 kDa) y para c-Kit (145 KDa) en ambas líneas celulares. Dicha banda es similar a la detectada en las células K562, que fueron incluidas como un control positivo de la expresión de ambos receptores (Fig. 11A). Como puede observarse en la Fig. 11B, el estudio por citometría de flujo mostró que la línea celular CaLo expresa al receptor EpoR en un 56.8% de la población, mientras que el receptor c-Kit está presente en un 12.8% de las células. Ahora bien, para la línea celular InBl encontramos que el receptor de eritropoyetina se encuentra expresado en el 85.7% de las células y el receptor c-Kit en el 11.4%. Ahora bien, notamos que la expresión del EpoR es diferencial para cada una de las líneas, es decir que la proporción de células que expresan este receptor en InBl es mayor comparado con la línea celular no metastásica (CaLo),

por otro lado, el receptor c-Kit se encuentra expresado en una proporción semejante en ambas líneas celulares.

Efecto de la EPO en la proliferación celular.

Dado que se ha observado que la estimulación exógena del EpoR conlleva una respuesta proliferativa en la célula, hicimos estudios de viabilidad celular por MTT, para determinar indirectamente el potencial proliferativo de las células y encontramos que el estímulo con EPO contribuye a la proliferación de cultivos celulares (Figura 12). Podemos observar que la mejor respuesta proliferativa se alcanza cuando se adicionan 30U de eritropoyetina. Con ello podemos determinar que el receptor EpoR en ambos cultivos es activo al desencadenar una respuesta proliferativa.

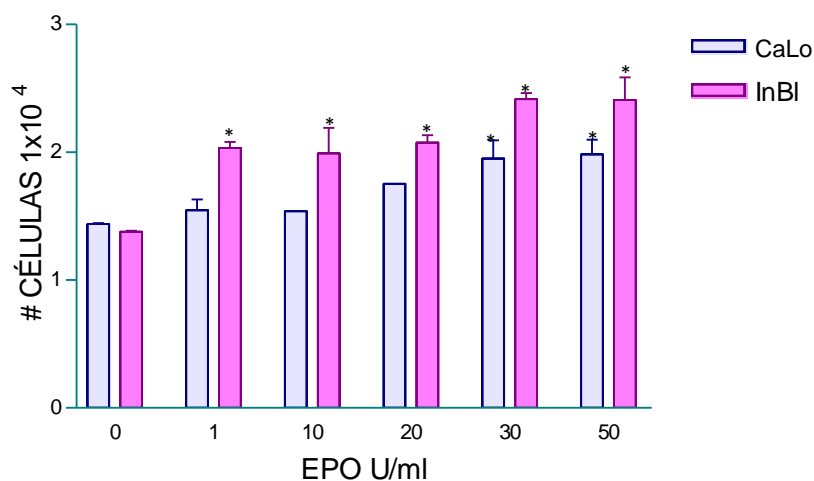


Fig. 12. Efecto de EPO en la proliferación celular. Células CaLo e InBl fueron incubadas con las concentraciones indicadas de eritropoyetina recombinante humana (EPO) por 4 días. El número de células viables fue determinado por el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras indican el valor estándar de la media. * $p < 0.05$ comparado con las células sin tratamiento.

Efecto del SCF en la supervivencia de las células en ausencia de nutrientes.

Se ha reportado que en cultivos celulares que expresan al receptor c-Kit y carecen de nutrientes provenientes de suero fetal bovino, la estimulación con SCF exógeno es suficiente para mantener viables los cultivos celulares¹⁶¹, por ello, medimos la viabilidad de los cultivos depletándolos de suero y manteniéndolos en incubación por períodos de tiempo largos (14 días), observamos que tanto las células CaLo como las InBl fueron incapaces de proliferar en ausencia de los nutrientes aportados por el suero fetal bovino. Por otra parte, las células CaLo mostraron mayor viabilidad en presencia de SCF comparada con lo observado en el cultivo sin SCF a los 14 días (Fig. 13A). En el caso de las células InBl, la presencia de SCF no solo ayudó a mantener la viabilidad celular en ausencia de suero, sino que además indujo la proliferación del cultivo a los 7 y 14 días (Fig. 13B).

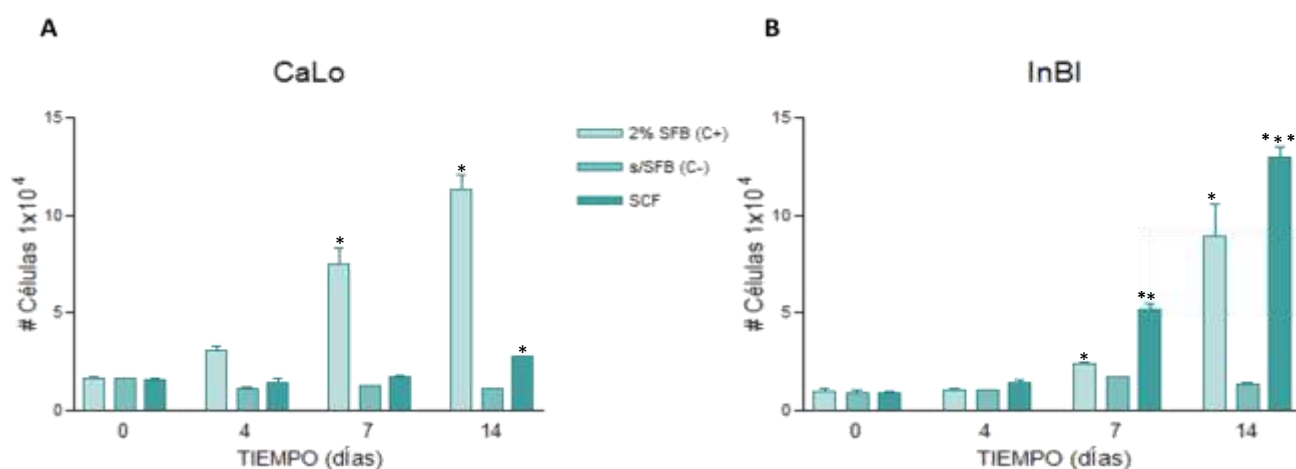


Fig. 13. Efecto del SCF en la supervivencia celular. Células CaLo (A) e InBl (B) fueron cultivadas en ausencia de suero fetal bovino (S/SFB), sin suero y con 30 U de SCF (S/SFB + SCF), o en presencia de 2% SFB (2% SFB) como control positivo por 14 días. El número de células viables fue evaluado por el ensayo de MTT a los tiempos indicados. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras indican el valor estandar de la media. * $p < 0.05$ comparado con las célula sin tratamiento.

Con estos resultados determinamos que el receptor c-Kit tiene actividad protectora ante la muerte por ausencia de nutrientes, con lo que podemos inferir que el receptor es activo en nuestros cultivos celulares.

Los resultados hasta ahora presentados corroboran que los receptores EpoR y c-Kit presentes en las células son funcionales al ser estimulados con sus respectivos ligandos (EPO y SCF).

Efecto de la EPO y el SCF en la migración de células CaLo e InBl.

Una vez analizada la funcionalidad de los receptores en nuestros cultivos procedimos a evaluar la capacidad migratoria de las células CaLo e InBl mediada por los receptores EpoR y c-Kit al ser estimulados con sus respectivos ligandos: EPO y SCF.

En todos los ensayos de migración se utilizaron 5×10^4 células y el periodo de incubación con el estímulo fue de 24 hrs. Los resultados son expresados en porcentaje de migración.

Por un lado, se estimularon las células con EPO y SCF con 5, 10, 20 y 30 unidades respectivamente. Los resultados se muestran en la Fig. 14. En ella podemos apreciar que la migración es inducida por ambos estímulos.

En las células CaLo, EPO y SCF inducen de manera similar la migración, incrementando significativamente el promedio de células que migran en un 20%. Por otro lado, en las células InBl podemos apreciar que la EPO induce un incremento significativo en la migración desde 5U ($p < 0.05$). Sin embargo, el mayor incremento inducido por EPO es del 30%. En contraste, el SCF, indujo un incremento en la migración del 40% al usar 5U ($p < 0.005$). Cabe mencionar que 10, 20 y 30 U de SCF también produjeron un aumento significativo en la migración ($p < 0.05$).

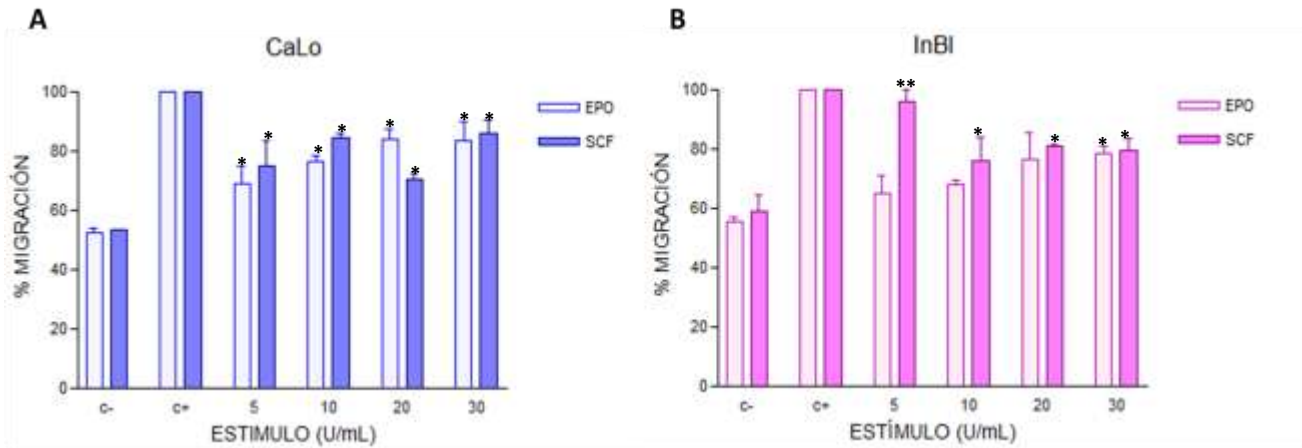


Fig. 14. Migración celular inducida por EPO y SCF. Células CaLo (A) e InBI (B) fueron sembradas en cámaras de Boyden. La migración inducida por suero fetal bovino (C+), o las concentraciones indicadas de EPO y SCF fue evaluada a las 24 hrs. C- - células sin suero fetal bovino. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras indican el valor estándar de la media. * $p < 0.05$ comparado con las célula sin tratamiento.

Estos resultados sugieren fuertemente que la activación de los receptores EpoR y c-Kit tiene una participación en el evento de migración celular.

Se ha demostrado que la estimulación de ambos receptores puede tener un efecto sinérgico en la proliferación¹⁷⁵, por lo que se realizaron los mismos ensayos de migración estimulando con los ligandos de EpoR y c-Kit pero en esta ocasión adicionados en conjunto.

Se adicionaron tres diferentes combinaciones de los estímulos EPO/SCF para cada línea celular y se analizó el porcentaje de células migratorias a las 24 hrs. de incubación. Los resultados se muestran en la Fig. 15.

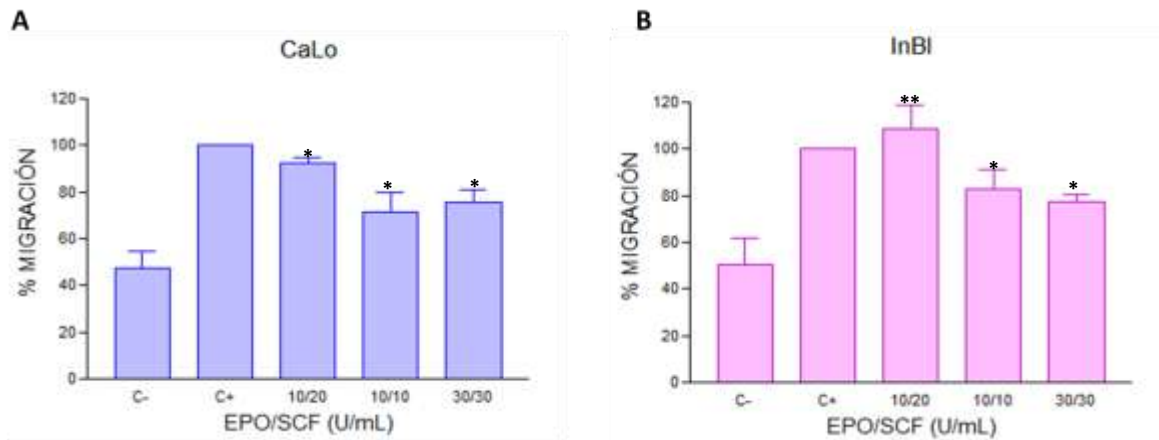


Fig. 15. Migración celular inducida por la coestimulación de EPO y SCF. Células CaLo (A) y células InBl (B) fueron coestimuladas con las concentraciones indicadas de EPO y SCR (EPO/SCF) en cámaras de Boyden durante 24 hrs. Medio libre de suero (-) y medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (+) fueron incluidos como control negativo y positivo respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras indican el valor estandar de la media. * $p < 0.05$ comparado con las célula sin tratamiento.

En la Fig. 15 se puede apreciar que las diferentes combinaciones de Epo y SCF inducen la capacidad migratoria de las células siendo más efectiva la combinación de 10U de EPO con 20U de SCF. Para la línea celular CaLo dicha combinación provoca un incremento migratorio del 44.95% ($p < 0.05$), mientras que para las células InBl esta misma combinación induce un incremento del 58.15% ($p < 0.005$), con respecto al control negativo sin suero, incluso las células rebasan la capacidad migratoria inducida por el control positivo (SFB).

Estos resultados muestran que las células CaLo e InBl responden de manera diferente al ser estimulados sus receptores EpoR y c-Kit, y que las células InBl tienen mayor capacidad de migrar al ser estimuladas con EPO y SCF.

Efecto de EPO y SCF en la capacidad clonogénica.

Una de las características que deben tener las células para poder generar metástasis es su capacidad de formar colonias en condiciones adversas. Por lo anterior, decidimos evaluar el efecto de EPO y SCF en la formación de colonias, montamos un ensayo de clonogenicidad en medio de cultivo semisólido y adicionamos los ligandos de los receptores EpoR y c-Kit para observar la formación de colonias. Como puede apreciarse en la Fig. 16, el tratamiento con EPO no fue capaz de inducir la formación de colonias en ninguna de las líneas celulares. Por otro lado, el estímulo con SCF indujo la formación de 9 colonias en la línea celular CaLo y 110 colonias para la línea celular InBl. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 17, la combinación de EPO y SCF provocó la formación de 19 colonias de células CaLo y de 652 colonias de células InBl.

