



UNIVERSIDAD NACIONAL ¿AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE
ERITROPOYETINA (EpoR) EN CÉLULAS DE CARCINOMA
CERVICAL, SU EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LAS
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE ACTIVA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. TANIA VALENTINA LÓPEZ PÉREZ

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA.**



2011.



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.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta quien ha sido parte fundamental en mi formación académica y personal.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Vilma Maldonado Lagunas y la Dra. Marcela Lizano Soberón quienes con sus observaciones y sugerencias a lo largo de todo mi doctorado me permitieron crecer como estudiante.

Al Dr. Terence Lappin por su infinita calidez humana y su total apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal durante mi estancia en su laboratorio.

A los sinodales Dr. Jaime Berumen, Dr. Alejandro García, Dr. Diego Arenas y el Dr. Juan José Montesinos quienes con sus comentarios enriquecieron esta tesis.

A la M. en C. Cecilia Aguilar por el apoyo técnico otorgado durante la realización de ésta tesis.

A la Veterinaria Georgina Díaz por su apoyo técnico en el bioterio.

A CONACYT por su apoyo económico en el desarrollo de este proyecto (CB-2005-01-49167) y por la beca que me otorgó durante mis estudios de posgrado (Becario 195193).

Al programa PAPPIT por su apoyo económico en el desarrollo de este proyecto (IN210507).

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que a través del Instituto de Investigaciones Biomédicas patrocinó mi asistencia a congresos nacionales e internacionales, así como mi estancia de investigación en el Reino Unido. Agradezco también al personal administrativo del posgrado en especial a Blanca Huerta, Azucena Ayala y Angélica Téllez por otorgar siempre su apoyo con un trato amable y una sonrisa.

DEDICATORIAS

A mis padres Lulú y Manuel por amarme y apoyarme incondicionalmente a pesar de mis múltiples errores, locuras y desasosiegos.

A mi abuelita Mere por la que siento un gran amor y me da una alegría inmensa poder compartir con ella estos momentos después de tantas pestañas quemadas. Abuela valió la pena porque ahora ya cuento con otro “cartoncito” xD

A mi hermano Francisco porque a pesar de que siempre le decía “Ahora si ya es la última” (– –) siempre me ayudó con la edición de mis imágenes y las animaciones de mis presentaciones para los congresos. ¡Ah claro! Y no olvidar los múltiples “ajustes” de mi siempre computadora fallida a pesar de ser nueva :P

A mis primos y tíos quienes siempre estuvieron al pendiente de todos mis pasos por el doctorado. Por el apoyo que me brindaron antes y durante mi estancia. Sus cartas y video llamadas por Skype que me hacían sentir cerca de casa.

A mi amiga Sara Erika Canales Moncada por el apoyo constante, por hacerme notar mis errores y exageraciones, por su personalidad honesta y humanitaria, por no competir sino más bien por compartir.

A mis amigas Eden Rodríguez, Erika Arroyo, Erika Sánchez, Fabiola Rojas, Mónica Espinosa y Rocío Montiel quienes me han brindado una amistad sincera más allá de los años de facultad, gracias a todas ellas por adoptarme en el 2000 y permitirme ser parte de sus vidas.

A mis amigas Cristina Aguilar, Irma Márquez y Olga Monroy quienes se convirtieron de compañeras de laboratorio a grandes amigas. Gracias por todos y cada uno de los momentos compartidos porque ustedes hicieron de mi estancia en el laboratorio algo extraordinario. Definitivamente el laboratorio y los congresos no habrían sido igual sin las comadre... jas y el lavadero. :D

A Roberto Valdez porque sus ojos pudieron ver que en el fondo de los mares hay mundos de corales, por dejar que su alma llegue a mí.

A mi amiga Ana Estrada con quien tuve la oportunidad de compartir las mieles de la ciencia n_n. Sé que de haber podido habría estado aquí.

A mis amigos Alejandro Lara, Irene Matamoros y Shantal Sánchez con quienes se inició una amistad muy linda. Gracias a ustedes no desistí del Francés y me divertí mucho con nuestras peripecias xD.

A Zenón Cano porque aunque no sé que ha sido de su vida, lo recuerdo a menudo sobre todo cuando califico a mis alumnos y veo que les tiembla el labio inferior. Espero que la próxima vez que nos veamos haya alcanzado el éxito evolutivo y sea ya la especie clave.

A los amigos que casi no veo (y que tampoco ellos me hablan ¡JUM! U_U) pero que sé que de vez en cuando se acuerdan de mi, los quiero a todos y que conste que no escribí sus nombres para no quemarlos públicamente. ^_^

Mi más profunda convicción es que la solución a los problemas actuales requiere de más variantes de respuesta para cada problema concreto que las contenidas en un tablero de ajedrez. Ni un solo detalle se puede ignorar, y no se trata de un camino fácil, si es que la inteligencia del ser humano en una sociedad revolucionaria ha de prevalecer sobre sus instintos.

Fidel Castro

INDICE.

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 El cáncer cérvico uterino.	
2.2 La anemia y el cáncer.	
2.3 Eritropoyetina y el receptor de eritropoyetina.	
2.4 La eritropoyetina y su receptor en el cáncer cérvico uterino.	
3. Justificación del proyecto.....	28
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo general.	
4.2 Objetivos particulares.	
5. Materiales y métodos.....	30
6. Resultados.....	50
7. Discusión.....	70
8. Conclusiones.....	81
9. Perspectivas.....	82
10. Referencias Bibliográficas.....	83
11. Apéndice.....	98
12. Publicaciones.....	99

1. RESUMEN.

Los tratamientos y medicamentos utilizados en pacientes con cáncer atacan a células en división provocando daños en el DNA o inhibiendo su replicación. Como consecuencia, estas drogas y tratamientos son dañinos no solo para las células cancerosas sino también para células que de forma natural se encuentran en replicación constante, como por ejemplo las células hematopoyéticas. Por ello, uno de los efectos colaterales de la quimio y la radioterapia es la anemia.

La eritropoyetina al unirse a su receptor inhibe la apoptosis, induce la diferenciación y la proliferación en las células progenitoras eritroides por lo que es ampliamente utilizada para tratar la anemia asociada al cáncer. Sin embargo, existen estudios en donde se observó una alta tasa de mortalidad y recurrencia en pacientes con cáncer que habían recibido tratamientos con eritropoyetina, lo cual ha despertado el interés por el estudio de los efectos mediados por ésta en los tumores.

En este estudio observamos que la eritropoyetina y su receptor se expresan de manera constitutiva en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical y que la inhibición de su expresión a través de RNAs interferentes disminuyen la proliferación. La administración de eritropoyetina exógena induce un incremento significativo en la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* y ésta se asocia a la activación de las proteínas JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5. Nuestros resultados son consistentes con la existencia de un sistema de estimulación autócrino/parácrino de la eritropoyetina y su receptor el cual induce la proliferación de células derivadas de carcinoma cervical.

ABSTRACT

Erythropoietin (Epo) regulates erythropoiesis by binding to its receptor (EpoR) and promoting cell proliferation, differentiation and inhibition of apoptosis. Epo is widely used to treat cervical cancer-related anaemia. However, there are data suggesting that administration of Epo is associated with an increment in recurrence rate, and decreased disease-free and overall survival. In the present study, we investigated the expression of Epo and EpoR on cervical cancer cell lines. We observed that both EpoR and extracellular Epo are constitutively expressed in cervical cancer cells. Inhibition of either Epo or EpoR expression with siRNA attenuated cell proliferation, whereas addition of exogenous Epo led to a significant increase in cell growth, both *in vitro* and *in vivo*. Epo-induced proliferation was associated with the activation of JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5 but not JAK1 and STAT1. Our results are consistent with the existence of a functional, endogenous Epo/EpoR system in cervical cancer with the capacity to activate the transduction of signals resulting in an increased proliferation potential.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 La anemia y el cáncer.

La anemia se define como un trastorno de la sangre que ocurre cuando la cantidad de glóbulos rojos o eritrocitos es menor que lo normal. La anemia se diagnostica cuando los niveles de hemoglobina en sangre son menores a 12g/dL. Los síntomas que produce la anemia son diversos entre ellos se encuentra la taquicardia, disnea, fatiga, pérdida de peso, dolor de cabeza, mareos y/o vértigo. La mayoría de los síntomas de la anemia son el resultado de la disminución de oxígeno en las células, condición que se conoce como hipoxia.

Existen diferentes tipos de anemia, algunos de ellos están relacionados con la función de la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno en el cuerpo. Ejemplos de estos tipos de anemia son la anemia falciforme y la anemia ferropénica, siendo esta última la más común. Sin embargo hay otros tipos de anemia en donde el problema radica en los eritrocitos y no en la hemoglobina como son la anemia hemolítica (AH), la anemia megaloblástica y la anemia aplásica.

En la AH los glóbulos rojos se destruyen rápidamente debido a que sufren lisis celular (Bunn 1994) y la médula ósea no es capaz de compensar adecuadamente esta pérdida; como consecuencia hay pocos eritrocitos disponibles para el transporte de oxígeno. La AH puede ser inducida por factores intrínsecos (deficiencia en la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa la cual protege a los eritrocitos de los productos químicos naturales del oxígeno) o bien por factores extrínsecos (por infección viral o el consumo de fármacos).

En el caso de la anemia megaloblástica existe una disminución en la producción de eritrocitos debido a que la síntesis de ADN se ve afectada por algún fármaco o por una deficiencia de folato y/o vitamina B12 (Chapman 2006). En la anemia aplásica, la médula ósea produce bajas cantidades de los tres tipos de células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y plaquetas) lo cual generalmente se debe a la exposición a radiación, toxinas, metales pesados y en ocasiones por enfermedad autoinmune (Bunn 1994).

De acuerdo con varios estudios, se estima que hasta el 70% de los pacientes con neoplasias hematológicas y un 62% de los pacientes con tumores sólidos presentarán anemia durante la evolución de su enfermedad (Waters et al. 2002; Tas et al. 2002; Ludwig et al. 2004). El

origen de la anemia en cáncer es multifactorial y el grado de anemia varía dependiendo del tipo del tumor y del tipo de terapia administrada (Waters et al. 2002; Tas et al. 2002; Silvestris et al. 2003). La anemia en pacientes con cáncer es un problema complejo en el cual se encuentran involucrados diferentes factores.

Las células hematopoyéticas al encontrarse en constante división se vuelven blanco de la quimio y radioterapia las cuales están diseñadas para producir daño al DNA y/o inhibir la duplicación del mismo en células que se encuentran en división celular. Por lo anterior, uno de los efectos colaterales de la quimio y la radioterapia es la anemia aplásica (Groopman e Itri 1999; Henke 2001). Aunado al efecto mielotóxico, la quimioterapia (principalmente la basada en cis-platino) es nefrotóxica dañando principalmente a las células peritubulares del riñón (Welch et al. 1995; Wood y Hrushesky 1995; Tas et al. 2002), las cuales son las principales productoras de eritropoyetina la cual es crucial para mantener los niveles de oxígeno en el organismo. Se ha mostrado que los pacientes con cáncer poseen bajos niveles de hemoglobina en suero y que esto se correlaciona con el grado de anemia (Miller et al. 1990). Por otro lado, las células tumorales pueden interactuar con las células del sistema inmunológico y favorecer la producción y liberación de citocinas como el interferón γ , TNF- α , IL-1, IL-6 y TGF- β las cuales en

exceso favorecen la disminución en la reutilización del hierro (Miller et al. 1990), la hipoplasia eritroide en médula ósea (Taniguchi et al. 1997), reducción en la vida media del eritrocito y la baja producción de eritropoyetina (Faquin et al. 1992). A este conjunto de características se le conoce como síndrome anémico crónico, común en pacientes con cáncer. Otros factores de riesgo para el desarrollo de anemia son las hemorragias y una dieta pobre en ácido fólico y hierro. En la tabla 1 se resumen las principales causas de anemia en los pacientes con cáncer.

2.2 La anemia y el cáncer cérvico uterino.

La incidencia de cáncer cérvico uterino (CaCu) en países desarrollados ha disminuido en los últimos años, sin embargo en países en desarrollo continúa siendo un problema serio de salud. En México el cáncer ocupa la segunda causa de mortalidad general, y el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias entre las mujeres mayores de 25 años (SSA, 2007).

Tabla 1. Causas de anemia en pacientes con cáncer.

Factor	Efecto
Radioterapia	Muerte de células progenitoras en médula ósea. Anemia Aplásica.
Quimioterapia	Muerte de células progenitoras en médula ósea. Anemia Aplásica. Efecto nefrotóxico, muerte de células productoras de EPO.
Infiltración tumoral en médula ósea	Producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias. Hemólisis. Menor reutilización de hierro. Baja producción de EPO. Anemia Megaloblástica.
Hemorragias	Pérdida de eritrocitos.
Mala Nutrición	Déficit de folato y/o Vitamina B 12. Anemia Megaloblástica. Déficit de Hierro. Anemia Ferropénica.

EPO. Eritropoyetina.

Las pacientes con CaCu presentan un doble riesgo de desarrollar anemia, por un lado el tumor produce hemorragias y por otro la terapia que se recibe para tratar el tumor induce anemia ya que dichas pacientes reciben una terapia basada en Cis-Platino y radiación. Aunado a lo anterior, la mayoría de las mujeres que lo padecen presentan deficiencias nutricionales debido a que este tipo de cáncer afecta a los sectores económicamente más desprotegidos. De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Cancerología al momento del diagnóstico el 37% de las pacientes presentan anemia y el porcentaje aumenta al recibir el tratamiento (Candelaria et al. 2005). Actualmente, como terapias de soporte para tratar la anemia en las pacientes con CaCu se administran de manera adyuvante y neoadyuvante hierro (Candelaria et al. 2005) y agentes estimulantes de la eritropoyesis como la eritropoyetina recombinante humana (Temkin et al. 2006).

Varios estudios han mostrado que el uso de eritropoyetina en pacientes oncológicos corrige los síntomas de la anemia (Abels 1993; Case et al. 1993; Henry et al. 1995) e incrementa los niveles de hemoglobina en sangre hasta llegar a niveles basales e incluso por arriba de los 12g/dL demostrando que se corregía la anemia (Glaspy et al. 1997; Demetri et al. 1998; Gabrilove et al. 2001; Littlewood et al. 2001).

Dependiendo del tipo y del grado de anemia que presenten los pacientes en ocasiones es necesario que independientemente del tratamiento con eritropoyetina reciban transfusiones sanguíneas. Estudios mostraron que el porcentaje de pacientes con cáncer que requerían transfusiones sanguíneas era menor cuando recibían eritropoyetina (Oberhoff et al. 1998; Littlewood et al. 2001; Osterbog et al. 2002; Boogaerts et al. 2003). Así mismo se corroboró el hecho de que los pacientes que recibían eritropoyetina incrementaban los niveles de hemoglobina versus los pacientes que recibían placebo.

2.3 La eritropoyetina y su función biológica.

La eritropoyetina (Epo) pertenece a la familia de las citocinas de tipo I, consiste de 165 residuos de aminoácidos y posee cuatro pequeñas cadenas de azúcares que terminan en ácido siálico (Fig. 1). Los azúcares de la Epo están implicados en la secreción de la molécula, en su tiempo de vida (Takeuchi et al. 1990) y en su estabilidad en la circulación (Misaizu et al. 1995). Se ha observado que la actividad biológica de la Epo no depende de la glicosilación de la misma, sino del mantenimiento de dos puentes disulfuro que se encuentran entre los residuos cisteínas 29 y 33 así como en los residuos 7 y 161 (Dordal et al. 1985).

2.4 El EpoR

Para realizar sus funciones la Epo debe unirse a su receptor. El EpoR es una proteína de un solo dominio transmembranal que pertenece a la superfamilia de los receptores de las citocinas, los cuales se caracterizan por poseer una secuencia de aminoácidos WSXWS, así como una región de homología de 4 cisteínas en el dominio extracelular que forman dos puentes disulfuro (Landschulz et al. 1989; Jones et al. 1990). En la porción extracelular del EpoR se localiza el extremo amino terminal, el dominio de interacción con la Epo y el sitio de dimerización del receptor. En la porción intracelular del EpoR se localiza el extremo carboxilo terminal, esta región se caracteriza por poseer 8 residuos de tirosina (Tyr) susceptibles a fosforilación (Landschulz et al. 1989; Jones et al. 1990).

Cuando una molécula de eritropoyetina se une a su receptor, éste se dimeriza (Watowich 1999) y la proteína tirosina cinasa JAK2 (por sus siglas en inglés; Janus Kinases) que se encuentra asociada a éste a través del residuo triptofano 282 (Witthuhn et al. 1993), induce su transfosforilación y su subsecuente activación (Fig. 2). JAK2 fosforila los residuos de Tyr del receptor los cuales servirán como sitios de unión

para moléculas con dominios SH2. Actualmente se han identificado 5 diferentes vías de señalización mediadas por el eje Epo-EpoR.

La ruta clásica de señalización en las células progenitoras eritroides es la vía JAK2-STAT5. Una vez que el factor de transcripción STAT5 (por sus siglas en inglés; Signal Transducer and Activator of Transcription) se une al EpoR, es fosforilado por la proteína JAK2 en una Tyr (Damen et al. 1995). Esta fosforilación le permite formar un dímero estable y translocarse al núcleo estimulando así la expresión de genes involucrados en la proliferación celular como ciclina D1 y D2 (Wojchowski et al. 1999) y c-myc (Chen y Sytkowski 2001). Por otro lado, se ha observado que la eritropoyetina es capaz de inducir la expresión de genes involucrados en la inhibición de la apoptosis como bcl-2 y bcl-x (Silva et al. 1999) en las células progenitoras eritroides.

Otras vías que pueden ser activadas por la eritropoyetina son las vías de las MAPK cinasas (por sus siglas en inglés; Mitogen Activated Protein Kinases) y PI3K-AKT. Estas dos vías son moduladas a través de Ras, una proteína G que sirve como un switch entre ambas vías (Figura 2). Las MAPK ERK1 y ERK2 inducen la expresión de bcl-x (Mori et al. 2003). Aunado a esto, en líneas celulares dependientes de Epo se ha observado la activación de la vía de la proteína cinasa C (PKC, por sus

siglas en inglés Protein Kinase C) la cual a su vez es capaz de activar a RAF-1 y MEK ambas miembros de la vía MAPK (Chen y Sytkowski 2001). La activación de la vía de la PKC induce la expresión de bcl-x (Tsushima et al. 1997) así como de c-myc. Las vías de las MAPK y la PI3K han sido estudiadas tanto en leucemias (Zhao et al. 2006) como en neuronas (Koshimura et al. 1999) y astrocitos (Lee et al. 2004).

Recientemente se ha observado que la eritropoyetina también es capaz de inducir la activación de la vía NFκ-B (por sus siglas en inglés; Nuclear Factor κ B) en neuronas y astrocitos (Lee et al. 2004).

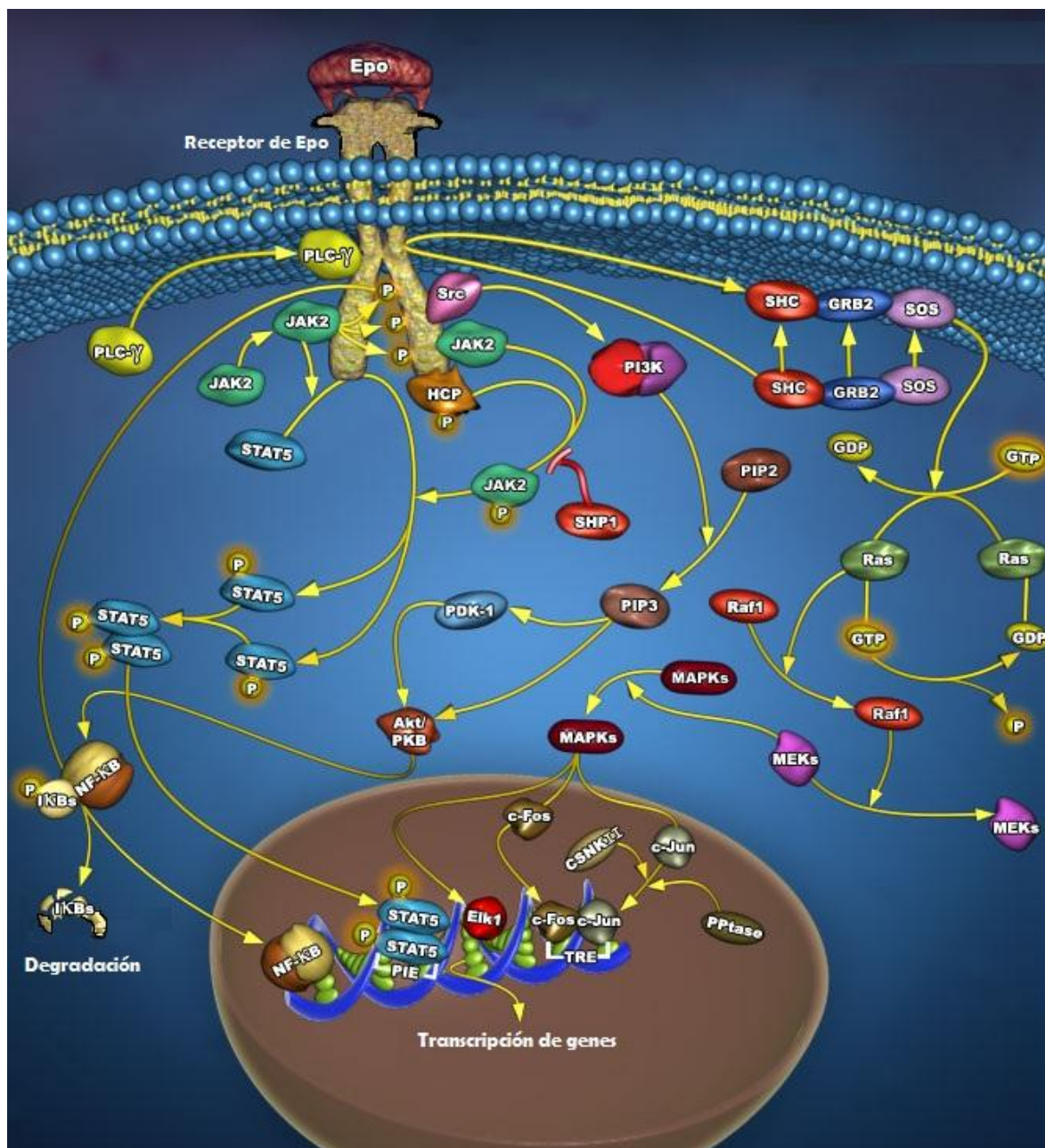


Fig. 2. Vías de señalización mediadas por la eritropoyetina y su receptor. La activación del EpoR ocurre tras la unión de la Epo que induce su dimerización. La vía clásica de señalización está mediada por la tirosina cinasa JAK2 que a su vez activa al factor de transcripción STAT5. Se ha observado que se activan vías alternas como las MAPK (Raf, MEK, ERK), PI3K, NF-κB así como la fosfolipasa C (PLC).

2.5 El eje Epo-EpoR en los órganos reproductores femeninos.

Hasta hace algunos años se creía que el receptor de la eritropoyetina se expresaba solo en células progenitoras eritroides, pero más tarde se descubrió su presencia y la producción de Epo en otros tejidos, sugiriendo que la Epo podría estimular vías de señalización en células no eritroides. Algunos tejidos en donde la evidencia experimental ha mostrado la presencia de EpoR y la producción de Epo han sido el riñón (Acs et al. 2001), colon (Arcasoy et al. 2003) y ovario (Yasuda et al. 2003), sin embargo su expresión es muy baja y todavía no ha quedado clara su función en estos tejidos.

En 1998, Yasuda y colaboradores publicaron el primer indicio de la expresión de la Epo en un órgano reproductor femenino: el endometrio. Encontraron que el ARNm de la Epo era prácticamente indetectable en los cultivos *in vitro* del útero de ratones OVX; sin embargo, cuando eran cultivados en presencia de estrógenos (E2) la expresión del ARNm de la Epo aumentaba de manera dosis dependiente, alcanzando el máximo punto a concentraciones fisiológicas de E2; es decir que la expresión de Epo en el endometrio es dependiente de E2. El mismo efecto fue observado *in vivo* cuando en la cavidad uterina de las ratonas se inyectaba E2. Sin embargo, estos hallazgos son aún controversiales ya

que interesantemente en el 2004 Acs y colaboradores observaron una correlación negativa entre la expresión de Epo y los receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio humano.

Por otro lado, las células endoteliales del endometrio humano (Yasuda et al. 1998) y de ratonas (Yasuda et al. 2001b) expresan el EpoR. En ese sentido se ha sugerido que la Epo desencadena la formación de nuevos vasos sanguíneos vía VEGF ya que cuando la acción de la Epo se bloquea por el sEpoR, (una forma soluble del EpoR que es capaz de unirse a la Epo) se inhibe el crecimiento del endometrio y la angiogénesis (Yasuda et al. 1998).

En biopsias de endometrio humano se ha observado que las células epiteliales expresan ARNm de la Epo y el EpoR, la expresión de Epo durante la fase proliferativa es alta y se incrementa aun más durante la fase secretora del ciclo menstrual (Yokomizo et al. 2002). Algunos estudios han detectado la expresión del EpoR en biopsias de tejido endometrial humano, la inmunoreactividad se observó en el citoplasma de las células epiteliales glandulares del endometrio (Yokomizo et al. 2002; Yasuda et al. 2002; Matsuzaki et al. 2003); además la expresión ocurre durante la fase proliferativa media y se mantiene durante toda la fase secretora (Yokomizo et al. 2002).

Adicionalmente se ha encontrado expresión de la Epo y el EpoR en el ovario humano (Masuda et al. 2000) y de ratón (Yasuda et al. 2001a). Aunque aún no es clara la función que realizan en el ovario, se ha observado que la vía de señalización JAK/STAT se encuentra activa y se sugiere que intervenga en la diferenciación y maduración de los folículos (Yasuda et al. 2001a). El oviducto de ratón también expresa la Epo de manera dependiente de los E2; sin embargo no se ha determinado su función (Masuda et al. 2000). A pesar de que la hipoxia es un estímulo suficiente para la producción de la Epo en tejidos como el cerebro, en el caso del oviducto y del útero parece no ser así. En el 2000 Masuda y colaboradores observaron que en condiciones hipóxicas el útero producía una mínima cantidad del ARNm de la Epo, pero si al tejido hipóxico se le administran E2, la producción de ARNm de la Epo incrementa notablemente; un efecto similar se observó en el oviducto.

En el caso del cérvix se ha demostrado la presencia del ARNm de la Epo en biopsias humanas (Yasuda et al. 2001a). En cuanto a la expresión del EpoR se ha observado positividad citoplasmática en el exocérnix (Yasuda et al. 2001a). Hasta ahora no se ha analizado el papel de las hormonas ováricas en la expresión de la Epo y el EpoR en el tejido cervical; por lo que se desconoce si los estrógenos regulan la expresión de éstas proteínas en el cérvix a lo largo del ciclo menstrual como es el

caso del endometrio. Tampoco se ha sugerido la función de la Epo y el EpoR en el tejido cervical.

Los datos anteriores en su conjunto nos indican que bajo la acción de los E2 la Epo y el EpoR juegan un papel importante en la angiogénesis y la proliferación; eventos que caracterizan a los cambios cíclicos de los órganos reproductores femeninos.

2.6 El eje Epo-EpoR en patologías y carcinomas de los órganos reproductores femeninos.

Dado que el eje Epo-EpoR se encuentra activo naturalmente en los órganos reproductores femeninos, diversos trabajos se han dado a la tarea de evaluar su presencia y posible acción en diversas patologías como la endometriosis, los miomas así como lesiones intraepiteliales del cérvix.

La endometriosis consiste en el crecimiento del tejido endometrial fuera del útero generando tumores que la mayoría de las veces son benignos o no cancerosos y de acuerdo a su apariencia macroscópica se clasifican en lesiones rojas, negras y blancas. El papel de la Epo y el EpoR en la endometriosis aún no se ha determinado. En el 2003,

Matsuzaki y colaboradores encontraron una prominente expresión de la Epo en las células glandulares epiteliales de biopsias de lesiones rojas y negras sin encontrar una diferencia significativa entre unas y otras. Sin embargo, se observó que la inmunoreactividad al EpoR era mucho menor en las lesiones negras en comparación con las rojas. Estudios previos reportaron que las lesiones rojas son más activas que las negras ya que poseen mayor proliferación (Nisolle y Donnez 1997; Matsuzaki et al. 2001), la cual podría estar mediada por la expresión incrementada del EpoR en dichas lesiones.

Los miomas (fibromas, fibromiomas o leiomiomas) son los tumores benignos más frecuentes del aparato genital femenino, apareciendo con una alta incidencia en mujeres entre los 35 y los 49 años. Varios autores han demostrado a través de diversas técnicas que los leiomiomas uterinos son capaces de producir Epo (Yoshida et al. 1999; Kohama et al. 2000; Suzuki et al. 2001; Yokohama et al. 2003). En el 2005 Pollio y colaboradores realizaron estudios inmunohistoquímicos en biopsias de miomas uterinos grandes, y observaron que las muestras presentaban una tinción moderada a la Epo pero la tinción para el EpoR era más prominente. Los autores sugieren que el sistema Epo/EpoR podría ser determinante en el tamaño de los miomas y se une a la cascada de nuevas evidencias que sugieren que factores de crecimiento

producidos localmente estimulan el tamaño de los miomas uterinos (Dixon et al. 2000; Wu et al. 2001; Di Lieto et al. 2002).

En el caso del cérvix, las lesiones premalignas se conocen con el nombre de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y se clasifican en tres grados. En el 2003, Acs y colaboradores evaluaron por inmunohistoquímica la expresión de Epo y EpoR en biopsias cervicales de lesiones benignas y NIC de grado I, II y III. Como resultado de dicho estudio se encontró que la expresión del EpoR se correlacionaba positivamente con el grado de lesión. Interesantemente en las biopsias de lesiones benignas se encontró que la positividad al EpoR se restringía a la capa basal del epitelio (Acs et al. 2003). Por otro lado, a través de un ensayo de doble inmunofluorescencia se observó que en las NIC I, II y III había co-expresión del EpoR y la proteína p16^{INK4a} (Acs et al. 2003); esto resulta relevante debido a que la p16^{INK4a} se considera un marcador específico de células que expresan los oncogenes virales E6 y E7 de virus del papiloma humano de alto riesgo, principal factor de riesgo en el desarrollo del cáncer cervical (Walboomers et al. 1999). Los autores sugieren que el EpoR podría servir también como un marcador de diagnóstico de progresión de cáncer cervical. En cuanto a la expresión de la Epo, se observó una tinción débil a lo largo de todo el epitelio plano estratificado de las lesiones benignas (Acs et al. 2003).

Finalmente la positividad de Epo en las NIC I y II fue débil mientras que en lesiones avanzadas (NIC III) se observa una fuerte tinción (Acs et al. 2003).

Los estudios anteriores en su conjunto sugieren que el eje Epo-EpoR podría estar jugando un papel importante en el desarrollo de algunas patologías de los órganos reproductores femeninos; particularmente induciendo proliferación de las células epiteliales aspecto que toma relevancia en el contexto del cáncer. Aunado a esto, se encuentra el hecho de que el gen que codifica para la Epo posee elementos de respuesta a la hipoxia y dado que una de las principales características de los tumores sólidos es la presencia de regiones hipóxicas se ha evaluado la expresión de Epo y EpoR en tumores sólidos.

Existen varios reportes de la expresión de EpoR en biopsias de melanoma (Selzer et al. 2000); cáncer renal (Westenfelder y Baranowski 2000), hepatoma, cáncer de mama, de pulmón (Acs et al. 2001), de colon y próstata (Yasuda et al. 2003) así como en líneas celulares derivadas de dichos tumores.

En lo que respecta a los carcinomas de los órganos reproductores femeninos se ha observado la expresión de el EpoR en biopsias de adenocarcinomas de ovario y endometrio, así como en biopsias de carcinoma invasor de células escamosas del cérvix mediante RT-PCR (Yasuda et al. 2001b). Interesantemente, en estudios inmunohistoquímicos se observó que la tinción del EpoR en las biopsias de tumores de endometrio y cérvix era heterogénea y presentaba mayor acentuación en las regiones hipóxicas cercanas a las áreas necróticas (Acs et al. 2003; Acs et al. 2004), por lo que se ha sugerido que la hipoxia podría inducir la expresión del EpoR. También se observó positividad del EpoR en células endoteliales y células del músculo liso del tejido cervical (Acs et al. 2003) y endometrial (Acs et al. 2004). Recientemente se evaluó por inmunohistoquímica la expresión de EpoR en biopsias de carcinoma de células escamosas del cérvix y su relación con la edad de las pacientes; los datos obtenidos muestran que la intensidad de la tinción tiene una correlación positiva con la edad (Shenouda et al. 2006). Sin embargo, debido al pequeño número de muestras analizadas no es posible determinar si esta correlación depende realmente de la edad.