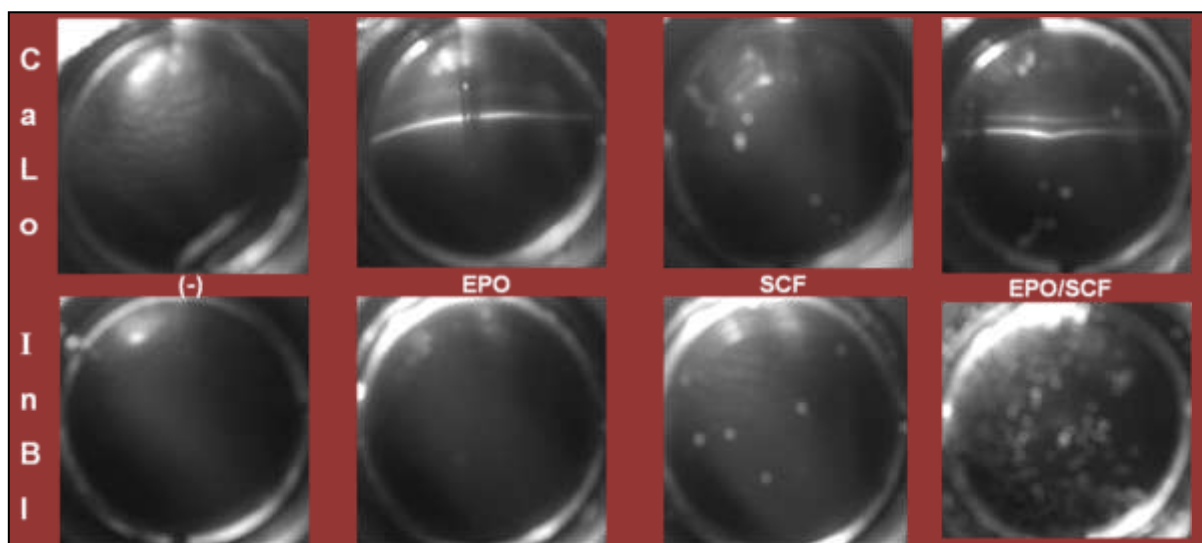


Fig. 16. Ensayo de clonogenicidad. 500 células CaLo e InBl fueron sembradas en medio de cultivo semi-sólido en ausencia (-) o presencia de 30 U de EPO, 15 U de SCF, o una combinación de ambos (EPO/SCF). Las colonias formadas después de 3 días se observan en esta fotografía representativa.

Este dato es relevante ya que este cultivo proviene de células metastásicas, lo cual podría indicar que la presencia de ambos receptores son importantes para que las células puedan implantarse en algún tejido distante.

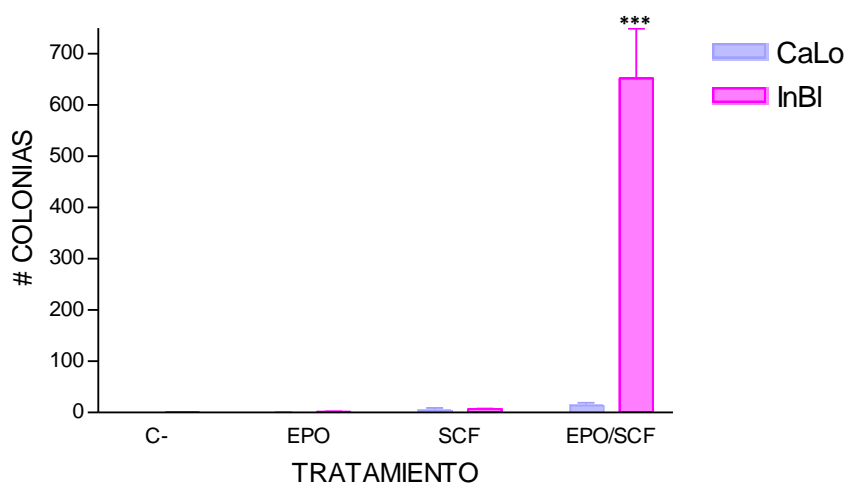


Fig. 17. Gráfica de clonogenicidad. 500 células CaLo e InBl fueron sembradas en medio de cultivo semi-sólido en ausencia (-) o presencia de 30 U de Epo, 15 U de SCF, o una combinación de ambos (EPO/SCF). Las colonias formadas después de 3 días fueron contadas usando un estereoscopio. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras indican el valor estándar de la media. * $p < 0.05$ comparado con las células sin tratamiento.

Selección positiva de células que expresan c-Kit.

Las células InBl positivas al receptor c-Kit fueron separadas por selección positiva en columnas magnéticas y se colectaron tanto las fracciones negativas como positivas. Posteriormente se realizó un marcaje directo con anticuerpos que reconocen a los receptores acoplados a un fluorocromo y se pasaron por el clitómetro para conocer la eficiencia en la separación. Los resultados obtenidos son mostrados en la Fig. 18. Al analizar la fracción celular obtenida como

c-Kit⁻ y teñir contra c-Kit apreciamos que solo un pequeño porcentaje de la población (5.28%) eran positivas al receptor.

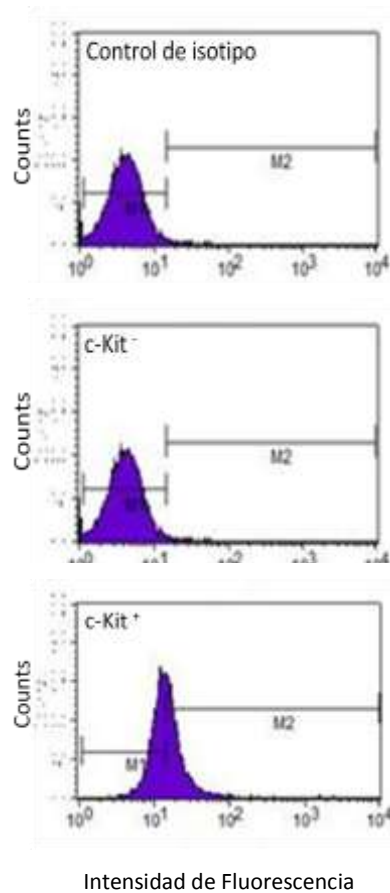


Fig. 18. Separación de células InBl. Las células InBl que expresan el receptor c-Kit (c-Kit⁺) fueron separadas usando un anticuerpo anti-CD117 conjugado a microperlas paramagnéticas. Las células negativas a la expresión del receptor fueron también colectadas (c-Kit⁻). La pureza de las poblaciones separadas fue corroborada mediante citometría de flujo. Se incluyó una prueba utilizando un control de isotipo).

Una vez obtenidas las dos poblaciones (positivas o negativas a la expresión de c-Kit) procedimos a realizar ensayos de migración celular a realizar ensayos de migración con ambas fracciones en la línea celular InBl. El resultado obtenido se muestra en la Fig. 19. En ella se puede apreciar que las células c-Kit⁺ al ser estimuladas con SCF se incrementa el potencial migratorio en un

71.81% y al usar los estímulos combinados el incremento es del 115.27% con respecto al control negativo.

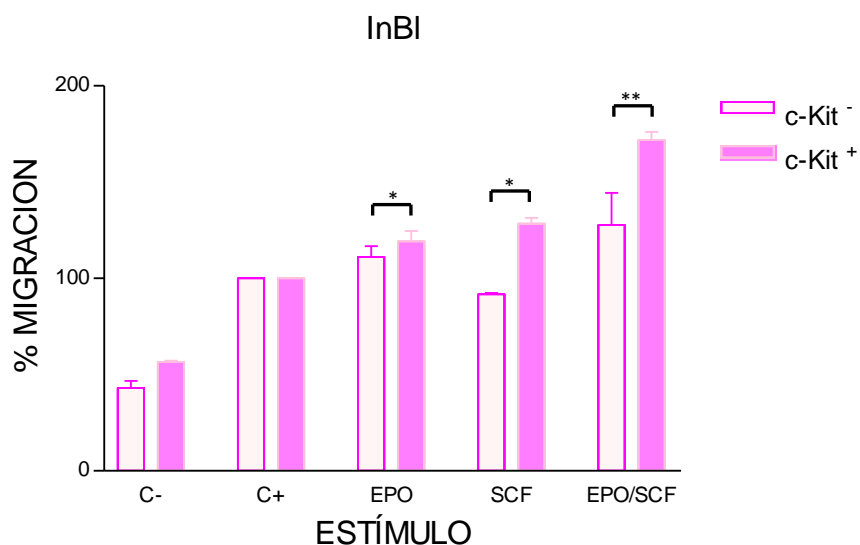


Fig. 19. Células InBI aisladas que expresan c-Kit (c-Kit⁺) o no expresan (c-Kit⁻) fueron probadas en un ensayo de migración en presencia de EPO (10 U/ml), o una combinación de EPO y SCF (EPO/SCF 10/20 U/ml).. Como control negativo fue usado medio de cultivo libre de suero fetal bovino (C-). Medio suplementado con 10% de suero fetal bovino fue usado como control positivo (C+). Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras indican el valor estandar de la media. * $p < 0.05$ comparado con las célula sin tratamiento.

Análisis de las vías de señalización involucradas en la migración celular.

Nuestras observaciones sugieren que SCF, EPO y EPO/SCF inducen la migración en células de cáncer cervical. La unión de SCF soluble a c-Kit y de EPO a su receptor (EpoR) activa tres principales vías de señalización. Entonces, en un intento por comprobar la participación de cada cascada en la migración, las células fueron preincubadas con Tirfostin AG490, Wortamanina y U0126 etanolato para inhibir JAK2, PI3K y ERK1/2 respectivamente y posteriormente se hizo un ensayo de migración. Como esperábamos, en la Fig. 20 podemos ver que la migración inducida por EPO SCF y la combinación de estos, fue significativamente reducida cuando se inibió la fosforilación de JAK2. Contrariamente, la inhibición de PI3K resultó modestamente decrementada para la migración celular. En contraste, la migración inducida por estos

estímulos fue en células inhibidas en la vía ERK1/ERK2 fue rescindida. Esta observación sugiere fuertemente que la migración es regulada por la señalización mediada por JAK2 y la vía MAPK/ERK.

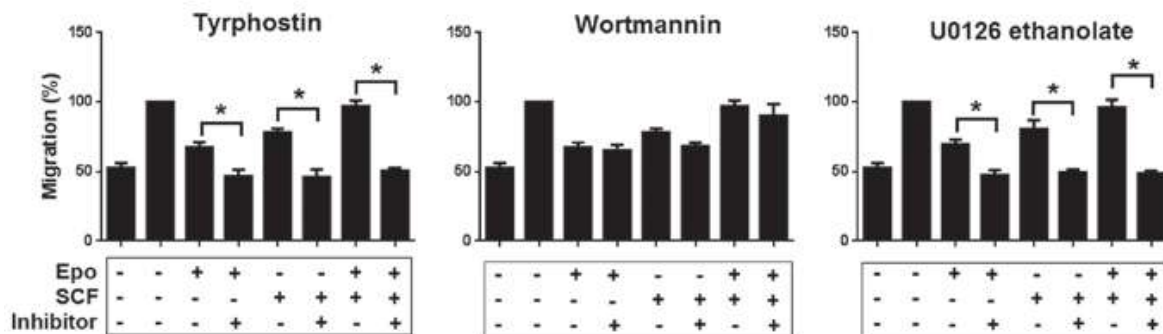


Fig. 20. Efecto de la inhibición de diferentes vías de señalización en la migración inducida por EPO/SCF. Para inhibir la fosforilación de JAK2, las células InBl fueron preincubadas con 10 μ M de Tirfostina AG490 diluida en etanol por 24 hrs. La vía PI3K fue inhibida preincubando las células con 100 nM de Wortmanina diluida en DMSO por 24 hrs. Para inhibir las cinasas ERK1/2 las células fueron preincubadas con 20 μ M de U9126 etanolate diluido en DMSO por 24 hrs. La migración inducida por EPO (10 U/ml), SCF (20U/ml) o una combinación de EPO y SCF fue entonces evaluada por ensayos en cámara de Boyden. Todos los valores reportados representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras de error indican el valor estándar de la media. * $p < 0.05$ comparando las células preincubadas con los inhibidores indicados contra las células no tratadas.

Para corroborar la activación de estas vías de señalización, evaluamos la fosforilación de STAT5 y ERK1/2 mediada por la estimulación con EPO, SCF y EPO/SCF a diferentes tiempos. Como se muestra en la Fig. 21, la activación de STAT5 fue evidente solamente un minuto después de la estimulación con EPO, mostrando su fosforilación máxima al minuto 30. La estimulación con SCF indujo una rápida activación de STAT5, presentando su máximo al minuto 1 posterior a la estimulación y disminuyendo al minuto 30. La estimulación de STAT fue solamente detectada al minuto 3, 5 y 10 post-tratamiento con la combinación de EPO/SCF. Diferente a la fosforilación de STAT5, la fosforilación de ERK1/2 fue débilmente inducida por EPO. Ahora bien, SCF y la combinación de EPO/SCF promovió una fuerte fosforilación de ERK1/2 desde 1 minuto después del tratamiento. Notablemente, la activación de ERK1/2 persiste en altos niveles hasta una hora después del tratamiento.

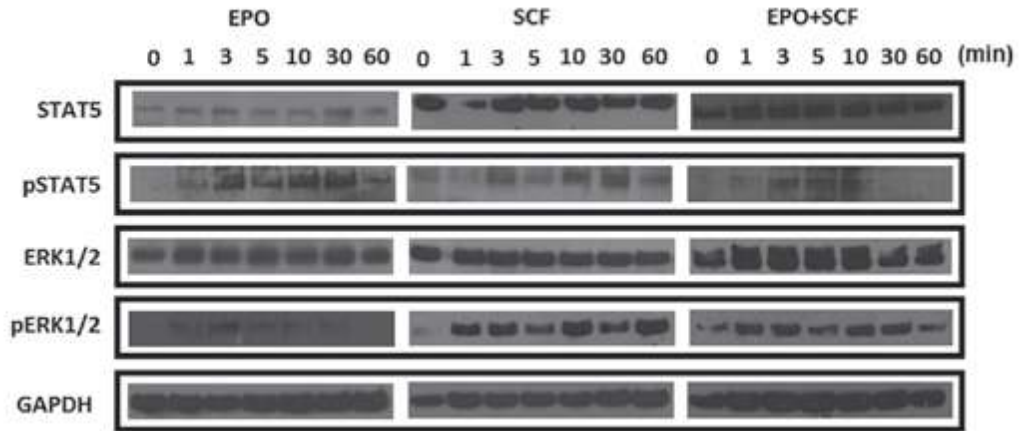


Fig. 21. Análisis de Western blot de la activación de STAT5 y ERK1/2 en respuesta a la estimulación con EPO, SCF y EPO/SCF. Las células InBl fueron incubadas con EPO (10U/ml, SCF (20 U/ml) o EPO/SCR (10/20 U/ml). Los aislados de proteínas (30 μ g) fueron analizados por SDS-PAGE 10%. Las proteínas específicas fueron detectadas usando anticuerpos para STAT5, pSTAT5, ERK1/2 and pERK1/2. La detección de GAPDH fue incluida como contro. Un blot representativo de experimentos por triplicado es presentado.

DISCUSIÓN

Hoy en día se tienen claras evidencias que demuestran que la EPO contribuye a la proliferación de células de diferentes tipos tumorales, como son el carcinoma de células renales ¹⁷⁸, el melanoma ¹⁷⁹, los carcinomas de cabeza y cuello ¹⁸⁰ y el cáncer de próstata ¹⁸¹. Adicionalmente, nosotros hemos demostrado que la EPO promueve la proliferación de tres diferentes líneas celulares derivadas de tumores cervicales ¹⁷⁷. En el presente estudio, observamos que la EPO estimula la proliferación en dos líneas celulares más de cáncer cervical. Estas observaciones sugieren que la proliferación inducida por la EPO es un fenómeno común en éste tipo de cáncer.

Por otro lado, la expresión del receptor c-Kit ha sido identificada en tejido proveniente de tumores cervicales y en líneas celulares ¹⁸². En este estudio, hemos detectado la expresión de c-Kit en dos líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, los estudios de citometría de flujo indican que solo una pequeña proporción (< 13%) de las células expresan c-Kit en su membrana. A pesar de esto, es interesante observar que a pesar del pequeño número de células que expresan c-Kit, la administración de SCF indujo la sobrevivencia de las células cuando éstas fueron cultivadas en ausencia de SFB. La activación del eje SCF/c-Kit es crucial para la sobrevivencia de varios tipos celulares, incluyendo las células hematopoyéticas ¹⁸³, las células troncales embionarias ¹⁸⁵ y las células de cáncer ovárico ¹⁸⁶. Esta observación indica que la activación del receptor c-Kit en células de cáncer cervical contribuye a la sobrevivencia de las células cuando son expuestas a condiciones desfavorables.

Con la finalidad de estudiar más de cerca el potencial de la EPO y el SCF de estimular el crecimiento de las células de cáncer cervical, desarrollamos un estudio de crecimiento independiente al anclaje. Los resultados obtenidos demostraron que la administración individual de EPO o SCF indujeron la formación de un número muy limitado de colonias. Sin embargo, la combinación de EPO y SCF produjo un incremento significativo del número de colonias, particularmente de células InBl. En un estudio previo, se había demostrado que el SCF

es capaz de incrementar el potencial de formación de colonias de células derivadas de un carcinoma de colon ¹⁵⁶, y que la EPO aumenta el número de colonias en una línea celular de cáncer de mama modificada que expresa c-Kit ¹⁸⁷. Sin embargo, el efecto coordinado de EPO y SCF sobre el potencial de formar colonias de células tumorales no había sido descrito con anterioridad. Es importante mencionar que el crecimiento independiente al anclaje está directamente asociado con el potencial metastásico, pero la migración es considerada como el primer paso en la formación de metástasis.

Es digno de mención que en este trabajo se demostró que tanto la EPO como el SCF administrados individualmente son capaces de inducir la migración de células de cáncer cervical. Pero este fenómeno se magnifica cuando son administradas en combinación. Estos resultados son consistentes con un estudio previo en el que se demostró que la EPO induce la migración de células HeLa, actuando como un quimioatrayente bajo condiciones libres de SFB ¹⁶³. De manera similar, se ha reportado que el SCF puede inducir la migración de células de carcinoma de colon ¹⁵⁶. El efecto combinado de EPO y SCF sobre la migración celular no había sido investigado antes.

Los resultados reportados aquí sugieren fuertemente que EPO y SCF tienen un efecto cooperativo en células de cáncer cervical. El efecto coordinado de dichas citocinas se había observado durante la generación de eritroblastos y unidades formadoras de colonias eritroides, donde se observó que c-Kit podía fosforilar residuos de tirosina del EpoR interactuando con la región de la caja extendida 2 del receptor ¹⁸⁸. Adicionalmente, se ha observado que existen interacciones sinérgicas entre la EPO y el SCF, debido a un fenómeno de co-señalización. El EpoR y c-Kit comparten tres vías de señalización básicas, JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK. En el presente estudio, se identificó que la inhibición de JAK2 eliminó la migración inducida por una combinación de EPO y SCF. En este contexto, Hong et al ¹⁷⁶, reportaron que el sitio de unión a JAK2 en el EpoR es esencial para la co-señalización con el receptor de c-Kit. Más aún, se ha demostrado que c-Kit activa de manera cruzada el eje JAK2/STAT5 para promover la hematopoyesis ¹⁸⁹.

En este estudio se observó la activación de STAT5, sin embargo no hubo diferencia en el nivel de fosforilación de STAT5 cuando las células fueron incubadas con alguna de las citocinas individuales, o bien en combinación. Esta observación parece indicar que el sistema JAK2/STAT5 es un sistema común y crucial para la promoción de la migración de células de cáncer cervical como respuesta a la EPO, al SCF o a ambos. De manera similar, la obstrucción de la vía MAPK/ERK utilizando U0126 etanolato, un inhibidor específico de las moléculas ERK1/2, eliminó la migración inducida tanto por EPO, SCF, como por la combinación de ambos. De manera similar, un reporte anterior mostró que la EPO inducía la migración de células HeLa, y que este efecto es dependiente de la actividad de la vía de las cinasas MAP¹⁶³. Los mismos autores reportaron que la activación de esta vía de señalización es, a su vez, dependiente de la actividad de JAK2.

En este estudio, se demostró que la co-administración de EPO y SCF incrementan significativamente la migración de las células InBl, las cuales tienen una mayor proporción de células que expresan c-Kit. Se sabe que el SCF y la EPO inducen la activación continua de ERK1 / 2 en células eritroides de manera sinérgica¹⁹⁰. En nuestro caso, la co-estimulación con SCF y EPO produjo una activación sostenida de ERK 1/ 2 en las células InBl. En contraste, el tratamiento con EPO solo provocó una activación modesta y transitoria de estas cinasas. Estos resultados indican que la co-estimulación de la migración de las células InBl con EPO y SCF es regulada por la vía de señalización JAK/STAT5 en coordinación con la activación sostenida de ERK 1 / 2.

En resumen, con este trabajo se ha demostrado que la co-estimulación de células de cáncer cervical con EPO y SCF promueve la migración y el crecimiento celular independiente al anclaje, el efecto obtenido es superior a aquel producido por cada una de las citocinas por separado. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que la co-estimulación de los receptores EpoR y c-Kit converge en la activación de la vía JAK2/STAT5, y que esta cascada de señalización es un importante regulador de la migración celular. Es importante notar que la estimulación con SCF

solo o en combinación con EPO, indujo la activación sostenida de ERK 1 /2, y que la inhibición de estas cinasas resultó en la eliminación de la migración.

La metástasis es un fenómeno complejo, y los resultados reportados en este trabajo proveen mayor conocimiento acerca de cómo la co-señalización desde diferentes receptores puede inducir la migración, y sugieren que la migración podría estar regulada por varias vías de señalización. Por lo tanto, es importante que estudios futuros investiguen múltiples cascadas regulatorias que participen coordinadamente en la migración, esto facilitará el desarrollo de acercamientos terapéuticos más eficaces para combatir el cáncer.

CONCLUSIONES

- ☛ Las células CaLo e InBl expresan a los receptores de eritropoyetina y stem cell factor.
- ☛ Las células en cultivo al ser estimuladas con eritropoyetina recombinante humana aumentan su capacidad proliferativa, corroborando con ello la funcionalidad del receptor EpoR. Asimismo, el estímulo con stem cell factor impactó positivamente en la capacidad de sobrevivencia de los cultivos celulares, indicando que el receptor c-Kit expresado en los cultivos era funcional.
- ☛ La migración celular inducida por estos ligandos (EPO y SCF) es observada cuando estos son adicionados de manera independiente, pero este potencial se exagera cuando son usados en combinación.
- ☛ La formación de colonias en estos cultivos se vió claramente influenciada por el estímulo conferido por SCF.
- ☛ Las células metastásicas que expresan al receptor c-Kit tienen mayor capacidad migratoria que aquellas que no lo tienen.
- ☛ Las vías de señalización que median la respuesta migratoria son JAK2/STAT5 y MAPK/ERK.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento sobre el desarrollo de metástasis en cáncer cérvico uterino. Por un lado, el uso de algunos fármacos utilizados como terapia básica para contrarestar la anemia como es el caso de la eritropoyetina podrían conferir estímulo migratorio en las pacientes diagnosticadas con este padecimiento, sin embargo, sería necesario corroborar el efecto migratorio de eritropoyetina cuando es usada en combinación con quimioterapia en biopsias de cérvix. Por otro lado, con estos resultados vemos que existe un fuerte potencial para el desarrollo de metástasis cuando el receptor c-Kit es estimulado, en este contexto, existe una familia de inhibidores de receptores cinasa de tirosina (como es el caso de c-Kit) que comenzaron a desarrollarse desde finales de los años noventa y a partir de estos se han generado inhibidores con diferentes blancos de este tipo de receptores, por lo cual podrían evaluarse estos fármacos en muestras de pacientes en diferentes estadios de cáncer cérvico uterino, con la finalidad de implementar una terapia de rescate para evitar el desarrollo de metástasis para este tipo de cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.elcastellano.org/palabra.php?id=1098>
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. Instituto Nacional del Cáncer (2011e). *¿Qué es el cáncer?* Revisado el 10 de enero de 2012, de: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
4. Organización Mundial de la Salud (2011). *Cancer*. Fact sheets num. 297. Octubre 2011. Revisado el 9 de enero de 2012, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
5. Organización Panamericana de la Salud (2011). *Health Situation in the Americas. Basic Indicators*. OPS. Revisado el 9 de enero de 2012, de: http://ais.paho.org/chi/brochures/2011/BI_2011_ENG.pdf
6. Globocan <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#BOTH> y http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_pop.asp?selection=126484&title=Mexico&statistic=2&number=15&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=%C2%A0Execute.
7. Secretaría de Salud (2001). *Programa de Acción: Cáncer de Próstata*. México: SSA. Revisado el 14 de enero de 2012, de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/cancer_prostata.pdf.
8. <http://www.webconsultas.com/salud-al-dia/vph/causas-y-formas-de-transmision-del-vph-8883>.
9. VPH ESPAÑOL DRA. ROCHA Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*, Nov 2007;107(2)Suppl 1:S2-S5.)
10. <http://www.infocancer.org.mx/factores-de-riesgo-cancer-cervicouterino>
11. Francesco Colotta, Paola Allavena, Antonio Sica, Cecilia Garlanda and Alberto Mantovani. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30(7) 2009. 1073-1081.
12. Dimitriy Kedrin & Jacco van Rheenen & Lorena Hernandez & John Condeelis & Jeffrey E. Segall Cell Motility and Cytoskeletal Regulation in Invasion and Metastasis *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2007) 12:143–152.
13. Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 2005;42(7):799–809.
14. Lacombe C, Mayeaux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(suppl2):22-28.
15. Sasaki R, Masuda S, Nagao M. EPO multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64:1775:1793.
16. Mulcahy L. The EPOR. *Semin Oncol*. 2001;28 (suppl 8):19-23.
17. Donald MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in EPO action. *Endocrinology*. 1985;116:2293-2299.
18. Leyland-Jones B. Trastuzumab: hopes and realities. *Lancet Oncol*. 2002;3:137-144.
19. D'Andrea, A. D., Lodish, H. F. and Wong, G. G. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*. 1989;47:277-285.
20. Freng, J. et al. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol. Cell. Biol*. 1997;17:2497-2501.

21. Tilbrook, P.A., Ingley, E., Williams, J.H., Hibbs, M.L. and Klinken, S.P. Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *EMBO J.* 1997;16:1610-1619.
22. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The JAK/STAT pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000;95:19-29.
23. Arbouzova NI, Zeidler MP. JAK/STAT signalling in Drosophila: Insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 2006;133:2605–2616.
24. Neubauer, H. et al. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell.* 1998;93; 397-409.
25. Parganas, E. et al. Jak2 is essential for signalling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998; 93;385-395.
26. Miura, O., Miura Y., Nakamura, N., Quelle, F. W., Witthuhn, B. A., Ihle, J. N., and Aoki, N., Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood.* 1992;84:4135-4141.
27. Crespo, P., Schuebel, k. e., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., and Bustelo, X. R., Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature.* 1997;385:169-172.
28. Shigematsu, H., Iwasaki, H., Otsuka, T., Ohno, Y., Arima, F., and Niho, Y. Role of the vav proto-oncogene product (Vav) in erythropoietin-mediated cell proliferation and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 1997;272:14334-14340.
29. Torti, M., Marti, K. B., Altshuler, D., Yamamoto, K., and Lapetina, E., G. Erythropoietin induces p21 ras activation and p120 GAP tyrosine phosphorylation in human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.,* 1992;267:8293-8298.
30. Hanazono, Y., chiba, S., Sasaki, K., Mano, H., Yazaki, Y., and Hirai, H., Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and kinase activity of the c-fps/fes proto-oncogene product in human erythropoietin-responsive cells. *Blood.* 1993;81:3193-3196.
31. Chin, H., Arai, a., Wakao, H., Kamiyama, R., Miyasaka, N., and Miura, O., Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood.* 1998;91:3734.3745.
32. Odai, H., Sasaki, K., Iwamatsu, A., Hanazono, Y., Tnaka, T., Mitani, K., Yazaki, Y., and Hirai, H., The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 1995;20:10800-10805.
33. Bondurant, M. C. & Koury, M. J. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol. Cell. Biol.* 1986. 6:2731-2733.
34. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 2003;3:721-732.
35. Koury, S. T., Koury, M. J. bondurant, M. C., Caro, J. & Graber, S. E. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood.* 1989;74:645-651.
36. Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J. & Semenza, G. L. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood.* 1991;77:2497-2503.