En el caso de la Epo, se ha demostrado la presencia del ARNm en biopsias de adenocarcinomas de ovario, endometrio y en carcinoma

invasor de células escamosas del cérvix (Yasuda et al. 2001b). Por otro lado los estudios inmunohistoquímicos revelan co-expresión de la Epo y el HIF-1 en biopsias de carcinomas de cérvix (Acs et al. 2003) y endometrial (Acs et al. 2004).

En el 2002 Yasuda y colaboradores obtuvieron un extracto de proteína total de biopsias de tumores de ovario y endometrio y mediante un ensayo de ELISA determinaron la cantidad de la Epo producida por cada tumor. Interesantemente encontraron que los adenocarcinomas de ovario y endometrio producían una mayor cantidad de la Epo en comparación con los tejidos sanos (62.75 mU/g de tejido contra 28.13 mU/g de tejido para el ovario y 57.33 mU/g de tejido contra 19.14 mU/g de tejido para el endometrio) (Yasuda et al. 2001b). Estos resultados dejan abierta la discusión sobre si esta producción endógena de la Epo es suficiente para regular el microambiente del tumor.

Debido a que la expresión de la Epo y el EpoR se incrementa en los carcinomas, se han realizado varios estudios para analizar la función que estarían regulando. El primer trabajo que analizó el papel de la Epo y el EpoR en los carcinomas de los órganos reproductores femeninos se realizó en el 2001. En este estudio se transplantaron adenocarcinomas

de ovario y carcinomas invasores de células escamosas de cérvix en ratones, los cuales fueron tratados con un anticuerpo inhibidor de la actividad de la Epo. Los carcinomas transplantados presentaron regiones con muerte apoptótica e invasión de neutrófilos y macrófagos en dichas áreas (Yasuda et al. 2001b). El grado de regresión del tumor se correlacionó positivamente con la dosis y la frecuencia del anticuerpo inyectado (Yasuda et al. 2001b). Posteriormente el mismo grupo de investigación cultivó *in vitro* fragmentos de tumores de adenocarcinoma de ovario, endometrio y cérvix, los cuales posteriormente fueron inyectados con el sEpoR. Interesantemente se encontró que los fragmentos tumorales tratados con sEpoR formaban un menor número de capilares que aquellos que habían sido inyectados con solución salina (Yasuda et al. 2002). También se observó una disminución en la fosforilación de STAT5 en los adenocarcinomas de endometrio y ovario tras la inyección de sEpoR, por lo que se sugiere que la vía JAK- STAT podría estar induciendo la angiogénesis (Yasuda et al. 2002). No se demostró algún cambio en la fosforilación de STAT5 en adenocarcinomas de cérvix.

Otro aspecto que se ha analizado es el papel que juegan la Epo y EpoR en la inhibición de la apoptosis. Se ha observado que la Epo induce protección de manera dosis dependiente en células HeLa cuando

son tratadas con cis-platino (Acs et al. 2003). Así mismo mediante ensayo de MTT se ha observado que la Epo induce protección al cis-platino y radiación ionizante en cultivos primarios de biopsias de carcinoma cervical; adicionalmente, se observó que este efecto se abate cuando se usa tirfostina AG490 (un inhibidor de JAK2) por lo que se sugiere que la inhibición de la apoptosis se da por la vía de las JAK- STAT (Belenvok et al. 2004). En ninguno de los estudios se ha reportado si la estimulación con la Epo induce la transcripción de genes anti-apoptóticos como bcl-2 o bcl-x como sucede en el cerebro y las células progenitoras eritroides. Tampoco se ha descrito un efecto protector en carcinomas de ovario y endometrio.

Se ha sugerido que la expresión del EpoR en el carcinoma endometrial podría estar jugando un papel importante en el incremento de la agresividad del tumor. En biopsias de carcinoma endometrial se ha observado que el incremento en la expresión del EpoR se asocia al grado de avance del tumor (la invasión linfovascular, la metástasis del nódulo linfático y la pérdida de la expresión de receptores de estrógenos), mientras que la expresión de la Epo al parecer no se correlaciona con la invasividad del tumor (Acs et al. 2004). Hasta el momento no se ha analizado el papel de la Epo y el EpoR en la invasividad de tumores de ovario o cérvix.

En cuanto al papel que juega el eje Epo-EpoR en la inducción de la proliferación celular en los tumores es todavía controversial. Por un lado, existen estudios en donde se ha observado que la Epo exógena es capaz de inducir proliferación de líneas celulares de cáncer renal (Westenfelder y Baranowski 2000), mama (Acs et al. 2001), cabeza y cuello (Lai et al. 2005) y próstata (Feldman et al. 2006). Sin embargo otros estudios no han detectado efectos proliferativos en líneas celulares de cáncer de mama (LaMontagne et al. 2006), cáncer renal y colorectal (Liu et al. 2004; Laugsch et al. 2008), neuroblastoma, hepatoma y cervix (Laugsch et al. 2008). En el 2008 Jeong y colaboradores demostraron la funcionalidad del eje Epo-EpoR en células de cáncer de ovario. En este estudio, la proliferación celular era parcialmente inhibida cuando se adicionaba un anticuerpo neutralizante de la actividad de la Epo sugiriendo que la Epo endógena podría activar al EpoR de una forma autócrina/parácrina. Un efecto similar se observó en una línea celular de cáncer de próstata (Jeong et al. 2009), en este modelo la proliferación celular era parcialmente inhibida al adicionar un RNA interferente humano de la Epo (Epo-shRNA). El efecto se abatía cuando las células eran transfectadas con un plásmido murino de la Epo que no era afectado por el Epo-shRNA.

2.7 Efectos clínicos del uso de Epo en pacientes con cáncer.

Los efectos de la Epo sobre la inhibición de la apoptosis, la inducción de la proliferación, la angiogénesis e invasividad de las células tumorales ha despertado un enorme interés debido al amplio uso de la Epo para tratar la anemia en los pacientes con cáncer. Como ya se mencionó, el uso de la Epo eleva los niveles de hemoglobina en sangre; sin embargo efectos adversos se han observado en los pacientes con cáncer que reciben Epo.

En cáncer de mama se ha observado que cuando la Epo es utilizada como adyuvante en la quimioterapia hay un incremento en la progresión de la enfermedad así como una elevada mortalidad en comparación con los pacientes que reciben placebo (Leyland-Jones et al. 2003). En pacientes con cáncer de cabeza y cuello, la utilización de Epo como adyuvante durante la radioterapia tiene un efecto negativo en comparación con la radioterapia sola (Lambin et al. 2009). En el caso del cáncer cervical, se ha evaluado la respuesta de mujeres con cáncer cervical que recibieron Epo durante la quimio y radioterapia. Se encontró que el 61% de las mujeres que recibieron Epo habían presentado reincidencia del tumor, comparado con el 30% de las mujeres que no habían recibido Epo (Temkin et al. 2006). Además la

sobrevida a 5 años fue del 44% en las mujeres que recibieron Epo mientras que en las mujeres que no recibieron Epo fue del 72% (Temkin et al. 2006).

Las evidencias obtenidas por los estudios descritos han sido analizados por la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC; por sus siglas en inglés European Organization for Research and Treatment of Cancer) emitió una alerta sobre la necesidad de realizar estudios de investigación básica así como estudios clínicos que permitan definir el costo/beneficio del uso de Epo en pacientes anémicos con cáncer (Bokemeyer et al. 2007).

3. JUSTIFICACIÓN.

Los pacientes con cáncer reciben diferentes terapias de soporte para disminuir los efectos colaterales de la quimio y radioterapia. El padecimiento más común es la muerte de las células hematopoyéticas que genera principalmente anemia aplásica en los pacientes. Con el fin de tratar la anemia se incluyen tratamientos con diferentes citocinas y factores de crecimiento que estimulan al sistema inmunológico; uno de ellos es la eritropoyetina. La Epo es comúnmente empleada para el tratamiento anemia en pacientes con cáncer cervical.

Por ello, es necesario que se estudie la expresión del EpoR en células tumorales derivadas de carcinoma cervical que podría estar promoviendo el crecimiento de los tumores a través de una vía de proliferación mediada por este receptor. Cabe resaltar que aún se desconocen las vías de señalización que desencadena el EpoR al ser estimulado con Epo en los epitelios. Por todo lo anterior, nos hemos planteado investigar, si el EpoR esta presente en tejido cervical humano así como en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical; para evaluar su posible efecto en la proliferación celular.

4. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- 🏆 Evaluar la expresión, el efecto sobre la proliferación y las vías de señalización activadas por el EpoR en células de carcinoma cervical.

Objetivos Particulares.

- 🏆 Analizar la presencia del EpoR en tres líneas celulares derivadas de cáncer cervical.
- 🏆 Determinar si las líneas celulares producen Epo.
- 🏆 Evaluar la presencia de Epo en sueros de mujeres.
- 🏆 Evaluar la presencia de EpoR y Epo bajo condiciones hipóxicas.
- 🏆 Determinar la existencia de estimulación autócrina/parácrina del sistema Epo/EpoR.
- 🏆 Evaluar el efecto de la Epo exógena sobre la proliferación de las líneas celulares.
- 🏆 Evaluar el efecto de la Epo exógena *in vivo*.
- 🏆 Analizar la cascada de señalización mediada por el EpoR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Líneas celulares.

En este estudio se utilizaron 3 líneas celulares derivadas de carcinoma cervical obtenidas del ATCC (por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection, Manassas VA, USA). La línea celular C33 proviene de un cáncer cervical no asociado a VPH, por lo que no posee DNA viral en su genoma. La línea celular SiHa que tiene DNA integrado de VPH16 y la línea celular HeLa que posee DNA integrado de VPH18. Como controles se utilizaron las líneas celulares 3T3, HepG2, K562 y MCF-10A. La línea celular 3T3 es derivada de fibroblastos de ratón y es negativa para la expresión de Epo humana. La línea celular HepG2 es derivada de un hepatocarcinoma humano y es positiva para la expresión de Epo (Goldberg et al. 1987) ambas líneas fueron obtenidas del ATCC. La línea celular MCF-10A es derivada de epitelio mamario humano y es negativa para la expresión del EpoR (Jeong et al. 2008) y fue donada por la Dra. María Ibarra del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. La línea celular de leucemia humana K562 se sabe que es positiva para el EpoR (Fraser et al. 1988) y fue generosamente donada por el Dr. José J. Montesinos del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

5.2 Cultivo celular.

Las líneas celulares MCF-10A, 3T3, SiHa, Hela y C33 fueron cultivadas en medio DMEM (Invitro, México DF, México) suplementado al 2% con suero fetal de bovino inactivado (SFB) a 57°C durante 30min, (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA), 100 UI/ml de penicilina (Invitro) y 100µg/ml de estreptomina (Invitro) en cajas Petri para cultivo de tejidos de 50cm² (Nun Brand Products, USA). Las células fueron sembradas cuando alcanzaban el 80% de confluencia utilizando una solución de verseno (Invitro). Las células HepG2 y K562 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Invitro) suplementado al 10% con SFB (Invitrogen), 100 UI/ml de penicilina (Invitro) y 100µg/ml de estreptomina (Invitro). Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 95% aire/ 5% CO₂ y un ambiente saturado de humedad. La densidad y viabilidad de los cultivos fue analizada usando una cámara de Neubauer (American Optical, USA) y evaluadas por exclusión de azul tripano (Apéndice 11.1). En todos los experimentos se utilizaron cultivos al 80% de confluencia.

5.3 Análisis de la expresión de EpoR por inmunofluorescencia.

Para el análisis de la expresión del EpoR a través de inmunofluorescencia las líneas celulares fueron cultivadas sobre cubreobjetos hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Las células fueron lavadas 3 veces con una solución de buffer salino de fosfatos (PBS) frío (Apéndice 11.2) y posteriormente fijadas en etanol al 95% toda la noche a temperatura ambiente. Después de ser lavadas 3 veces con una solución de PBS, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal de conejo anti-EpoR (Sigma-Aldrich Inc. Saint Louis. MS, USA) diluido 1:100 en PBS. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fluoresceína (Invitrogen, USA) diluido 1:500 durante 1h a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 5 veces con PBS y cubiertas con medio de montaje.

5.4 Análisis de la expresión de EpoR por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR).

Para el análisis de la expresión del EpoR a través del ensayo de RT-PCR (por sus siglas en inglés; Reverse Transcriptase-Polymerase Chain

Reaction) se extrajo RNA total de las líneas celulares utilizando el Mini kit RNeasy (Qiagen Inc. Valencia CA, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue amplificado utilizando el kit SuperScript One-Step RT-PCR *Taq* system (Qiagen). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del EpoR fueron EpoR forward 5' GGC AGT GTG GAC ATA GTG GC 3', y EpoR reverse 5' AGC AGG ATG GAT TGG GCA GA 3. Los oligonucleótidos amplifican un fragmento de 497pb los cuales corresponden a los nucleótidos del 1304 al 1801 del gen de EpoR (Acs et al. 2001). Para cada reacción los oligonucleótidos se utilizaron en una concentración final de 0.6 μ M y se utilizaron 100ng de RNA total para la amplificación. La transcripción reversa se realizó a 50°C por 30 min. La activación de la polimerasa se realizó a 95°C durante 15 min y posteriormente se realizaron 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. Por último se realizó una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos del PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE el cual fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Como control interno se amplificó el gen de la β -actina usando los oligonucleótidos β -actina forward 5' GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3', y β -actina reverse 5' GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3' bajo las condiciones descritas para el gen del EpoR.

5.5 Obtención de esferoides.

Para la obtención de los esferoides, se sembraron 3×10^6 células sobre cajas de cultivo previamente cubiertas con una capa de agarosa al 5% en TBE. Las células fueron cultivadas en medio Leibovitz's L-15 (Invitro, México DF, México) suplementado al 5% de SFB (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA) a 37°C en ausencia de CO₂ con agitación orbital a 13,000 rpm durante 14 días. Los esferoides formados fueron retirados cuidadosamente con una pipeta y analizados por inmunohistoquímica como se indica en la sección 5.13 con la finalidad de analizar la presencia de EpoR, Epo y HIF-1.

5.6 Análisis de la expresión de Epo por Inmunocitoquímica.

Las líneas celulares fueron cultivadas sobre cubreobjetos hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Las células fueron lavadas 3 veces con una solución de buffer salino de fosfatos (PBS) frío (Apéndice 11.2) y posteriormente fijadas en etanol al 95% toda la noche a temperatura ambiente. Después de ser lavadas 3 veces con una solución de PBS, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal de conejo anti-EPO humana (Sigma-Aldrich Inc.

Saint Louis, MS, USA) diluido 1:100 en PBS. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Zymed Laboratories, USA) diluido 1:500 durante 1h a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con el cromógeno 3,3'diaminobenzidina (Biocare Medical Concord CA, USA) durante 2 min. Finalmente las muestras fueron lavadas con agua, contrateñidas con hematoxilina (Biocare Medical) y cubiertas con medio de montaje (Biocare Medical).

5.7 Determinación cuantitativa de Epo.

La concentración de Epo fue determinada en el medio condicionado de las líneas celulares SiHa, HeLa y C33, en SFB y en muestras de suero de mujeres sanas, pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y pacientes con cáncer cervical (CaCu). En un estudio previo en el laboratorio, se colectó el suero de pacientes tratadas en el Centro Nacional de Clínicas de Displasias del Hospital General de México. Las mujeres fueron sometidas a un estudio colposcópico para su diagnóstico el cual fue corroborado por histopatología. Se obtuvieron 3 grupos de estudio: mujeres sanas (n=17), mujeres con NIC (n=27) y mujeres con CaCu (n=17).

Para obtener el medio condicionado de las líneas celulares, las células fueron sembradas en platos de 10mm durante 24h. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS e incubadas con medio DMEM libre de suero (Invitrogen) durante 48h. El medio fue colectado y centrifugado a 13,000g durante 15 min para eliminar detritus celular. El medio fue congelado y concentrado al vacío. Finalmente fue reconstituido en 1 ml de agua ultra pura (Invitrogen).

La determinación cuantitativa de la concentración de Epo se realizó utilizando el kit Epo ELISA photometric system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. En cada pozo de la placa de ELISA se incubaron 20 μ l de medio condicionado, de SFB o de suero humano. Los valores de absorbancia fueron medidos a 450nm en un lector ELx800 (Bio Tek Instruments Inc, Winooski, VT, USA).