37. Tan, D. C., Eckardt, K. U., Firth J. K. & Ratcliffe, P. J. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am. J. Physiol.* 1992;263:F474-F481.
38. Jewell, U. R. et al. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001;15:12-12-1314.
39. Sawyer, S. T., Krantz, S. F. & Goldwasser, E. binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells. *J. Biol Chem.* 1987;262:5554-5582.
40. Chapel, S. H., Veng-Pedersen, P., Schmidt, R. L. & Wildness, J. A. Receptor-based model accounts for phlebotomy-induced changes in erythropoietin pharmacokinetics. *Exp. Hematol.* 2001;29:425-431.
41. Slingsh, A. et al. Increased plasma viscosity as a reason for inappropriate erythropoietin formation. *J. Clin. Invest.* 1993;91:251-256.
42. Spivak, J. L. the blood in systemic disorders. *Lancet.* 2000;355:1707-1712.
43. Faquin, W. C., Schneider, T. J. & Goldber, M. A. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood.* 1992;79:1987-1994.
44. Vannacchi, A. M. et al. Inhibition of erythropoietin production in vitro by human interferon γ . *Br. J. Haematol.* 1994;87:18-23.
45. Frede, S., Fandrey, J., Pagel, H., Hellwig, T. & Jelkmann, W. Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 β injections in rats. *Am J. Physiol.* 1997;273:R1067-R1071.
46. Hellwing-Buge, T., Rutkowski, K., Meltzen, E., Fandrey, J. & Jelkmann, W. Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999;94:1561.1567.
47. La Ferla, K., Reimann, C., Jelkmann, W. & Hellwing-Burngel, T. Inhibition of erythropoietin gene expression signalling involves the transcription factors GATA-2 and NF- κ B. *FASEB. J.* 2002;16:1811-1813.
48. Kling, P. J. et al. Iron deprivation increases erythropoietin production in vitro, in normal subjects and patients with malignancy. *Vr. J. Haematol.* 1996;95:241-248.
49. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N et al. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 1990;87:5978-5982.
50. Anagnostou A, Lui Z, Steiner M et al. Erythropoietin receptor Mrna expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:3974-1978.
51. Masuda S., Nagao M., takahata K. et al. Functional erythropoietin recpetor of the cells with reural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:11208-11216.
52. Mioni, R., Gottardello F., Bordon, P. et al. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leyding cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;127:459.465.
53. Ogilvie, M., Yu, X., Nicolas-Metral V. et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblast. *J. Biol. Chem.* 2000;275:39754-39761.
54. Fraser, J.K., Tan, A.S., Lin, F.K. et al. Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes. *Exp. Hematol.* 1989;7:10-16.

55. Westenfelder C, Beranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int.* 2000;58:647-657.
56. Acs G, Acs P, Beckwith SM et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression en human cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3561-3565.
57. Selzer, E., Wacheck, V., Kodym, R., et al. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res.* 2000;10:421-426.
58. Westphal G., Niederberger, E., Blum, C. et al. Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality. *Tumori.* 2002;88:150-159.
59. Yasuda, Y, Musha T, Tanaka H, et al. Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br. J. Cancer.* 2001;84:836-843.
60. Acs, G, Zhang P, McGrath C, et al. Hypoxia-inducible erythropoietin signalling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol.* 2003;162:1789-1806.
61. Acs, G, Xu X, Chu C, et al. Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma. *Cancer.* 2004;100:2376-2386.
62. Yasuda, Y, Fujita Y, Masuda S, et al. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumors of female reproductive organs. *Carcinogenesis.* 2002;23:1797-1805.
63. Anderson, D.M., Wiilliams, D.E., Tushinski, R., Gimpel, S., Eisemman, J., Cannizzaro, L.A., Aronson, M., Croce, D.M., Huebner, K., Cosman, D., Lyman, S.D. Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth Differ.* 1991;2:373-378.
64. Flanagan, J.G., Chan, D.C., Leder, P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alterntive splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell.* 1991;64:1025-1035.
65. Pandiella, .A, Bosenberg, M.W., Huang, E.J., Besmer, P., Massague, J. Cleavage of membrane-anchored growth factors involves distinct protease activities regulated through common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992;267:24028-24033.
66. Majumdar, M.K., Feng, L., Medlock, E, Toksoz, D., Williams, D.A. Identificaion and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. *J. Biol. Chem.* 1994;269:1237-1242.
67. Langley, K.E., bennett, L.G., Wypych, J., Yancik, S.A., Liu, X.D., Westcott, K.R. Chang, D.G., Smith, K.A., Zsebo, K.M. Soluble stem cell factor in human serum. *Blood* 1993;81:656-660.
68. Arakawa, T., Ypantis, D.A., Lary, J.W., Narhi, L.O., Lu, H.S., Prestrelski, S.J., Clogston, C.L., Zsebo, K.M., Mendiaz, E.A., Wypych, J., Langley, K.E. Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimereic and have extensive regular secondary structure. *J. Biol. Chem.* 1991;266:18942-18948.
69. Lu, H.S., Chang, W.C., Mendiaz, E.A., Mann, M.B., Langley, D.E., Hsu, Y.R. Spontaneous dissociation-association of monomers of the human stem cell factor dimer. *Biochem. J.* 1995;305:563-568.

70. Hsu, Y.R., Wu, G.M., Mendiaz, E.A., Syed, R., Wypych, J., Toso, R., Mann, M.B., Boone, T.C., Narhi, L.O., Lu, H.S., Keith, E. the majority of stem cell factor exists as monomer under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 1997;272:6406-6415.
71. Huang, E.J., Nocka, K.H., Buck, J., Besmer, P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit ligand: KL-1 and KL-2. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3:349-362.
72. Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T., Henz, B.M. Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor. *Scand. J. Immunol.* 1999;49:495-500.
73. Kassel, O., Schmidlin, F., Duvernelle, C., Gasser, B., Massard, G., Frossard, N., Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. *Eur. Respir. J.* 1999;13:951-954.
74. Kiener, H.P., Hofbauer, R., Tohidast-Akrad, M., Walchshofer, S, Redich, K., Bitzan, P., Kapiotis, S., Steiner, G., Smolen, J.S., Valent, P. Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of stem cell factor in synovial fibroblast and their capacity to induce mast cell chemotaxis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:164-174.
75. Jiang, X., Gurel, O., Mendiaz, E.A., Stearns, G.W., Clogston, C.L., Lu, H.S., Osslund, T.D., Syed, R.S., Langley, K.E., Hendrickson, W.A. Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *EMBO J.* 2000;19:31092-3203.
76. Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J., Kong, X.P. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:7732-7737.
77. Tajima, Y., Huang, E.J., Vosseler, K., Ono, M., Moore, M.A.S., Berner, P. Role of dimerization of the membrane-associated growth factor kit ligand in juxtacrine signalling: the S117H mutation affects dimerization and stability-phenotypes in hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 1998;4:1451-1461.
78. Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E, Schlessinger, J., Francke, U., Ullrich, A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987;6:3341-3351.
79. Broudy, V.C., Kovach, N.L., Bennett, L.G., Lin, N., Jacobsen, F.W., Kidd, P.G.. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor. *Blood.* 1994;83:2145-2152.
80. Brizzi, M.F., Blechman, J.M., Cavalloni, G., Givol, D., Yarden, Y., Pegoraro, L. Protein kinase C-dependent release of a functional whole extracellular domain of the mast cell growth factor (MGF) receptor by MGF-dependent human myeloid cells. *Oncogene* 1994;9:1583-1589.
81. Yee, N.S., Langen, H., Besmer, P. Mechanism of kit ligand, phorbol ester, and calcium-induced down-regulation of c-kit receptor in mast cells. *J. Biol. Chem.* 1993;368:189-201.
82. Turner, A.M., Bennet, L.G., Lin, N.L., Wypych, J., Bartley, T.D., Hunt, R.W. Atkins, H.L., Langley, K.E., Parker, v., Martin, F., Borudy, V.C. Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood.* 1995;8:2052-2058.

83. Wypych, J., Bennet, L.G., Schwartz, M.G., Clogston, C.L., Lu, H.S., Broudy, V.C., Bartley, .D., Parker, V.P., Langley, K.E. Soluble kit receptor in human serum. *Blood*. 1995;85:66-73.
84. Broudy, V.C., Lin, N.L., Sabath, D.F. the fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine*. 2001;15:188-195.
85. Geissler, E.N., Ryan, M.A., Housman, D..E. the dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell*. 1988;55:185-192.
86. Qiu, F.H., Ray, P., Brown, K., Barker, P.E., Jhanwar, S., Ruddle, F.H., Besmer, P. Primary structure of c-kit relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J*. 1988;7:1003-1011.
87. Lemmon, M.A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I., Schlessinger, J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J. Biol. Chem*. 1997;272:6311-6317.
88. Broudy, v.c., Lin, N.L., Buhning, H.J., Komatsu, N., Kavanagh, T.J. Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood*. 1998;91:898-906.
89. Langley, K.E., Mendiaz, E.A., Liu, N.L., Narthi, L.O., Zeni, L., Parseghian, C.M., Clogston, C.L., Leslie, I., Pope, J.A., Lu, H.S. Zsebo, K.N., Boone, T.C. Proprieties of variant forms of human stem cell factor recombinantly expressed in Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys*. 1994;311:55-61.
90. Matous, J.V., Langley, K.E., Kaushansky, K. Structure-function relationships of stem cell factor: an analysis based on a serie of human-murine SCF chimera and the mapping of a neutralizing monoclonal antibody. *Blood*. 1996;88:437-444.
91. Mendiaz, E. A., Chang, D.G., Boone, T.C., Grant, J.R., Wypych, J., Aguero, B., Egrie, J.C., Langley, K.E. Epitope mapping and immunoneutralization of recombinant human stem cell factor. *Eur. J. Biochem*. 1996;239:842-849.
92. Mol, C.D., Lim, K.B., Sridnar, V., Zou, H., Chien, E.Y.T., Sang, B.C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N., McReel, D.E. Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase trnasactivation. *J. Biol. Chem*. 2003;278:31461-31464.
93. Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M., Romnstrand, L. Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit stem cell factor receptor. *Biochem. J*. 1999;341:211-216.
94. Duronio, V., Welham, M.J., Abraham, S., Dryden, P., Shcrader, J.. p21ras activation via hematopietin receptors and c-Kit requieres tyrosine kinase activity but not tyrosine phosphorylation of p21ras GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1992;89:1587-1591.
95. Miyazawa, K., Hendrie, P.C., Mantel, C., Wood, K., Ashman, L.K., Broxmeyer, H.E. Comparative analysis of signaling pathways between mast cell growth factor (c-kit ligand) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human factor-dependent myeloid cell lines involves phosphorylation of Raf-1, GTPase-activating protein and mitogen-activated protein kinase. *Exp. Hematol*. 1991;19:1110-1123.

96. Ishizuka, T., Chayama, K., Takeda, K., Hamelmann, E., Terada, N., Keller, G.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W. Mitogen-activated protein kinase activation through Fc epsilon receptor 1 and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* 1999;162:2087-2094.
97. Ishizuka, T., Kawasome, H., Terada, N., Takeda, K., Gerwins, P., Keller, B.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W. Stem cell factor augments Fc epsilon RI-mediated TNF-alpha production and stimulates MAP kinases via a different pathway in MC/9 mast cells. *J. Immunol.* 1998;161:3624-3630.
98. Hallek, M., Druker, B., Lepisto, E.M., Wood, K.W., Ernst, T.J., Griffin, J.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and steel factor induce phosphorylation of both unique and overlapping signal transduction intermediates in a human factor-dependent emtopoietic cell line. *J. Cell. Physiol.* 1992;153:176-186.
99. Introducció a la biología celular. Alberts et. Al. 2ª ed. Editorial medica panamericana. 2004. Pp. 560.
100. Lennartsson, J., Blume-Jensen, P., Hermanson, M., Ponten, E., Carlberg, M., ronstrand, L. Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene.* 1999;18:5546-5553.
101. Bondzi, C., Litz, J., Dent, P., Krystal, G.W. Src family kinase activity is required for Kit-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase activation, however loss of functional retinoblastoma protein makes MAP kinase activation unnecessary for growth of small cell lung cancer cells. *Cell Growth Differ.* 2000;11:305-314.
102. Serve, H., Hsu, Y.C., Besmer, P. Tyrosine residue 719 of hte c-kit receptor is essential for binding of the p85 subunit of Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase and for c-kit associated PI 3-Kinase activity in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 1994;269:6026-6030.
103. Blume-Jensen, P., Janknect, R., Hunter, T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Bio.* 1998;8:779-782.
104. Young, S.M., Cambareri, A.C., Ashman, L.K. role of c-kit expression level and phosphatidylinositol 3-kinase activation in survival and proliferative response of early myeloid cells. *Cell. Signal.* 2006;18:608-620.
105. Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G, Besmer, P. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J.* 1998;17:6250-6262.
106. Fukao, T. Yamada, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., takayama, T., Asano, T., Takeuchi, t., Kadowaki, T., Hata Ji, J., Koyasu, S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat. Immunol.* 2002;3:295-304.
107. Koike, T., Hirai, K., Morita, Y., Nozawa, Y. Stem cell factor-induced signal transduction in rat mast cells. Activation of phospholipase D but not phosphoinositide-specific phospholipase C in c-kit receptor stimulation. *J. Immunol.* 1993;151:359-366.

108. Gommerman, J.L., Sittaro, D, Klebasz, N.Z., Williams, D.A., Berger, S.A. Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood*. 2000;96:3734-3742.
109. Rottapel, R., Reedijk, M., Williams, D.E., Lyman, S.D., Anderson, D.M., Pawson, T., Bernstein, A. The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the Steel factor. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11:3043-3051.
110. Herbst, R., Lammers, R., Schlessinger, J., Ullrich, A. Substrate phosphorylation specificity of the human c-kit receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 1991;266:6406-6415.
111. Sette, C. Bevilacqua, A., geremia, R., Rossi, P. Involvement of phospholipase C γ 1 in mouse egg activation induced by truncated form of the c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *J. Cell Biol.* 1998;142:1063-1074.
112. Maddens S, Charruyer A, Plo I, Dubreuil P, Berger S, Salles B, Laurent G and Jaffrezou JP (2002) Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood** 100, 1294-1301.
113. Plo I, Lautier D, Casteran N, Dubreuil P, Arock M and Laurent G (2001) Kit signaling and negative regulation of daunorubicin-induced apoptosis: role of phospholipase Cgamma. **Oncogene** 20, 6752-6763.
114. Blume-Jensen, P., Ronnstrand, L., Gout, I., Waterfield, M.D., Heklin, C.H. Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signalling by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1994;269:21793-21802.
115. Tang, B., Mano, H., Yi, T., Ible, J.N. Tec kinase associates with c-kit and is tyrosine phosphorylated and activated following stem cell factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14:8432-8437.
116. Linnekin, D., DeBerry, C.S., Mou, S. Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272:27450-27455.
117. Price, D.J. Rivnay, B., Fu, Y., Jiang, S., Avraham, S., Avraham, H. Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated c-KIT in megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* 1997;272:5915-5920.
118. Ueda, S., Mizuki, M., Ikeda, H., tsujimura, T., Matsumura, I., Nakano, K., Daino, H., Honda Zi, Z., Sonoyama, J., Shibayama, H., Sugahara, H., Machii, T., Kanakura, Y. Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood*. 2002;99:3342-3349. No numeradas (x alfabeto) de F.
119. O'Laughlin-Bunner, B., Radosevic, N., Taylor, M.L., DeBerry, C., Metcalfe, D.D., Zhou, M., Lowell, C., Linnekin, D. Lyn is required for normal stem cell factor-induced proliferation and chemotaxis of primary hematopoietic cells. *Blood*. 2001;98:343-350. No numeradas (x alfabeto) de F.