5.8 Inhibición de la expresión de Epo y EpoR a través de RNAs interferentes pequeños (siRNA).

Para la inhibición de la expresión de Epo y el EpoR, se utilizó el kit comercial siRNA Reagent System (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa

Cruz CA, USA). Los RNA interferentes utilizados para la inhibición de la expresión de Epo y el EpoR corresponden a 3 siRNAs específicos de 19-25 nucleótidos (Santa Cruz, número de catálogo sc-37220 para Epo y sc-37092 para EpoR). Un RNA scrambled incluido en el kit fue utilizado como control negativo. Se sembraron 2×10^5 células en cajas de 6 pozos (Nun Brand Products) en medio de cultivo libre de antibióticos a 37°C durante 24h. Los siRNA fueron diluidos en medio de transfección y mezclados con reactivo de transfección para ser incubados durante 30min a temperatura ambiente. La mezcla fue adicionada a las células que previamente fueron lavadas con medio de transfección. Las células fueron incubadas a 37°C por 7h y posteriormente se adicionó 1ml de medio DMEM que contenía una doble concentración de SFB y antibióticos. Las células se cultivaron durante 24h. El medio fue desechado y reemplazado con 1ml de medio fresco de DMEM suplementado al 10% con SFB. La expresión de Epo y EpoR fue analizadas por citometría de flujo y western blot.

Para evaluar la especificidad de los RNA interferentes utilizados se realizaron experimentos de rescate. En el ensayo de rescate de células tratadas con siRNA EpoR, las células fueron transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.1EpoR el cual contiene el gen silvestre humano del EpoR (Shi et al. 2010). El vector vacío pcDNA3.1 se utilizó como

control negativo. Para cada ensayo 5×10^4 células silenciadas fueron transfectadas con $1 \mu\text{g}$ de pcDNA3.1EpoR o pcDNA3.1 usando el agente de transfección TurboFect (Fermentas Inc. MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el ensayo de rescate de células transfectadas con siRNA Epo, las células fueron suplementadas con 30U/ml de Epo (Sigma-Aldrich).

5.9 Inducción de la proliferación celular.

5×10^4 células se sembraron en placas para cultivo de tejido de 24 pozos (Nun Brand Products) y se incubaron por 2h a 37°C . Se retiró el medio de cultivo y se adicionó 1ml de medio fresco. Se agregó Epo (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 0, 2, 5, 7.5, 10, 20, 30 y 50U/ml y se incubaron durante 24, 48 y 96h. Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado. Posterior al tiempo de estimulación con Epo, la proliferación celular fue evaluada a través de la reducción del bromuro [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT).

5.10 Inhibición de la proliferación celular.

5×10^4 células se sembraron en placas para cultivo de tejido de 24 pozos (Nun Brand Products) y se incubaron por 2h a 37°C. Posteriormente las células recibieron los siguientes tratamientos:

Para inhibir la Epo, 30 U/ml de Epo fueron pre-incubadas con 10µg/ml de anticuerpo neutralizante anti-Epo (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 2h. Posteriormente, este medio fue adicionado a las células.

Para inhibir la expresión de EpoR en la superficie celular, las células fueron incubadas con lovastatina 20µM (Sigma-Aldrich) durante 20h a 37°C. La lovastatina es un inhibidor selectivo de la enzima 3-hidroxi-3metilglutaril CoA reductasa implicada en la maduración del EpoR. La expresión del EpoR en la superficie celular fue evaluada por citometría de flujo.

Para inhibir la fosforilación de la cinasa JAK2 en residuos tirosina, las células fueron incubadas con tirfostina AG490 150µM (Sigma-Aldrich) durante 16h a 37°C. La inhibición de la fosforilación de JAK2 fue evaluada por Western Blot.

Posterior a cada tratamiento de inhibición, las células fueron incubadas con 30 U/ml de Epo y la proliferación celular fue evaluada a las 48h por el ensayo de MTT. Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado.

5.11 Ensayo de MTT.

Tras la estimulación con Epo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS. Se adicionaron 500µl de medio fresco y 125µl de una solución de MTT (Apéndice 11.3) y se incubó por 2h a 37°C. Posteriormente se retiró el medio y se solubilizó la sal de formazán resultante en 200µl de isopropanol. Las placas fueron agitadas ligeramente durante 5 min. El color azul-violeta producto de la reducción del MTT fue leído en un lector de placas (BioTek) a una longitud de onda de 570nm.

5.12 Citometría de flujo

Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y disgregadas usando solución TrypLE express (Gibco). Se colocaron 1×10^6 células por tubo y

se centrifugaron 5 min a 13,000g. Se realizaron 3 lavados más con PBS. Las células fueron fijadas en solución de paraformaldehído al 2% (Sigma-Aldrich) y 0.01% de azida de sodio (Sigma-Aldrich) durante 10min a 37°C. La solución fijadora fue retirada por centrifugación. Se lavó 3 veces con buffer de incubación (Apéndice 11.4). Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de cabra anti-EpoR (Sigma-Aldrich) o con un anticuerpo de control de isotipo de cabra (Abcam Inc, Cambridge, MA, USA) diluidos en buffer de incubación 1:50 durante 1h. Las células fueron lavadas 3 veces y posteriormente incubadas con un anticuerpo policlonal de conejo acoplado al fluorocromo fluoresceína-5-isotiocinato (FITC) (Abcam) diluido 1:500 en buffer de incubación durante 1h. Las células se lavaron 3 veces con buffer de incubación y se resuspendieron en 1ml de PBS. La citometría de flujo fue hecha en un citómetro FACScalibur (Becton Dickson Co, San Jose CA, USA) y los datos analizados usando el programa Cell Quest Software.

5.13 Inducción de la proliferación celular *in vivo*.

Para la inducción de la proliferación *in vivo* se utilizaron ratones nu⁻/nu⁻ hembras de 8 semanas a las cuales se les inyectaron

subcutáneamente (s.c.) 1×10^6 células resuspendidas en 100 μ l de PBS. Los ratones fueron monitoreados durante 15 días después de los cuales los tumores alcanzaron una medida promedio de 0.5 cm². Los ratones recibieron 4 dosis de 300 U/kg de Epo s.c. cada tercer día. Como controles se utilizaron ratones que recibieron 4 dosis s.c. de 100 μ l de PBS. Dos días después de la cuarta dosis los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron disectados, medidos y pesados.

5.14 Inmunohistoquímica.

Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron en muestras de tumores de ratones y en esferoides. Los tumores disectados fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 4°C. Los esferoides fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 10% durante toda la noche. Posteriormente, tanto los tumores como los esferoides fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes seriales de 4 μ m. Para eliminar la parafina, las laminillas fueron incubadas con xileno durante 5min a temperatura ambiente 3 veces. Para su rehidratación, las muestras se incubaron 3 veces en concentraciones decrecientes de etanol (absoluto, etanol al 96%, etanol al 70% y finalmente agua

destilada) por 5 min. Posteriormente las laminillas se cubrieron con buffer de citratos 10mM (pH 6.2) y se calentaron en microondas durante 20 minutos para la recuperación de los antígenos. Las muestras se enfriaron con agua corriente durante 5 min. Para inhibir la actividad endógena de peroxidasas las laminillas fueron incubadas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto durante 5min. Posteriormente las laminillas fueron bloqueadas con una solución de SFB al 10% en PBS. Para analizar la presencia de EpoR, Epo y HIF-1 en los esferoides se utilizaron los anticuerpos anti-EpoR humano (Sigma-Aldrich), anti-Epo humana (Sigma-Aldrich) y anti-HIF-1 humano (Abcam Inc.) diluidos 1:100 en PBS durante toda la noche a 4°C. Las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS por 5min y posteriormente incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (Dako, Denmark) durante 1h a temperatura ambiente. Posterior a 3 lavados con PBS, las laminillas se incubaron durante 1h con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Dako).

Para la detección de células en proliferación, las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-Ki67 humano (Abcam) diluido 1:100 en PBS durante toda la noche a 4°C. Las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS por 5min y posteriormente incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (Dako, Denmark) durante 1h a

temperatura ambiente. Posterior a 3 lavados con PBS, las laminillas se incubaron durante 1h con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Dako).

Para la detección de células en apoptosis, las laminillas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa (Abcam) diluido 1:100 en PBS durante toda la noche a 4°C. Las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS por 5min y posteriormente incubadas con el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (Zymed). La tinción fue visualizada usando 3,3'diaminobencidina (Biocare Medical). Un total de 1,000 células fueron contadas en cada laminilla. El índice de proliferación (IP) y el índice de apoptosis (IA) se expresó como el porcentaje de células que muestran positividad para Ki67 y caspasa 3 activa respectivamente.

5.15 Extracción de proteína.

Para la extracción de proteína total, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío y disgregadas incubando 3 min con verseno (Invitrogen) y nuevamente lavadas 3 veces con PBS frío. El botón celular fue resuspendido en el buffer de lisis [50mM Tris-HCl, pH 7.4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40; 0.25% de deoxicolato de sodio] que

contenía 100µl/ml de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y 10µl/ml de inhibidores de fosfatasas (Sigma-Aldrich). Las células fueron incubadas en hielo por 10 min. El lisado celular fue centrifugado a 13,000g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y transferido a un tubo nuevo.

Para la extracción de proteína de membrana, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío y disgregadas incubando 3 min con verseno (Invitrogen) y nuevamente lavadas 3 veces con PBS frío. El botón celular fue resuspendido en 1ml de buffer de lisis frío recién preparado [10mM TrisHCl, pH 7.4; 50mM NaCl; 5mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.05% SDS] que contenía 100µl/ml de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y 10µl/ml de inhibidores de fosfatasas (Sigma-Aldrich). Las células fueron incubadas en hielo por 10 min. El lisado celular fue centrifugado a 13,000g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y transferido a un tubo nuevo.

Para la extracción de proteína total de los tumores disectados, el tejido fue cortado en pequeños fragmentos y resuspendidos en buffer de lisis [0.06M Tris-HCl, pH 6.0; 10% glicerol; 5% β-mercaptoetanol; 2% SDS; 0.0025% azul bromofenol] que contenía 100µl/ml de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) y 10µl/ml de inhibidores de

fosfatasas (Sigma-Aldrich). Las células fueron incubadas en hielo por 20 min. El lisado celular fue centrifugado a 13,000g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y transferido a un tubo nuevo.

La cantidad total de proteína fue determinada utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories, Hercules CA, USA).

5.16 Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación, 10µg/ml del anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate Co., Lake Placid, NY, USA) fueron incubados con esferas de proteína A-agarosa por 4 horas a 4°C con agitación suave y constante. Se realizaron 3 lavados con PBS frío. Posteriormente se adicionó 500µg de proteína total y se incubó a 4°C toda la noche con agitación suave constante. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron lavadas 3 veces en buffer de lisis. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (por sus siglas en inglés; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

5.17 Electroforesis (SDS-PAGE)

El gel concentrador se preparó a una concentración de 5% de acrilamida (BioRad) en una solución 0.495M Tris base pH 6.8, 10% dodecil sulfato sódico (SDS). El gel separador se preparó a una concentración de 7% de acrilamida en una solución 0.285M Tris-HCl, 1.21M Tris base pH 8.7, 10% SDS. Los geles se polimerizaron por la adición de persulfato de amonio al 10% (BioRad) y de TEMED al 0.08% (BioRad) para el gel de resolución y 0.5% y 0.1% respectivamente para el gel concentrador. De cada línea celular se tomaron 20 μ g de proteína y fue resuspendido en buffer de carga (Apéndice 11.5). Posteriormente las muestras se incubaron por 5min a 96°C antes de ser cargadas en el gel. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido (Invitrogen) que consiste en 10 bandas con pesos moleculares que van de 181.8kD a 6kD. Se utilizó el marcador de peso molecular MagicMark (Invitrogen) que consiste en 8 bandas con pesos moleculares que van desde 20kD hasta 120kD las cuales se visualizan por quimioluminiscencia. El gel se corrió en un buffer MOPS-SDS-PAGE (Invitrogen) por 50 min con voltaje constante de 200V en una cámara de electroforesis vertical.

5.18 Análisis por Western Blot.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de polivinilidina fluorida (PVDF) (Millipore Co., Billerica MA, USA) en cámara húmeda vertical con amperaje constante de 300mA durante 1.5h en buffer de transferencia Nu-PAGE (Invitrogen) que contenía 10% de metanol. Las membranas fueron incubadas durante 4h a temperatura ambiente con una solución bloqueadora Western Breeze Blocking (Invitrogen) para el bloqueo de sitios de unión inespecíficos. Al día siguiente las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios específicos diluidos 1:1000 en solución bloqueadora Western Breeze Blocking. Las membranas se lavaron tres veces con PBS-T (Apéndice 11.6) por 10min. Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente con solución bloqueadora Western Breeze Blocking diluida 1:2 con agua ultra pura (Invitrogen). Las membranas se incubaron 1h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios apropiados acoplados a peroxidasa (Zymed Laboratories) diluidos 1:2000 en solución bloqueadora Western Breeze Blocking diluida 1:2. Después de tres lavados con PBS-T de 10min cada uno, las membranas fueron incubadas por 1min con el kit de quimioluminiscencia Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Science Co. Piscataway

NJ, USA). Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas tras 15seg de exposición a una película radiográfica sensible al azul (Kodak). Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron: Anticuerpo policlonal de conejo anti-JAK1, anti-JAK2, anti-JAK3, anti-STAT1, anti-STAT3 y anti-STAT5; así como y el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (todos de Abcam). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo acoplados a peroxidasa (Zymed).

5.19 Análisis estadísticos.

Las diferencias entre los tratamiento fueron analizados por la prueba de ANOVA y la prueba post hoc Tukey-Kramer con el programa Graph Pad Prisma versión 3.02. Se consideró un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ en todas las pruebas y un intervalo de confianza del 95%. Los resultados representan la media \pm el error estándar.

6. RESULTADOS.

6.1 Las células de cáncer cervical expresan EpoR y Epo.

Con el fin de determinar si las líneas celulares expresan el gen que codifica para el EpoR, realizamos un estudio para detectar el transcrito de dicho gen mediante un ensayo de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los datos obtenidos muestran que el gen del EpoR se encuentra transcripcionalmente activo en las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical SiHa, HeLa y C33 (Figura 3a) en las cuales se observó la amplificación de un fragmento de idéntico tamaño al observado en el control positivo, la línea celular K562. Como se esperaba, no se detectó el fragmento en el control negativo, la línea celular MCF-10A.

Dado que para ser funcional, el EpoR debe presentarse en la superficie celular, se determinó la presencia del EpoR en extractos de proteína de membrana de las líneas celulares por Western Blot. Como se observa en la figura 3b, se identificó una banda del peso molecular esperado para el EpoR (65KD) en las líneas celulares de cáncer cervical así como en la línea K562 positiva para la expresión del EpoR. La proteína no fue detectada en la línea MCF-10A, negativa para la expresión del EpoR. Posteriormente se evaluó la presencia del EpoR mediante inmunofluorescencia como se muestra en la figura 3c.