120. Brizzi, M.F., Zini, M.G., Aronica, M.G., Blechmann, J.M., Yarden, Y., Pegoraro, L. Convergence of signaling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 1994;369:31680-31684.
121. Brizzi, M.F., Dentilli, P., Rosso, A., Yarden, Y., Pagoraro, L. STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J. Biol. Chem.* 1999;274:16965-16972.
122. Weiler, S.R., Mou, S., DeBerry, C.S., Keler, J.R., Ruscetti, F.W., Ferris, D.K. JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood.* 1996;87:3688-3693.
123. DeBerry, C., Mou, S., Linnekin, D. Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem. J.* 1997;327:73-80.
124. Ryan, J.J., Huang, H., McReynolds, L.H., Shelburne, C., Hu-Li, J., Huff, T.F., Paul, W.E. Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Exp. Hematol.* 1997;25:357-362.
125. Gotoh, A., Takahira, H., Mantel, C., Litz-Jackson, S., Boswell, H.S., Brxmeyer, H.E. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood.* 1996;88:138-145.
126. Linnekin, D., Weiler, S.R., Mou, S., DeBerry, C.S., Keller, J.R., Ruscetti, F.W., Ferris, D.K., Longo, D.L. JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol.* 1996;95:221-228.
127. Radosevic, N., Winterstein, D., Keller, J.R., Neubauer, H., Pfeffer, K., Linnekin, D. JAK2 contributes to the intrinsic capacity of primary hematopoietic cells to respond to stem cell factor. *Exp. Hematol.* 2004;32:149-156.
128. Blume-Jensen, P., Wernstedt, C., Heldin, C.H., Romnstrand, L. Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in Kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells. *J. Biol. Chem.* 1995;270:14192-14200.
129. Yee, N.S., Hsiau, C.W.M., Serve, H., Vosseler, K., Besmer, P. Mechanism of down-regulation of c-Kit receptor: Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1994;269:31991-31998.
130. Koslowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D.M., Rottapel, R., Siminovitch, D.A. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:2089-2099.
131. De Sepulveda, P., Okkenhaug, K., Rose, J.L., Hawley, R.G., Du Brenil, P., Rottapel, R. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses stem cell factor-dependent proliferation. *EMBO J.* 1999;18:904-915.
132. Bayle, J., Lettard, S., Frank, R., Dubreuil, P., De Sepulveda, P. Suppressor of Cytokine Signaling 6 Associates with KIT and regulates KIT receptor Signalling. *J. Biol. Chem.* 2004;279:12249-12259.
133. Zeng, S., Xu, Z., Lipkowitz, S., Longley, J.B. Regulation of stem cell factor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood.* 2005;105:226-232.

134. Gommerman, J.L., Rottapel, R., Besmer, S.A. Phosphatidylinositol 3-kinase and Ca²⁺ influx dependence for ligand-stimulated internalization of the c-kit receptor. *J. Biol. Chem.* 1997;272:30519-30525.
135. Miyazawa, K., Toyama, K., Gotoh, A., Hendrie, P.C., Mantel, C., Broxmeyer, H.E. Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product a possible mechanism of receptor down modulation in MO7e cells. *Blood.* 1994;83:137-145.
136. Broudy, V.C., Lin, N.L., Liles, W.C., Corey, S.J., O'Laughlin, B., Mou, S., Linnekin, D. Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood.* 1999;94:1979-1986.
137. Jahn, T., Seipel, P., Coutinho, S., Urschel, S., Schwartz, K., Miething, C., Serve, H., Peschel, C., Duyster, J. Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene.* 2002;21:4508-4520.
138. Wen, L.P., Fahrni, J.A., Matsui, S., Rosen, G.D.. Airway epithelial cells produce stem cell factor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996;1314:183-186.
139. Zhang, S., Howarth, P.H., Roche, W.R. Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblast. *J. Pathol.* 1996;180:95-101.
140. Kassel, O., Schmidlin, F., Duvernelle, C., de Blay, F., Frossard, N., Up- and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor stem cell factor by human lung fibroblast in culture. *Mol. Pharmacol.* 1998;54:1073-1079.
141. Da Silva, C.A., Kassel, O., Mathiewu, E., Massard, G., Gasser, B., Frossard, N. Inhibition by glucocorticoids of the interleukin-1beta-enhanced expression of the mast cell growth factor SCF. *Br. J. Pharmacol.* 2002;135:1634-1640.
142. Da Silva, C.A., Heilbock, C., Kassel, O., Frossard, N., Transcription of stem cell factor (SCF) is potentiated by glucocorticoids and interleukin-1beta through concerted regulation of a GRE-like and an NF-kappaB response element. *FASEB J.* 2003;17:2334-2336.
143. Heinrich, M.C., Dooley, D.C., Freed, A.C., Band, L., Hoatlin, M.E., Keeble, W.W., Peters, S.T., Silvey, K.V., Ey, F.S., Kabat, D., Maziarz, R.T., Bagby, G.C., Constitutive expression of stem cell factor gene by human stromal cells. *Blood.* 1993;83:771-783.
144. Hartman, M., Piliponsky, A.N., Temkin, V., Levi-Schaffer, F. Human peripheral blood eosinophils express stem cell factor. *Blood.* 2001;97:1086-1091.
145. de Paulis, A., Minopoli, G., Arbustini, E., DE Crescenzo, G., Dal Piaz, F., Pucci, P., Russo, T., Marone, G. Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *J. Immunol.* 1999;163:2799-2808.
146. Zhang, S., Anderson, D.F., Bradding, P., Coward, W.R., Baddeley, S.M., MacLeod, J.D., McGill, J.I., Church, M.K., Holgate, S.T., Roche, W.R. Human mast cells express stem cell factor. *J. Pathol.* 1998;186:59-66.
147. Okayama, Y., Hunt, T.C., Kassel, O., Ashman, L.K., Church, M.K. Assessment of the anti-c-kit monoclonal antibody YB5.B8 in affinity magnetic enrichment of human lung mast cells. *J. Immunol. Methods.* 1994;169:153-161.

148. Yuan, Q., Auste, K.F., Friend, D.S., Heidtman, M., Boyce, J.A. Human peripheral blood eosinophils express a functional c-kit receptor for stem cell factor that stimulates very late antigen 4 (VA-4)-mediated cell adhesion to fibronectin and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J. Exp. Med.* 1997;186:313-323.
149. Columbo, M., Horowitz, E.M., Botana, L.M., MacGlashan Jr., D.W., Bochner, B.S., Gilis, S., Zsebo, K.M., Galli, S.J., Lichtenstein, L.M. The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J. Immunol.* 1992;149:599-608.
150. Hollenbeck, S.T., Sakakibara, K., Faries, P.L., Workhu, B., Liu, B., Kent, C. Stem cell factor and c-kit are expressed by and may affect vascular SMCs through an autocrine pathway. *J. Surg. Res.* 2004;120:288-294.
151. Peters, E.M.J., Maurer, M., Botchkarev, V.A., deMasey Jensen, K., Welker, P., Scott, G.A., Paus, R. Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 2003;121:976-984.
152. Aye, M.T., Hashemi, S., Leclair, B., Zeibdawi, A., Trudel, E., Halpenny, M., Fuller, V., Cheng, G. Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells 8CFU-RF). *Exp. Hematol.* 1992;20:523-527.
153. Tian Q, Frierson HF, Jr., Krystal GW and Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am. J. Pathol.* 1999;154:1643-1647.
154. Arber DA, Tamayo R and Weiss LM. "Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders". *Hum. Pathol.* 1998;29:498-504.
155. Hines SJ, Litz JS and Krystal GW. Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999;58:1-10.
156. Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, Martone T, Gramigni C, Camandona M, Emanuelli G and Rodeck U. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res.* 2001;61:2200-2206.
157. Pan CX, Yang XJ, Lopez-Beltran A, Maclennan GT, Eble JN, Koch MO, Jones TD, Lin H, Nigro K, Papavero V, et al. c-kit expression in small cell carcinoma of the urinary bladder: prognostic and therapeutic implications. *Mod. Pathol.* 2005;18(3):320-3.
158. Lin ZH, Han EM, Lee ES, Kim CW, Kim HK, Kim I and Kim YS. A distinct expression pattern and point mutation of c-kit in papillary renal cell carcinomas. *Mod. Pathol.* 2004;17:611-616.
159. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha-Zavaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Hama A, Hugo P, et al. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res.* 2001;61:6281-6289.
160. Kristal, GW, Hines SJ and Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res.* 1996;56:370-376.

161. Vitali R, Cesi V, Nicotra MR, McDowell HP, Donfrancesco A, Mannarino O, Natali PG, Raschella G and Dominici C. c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571. *Int. J. Cancer.* 2003;106:147-152.
162. Domenico Ribatti, Marco Presta, Angelo Vacca, Roberto Ria, Roberta Giuliani, Patrizia Dell'Èra, Beatrice Nico, Luisa Roncali and Franco Dammacco. Human Erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, 1999;93:2627-2636.
163. Sumaya N. Hamadmad and Raymond J. Hohl. "Erythropoietin stimulates cancer cell migration and activates RhoA protein through a MAPK/Erk-dependent mechanism". *Pharm. Exp. Therap.* 2008;324:1227-1233.
164. Heissing B, Hattori K, Dias S et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625-637.
165. Broudy V. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90:1345-1364.
166. Kiener, H.P., Hofbauer, R., Tohidast-Akrad, M., Walchshofer, S., Redlich, K., Bitzan, P., Kapiotis, S., Steiner, G., Smolen, J.S., Valent, P. "Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of stem cell factor in synovial fibroblast and their capacity to induce mast cell chemotaxis". *Arthritis Rheum.* 2000;43:164-174.
167. Nilsson, G., Hjertson, M., Andersson, M., Greiff, L., Svensson, C., Nilsson, K., Siegbahn, A. "Demonstration of mast-cell chemotactic activity in nasal lavage fluid: characterization of one chemotaxin as c-kit ligand, stem cell factor". *Allergy* 1998;53:874-879.
168. Olsson, N., Rak, S., Nilsson, G. "Demonstration of mast cell chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid collected from asthmatic patients before and during pollen season". *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105:455-461.
169. Jeong, H.J., Na, H.J., Hong, S.H., Kim, H.M. "Inhibition of the stem cell factor-induced migration of mast cells by dexamethasone". *Endocrinology.* 2003;144:4080-4086.
170. Sundstrom, M., Alfredsson, J., Olsson, N., Nilsson, G. "Stem cell factor-induced migration of mast cells requires p38 mitogen-activated protein kinase activity". *Exp. Cell Res.* 2001;267:144-151.
171. Tan, b.l., Yazicioglu, M.N., Ingram, D., McCarthy, J., borneo, J., Williams, D.A., Kapur, R. "Genetic evidence for convergence of c-Kit- and alpha4 integrin-mediated signals on class 1^a PI-3kinase and the Rac pathway in regultin integrin-directed migration in mast cells". *Blood.* 2003;101:4725-4732.
172. Akira, Y., Hirozumi, S., Hiroki, T., Nobuo, O., Yoichi, M., Hitoshi, F., Mikinori, S., Yuji, O., Hiromitsu, T., Tadao, M. "The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells". *Mol. Can.* 2006;5:46-55.
173. Junji Matsui, Toshiaki Wakkabayashi, Makoto Asada, Kentaro Yoshimatsu and Masayuki Okada. Stem Cell Factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004;270(18):18600-18607.
174. Shuji Ueda, Masao Mizuki, Hirokazu Ikeda, Tohru Tsujimura, Itaru Matsumura, Kazushi Nakano, Hanako Daino, Zen-ichiro Honda, Junko Sonoyama, Hirohiko Shibayama, Hiroyuki Sugahara, Takashi Machii, and Yuzuru Kanakura. Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood* 2002;99(9):3342-3349.
175. Bhavana Joneja, Hong-Chi Chen, Dhaya Seshasayee, Amy L. Wrentomore and Don M. Wojchowski. Mechanisms of stem cell factor and erythropoietin proliferative co-signaling in FDC2-ER cells. *Blood.* 1997;90:3533-3545.
176. Hong L., Ramdas B., Chen J. Harris C., Wojchowski DM and Kapur R. KIT associated intracellular tyrosines play an essential role in EpoR co-signalling. *Cell Signal.* 2008;20:1513-1520.

177. Lopez TV, Lappin TR, Maxwell P., Shi Z., Lopez-Marure R, Aguiler C and Rocha-Zavaleta L. Autocrine/paracrine erythropoietin signaling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *Int. J. Cancer*. 2011;129:1566-2576.
178. Fujisue Y., Nakagawa T., Takahara K., Inamoto T., Kiyama S., Azuma H and Asahi M. Induction of erythropoietin increases the cell proliferation rate in a hypoxia-inducible factor-1-dependent and – independent manner in renal cell carcinoma cell lines. *Onco Lett*. 2013;5:1765-1770.
179. Kumar, SM, Zhang G., Bastian, Bc., Arcasoy MO, Karande P., Pushparajan A., Acs G and Xu X. Erythropoietin receptor contributes to melanoma cell survival in vivo. *Oncogene*. 2012;31:1649-1660.
180. Steinmann K., Richter AM and Dammann RH. Epigenetic silencing of erythropoietin in human cancers. *Genes Cancer*. 2011;2:65-73.
181. Jeong JY, Hoxhaj G, Socha AL, Sytkowski AJ and Feldman L. An erythropoietin autocrine/paracrine axis modulates the growth and survival of human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res*. 2009;7:1150-1157.
182. Inoue M, Hyo S, Fujita M, Enomoto T and Kondoh G. Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res*. 1994;54:3049-3053.
183. Kapur R, Cooper R, Zhang L and Williams DA. Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways. *Blood*. 2001;97:1975-1981.
184. Yang FC., Kapur R., King AJ, Tao W., Kim C., Borneo J., Breese R., Marshall M., Dinauer MC and Williams DA. Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity*. 2000;12:557-568.
185. Fraser L., Taylor AH and Forrester LM. SCF/KIT inhibition has a cumulative but reversible effect on the self-renewal of embryonic stem cells and on the survival of differentiating cells. *Cell Reprogram*. 2013;15:259-268.
186. Liu L, Zhang X., Do C., Zhang X., Hou N., Zhao D., Sun J., Li L, Wang X and Ma C. MEK1-independent activation of MAPK and MEK1-dependent activation of p70 S6 kinase by stem cell factor (SCF) in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382:385-389.
187. Shi Z., Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP., El-Tanani M and Lappin TR. Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behavior in a modified breast cancer cell line. *Mol Cancer Res*. 2010;8:615-626.
188. Wu H., Klingmüller U., Bersmer P and Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995;377:242-246.
189. Grebier F., Kerenyi MA., Kovacic B., Kolbe T., Becker V., Dolznig H., Pfeiffer K., Klingmüller M., Beug H., *et al.* Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* 2008;111:4511-4522.
190. Sui X., Krantz SB, You M and Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood*. 1998;92:1142-1149.

Co-stimulation with stem cell factor and erythropoietin enhances migration of c-Kit expressing cervical cancer cells through the sustained activation of ERK1/2

CRISTINA AGUILAR¹, CECILIA AGUILAR¹, REBECA LOPEZ-MARURE²,
ALEJANDRO JIMÉNEZ-SÁNCHEZ¹ and LETICIA ROCHA-ZAVALA¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM, Ciudad Universitaria, C.P. 04510; ²Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez', Departamento de Biología Celular, Colonia Sección 16, Tlalpan, C.P. 14080, Mexico City, Mexico

Received July 30, 2013; Accepted February 17, 2014

DOI: 10.3892/mmr.2014.2044

Abstract. The cytokines erythropoietin (Epo) and stem cell factor (SCF), coupled with the cooperation between their receptors (EpoR and c-Kit), are essential components of normal physiological erythropoiesis. In earlier studies, we demonstrated the expression of c-Kit and EpoR in cervical cancer cells. It was identified that SCF is a survival factor, whereas Epo promotes cell proliferation. Cooperation between EpoR and SCF in cervical cancer has rarely been studied, despite the fact that cell migration and anchorage independent growth are considered initial steps in metastasis. Thus, the aim of this study was to analyse the effect of SCF and Epo alone, or in combination, on the migration and anchorage independent growth of two cervical cancer-derived cell lines. First, we demonstrated the expression of EpoR and c-Kit in the cell lines. Next, we evaluated anchorage independent growth, and identified that Epo and SCF produced a modest number of colonies, whereas the combination Epo/SCF induced a significantly higher number of colonies. Migration was then evaluated in Boyden chambers. Co-stimulation with Epo/SCF induced a significantly higher number of migrating cells than either cytokine alone. SCF-, Epo- and Epo/SCF-induced migration was inhibited by blocking phosphorylation of Janus kinase 2 (JAK2). Accordingly, western blot analysis demonstrated that the JAK2/signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) axis was activated in all cases. By contrast, inhibition of extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2 abrogated migration induced by SCF and Epo/SCF only. Concurrently, Epo induced a modest, transient

activation of ERK1/2, whereas SCF and Epo/SCF prompted a strong, sustained phosphorylation of ERK1/2. The results from this study have revealed that co-stimulation with Epo/SCF promotes migration and anchorage independent cell growth, and that co-signalling from EpoR and c-Kit converge on JAK2/STAT5 activation. Furthermore, SCF- and Epo/SCF-induced migration depends on the sustained activation of ERK1/2. These results indicate that co-signalling from different cytokine receptors induces migration, and this suggests that migratory behaviour may be regulated by the cooperative activity of Epo and SCF in cells expressing their cognate receptors.

Introduction

Erythropoietin (Epo) and stem cell factor (SCF) are key elements for normal erythropoiesis. Epo and SCF are important cytokines that regulate erythroid progenitor proliferation, survival and differentiation by binding to their receptors, EpoR and c-Kit, respectively. The interaction of Epo and EpoR induces the activation of EpoR-associated Janus kinase 2 (JAK2) by transphosphorylation. Activated JAK2 phosphorylates tyrosine residues on the cytoplasmic domain of the receptor (1). These phosphorylated residues may act as docking sites for a variety of Src homology-2 (SH2) domain-containing proteins, initiating relevant signalling pathways, including the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT, the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2, and the JAK2/signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) pathways, promoting cell survival (2,3) and proliferation (4).

On the other hand, binding of SCF induces the activation of c-Kit, a tyrosine kinase activity receptor, by transphosphorylation of various tyrosine residues. SH2 domain-containing signalling proteins are then recruited for the activation of transduction routes, including the PI3K/AKT cascade, which has been associated with the inhibition of apoptosis (5), the Src family kinase (SFK) signalling pathway, inducing cell proliferation (6), the MAPK/ERK route, implicated in the stimulation of cell migration (7), and the phospholipase C (PLC) and D (PLD) signalling cascade, which is involved in

Correspondence to: Dr Leticia Rocha-Zavaleta, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología UNAM, Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Mexico City, Mexico
E-mail: lrochaz@biomedicas.unam.mx

Key words: cervical cancer, erythropoietin, stem cell factor, c-Kit, cell migration

the protection against radiation-induced cell death (8) and the responses induced by membrane-bound SCF (9).

Cooperation between EpoR and c-Kit during erythropoiesis has been well documented (10-12). However, EpoR and c-Kit are also expressed in nonerythroid cells of the normal female genital tract (13,14) and cervical tumours (15). The effect of Epo and SCF on cervical cancer cells has been studied separately. In a previous study, we demonstrated the expression of functional c-Kit in cervical cancer cells, and presented evidence that SCF is a survival factor for this type of tumour cell (16). Following this, we described the presence of an autocrine/paracrine Epo/EpoR system in cervical cancer cells, and demonstrated that exogenous Epo promotes cell proliferation in a JAK/STAT-dependent manner (17). In addition, it has been revealed that activation of EpoR may enhance the migration of cells derived from head and neck squamous cell carcinoma (18), breast cancer (19) and cervical cancer (20). Although cooperation between EpoR and c-Kit has been characterised in erythropoiesis (10-12), less is known about co-signalling between Epo and SCF in cancer. Cell migration is considered the first step in metastasis, therefore, identification of signalling proteins with the potential to contribute to cell migration may provide new insights into how cancer cell migration and metastasis are regulated. Thus, the aim of this study was to analyse the role of SCF, Epo and a combination of Epo/SCF on the anchorage independent cell growth and migration of cells derived from cervical tumours. We identified that co-stimulation of cervical cancer cells with Epo and SCF promotes migration and anchorage independent cell growth. This effect is significantly higher than that induced by either cytokine alone. Inhibition of JAK2 phosphorylation caused a significant reduction of Epo-, SCF- and Epo/SCF-induced migration. Similarly, western blot analysis demonstrated the activation of STAT5 in all treatments, suggesting that co-signalling from EpoR and c-Kit converge on JAK2/STAT5 activation. Furthermore, inhibition of ERK1/2 resulted in the abrogation of Epo-, SCF-, and Epo/SCF-induced migration. Western blot analysis demonstrated that stimulation with Epo induced a weak, transient activation of ERK1/2, whereas administration of SCF alone and Epo/SCF, induced a sustained activation of ERK1/2. Therefore, this suggests that co-stimulation with Epo/SCF may be regulating migration through the activation of multiple different signalling cascades.

Materials and methods

Cell lines and culture. Cervical cancer-derived cell lines were obtained as previously described (16). InB1 cells were derived from a patient diagnosed with epidermoid, non-keratinized, metastatic cervical cancer (FIGO, stage IVB). The CaLo cell line was derived from a tumour biopsy from a patient diagnosed with epidermoid, non-keratinized cervical cancer (FIGO, stage IIB). The two cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Invitro, Mexico City, Mexico) supplemented with 2% foetal bovine serum (FBS; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The K562 human chronic myelogenous leukaemia cell line was used as a positive control for the expression of EpoR (21). K562 cells were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies) containing 10% FBS. All cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂.

Western blot analysis. The cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; 0.25% sodium deoxycholate), containing 100 µl/ml complete protease inhibitors cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and 10 µl/ml phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For the isolation of membrane proteins, cells were resuspended in a lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 0.05% SDS. Total protein content was determined using the DC protein assay kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The protein (30 µg) was resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated at 4°C, overnight with specific antibodies diluted 1:1,000 and then washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted 1:5,000 (Zymed Laboratories, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For the detection of c-Kit, membranes were incubated with a biotinylated-swine antiserum, mouse and rabbit polyclonal antibody (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) diluted 1:2,000 for 2 h at room temperature, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (DakoCytomation) diluted 1:3,000 for 2 h at room temperature. Proteins were detected by chemiluminescence using the Amersham ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA). For the detection of human EpoR, a goat anti-human EpoR antibody (Sigma-Aldrich) was used, which was produced using purified recombinant human erythropoietin soluble receptor as an immunogen. For the detection of c-Kit, a mouse anti-human c-Kit from Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, MA, USA) was used. For the study of signalling cascades, rabbit anti-STAT5, rabbit anti-STAT5 (phospho Tyr 694), rabbit anti-ERK1 and ERK2 (ERK1/2) and rabbit anti-ERK (phospho Thr185 + Thr202 + Tyr204 + Tyr187) were used, all from GeneTex Inc. (Irvine, CA, USA). As an internal control, a rabbit anti-GAPDH (GeneTex Inc.) was included.

Flow cytometry. Cells were harvested, fixed in 2% paraformaldehyde, and stained with the carboxyfluorescein-conjugated mouse monoclonal anti-human erythropoietin receptor or phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-human c-Kit/CD117 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h. Cells were washed with PBS and analysed using a FACScalibur with Cell Quest software (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Cell proliferation and survival assays. To evaluate cell proliferation, cells were incubated with different concentrations of human recombinant Epo (1, 10, 20, 30 and 50 U/ml; Sigma-Aldrich) or left untreated for 4 days. Proliferation was determined by the colorimetric MTT assay. To evaluate the effect of SCF on survival, the cells were incubated in the culture medium without FBS, treated with 15 U/ml of SCF, or left untreated for 14 days. Cell viability was evaluated by the MTT assay.

Cell migration assay. The effect of Epo and SCF on migration was evaluated using the QCM™ 24-well colorimetric cell migration assay (Chemicon International, Millipore, Temecula, CA, USA), which is based on the Boyden Chamber

migration assay. The cells were starved by incubating 12 h prior to assay in FBS-free medium. Cells (1×10^5) were then seeded onto the upper chamber in 300 μ l of FBS-free medium and then supplemented with 5% bovine serum albumin (BSA). FBS-free medium (500 μ l) containing 5, 10, 20 and 30 U/ml Epo or SCF, or 10/20, 10/10 and 30/30 U/ml of Epo/SCF combinations, was loaded into the lower chambers. As a negative control, FBS-free medium was used. Medium supplemented with 10% FBS was included as a positive control. The plates were incubated for 24 h. Cell migration was determined by colorimetric measurement at 560 nm.

Soft agar colony formation assay. Cells (1×10^5) were seeded in 0.3% agar in culture medium supplemented with 5% FBS and 30 U/ml Epo or 15 U/ml SCF, or a combination of 30 U/ml Epo and 15 U/ml SCF, over a layer of 0.6% agar in 24-well plates. Following 7 days of incubation, colonies were stained with 1% crystal violet in 20% methanol, then imaged and counted.

Inhibition of receptors and signalling molecules. To inhibit the expression of EpoR in the cell membrane, the cells were incubated with 20 μ M lovastatin (Sigma-Aldrich), which is a selective inhibitor of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase, for 20 h at 37°C. Inhibition of surface expression was evaluated by western blotting of membrane protein extracts. For transient inhibition of c-Kit gene expression, a commercial small interfering RNA (siRNA) system was used (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Pools of target-specific 19-25 nucleotide siRNA (Santa Cruz catalogue no. 29225) were used to transfect cells according to the instructions of the manufacturer. As a negative control, cells were transfected with scrambled RNA. Cells were pre-incubated in antibiotic-free culture medium for 24 h. siRNAs were diluted in transfection medium, mixed with the transfection reagent and incubated at room temperature for 30 min. The mixture was overlaid onto the cells and then incubated for 7 h at 37°C. Culture medium containing a double concentration of FBS and antibiotics was added without removing the transfection mixture and further incubated for 24 h. The medium was replaced with fresh culture medium supplemented with 10% FBS and the cells were assayed 48 h later. Expression of c-Kit was evaluated by western blotting. To inhibit the JAK2 phosphorylation, the cells were incubated with 10 μ M Tyrphostin AG-490 (Sigma-Aldrich) diluted in ethanol for 24 h. PI3K was inhibited by incubating the cells with 100 nM Wortmannin (Sigma-Aldrich) diluted in DMSO for 24 h. To inhibit ERK1/2 kinases, the cells were incubated with 20 μ M U0126 ethanolate (Sigma-Aldrich) diluted in DMSO for 24 h.

Isolation of c-Kit-expressing cells. Columns and reagents were purchased from Miltenyi Biotec (Teterow, Germany). For the isolation of c-Kit (also known as CD117) positive cells, the CD117 MicroBead kit, including paramagnetic microbeads conjugated to monoclonal mouse anti-human CD117 antibody, were used according to the instructions of the manufacturer. Briefly, 1×10^6 cells were resuspended in 300 μ l of column buffer, then 100 μ l of FcR blocking reagent and 100 μ l of CD117 MicroBeads were added, the cells were incubated for 15 min at 4°C. Following washing of the cells, they were resuspended in 500 μ l of buffer. LS* columns were attached to the magnet and washed with 3 ml of buffer, then the cell suspension was applied onto the column.

The column was washed three times and the unlabeled cells flowing through were collected for analysis. The column was removed from the separator magnet, 5 ml of buffer was added onto the column, and magnetically labelled cells were flushed out by pushing the plunger into the column.

Statistical analysis. Results are presented as the mean \pm standard error (SEM). The t-test was used for the comparison between treatment groups and between cell lines. Confidence intervals (CI, 95%) and P values were calculated. The test was two-tailed and $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant result.

Results

Expression of EpoR and c-Kit in CaLo and InBl cells. Expression of EpoR and c-Kit was investigated in CaLo and InBl cells. Western blot analysis demonstrated the presence of a band of the predicted molecular weight for EpoR (65 kDa) and c-Kit (145 kDa) in CaLo and InBl cells (Fig. 1A). For EpoR to be functional, it must be translocated to the cell surface. Therefore, the expression of EpoR in the cell membrane was analysed by flow cytometry. As demonstrated in Fig. 1B, membrane expression of EpoR was detected in the CaLo and InBl cell lines. By contrast, detection of c-Kit by western blotting was problematic and required a biotin-mediated amplification step, suggesting that the receptor was either expressed at low levels or by a low number of cells. Therefore, the proportion of c-Kit expressing cells were evaluated by flow cytometry. As observed in Fig. 1B, a population of 12.8% of CaLo cells and 11.4% of InBl cells revealed a positive membrane expression of c-Kit.

Exogenous Epo stimulates proliferation of CaLo and InBl. In a previous study, we identified that exogenous Epo induces proliferation of cervical cancer cell lines. Therefore, to investigate whether stimulation with Epo induces proliferation of CaLo and InBl, the cell lines were incubated in the presence of increasing concentrations of Epo. As expected, the cell lines demonstrated a dose-dependent increase in cell proliferation (Fig. 2A). However, proliferation of CaLo cells was significantly augmented from doses >30 U/ml, whereas enhancement of InBl proliferation was evident from doses >1 U/ml. In fact, throughout the various concentrations of Epo tested, proliferation of InBl was constitutively higher than that of CaLo (Fig. 2A). To verify that cell proliferation was mediated by EpoR, the cells were pre-incubated with lovastatin, which reduced the cell membrane expression of EpoR (Fig. 2B). As summarized in Fig. 2C, incubation with lovastatin reverted the proliferation effect induced by 30 U/ml of Epo, demonstrating that proliferation was mediated by EpoR.