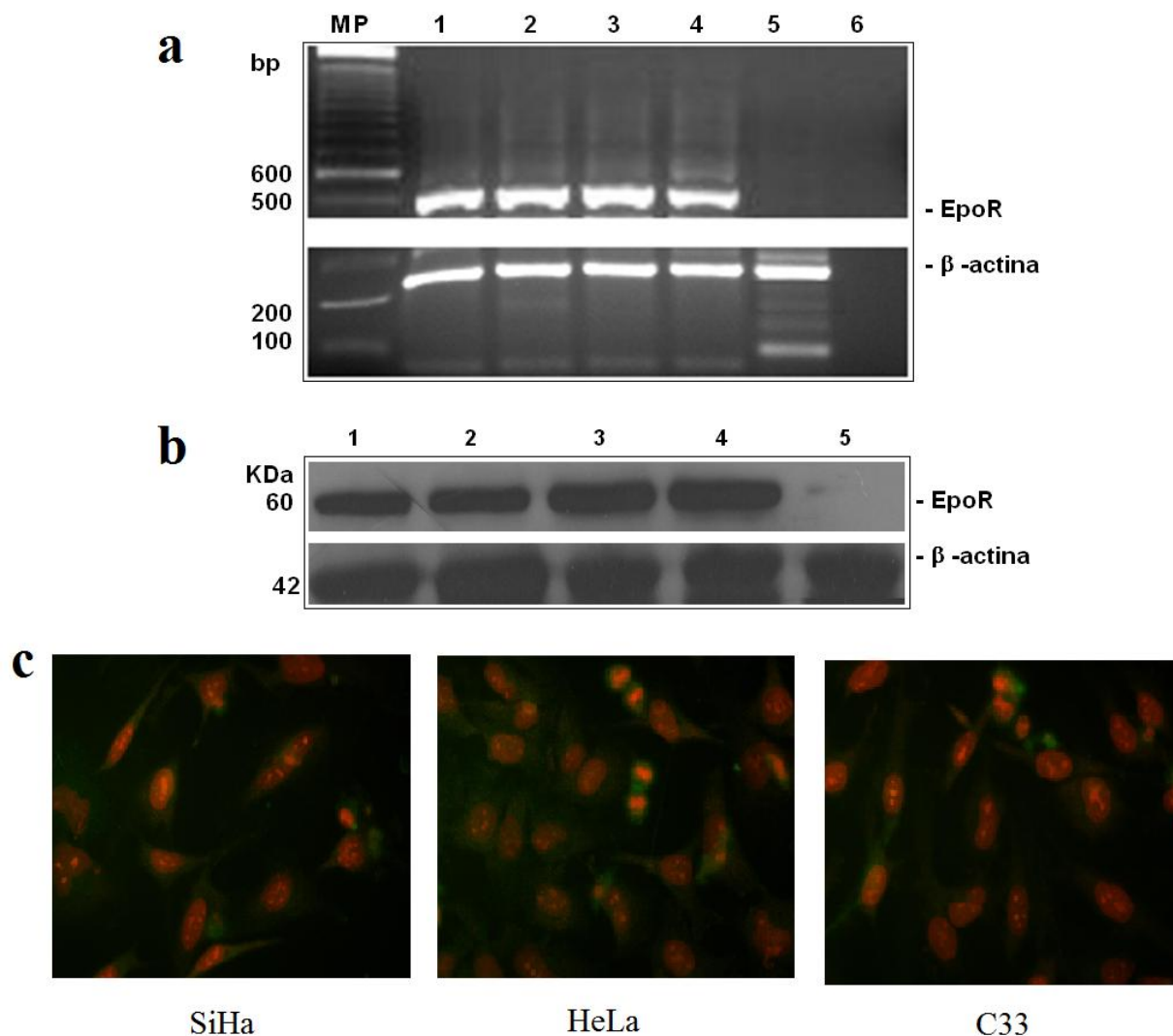


Figura 3. Expresión del EpoR humano en células de carcinoma cervical. (a) La expresión del EpoR fue investigada por RT-PCR de células HeLa (1), SiHa (2) y C33 (3). La leucemia humana K562 fue usada como control positivo (4) y la línea MCF-10A como control negativo (5). Como control negativo adicional se incluyó agua purificada en lugar de RNA (6). La expresión del gen de β -actina fue utilizada como control interno. MP=marcador de peso molecular. (b) Análisis por Western Blot de la expresión del EpoR en membrana de células HeLa (1), SiHa (2) y C33 (3). Las líneas K562 (4) y MCF-10A (5) fueron utilizadas como control positivo y negativo respectivamente. La expresión de la proteína β -actina fue incluida como control de carga. (c) La expresión del EpoR fue analizada mediante inmunofluorescencia en las células SiHa, HeLa y C33.

Por otro lado, se decidió evaluar la expresión de la Epo por inmunocitoquímica en las líneas celulares. Una fuerte tinción granular fue observada en las 3 líneas celulares (Figura 4) así como en el control positivo, la línea celular HepG2. No se detectó inmunoreactividad en el control negativo, la línea celular 3T3.

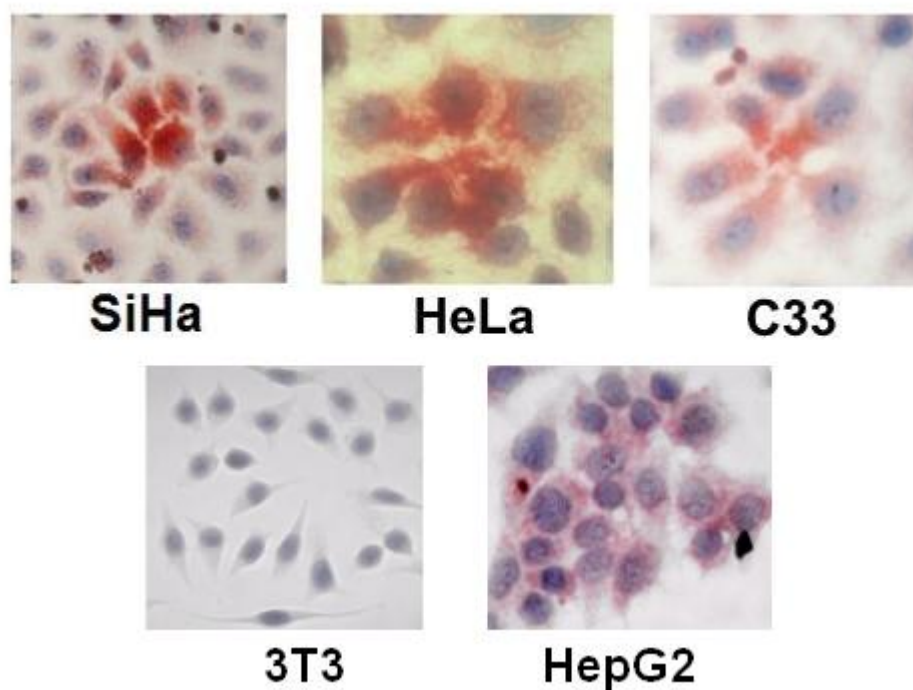


Figura 4. Expresión endógena de Epo en líneas celulares derivadas de cáncer cervical. Inmunodetección de Epo en células SiHa, HeLa y C33. La línea celular HepG2 de hepatoma humano y la línea 3T3 de fibroblastos de ratón fueron incluidas como controles positivo y negativo respectivamente. Imagen representativa de 3 ensayos independientes.

Puesto que la hipoxia es un estímulo que induce la expresión de la Epo y del EpoR se decidió evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de ambas proteínas en el modelo de los esferoides. Los resultados obtenidos muestran una fuerte tinción tanto para el EpoR como para la Epo en el citoplasma de las células quiescentes de los

esferoides de células SiHa, HeLa y C33 (Figura 5) que se caracterizan por poseer un microambiente hipóxico. Los sitios de expresión del EpoR y la Epo co-localizan con el de HIF-1 el cual es un factor de transcripción inducido por hipoxia (Figura 5).

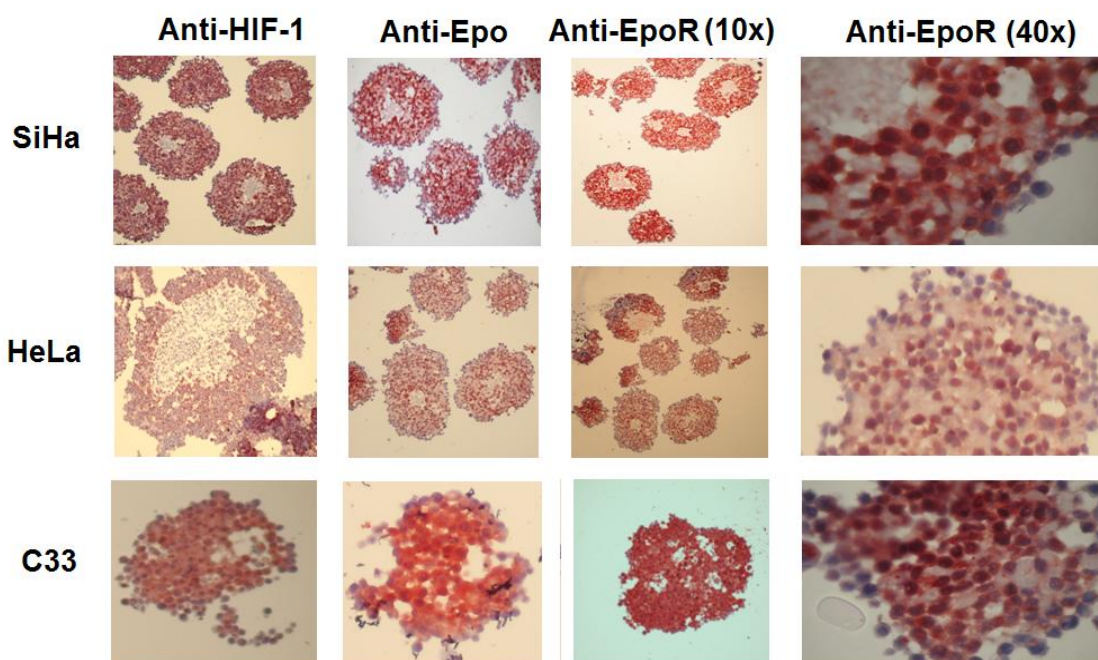


Figura 5. Expresión de EpoR y Epo en condiciones de hipoxia. La expresión de EpoR, Epo y HIF-1 fue analizada en esferoides de células SiHa, HeLa y C33 mediante inmunohistoquímica. Imagen representativa de 3 ensayos independientes.

Posteriormente se evaluó si la Epo producida por las células era secretada al medio extracelular. Como se muestra en la Tabla 2, mediante un ensayo de ELISA cuantitativo se determinó que las líneas tumorales producen Epo en un rango de 2.5 a 2.8 mU/ml. La concentración media producida por las células fue mayor que la observada en el SFB (1.7 mU/ml). En todos los casos las concentraciones

detectadas estuvieron por encima del valor límite de detección del ensayo (≥ 0.24 mU/ml).

	Epo mU/mL
SiHa	2.8 ± 0.13
HeLa	2.6 ± 0.28
C33	2.5 ± 0.15
Medio	0
SFB	1.7 ± 0.21

Tabla 2. Secreción de la Epo endógena al medio condicionado. Las células SiHa, HeLa y C33 fueron cultivadas en medio sin suero durante 48h. La concentración de Epo fue evaluada por ensayo cuantitativo de ELISA utilizando el medio condicionada de cada línea celular, suero fetal de bovino (SFB) como control positivo y el medio de cultivo como control negativo. Los valores representan \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Los datos indican que las células de carcinoma cervical expresan constitutivamente EpoR y Epo tanto en condiciones de hipoxia como en condiciones de normoxia. En adición, en condiciones de normoxia la Epo producida es secretada al medio extracelular lo cual podría sugerir la existencia de un sistema de estimulación autócrino-parácrino.

6.2 La estimulación endógena del eje Epo/EpoR incrementa la proliferación celular.

Para evaluar la posible estimulación autócrina-parácrina del eje Epo/EpoR, se inhibió de manera independiente la expresión de Epo y EpoR utilizando siRNA específicos para dichos genes en células SiHa y HeLa. Como se muestra en la figura 6a, la expresión de EpoR fue reducida de manera significativa 24h posterior a la transfección con siRNA específicos para el EpoR mientras que en células tratadas con el RNA control o “scrambled” no se observó dicho efecto. Del mismo modo, las células transfectadas con el siRNA específico para la Epo disminuyeron significativamente la expresión de Epo, mientras que en las células tratadas con el RNA “scrambled” no se observó el efecto (Figura 6b).

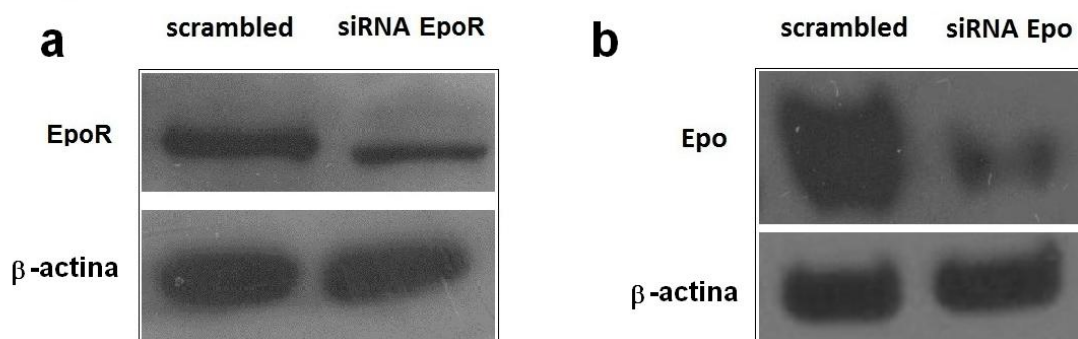


Figura 6. Silenciamiento de los genes del EpoR y la Epo. Células HeLa y SiHa fueron transfectadas con RNA interferentes pequeños específicos para el EpoR (siRNA EpoR) y Epo (siRNA Epo) o con un RNA scrambled como control negativo. La expresión del EpoR (a) y Epo (b) fue analizada en células HeLa por Western blot tras 48h de transfección. La expresión de β -actina fue incluida como control de carga.

El silenciamiento del EpoR resultó en una reducción significativa en la proliferación de células HeLa (Figura 7a) y SiHa (Figura 7b) comparadas con células transfectadas con el RNA “scramble” ($p < 0.05$). Para corroborar la especificidad de los siRNA en el silenciamiento del EpoR se realizaron ensayos de rescate transfectando las células con el vector de expresión pcDNA3.1 EpoR el cual contiene la secuencia del gen del EpoR humano o bien el vector pcDNA3.1 vacío. El efecto del silenciamiento del gen del EpoR fue totalmente revertido por la re-expresión del EpoR tanto en células HeLa (Figura 7a) como en células SiHa (Figura 7b). Por el contrario, el nivel de proliferación no fue restituido en las células que fueron transfectadas con el vector vacío. El silenciamiento de la Epo provocó una reducción significativa en la proliferación tanto de las células HeLa (Figura 7c) como en células SiHa (Figura 7d) en comparación con las células transfectadas con el RNA scrambled ($p < 0.05$).

Para determinar que la reducción en la proliferación se debió a la ausencia de Epo endógena por el silenciamiento del gen, se evaluó el efecto de la Epo exógena en las células transfectadas. El nivel de proliferación fue totalmente restaurado cuando las células transfectadas fueron suplementadas con 30 U/ml de Epo exógena tanto en células HeLa (Figura 7c) como en células SiHa (Figura 7d).

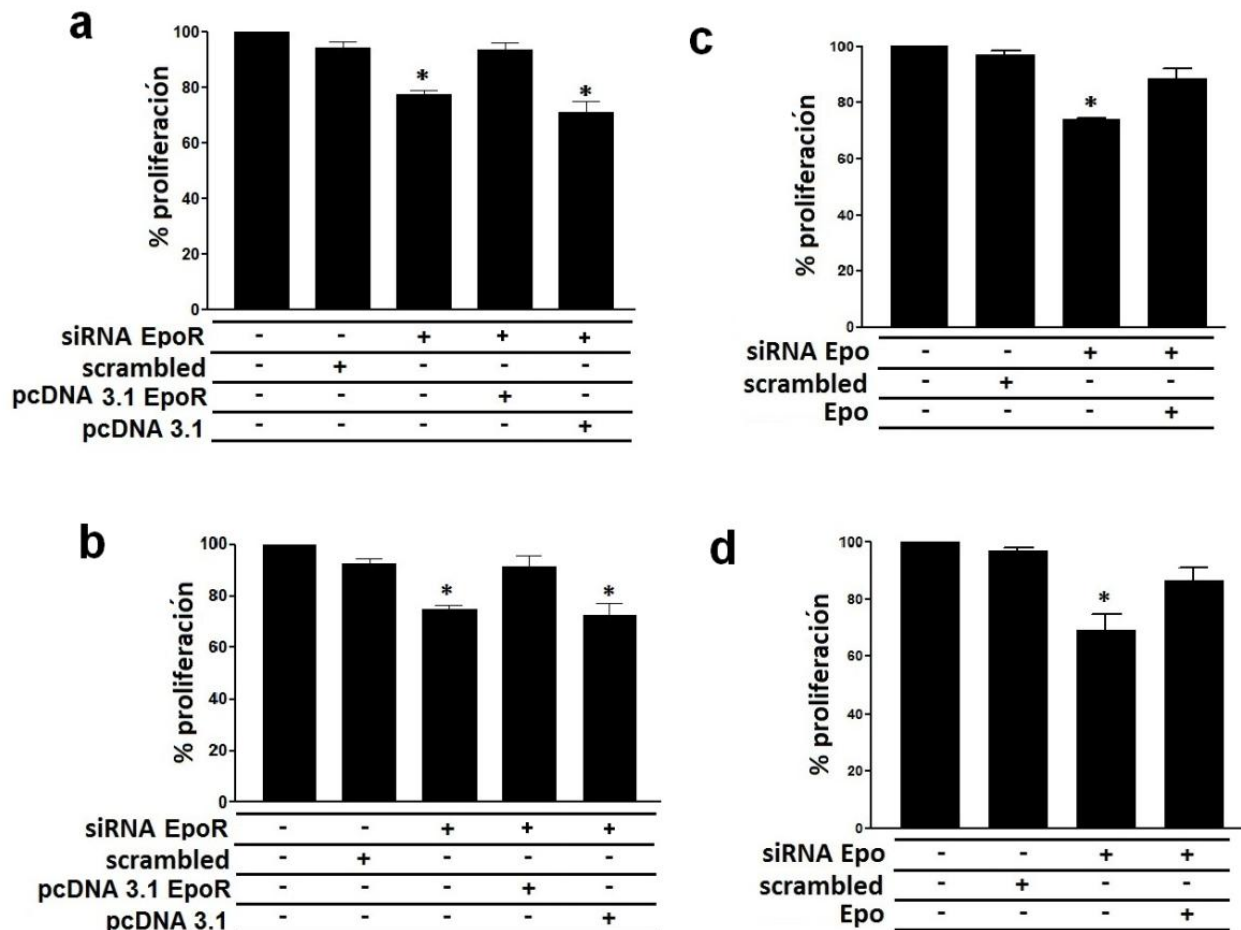


Figura 7. Estimulación endógena del sistema Epo/EpoR en células de carcinoma cervical. Células HeLa y SiHa fueron transfectadas con RNA interferentes pequeños específicos para el EpoR (siRNA EpoR) y Epo (siRNA Epo) o con un RNA scrambled como control negativo. La proliferación celular fue analizada por ensayo de MTT. El efecto proliferativo mediado por el EpoR fue restituido en las células HeLa (a) y SiHa (b) transfectadas con el vector de expresión pcDNA 3.1 EpoR que contiene el gen del EpoR humano. El vector vacío pcDNA 3.1 se utilizó como control negativo. El efecto proliferativo de la Epo endógena fue restituido suplementando las células HeLa (c) y SiHa (d) con 30U/ml de Epo recombinante humana. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA con la prueba post-test Tukey-Kramer. Los valores mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican un error estándar de la media. * $p \leq 0.05$ vs el valor de los controles no tratados.

Las observaciones anteriores sugieren fuertemente que la estimulación endógena del eje Epo/EpoR contribuye al crecimiento *in vitro* de las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical.

Puesto que los datos sugieren que la Epo endógena podría estar induciendo un loop autócrino-parácrino de estimulación, se decidió evaluar la concentración de Epo en el suero de mujeres mediante el ensayo de ELISA. Como se observa en la figura 8, la concentración de Epo en el suero de mujeres con NIC y CaCu es 3 veces mayor que la observada en las mujeres sanas (Figura 8). Estos datos sugieren que la Epo podría estar involucrada en el proceso de transformación celular.

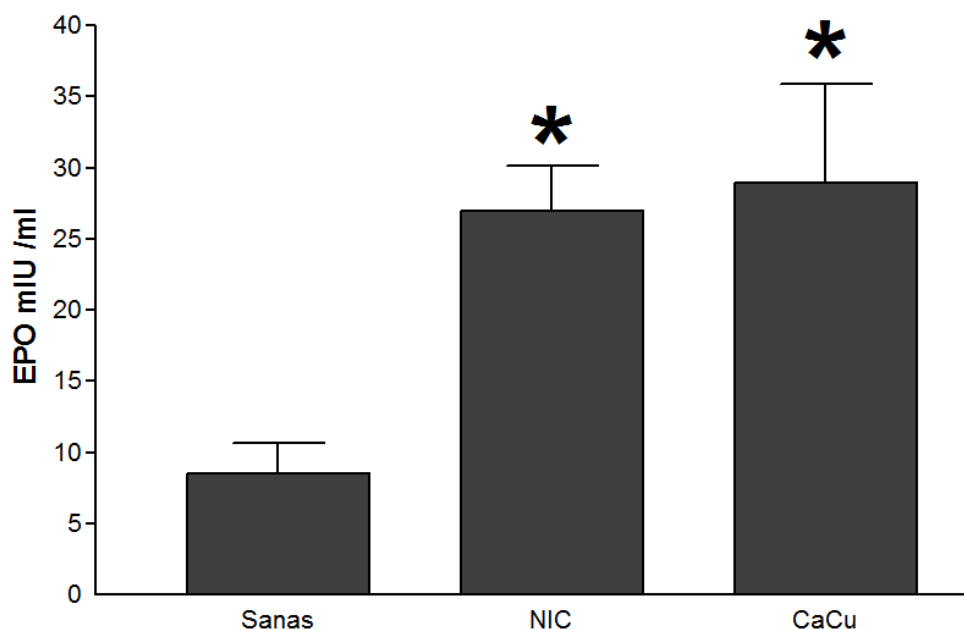


Figura 8. Detección de Epo en sueros de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervical. 20µl de cada muestra de suero fue analizada por el ensayo de ELISA para la detección de Epo. NIC =neoplasia intraepitelial cervical. CaCu = cáncer cérvico uterino. Sanas = mujeres sin lesión cervical. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA con la prueba post-test Tukey-Kramer. Los valores mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican un error estándar de la media. * $p \leq 0.05$ vs el valor de las mujeres sanas.

6.3 La Epo exógena induce la proliferación de las células derivadas de carcinoma cervical.

Los resultados obtenidos indican que el EpoR se expresa en la membrana de células de carcinoma cervical, por lo anterior decidimos evaluar el papel de la Epo exógena para inducir proliferación celular. Las células fueron cultivadas a dosis crecientes de Epo durante 48h. Como se muestra en la figura 9 la administración de Epo indujo proliferación dosis-dependiente, la cual fue significativamente mayor que en células no tratadas a partir de dosis mayores de 7.5 U/ml. El efecto máximo fue alcanzado con 20 U/ml de Epo. Esta dosis fue utilizada en los experimentos subsecuentes.

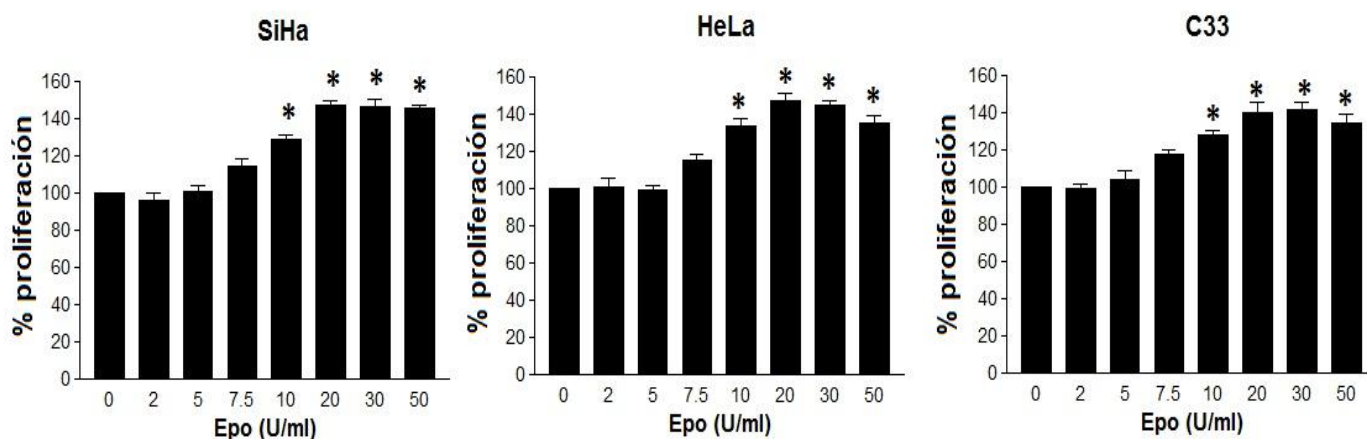


Figura 9. La Epo exógena induce la proliferación de células derivadas de carcinoma cervical.

Las células SiHa, HeLa y C33 fueron cultivadas con dosis crecientes de Epo como se indica. La proliferación celular fue evaluada a las 48h por el ensayo de MTT. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA con la prueba post-test Tukey-Kramer. Los valores mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar de la media. * $p \leq 0.05$ vs el valor de los controles no tratados.

El estudio de la cinética de crecimiento de las células en presencia de Epo muestra que el efecto proliferativo inducido por la EPO es evidente a partir de las 48h ($p \leq 0.001$) (Figura 10).

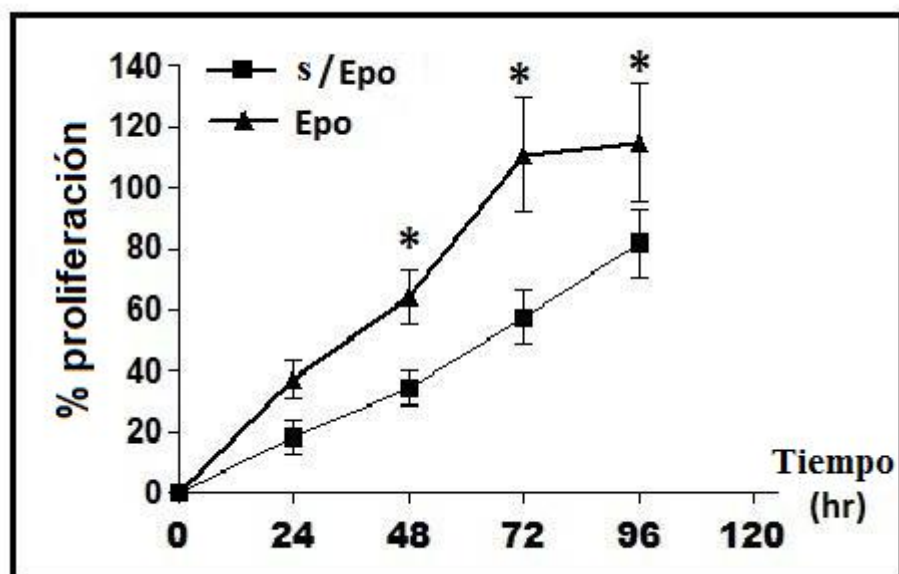


Figura 10. Cinética de crecimiento de células tratadas con Epo. Células HeLa fueron incubadas con 20 U/ml de Epo o no tratadas (s/Epo) y la proliferación fue evaluada por el ensayo de MTT a los tiempos indicados. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA con la prueba post-test Tukey-Kramer. Los valores mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican un error estándar de la media. * $p \leq 0.05$ vs el valor de los controles no tratados.

Para demostrar que el efecto proliferativo es mediado por la Epo, las células se incubaron en presencia del anticuerpo neutralizante de la actividad de la Epo. El tratamiento con el anticuerpo neutralizante redujo significativamente la proliferación celular (Figura 11). Por otro lado, para confirmar que la proliferación era mediada por el EpoR las células fueron pre-incubadas en presencia de lovastatina por 16h, la

cual es un inhibidor de la HMGC_oA reductasa, enzima clave de la ruta del mevalonato implicada en la maduración del EpoR. El tratamiento con lovastatina redujo significativamente la proliferación celular ($p=0.01$) (Figura 11). Un efecto similar se observó en células tratadas con tirfostina AG490 ($p=0.01$) (Figura 11), la cual es un inhibidor de JAK2, la cinasa asociada al EpoR y que se activa tras la estimulación con Epo.

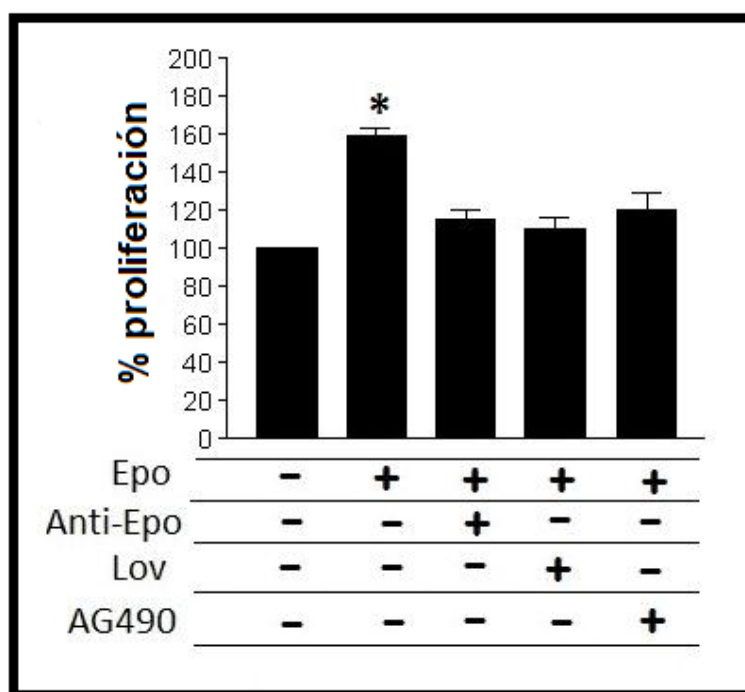


Figura 11. Inhibición de la proliferación mediada por el eje Epo/EpoR. Células HeLa fueron estimuladas con 20U/ml de Epo, o con Epo + un anticuerpo neutralizante de la actividad de la Epo (Anti-Epo), o pre-tratadas con 20 μ M de lovastatina (Lov), o pre-tratadas con 150 μ M de tirfostina AG490 (AG490). Las células pre-tratadas fueron incubadas por 48h en presencia de 20U/ml de Epo. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA con la prueba post-test Tukey-Kramer. Los valores mostrados representan el promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican un error estándar de la media. * $p \leq 0.05$ vs el valor de los controles no tratados.

Para corroborar la eficacia de los inhibidores utilizados, se evaluaron sus respectivas moléculas blanco. La lovastatina redujo la expresión del EpoR en la membrana celular de un $87 \pm 4.9\%$ a $53 \pm 9.3\%$ (Figura 12a). Como se muestra en la figura 12b, la tirfostina AG490 inhibe la fosforilación de JAK2 mediada por la Epo. Lo anterior sugiere que la proliferación de las células de cáncer cervical inducida por la Epo puede ser mediada por la activación del eje Epo/EpoR a través de la cinasa JAK2.

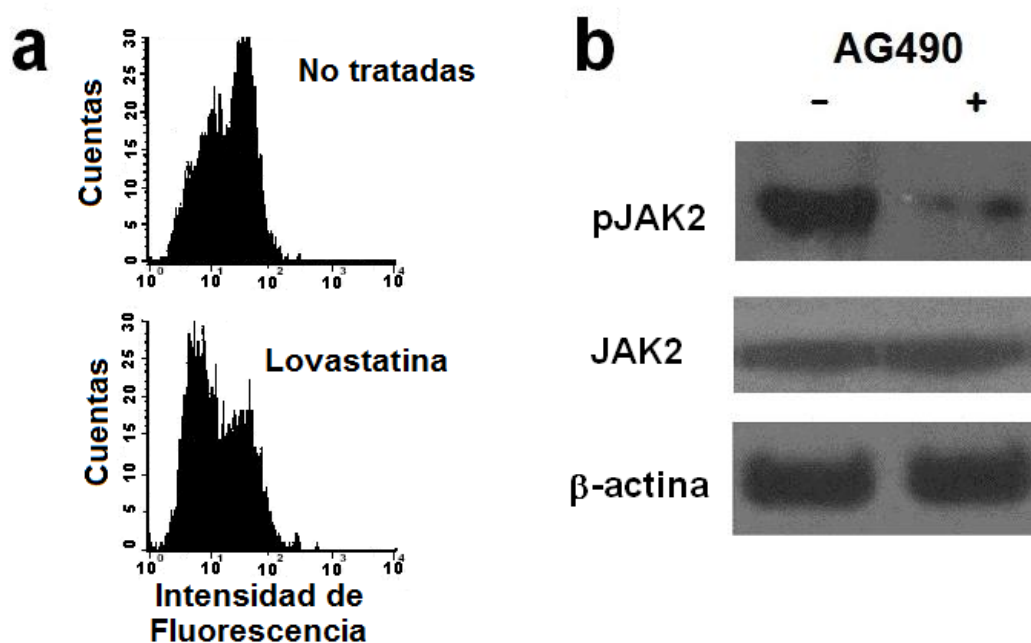


Figura 12. Efecto de la lovastatina y de la tirfostina AG490. (a) La expresión del EpoR en la membrana celular fue analizada por citometría de flujo en células tratadas con lovastatina (Lovastatina) y células control (No tratadas). (b) La fosforilación de JAK2 (pJAK2) inducida por la Epo fue analizada por Western Blot en células incubadas en presencia o ausencia de tirfostina AG490 (AG490). La expresión de β -actina fue incluida como control de carga.

6.4 La estimulación del EpoR induce la activación de diferentes miembros de la familia JAK/STAT.

Nuestros resultados sugieren que JAK2 contribuye a la proliferación celular mediada por la Epo, por ello evaluamos la vía de señalización JAK/STAT. La fosforilación de JAK1, JAK2 y JAK3 fue analizada por Western Blot tras la estimulación con 20U/ml de Epo. Como se muestra en la figura 13, la Epo no indujo la fosforilación de JAK1. En contraste, la Epo induce un incremento en la fosforilación de JAK2 y JAK3 siendo evidente a los 3 y 10 min respectivamente.