Exogenous SCF induces survival of cells in the absence of FBS. Inhibition of endogenous SCF expression induces apoptosis in CaLo and InBl cells (16). In the present study, it was investigated whether exogenous SCF would protect cells from starvation-induced death. As observed in Fig. 2D, a small but significant proportion of CaLo cells survived FBS withdrawal when cultured in the presence of SCF. Of note, InBl cells were able not only to survive but also to proliferate as a response to SCF. Inhibition of c-Kit expression using siRNA (Fig. 2E) completely eliminated the effect of SCF (Fig. 2F). These obser-

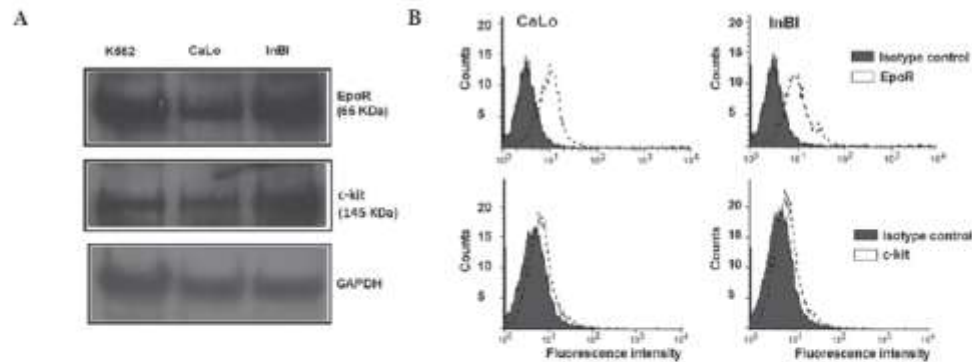


Figure 1. Expression of EpoR and c-Kit in cervical cancer cell lines. (A) Expression of EpoR and c-Kit was analysed in membrane protein extracts from CaLo and InBI cells by western blotting. EpoR was detected with an antibody produced using human erythropoietin soluble receptor as an immunogen. c-Kit could only be detected by using a biotin/streptavidin-mediated signal amplification step, following incubation with a monoclonal anti-human c-Kit antibody. Human leukaemia K562 cells were used as the positive control. (B) Cell surface expression of EpoR and c-Kit in CaLo and InBI cells was evaluated by flow cytometry. As a negative control, a primary isotype control antibody was used instead of either anti-EpoR or anti-c-Kit antibodies. EpoR, erythropoietin receptor.

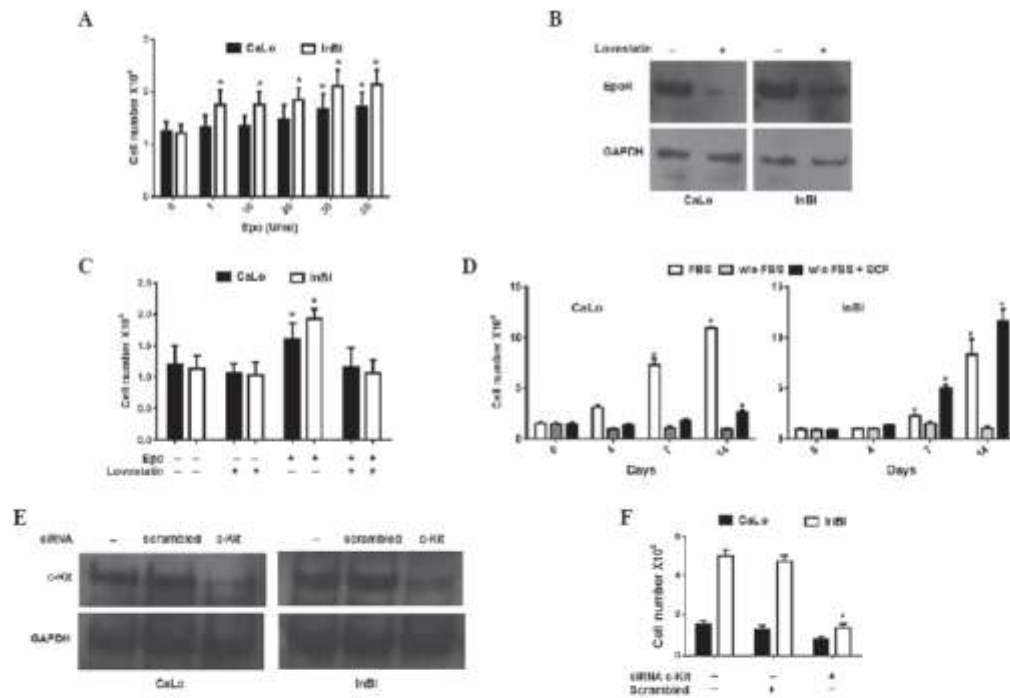


Figure 2. Evaluation of the effect of Epo and SCF on cervical cancer cells. (A) CaLo and InBI cells were incubated with the indicated concentrations of Epo. Cell number was evaluated by the colorimetric MTT assay. (B) To demonstrate that Epo-induced proliferation was mediated by cell membrane EpoR, the cells were pre-incubated with lovastatin. The effect of lovastatin on the cell surface expression of EpoR was investigated by western blotting of membrane protein fractions. Detection of GAPDH expression was included as a control. (C) Cells were pre-treated with lovastatin and then incubated with 30 U/mL Epo. Cell proliferation was assessed using the MTT assay. (D) CaLo and InBI cells were cultured in FBS-free medium (w/o FBS), in FBS-free medium containing 15 U/ml SCF (w/o FBS + SCF) or in medium supplemented with 10% FBS as a control (FBS) for 14 days. Cell viability was evaluated by an MTT assay. (E) To demonstrate that the SCF-induced survival effect was mediated by c-Kit, cells were transfected with siRNA for transient inhibition of c-Kit gene expression (c-Kit) or with a non-related siRNA (scrambled) as a negative control. Expression of c-Kit was evaluated by western blotting and detection of GAPDH expression was included as a control. (F) Cells were transfected with specific c-Kit siRNA, non-related siRNA (scrambled) or left untreated. Following this, the cells were cultured in FBS-free medium containing 15 U/ml SCF for 7 days. Cell viability was evaluated by an MTT assay. * $P < 0.05$, compared with untreated control values. For (A), (C) and (F), values represent the mean of three independent experiments and the error bars indicate the SEM. Epo, erythropoietin; SCF, stem cell factor; SEM, standard error of the mean; FBS, foetal bovine serum; siRNA, small interfering RNA.

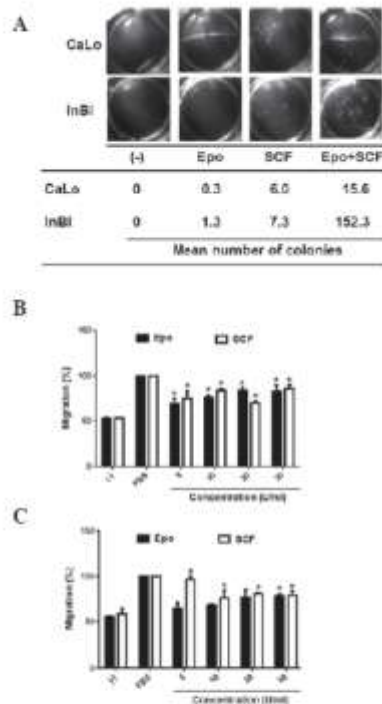


Figure 3. Effect of Epo and SCF on anchorage independent growth and cell migration. (A) Anchorage independent cell growth was evaluated by soft agar colony formation assays. Cells were seeded in soft agar containing Epo (30 U/ml), SCF (15 U/ml) or a combination of Epo and SCF (Epo+SCF) at the indicated concentrations, for 7 days. Colonies were stained and counted. A representative photograph of the colonies is shown. Data represent the mean of three independent experiments. Migration of (B) CaLo and (C) InBI cells was evaluated by Boyden chamber assays. The indicated concentrations of Epo and SCF were loaded into the lower chambers and the cells were allowed to migrate for 24 h. As a negative control, FBS-free culture medium (-) was used. Medium supplemented with 10% FBS (FBS) was included as a positive control. Data represent the mean of three independent experiments and the error bars indicate the SEM. * $P < 0.05$, compared with negative controls. Epo, erythropoietin; SCF, stem cell factor; SEM, standard error of the mean; FBS, foetal bovine serum.

vations suggest that SCF protects cells from starvation-induced death by activating its corresponding receptor, c-Kit.

Anchorage independent cell growth and migration are induced by a combination of Epo/SCF. Anchorage independent cell growth has been associated with metastatic potential. Therefore, it was next evaluated if Epo and/or SCF would be able to stimulate the formation of cell colonies in soft agar. The results are demonstrated in Fig. 3A. Administration of Epo or SCF alone produced a modest number of colonies in the cell lines. By contrast, the combination of Epo and SCF promoted a significant increase of cell colonies in CaLo and a highly significant increment of cell colony numbers in InBI cells. Cell migration is fundamental for tumour dissemination. Therefore, to investigate whether activation of EpoR and c-Kit induces cell migration, the cell lines were seeded on the upper insert of Boyden chambers, migration was tested in the presence of 5, 10, 20 and 30 U/ml of either Epo or SCF. As demonstrated in

Fig. 3B, CaLo cells were stimulated to migrate by Epo and SCF at the various different doses tested. The response of InBI cells was significantly higher at 5 U/ml of SCF, while only the higher concentration of Epo (30 U/ml) induced a significant number of migrating cells (Fig. 3C). Our results appear to indicate that Epo and SCF alone are associated with migration but not with clonal expansion of cervical tumours. This was in contrast with the combination of Epo/SCF, that was able to stimulate migration and colony formation.

Following this, we investigated the effect of a combination of Epo and SCF on the migratory behaviour of InBI cells. Our results demonstrate that the cell lines respond to Epo and SCF, thus for the following experiments, only InBI cells were tested. Three different combinations (10/20, 10/10 and 30/30 U/ml) of Epo/SCF were used. As observed in Fig. 4A, all of the combinations induced the migration of InBI, being 10/20 significantly higher. This particular combination was subsequently compared with the effect of the growth factors alone. The results are demonstrated in Fig. 4B. The proportion of cells migrating as a response to Epo alone was significantly lower than that induced by the combination of cytokine factors. By contrast, the proportion of migrating cells in the presence of SCF was comparable to that induced by the combination of growth factors. Our results appear to suggest that SCF is a strong inducer of migration. However, as described above, we identified that only 11.4% of InBI cells express c-Kit. Therefore, in order to corroborate that cells expressing c-Kit would in turn migrate as a response to SCF, we isolated c-Kit⁺ cells by utilising paramagnetic microbeads conjugated to monoclonal anti-human CD117 antibody (Fig. 4C). The c-Kit⁺ and c-Kit⁻ cells were tested in a migration assay in the presence of Epo, SCF or Epo/SCF (Fig. 4D). In all of the conditions the proportion of migrating c-Kit⁺ cells was significantly higher than the proportion of c-Kit⁻ cells. Additionally, migration induced by the combination of Epo/SCF was superior to that produced by SCF alone in the c-Kit⁺ cells.

Migration is mediated by the activation of JAK2/STAT5 and ERK1/2. Our observations suggest that SCF, Epo and Epo/SCF induce the migration of cervical cancer cells. Binding of soluble SCF to c-Kit and Epo to its receptor activates three main signalling pathways. Thus, in an attempt to ascertain the participation of each cascade in migration, the cells were pre-incubated with Tyrphostin AG490, Wortmannin and U0126 ethanolate to inhibit JAK2, PI3K and ERK1/2, respectively and then tested in a migration assay. As depicted in Fig. 5A, migration induced by Epo, SCF and the combination of Epo/SCF was significantly reduced by inhibiting JAK2 phosphorylation. Conversely, inhibition of PI3K resulted in a modest decrement of migrating cells. By contrast, migration induced by Epo, SCF and Epo/SCF was abrogated by the inhibition of ERK1/ERK2. This observation strongly suggests that migration is regulated by JAK2-mediated signalling and the MAPK/ERK pathway. To corroborate the activation of these signalling pathways, we evaluated the Epo-, SCF- and Epo/SCF-mediated phosphorylation of STAT5 and ERK1/2 in a time-course experiment. As demonstrated in Fig. 5B, activation of STAT5 was evident only 1 min following stimulation with Epo, showing maximum phosphorylation at 30 min. Stimulation with SCF induced a rapid activation of STAT5, presenting a maximum at 1 min following stimulation, with this response decaying after 30 min. Activation of STAT5

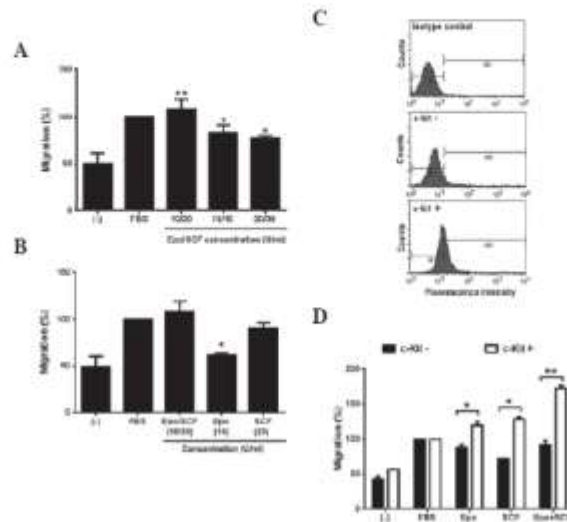


Figure 4 Induction of migration by co-stimulation with Epo and SCF. (A) InBl cells were co-stimulated with the indicated concentrations of Epo and SCF (Epo/SCF) in Boyden chambers for 24 h. FBS-free medium (-) and medium supplemented with 10% FBS were included as a negative and positive control, respectively. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$, compared with the negative controls. (B) InBl cells migration was evaluated in the presence of the combination of Epo/SCF that produced the highest migration effect (10/20 U/ml) and compared with the effect of either cytokine alone. As a negative control, FBS-free medium (-) was used. Medium supplemented with 10% FBS was included as a positive control. * $P < 0.05$, compared with cells stimulated with Epo/SCF. (C) c-Kit expressing InBl cells were isolated using anti-human CD117 (c-Kit)-conjugated paramagnetic microbeads. Isolated c-Kit expressing cells (c-Kit⁺), and unlabelled cells (c-Kit⁻) were analysed by flow cytometry. As a negative control c-Kit expressing cells were incubated with a primary isotype control antibody instead of anti-c-Kit. (D) Isolated c-Kit expressing (c-Kit⁺) and unlabelled (c-Kit⁻) InBl cells were assessed in a migration assay in the presence of Epo (10 U/ml), SCF (20 U/ml) or a combination of Epo and SCF (Epo+SCF; 10/20 U/ml). As a negative control, FBS-free culture medium (-) was used. Medium supplemented with 10% FBS (FBS) was included as a positive control. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$, comparing c-Kit⁺ with c-Kit⁻ cells. For (A), (B) and (D) data represent the mean of three independent experiments and the error bars indicate the SEM. Epo, erythropoietin; SCF, stem cell factor; FBS, foetal bovine serum; SEM, standard error of the mean.