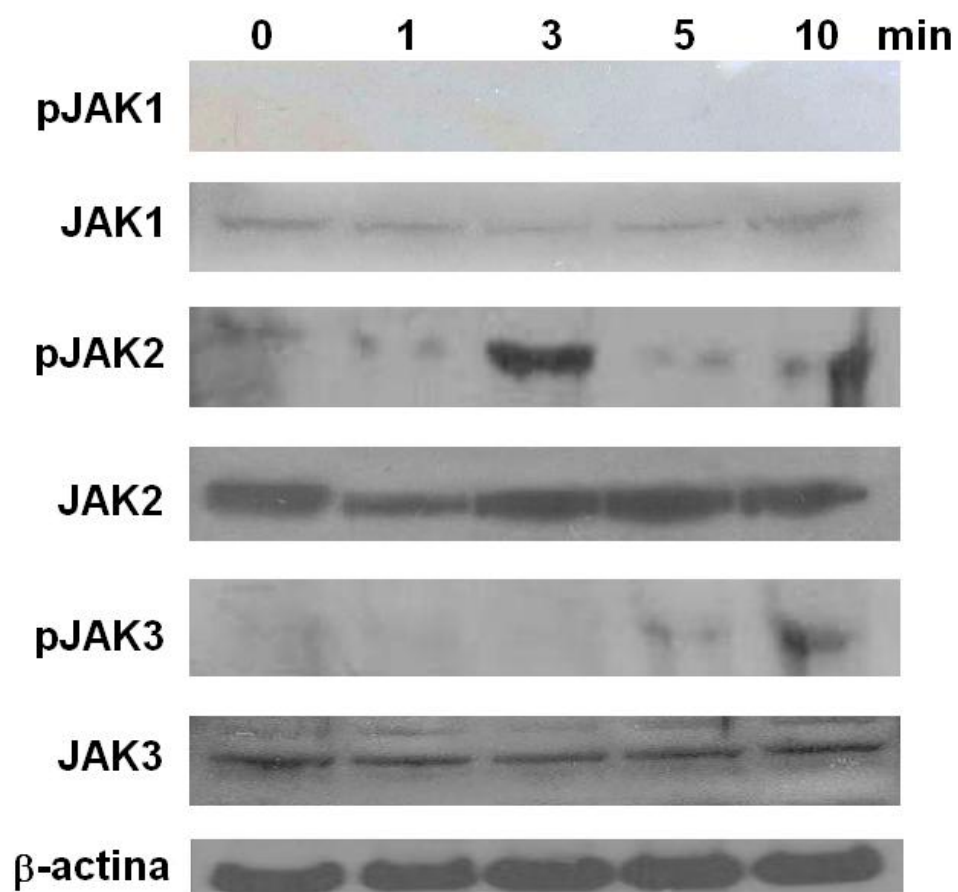


Figura 13. La Epo exógena induce la activación de la vía JAK/STAT en células de carcinoma cervical. Células HeLa fueron estimuladas con 20U/ml de Epo. La fosforilación de JAK1 (pJAK), JAK2 (pJAK2) y JAK3 (pJAK3) fue evaluada por Western Blot a los tiempos indicados. La expresión de β-actina fue incluida como control de carga.

En adición se evaluó la activación de STAT1, STAT3, STAT5 tras la estimulación con Epo. La fosforilación de STAT1 no fue modificada por la actividad de la Epo exógena, sin embargo la Epo indujo claramente la fosforilación de STAT3 y STAT5 (Figura 14). La activación de STAT3 fue detectada a los 5, 10, 30 y 60 min después del tratamiento. La fosforilación de STAT5 fue detectada a los 5 y 10 min mostrando un máximo a los 10 min.

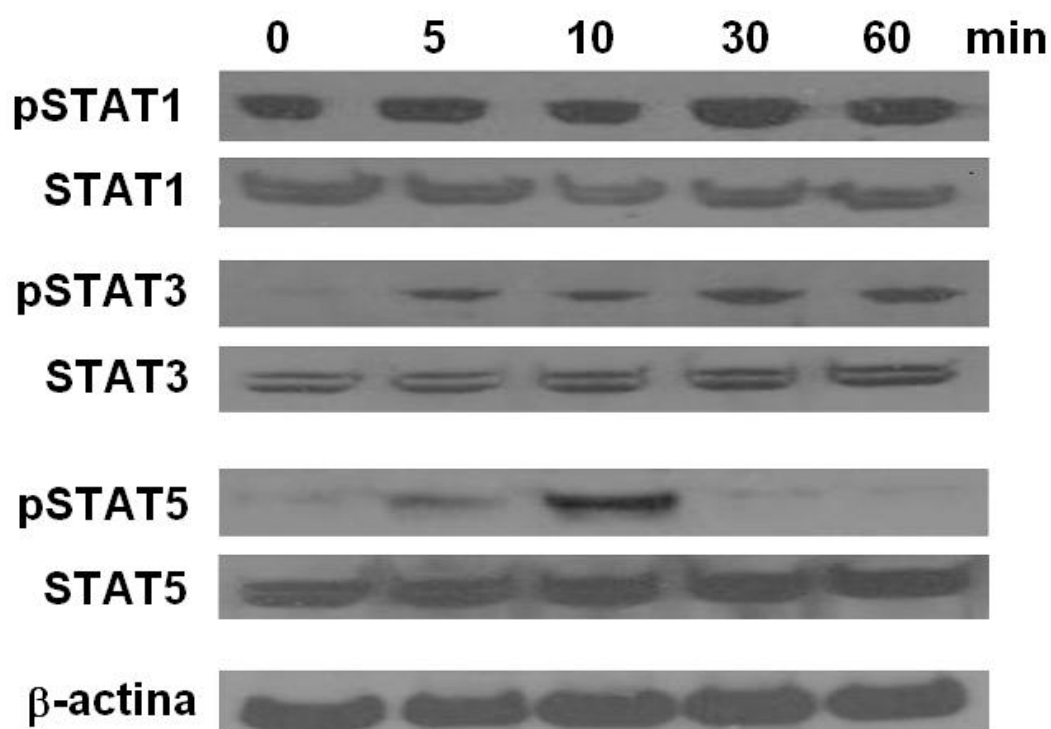


Figura 14. La Epo exógena induce la activación de la vía JAK/STAT en células de carcinoma cervical. Células HeLa fueron estimuladas con 20U/ml de Epo. La fosforilación de STAT1 (pSTAT1), STAT3 (pSTAT3) y STAT5 (pSTAT5) fue evaluada por Western Blot a los tiempos indicados. La expresión de β -actina fue incluida como control de carga.

Los datos indican que la Epo exógena es capaz de inducir la activación de diferentes miembros de la familia JAK/STAT. Como se observa en la figura 14 la fosforilación de STAT1 fue detectada antes del tratamiento con Epo exógena, por lo que decidimos evaluar si la Epo endógena se encuentra implicada en la fosforilación de STAT1. La fosforilación de STAT1 fue analizada por Western Blot en células transfectadas con siRNAs específicos para Epo o RNA scrambled como control negativo. Como se muestra en la figura 15, el silenciamiento del gen de la Epo da como resultado una reducción significativa en la fosforilación de STAT1 en comparación con las células transfectadas con el RNA scramble. La expresión de STAT1 permanece sin cambios tras el silenciamiento del gen de la Epo. Esta observación sugiere que la Epo endógena promueve parcialmente la activación constitutiva de STAT1 en células de carcinoma cervical.

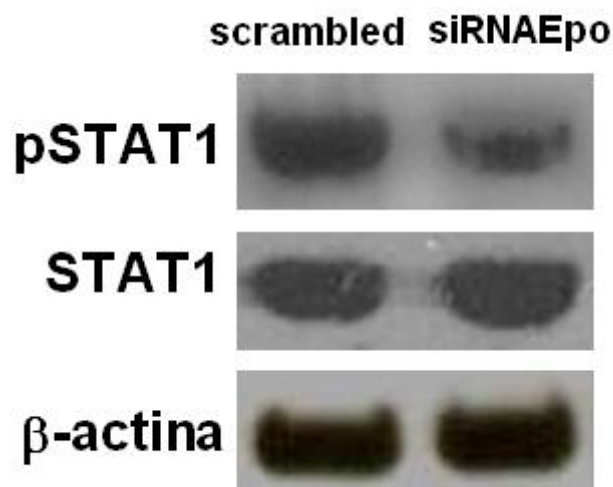


Figura 15. La Epo endógena promueve la fosforilación constitutiva de STAT1. Células HeLa fueron transfectadas con siRNA específicos para la Epo (siRNA Epo) o con RNA scramble como control negativo (scramble). La expresión y fosforilación de STAT1 fue evaluada por Western Blot. La expresión de β -actina fue incluida como control de carga.

Los datos en su conjunto indican que la Epo es capaz de inducir proliferación de las células de carcinoma cervical *in vitro* a través de la activación del eje Epo-EpoR vía JAK/STAT.

6.5 La EPO induce el crecimiento de tumores *in vivo*.

Puesto que se observó el efecto de la Epo sobre la proliferación de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical *in vitro* se decidió evaluar el efecto utilizando un modelo *in vivo*. Para ello se utilizaron ratones *nu/nu* hembras de 8 semanas a los cuales se les indujo un tumor con células HeLa y SiHa. Después de 15 días, los ratones recibieron dosis farmacológicas de Epo o PBS como vehículo. Los resultados muestran que los ratones que reciben el estímulo con Epo presentaron tumores más grandes en comparación con los ratones que no recibieron dicho estímulo (Figura 16a) tanto en células HeLa como en células SiHa.

Al final del experimento los tumores fueron disectados y pesados. Los animales que recibieron el tratamiento con Epo presentaron tumores del doble de peso en comparación con los tumores de los ratones que recibieron el vehículo ($p=0.01$), 2.08 veces para células SiHa y 2.49 veces para células HeLa (Figura 16b). En la figura 16c se muestra una fotografía representativa de los tumores disectados. Los resultados sugieren que la Epo es capaz de inducir proliferación de las células derivadas de cáncer cervical *in vivo*.

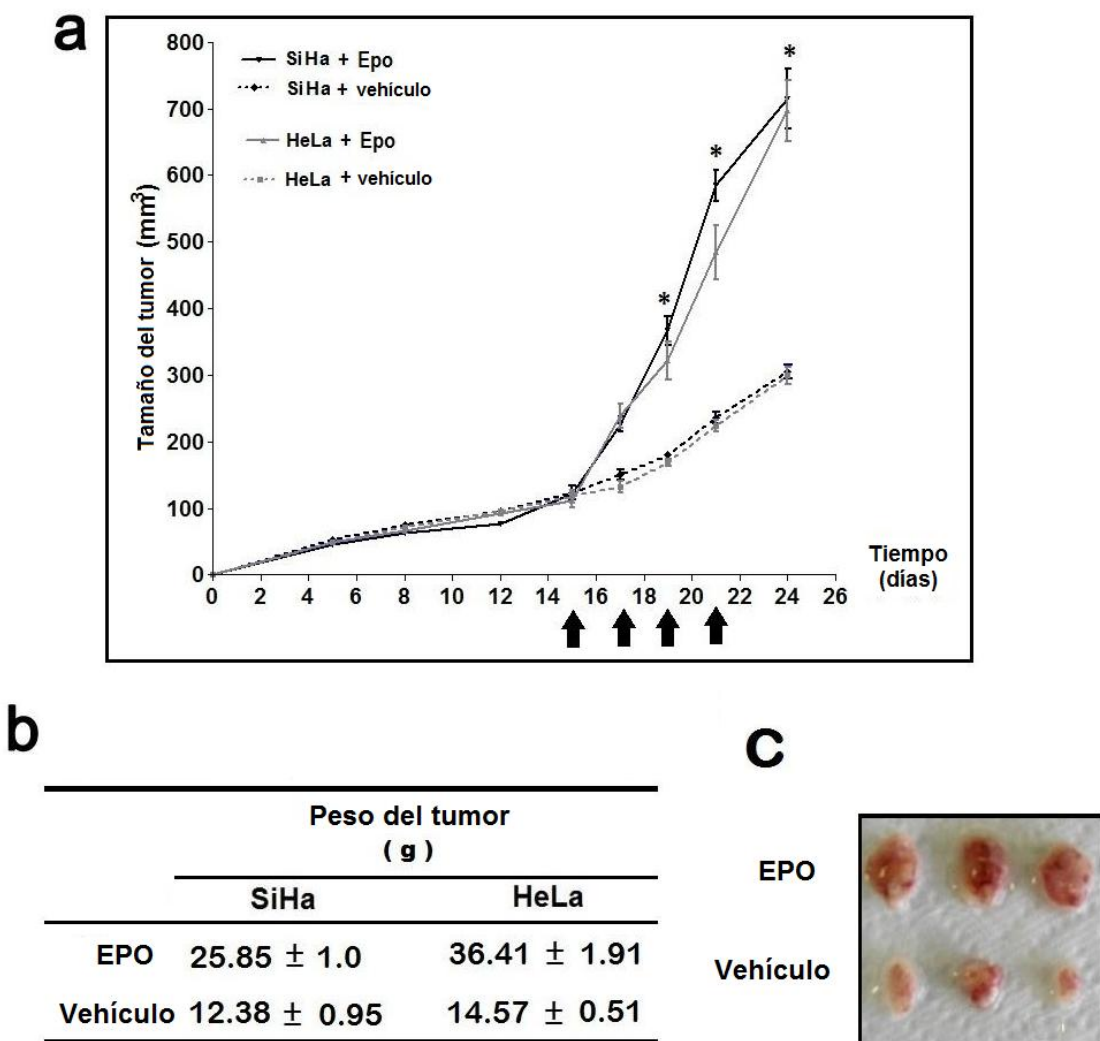


Figura 16. La Epo induce el crecimiento de tumores *in vivo*. (a) A ratones hembras nu/nu se les administró subcutáneamente (s.c.) 1×10^5 células HeLa o SiHa. Después de 15 días los ratones recibieron s.c. 4 dosis de 300U/kg de Epo o PBS como vehículo en los días indicados por las flechas. Los datos fueron analizados mediante la prueba de ANOVA con la prueba post-test Tukey-Kramer. Los datos representan la media de 5 animales por grupo. Las barras indican un error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs el valor de los ratones que recibieron el vehículo. (b) Media de los pesos de los tumores disectados al final del tratamiento con Epo o vehículo. (c) Imagen representativa que muestra los tumores tratados con Epo y controles no tratados (Vehículo),

Con el fin de demostrar que la Epo inducía proliferación *in vivo* se evaluó el índice de proliferación (IP) y el índice de apoptosis (IA) por inmunohistoquímica y se expresó como el porcentaje de células que muestran positividad para Ki67 y caspasa 3 activa respectivamente en un total de 1,000 células contadas en cada laminilla. La frecuencia de células proliferantes en los tumores de animales tratados con EPO fue significativamente más alto que el observado en los tumores de ratones que recibieron el vehículo ($p < 0.05$) (Tabla 3). En contraste, no se observaron diferencias en la frecuencia de células apoptóticas los dos grupos ($p=0.13$).

	EPO	Vehículo
IP (rango)	33.8 (17.3-79.4)	20.6 (8.9-70.5)
IA (rango)	1.5 (0.1-3.1)	0.8 (0.1-2.3)

Tabla 3. Índices de proliferación y apoptosis. Los ratones fueron tratados con Epo o vehículo. (a) Se analizó por la expresión del antígeno nuclear Ki67 y de la caspasa 3 activa por inmunohistoquímica. El índice de proliferación (IP) y el índice de apoptosis (IA) fue expresado como el porcentaje de células que muestran positividad para Ki67 y para caspasa 3 activa respectivamente de un total de 1,000 células cantadas en cada laminilla.

En este estudio se observó que la Epo exógena induce la fosforilación de JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5 *in vitro* por lo que se decidió analizar si la Epo era capaz de activar estas moléculas *in vivo*. Los tumores de ratones tratados con Epo o con vehículo fueron disectados y se extrajeron las proteínas para ser analizadas por Western Blot.

Como se muestra en la figura 17 la administración de Epo activó la fosforilación de JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5. El nivel total de estas proteínas permaneció sin cambios. Esta observación confirma que la Epo es capaz de inducir la activación de varios miembros de la vía JAK/STAT.