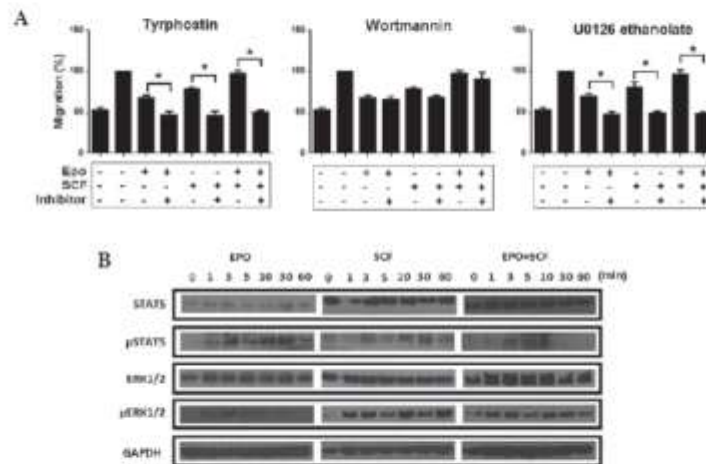


Figure 5 Effect of inhibition of different signalling pathways on Epo/SCF-induced migration. (A) To inhibit phosphorylation of JAK2, InBl cells were pre-incubated with 10 μ M Tyrosphostin AG-490 diluted in ethanol for 24 h. PI3K was inhibited by pre-incubating the cells with 100 nM Wortmannin diluted in DMSO for 24 h. To inhibit ERK1/2 kinases, the cells were pre-incubated with 20 μ M U0126 ethanolate diluted in DMSO for 24 h. Migration induced by Epo (10 U/ml), SCF (20 U/ml) or a combination of Epo and SCF was then evaluated by Boyden chamber assays. All values reported represent the mean of three independent experiments and the error bars indicate the SEM. * $P < 0.05$ comparing cells pre-incubated with the indicated inhibitors with untreated cells. (B) Western blot analysis of STAT5 and ERK1/2 activation in response to Epo, SCF, and Epo/SCF stimulation. InBl cells were incubated with Epo (10 U/ml), SCF (20 U/ml) or Epo/SCF (10/20 U/ml). Protein lysates (30 μ g) were analysed by 10% SDS-PAGE. Specific proteins were detected using antibodies to STAT5, pSTAT5, ERK1/2 and pERK1/2. GAPDH detection was included as a control. A representative blot from triplicate experiments is presented. Epo, erythropoietin; SCF, stem cell factor; JAK2, Janus kinase 2; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; ERK, extracellular signal-related kinase; SEM, standard error of the mean; STAT5, signal transducer and activator of transcription-5; pSTAT5, phospho-STAT5; pERK, 1/2 phospho-ERK1/2.

was only detected at 3, 5 and 10 min following treatment with the combination of Epo/SCF. Unlike STAT5, phosphorylation of ERK1/2 was weakly induced by Epo. By marked contrast, SCF, as well as the combination of Epo/SCF, promoted a strong phosphorylation of ERK1/2 from 1 min following treatment. Notably, ERK1/2 activation persisted at high levels until the end of the time-course experiment (60 min).

Discussion

Experimental evidence demonstrating that Epo contributes to cellular proliferation of human cancer cells is expanding. Accordingly, Epo has been recently associated with proliferation of renal cell carcinoma (22), melanoma (23), head and neck cancer (24) and prostate carcinoma (25). In addition, we demonstrated that Epo promotes cell proliferation of three cervical cancer-derived cell lines (17). In the present study, it was observed that Epo stimulates proliferation of two more cervical cancer cell lines. These observations suggest that Epo-induced proliferation is a common feature of this type of cancer. On the other hand, expression of c-Kit receptor has been identified in cervical cancer tissue samples and cell lines (26). In this study, we have detected the expression of c-Kit in two cervical cancer-derived cell lines. However, it has been observed that only a small proportion (<13%) of the cells were positive for the expression of the receptor at the cell surface. In spite of the low number of cells expressing c-Kit, SCF induced the survival of the cells when they were cultivated in the absence of FBS. Activation of the SCF/c-Kit axis is crucial for the survival of various types of cells, including hematopoietic cells (27), mast cells (28), embryonic stem cells (29) and ovarian cancer cells (30). This observation indicates that the activation of the c-Kit receptor in cervical cancer cells contributes to the survival of cells exposed to unfavourable conditions.

To further study the potential for SCF and Epo to support cervical cancer cells growth, an anchorage independent cell growth assay was set. The results demonstrated that individual administration of Epo or SCF induced a limited number of colonies. However, the combination of Epo/SCF produced a significantly higher number of colonies, particularly in InBI cells. Previous studies have demonstrated that SCF is able to increase the colony-forming potential of colon carcinoma cells (31), and that Epo augments the number of colonies in a modified, c-Kit-expressing breast cancer cell line (32). However, the coordinated effect of Epo and SCF on the colony-forming potential of tumour cells had not been described until now. Anchorage independent growth has been associated with metastatic potential, but cell migration is considered to be the first step in metastasis. Of note, in this study it was identified that migration of cervical cancer cells was stimulated by Epo and SCF alone, but was significantly enhanced by their co-administration. These results are consistent with an earlier study, which demonstrated that Epo induced the migration of HeLa cells, acting as a chemoattractant under serum-starved conditions (20). Similarly, induction of cell migration by SCF has been reported in colon carcinoma cells (31). The combined effect of Epo and SCF on the migration of cancer cells had not been investigated until now.

The results in the present study strongly suggest the cytokines Epo and SCF have a cooperative effect in cervical cancer. The coalition of Epo and SCF was initially observed during the

generation of erythroid blast and colony forming units, where it was revealed that c-Kit, via the interaction with the extended box 2 region of EpoR, triggered the induction of phosphorylation of EpoR's tyrosine residue (33). Additionally, the synergistic interactions between Epo and SCF appears to be due to co-signalling. EpoR and c-Kit share three basic signalling pathways, JAK/STAT, PI3K/AKT and MAPK/ERK. In the present study, it was identified that the inhibition of JAK2 eliminated Epo/SCF-induced migration. In this context, Hong *et al* (12) reported that the JAK2 binding site in the EpoR is essential for co-signalling with c-Kit receptor. Furthermore, c-Kit has been demonstrated to cross-talk with the JAK2/STAT5 axis to promote haematopoiesis (34). In this study we observed the activation of STAT5, however, there was no difference between the level of STAT5 phosphorylation induced by either cytokine alone or in combination. These observations indicate that the JAK2/STAT5 system, although not directly activated by these cytokines, is crucial in promoting migration as a response to Epo, SCF and Epo/SCF stimulation in cervical cancer cells.

Similarly, obstruction of the MAPK/ERK pathway using the ERK1/2-specific inhibitor U0126 ethanolate, eliminated Epo-, SCF- and Epo/SCF-induced cell migration. Consistent with these data, an earlier study identified that the migration of HeLa cells was induced by Epo in a MAPK-dependent manner (20). The authors also described that the activation of this pathway was, in turn, dependent on JAK2 activity. In the present study, it was observed that co-administration of Epo and SCF significantly increased migration of InBI cultures enriched with c-Kit⁺ cells. SCF and Epo have been demonstrated to induce the continuous activation of ERK1/2 in erythroid cells synergistically (35). In this study, it was revealed that co-stimulation with SCF and Epo produced a sustained activation of ERK1/2 in InBI cells. Notably, treatment with Epo caused a modest and transient activation of ERK1/2, whereas treatment with SCF prompted a sustained activation of these kinases. These results indicate that Epo/SCF co-stimulation of InBI cells migration is regulated by the JAK2/STAT5 axis in coordination with a sustained activation of ERK1/2.

In summary, we have demonstrated that co-stimulation of cervical cancer cells with Epo and SCF promotes migration and anchorage independent cell growth, which are effects that are superior to that promoted by either cytokine alone. In addition, our results suggest that co-signalling from EpoR and c-Kit converge on JAK2/STAT5 activation, being that this signalling pathway is an important regulator of migration. Of note, stimulation with SCF alone as well as Epo/SCF in combination, induced a sustained activation of ERK1/2 and inhibition of ERK1/2 resulted in the abrogation of migration. Metastasis is a complex issue and these results provide important insights into how co-signalling from different receptors induces migration, and suggests that migration may be regulated by a variety of signalling pathways. Therefore, future studies investigating multiple regulatory cascades participating in migration would facilitate the development of more efficacious therapeutic approaches in the treatment of cancer.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CONACyT (grant: 152492) and PAPIIT (grant: IN209613). The present work

was performed in partial fulfilment of the requirements for the PhD degree in Ciencias Biológicas of Cristina Aguilar at the Universidad Nacional Autónoma de México, with doctoral scholarships from CONACyT (Reg: 49102), ICyTDF (Reg: B112-179), and COMECyT (Reg: 12BCD0052-I). The authors thank the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for academical support.

References

- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O and Ihle JN: JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74: 227-236, 1993.
- Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wiekrema A and Sawyer ST: Protein kinase B (ϵ -Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 93: 3757-3773, 1999.
- Sokolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C and Lodish HF: Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98: 3261-3273, 2001.
- Damen JE, Wakao H, Miyajima A, Kros J, Humphries RK, Cutler RL and Krystal G: Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J* 14: 5557-5568, 1995.
- Blume-Jensen P, Janknecht R and Hunter T: The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8: 779-782, 1998.
- Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D and Litz J: Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family inhibitor PPI. *Cancer Res* 58: 4660-4666, 1998.
- Sundström M, Alfredsson J, Olsson N and Nilsson G: Stem cell factor-induced migration of mast cells requires p38 mitogen-activated protein kinase activity. *Exp Cell Res* 267: 144-151, 2001.
- Maddens S, Charruyer A, Plo I, Dubreuil P, Berger S, Salles B, Laurent G and Jaffrezou JP: Kit signalling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood* 100: 1294-1301, 2002.
- Trieselmann NZ, Soboloff J and Berger SA: Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation. *Cell Mol Life Sci* 60: 759-766, 2003.
- Wu H, Klingmüller U, Besmer P and Lodish HF: Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377: 242-246, 1995.
- Wu H, Klingmüller U, Acurio A, Hsiao JG and Lodish HF: Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1806-1810, 1997.
- Hong L, Ramdas B, Chen J, Harris C, Wojchowski DM and Kapur R: KIT associated intracellular tyrosines play an essential role in EpoR co-signalling. *Cell Signal* 20: 1513-1520, 2008.
- Farrell F and Lee A: The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 9 (Suppl 5): 18-30, 2004.
- Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Suginami H, Iwai M, Nakayama H and Mori T: The expression of c-kit protein in human adult and fetal tissues. *Hum Reprod* 8: 1955-1962, 1993.
- Shenouda G, Mehio A, Souhmi L, Duclos M, Portelance L, Belenkov A and Chow T: Erythropoietin receptor expression in biopsy specimens from patients with uterine cervix squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 16: 752-756, 2006.
- Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha-Zavaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, *et al.*: Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res* 61: 6281-6289, 2001.
- Lopez TV, Lappin TR, Maxwell P, Shi Z, Lopez-Marure R, Aguilar C and Rocha-Zavaleta L: Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *Int J Cancer* 129: 2566-2576, 2011.
- Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C, Lai SY, Cohen N, Acs G and Verma A: Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 7: 537-543, 2005.
- Lester RD, Jo M, Campana WM and Goniás SL: Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia. *J Biol Chem* 280: 39273-39277, 2005.
- Hamadmad SN and Hohl RJ: Erythropoietin stimulates cancer cell migration and activates RhoA protein through a mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 1227-1233, 2008.
- Fraser JK, Lin FK and Berridge MV: Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. *Blood* 71: 104-109, 1988.
- Fujisue Y, Nakagawa T, Takahara K, Inamoto T, Kiyama S, Azuma H and Asahi M: Induction of erythropoietin increases the cell proliferation rate in a hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent manner in renal cell carcinoma cell lines. *Oncol Lett* 5: 1765-1770, 2013.
- Kumar SM, Zhang G, Bastian BC, Arcasoy MO, Karande P, Pushparajan A, Acs G and Xu X: Erythropoietin receptor contributes to melanoma cell survival in vivo. *Oncogene* 31: 1649-1660, 2012.
- Steinmann K, Richter AM and Dammann RH: Epigenetic silencing of erythropoietin in human cancers. *Genes Cancer* 2: 65-73, 2011.
- Jeong JY, Hoxhaj G, Socha AL, Sytkowski AJ and Feldman L: An erythropoietin autoocrine/paracrine axis modulates the growth and survival of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* 7: 1150-1157, 2009.
- Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T and Kondoh G: Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res* 54: 3049-3053, 1994.
- Kapur R, Cooper R, Zhang L and Williams DA: Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signalling pathways. *Blood* 97: 1975-1981, 2001.
- Yang FC, Kapur R, King AJ, Tao W, Kim C, Borneo J, Breese R, Marshall M, Dinauer MC and Williams DA: Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity* 12: 557-568, 2000.
- Fraser L, Taylor AH and Forrester LM: SCF/KIT inhibition has a cumulative but reversible effect on the self-renewal of embryonic stem cells and on the survival of differentiating cells. *Cell Reprogram* 15: 259-268, 2013.
- Liu L, Zhang X, Do C, Zhang X, Hou N, Zhao D, Sun J, Li L, Wang X and Ma C: MEK1-independent activation of MAPK and MEK1-dependent activation of p70 S6 kinase by stem cell factor (SCF) in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 385-389, 2009.
- Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, Martone T, Gramigni C, Camandona M, Emanuelli G and Rodeck U: Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res* 61: 2200-2206, 2001.
- Shi Z, Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP, El-Tanani M and Lappin TR: Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT3, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behavior in a modified breast cancer cell line. *Mol Cancer Res* 8: 615-626, 2010.
- Wu H, Klingmüller U, Besmer P and Lodish HF: Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377: 242-246, 1995.
- Grebier F, Kerenyi MA, Kovacic B, Kolbe T, Becker V, Dolznig H, Pfeffer K, Klingmüller U, Müller M, Beug H, *et al.*: Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* 111: 4511-4522, 2008.
- Sui X, Krantz SB, You M and Zhao Z: Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 92: 1142-1149, 1998.

PALABRAS CLAVE

EPO	Eritropoyetina (ligando de EpoR).
SCF	Stem Cell Factor (ligando de c-Kit).
EpoR	Receptor de eritropoyetina.
c-Kit	Receptor de stem cell factor.
CaLo	Línea celular de carcinoma cervical epidermoide de células grandes no keratinizadas (NO METASTÁSICAS).
InBl	Línea celular de carcinoma cervical epidermoide de células grandes no keratinizadas (METASTÁSICAS).
rHuEPO	Eritropoyetina Recombinante Humana.