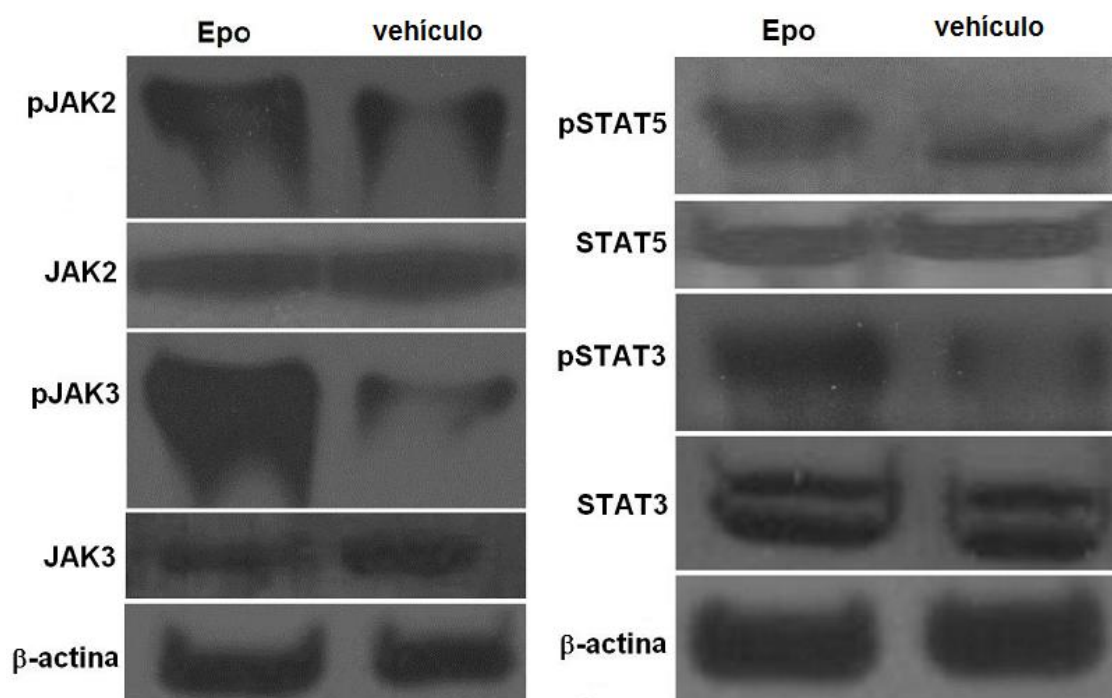


Figura 17. La Epo activa la fosforilación de varios miembros de la vía JAK/STAT *in vivo*. Se obtuvieron extractos de proteína total de los tumores disectados de ratones tratados con Epo o PBS (vehículo). El nivel de fosforilación de JAK1 (pJAK1), JAK2 (pJAK2), STAT3 (pSTAT3) y STAT5 (pSTAT5) se evaluaron por Western Blot. La expresión de β -actina fue incluida como control de carga.

7. DISCUSIÓN.

En pacientes oncológicos es común el desarrollo de anemia debido principalmente a la quimio y la radioterapia que reciben. Para tratar la anemia en pacientes con cáncer se emplea comúnmente Epo la cual ha mostrado incrementar los niveles de hemoglobina en sangre (Glaspy et al. 1997; Demetri et al. 1998). Sin embargo la inocuidad del uso de la Epo en estos pacientes se ha puesto a discusión debido a que en estudios recientes se han observado efectos adversos en aquellos que la reciben.

En pacientes con cáncer de mama metastásico la Epo ha mostrado incrementar la progresión de la enfermedad lo que conlleva a una mayor mortalidad de aquellas mujeres tratadas con Epo (Leyland-Jones et al. 2003). Por otro lado, se ha observado que el uso de Epo como adyuvante en la radioterapia de pacientes con cáncer de cabeza y cuello tiene efectos negativos en la sobrevida a 5 años (Lambin et al. 2009). En el caso del cáncer cervical, la tasa de recurrencia del tumor se duplica en mujeres que recibieron Epo y la tasa de sobrevida a 5 años se reduce a la mitad (Temkin et al. 2006). Como consecuencia, la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer reconoció la necesidad de realizar estudios clínicos adicionales, así como estudios de investigación básica que permitan determinar los costos y beneficios del uso de Epo en pacientes anémicos con cáncer (Bokemeyer et al. 2007).

En el presente estudio se investigó la expresión de la eritropoyetina y su receptor en células de carcinoma cervical y se proporcionan evidencias de la funcionalidad del receptor en dichas células.

La expresión de EpoR en células de carcinoma cervical y en biopsias de tumores cervicales se ha reportado previamente (Acs et al. 2003; Leo et al. 2006; Shenouda et al. 2006), sin embargo estos estudios han sido cuestionados debido al uso de anticuerpos que mostraron carecer de especificidad y afinidad por el receptor (Elliott et al. 2006; Brown et al. 2007; Kirkeby et al. 2007). Los anticuerpos C20 y M20 de la compañía Santa Cruz utilizados en dichos estudios reconocen los últimos 20 aminoácidos de la región carboxilo terminal del EpoR la cual presenta homología con las proteínas de estrés calórico HSP70-2 y HSP70-5 como lo demuestran los estudios de Elliott y colaboradores en el 2006. Adicionalmente se observó que cuando las muestras eran pre-tratadas con un péptido sintético de unión a las secuencias de las HSP70-2 y HSP70-5 la banda observada a los 60kd desaparecía (Brown et al. 2007). Del mismo modo, la tinción inmunohistoquímica del EpoR en muestras de pacientes con cáncer de pulmón disminuía drásticamente cuando las muestras eran pre-tratadas con los péptidos sintéticos (Brown et al. 2007).

Por el contrario, los anticuerpos que reconocen el extremo amino terminal del EpoR han mostrado ser específicos para su detección tanto por inmunohistoquímica como por Western Blot (Kirkeby et al. 2007; Della Ragione et al. 2007). Para aclarar la interrogante de la expresión

del EpoR en células de cáncer cervical evaluamos la expresión del EpoR a nivel transcripcional y a nivel de proteína utilizando un anticuerpo anti-EpoR que reconoce el extremo amino terminal del EpoR el cual ha demostrado ser específico en la detección de ésta proteína (Della Ragione et al. 2007).

En este trabajo mostramos la presencia de transcritos del EpoR en las tres líneas celulares derivadas de carcinoma cervical, esta observación concuerda con estudios previos en donde detectan RNAm del EpoR en células HeLa (Laugsch et al. 2008; Sinclair et al. 2008) y SiHa (Acs et al. 2003). Hasta el momento este es el primer reporte en el cual se detecta la transcripción del gen del EpoR en células C33. Dadas las características de las líneas celulares probadas, los datos sugieren que la expresión del EpoR y la Epo no se correlacionan con la asociación del virus del papiloma humano al cáncer cervical. Se ha determinado mediante análisis cuantitativos que el nivel de transcripción del EpoR en células HeLa es menor al nivel detectado en células UT7, la cual es una leucemia megacarioblástica dependiente de Epo (Sinclair et al. 2008). A pesar de que en nuestro trabajo no se realizó un análisis cuantitativo del RNAm del EpoR el nivel de transcripción observado en las líneas celulares fue débil. Aunado a esto, es importante destacar que la detección de RNAm del EpoR en los tumores sólidos no suele predecir la expresión de la proteína del EpoR y más aún la expresión del EpoR en la membrana celular ya que éste puede quedar atrapado en el citoplasma (Sinclair et al. 2008). Por esta razón se inmunoprecipitaron proteínas de la membrana celular y de esta forma se encontró evidencia de la expresión del EpoR en la superficie celular.

Adicionalmente, el uso de lovastatina inhibió la expresión del EpoR en la superficie celular como lo demostró la citometría de flujo de células no permeabilizadas. Dado que la lovastatina es un inhibidor de la ruta del mevalonato la cual a su vez es indispensable para la correcta maduración y localización del EpoR (Hamadmad y Hohl 2007), nuestros datos sugieren que el EpoR detectado en la membrana de las células SiHa, HeLa y C33 es una proteína madura y por lo tanto es potencialmente funcional.

A pesar de que los órganos reproductores femeninos se han reconocido como sitios no clásicos de la expresión de la Epo y el EpoR (Yasuda et al. 2001a) la importancia fisiológica de la expresión de estas proteínas permanece incierta. La co-expresión de Epo y del EpoR adquiere relevancia puesto que sugiere la existencia de un sistema de estimulación autócrino/parácrino del eje Epo-EpoR. En este estudio mostramos evidencia de la co-expresión de Epo y EpoR lo cual concuerda con estudios previos (Acs et al. 2003). Por otro lado, se determinó por primera vez que la Epo producida por las células es secretada al medio extracelular por lo que para probar nuestra hipótesis de un sistema de estimulación autócrino/parácrino silenciamos los genes de la Epo y del EpoR y observamos que esto conducía a una reducción significativa de la proliferación celular. Estas observaciones demuestran por primera vez que en las células de carcinoma cervical existe un sistema de estimulación autócrino/parácrino del eje Epo-EpoR involucrado en la regulación de la proliferación celular *in vitro*. La existencia de un eje Epo-EpoR funcional en células tumorales ha sido reportada recientemente. Mediante el uso de shRNAs se ha silenciado la expresión de los genes de la Epo y el EpoR

y se ha mostrado que esto conlleva a una reducción de la proliferación de células de cáncer de ovario (Paragh et al. 2009) y próstata (Jeong et al. 2009).

La existencia de un sistema de estimulación autócrino/parácrino del eje Epo-EpoR en células tumorales adquiere relevancia puesto que las evidencias sugieren que está involucrado en el proceso de transformación maligna. Datos interesantes se han reportado en el caso de las patologías de los órganos reproductores femeninos. Por ejemplo, en la endometriosis se ha observado que las lesiones producen Epo y que aquellas con una mayor expresión de EpoR son mucho más activas y proliferan más rápidamente (Matsuzaki et al. 2003). Un caso similar se observa en los leiomiomas en donde se ha observado que éstos producen y secretan Epo; aunado a esto se ha sugerido que la expresión diferencial de EpoR está involucrada en el tamaño de la lesión puesto que aquellos que presentan una mayor expresión de EpoR son más grandes (Pollio et al. 2005).

Por otro lado, se han detectado altos niveles de Epo en biopsias de diferentes carcinomas (Katsuoka et al. 1983; Yasuda et al. 2002; Manello et al. 2008) y aunado a lo anterior, se ha observado que la inhibición de la Epo endógena a través de anticuerpos anti-Epo induce la apoptosis de tumores transplantados en ratones *nu/nu* (Yasuda et al. 2001b). Estas observaciones sugieren que la Epo del microambiente celular puede regular la progresión del tumor. Por lo anterior y debido a que nuestros datos mostraban un sistema de estimulación autócrino/parácrino involucrado en proliferación celular, decidimos

evaluar la concentración de Epo en el suero de mujeres. Nuestros datos muestran que los niveles de Epo en mujeres con lesiones premalignas o cáncer cervical son 3 veces mayores a los que se observan en mujeres sanas. Puesto que hemos demostrado la existencia de un EpoR funcional en las células de carcinoma cervical estos resultados adquieren relevancia pues se abre a la discusión si la Epo en suero puede o no regular el tamaño de la lesión o tumor como lo sugiere la evidencia a nivel local en las patologías de los órganos reproductores femeninos. Hasta el momento no hay estudios en donde se evalúe la concentración de Epo en el suero de pacientes con cáncer por ello los datos de este trabajo son la base para realizar un estudio posterior en donde se analicen un mayor número de muestras para la detección de Epo en suero y a su vez correlacionar esos datos con la progresión de la enfermedad para poder determinar si la alta concentración de Epo en suero es o no un factor de mal pronóstico en el desarrollo del cáncer cervical.

A pesar de que la condición hipóxica no es necesaria en los tumores para la expresión tanto de la Epo y como del EpoR, la hipoxia si puede incrementar la expresión de dichas proteínas debido a que en condiciones normales el principal estímulo para su producción es precisamente la hipoxia. Se ha observado mediante análisis inmunohistoquímicos de biopsias de tumores cervicales (Acs et al. 2003) y endometriales (Acs et al. 2004) que la tinción de la Epo y el EpoR es mucho más acentuada en las zonas hipóxicas del tumor. En nuestro trabajo usamos el modelo de los esferoides y mediante inmunohistoquímica demostramos que las células de cáncer cervical presentan una fuerte tinción del EpoR y la Epo en condiciones hipóxicas.

Esta observación adquiere relevancia pues los tumores sólidos se caracterizan por poseer regiones hipóxicas y si ésta induce una mayor expresión de Epo y EpoR entonces la condición hipóxica podría ser crucial en la progresión del tumor pues demostramos la existencia de un eje Epo-EpoR funcional en estas células.

La expresión del EpoR ha sido detectada en tumores y diversas líneas celulares y por diversos métodos, sin embargo su relevancia biológica ha sido cuestionada recientemente. Por un lado, existen reportes en donde se ha observado que la Epo exógena es capaz de inducir proliferación en diferentes tumores (Selzer et al. 2000; Westenfelder y Baranowski 2000; Acs et al. 2001; Yasuda et al. 2003; Lai et al. 2005; Feldman et al. 2006), por otro lado existen reportes en donde se ha determinado que el EpoR no es funcional (Liu et al. 2004; Gewirtz et al. 2006; Laugsch et al. 2008). En el caso del cáncer cervical se ha observado que la hipoxia enriquece la expresión del EpoR y que la estimulación con Epo exógena induce fosforilación del receptor (Acs et al. 2003). Aunado a esto la Epo es capaz de inhibir apoptosis en células HeLa (Belenkov et al. 2004) sugiriendo que el EpoR es funcional. Sin embargo, en el 2008 Laugsch y colaboradores observaron lo contrario pues no detectaron efectos proliferativos tras la estimulación con Epo.

Esta última observación contrasta con nuestros datos que muestran que tras la estimulación con Epo exógena se induce proliferación de manera dosis dependiente. Cabe resaltar que nuestro trabajo demuestra que la inhibición del eje Epo-EpoR a diferentes niveles reduce significativamente la proliferación observada cuando se

estimula con Epo exógena. Adicionalmente el efecto proliferativo fue también evidente *in vivo*, los ratones que recibieron tratamientos con Epo presentaron tumores dos veces más grandes que los ratones que recibieron placebo. El contraste entre nuestros resultados y los de Laugsch y colaboradores podría deberse a diferencias en las condiciones de los ensayos de funcionalidad *in vitro*. El SFB utilizado como suplemento en el medio de cultivo contiene Epo por lo que los investigadores han optado por dos diferentes métodos para evitar que ésta Epo en suero enmascare la proliferación inducida por la Epo exógena. Por un lado, estudios reportan la utilización de bajas concentraciones de suero y por otro lado, algunos han optado por la inactivación de la Epo en suero por calor. En su estudio, Laugsch y colaboradores cultivaron las líneas celulares en medio suplementado al 10% con SFB y antes de realizar los experimento el medio fue retirado y sustituido por medio de cultivo suplementado solo al 0.5% de suero. Probablemente el efecto de proliferación no fue observado dado que las células fueron sometidas a este estrés. En nuestro estudio, las células fueron cultivadas de manera permanente en medio suplementado al 2% con SFB inactivado por lo que las células no sufrieron ningún tipo de estrés antes de realizar los experimentos. Cabe resaltar que en los estudios en donde se ha observado proliferación inducida por la Epo exógena, las líneas celulares han pasado por un período de adaptación al medio suplementado con SFB inactivado el cual varía dependiendo del estudio de entre 16 a 24 horas previo a la estimulación con Epo (Lai et al. 2005; Feldman et al. 2006; Bose y Udupa 2008). Aunado a esto, la Epo tiene una vida media corta por lo que en nuestro trabajo la Epo fue renovada cada 24 horas durante el transcurso del experimento; en el trabajo de Laugsch no se especifica si la Epo fue renovada o no durante el tiempo que duró el experimento.

Para continuar evaluando la funcionalidad del EpoR, en nuestro estudio presentamos evidencia de que tras la estimulación con Epo exógena se activan varios miembros de la vía de señalización JAK/STAT. La Epo fue capaz de incrementar la fosforilación de JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5 tanto *in vitro* como *in vivo*. Previamente se reportó la fosforilación de JAK2 y STAT5 en biopsias de tumores cervicales por inmunohistoquímica y la fosforilación de ambas proteínas depende fuertemente de la activación del EpoR por su ligando (Yasuda et al. 2002). En concordancia con esto, nuestros datos indican que la Epo exógena induce fosforilación de JAK2 y STAT5 induciendo proliferación en células de cáncer cervical. Es importante resaltar que la cinasa JAK2 es la primer cinasa activada tras la estimulación con Epo y que ésta no solo está involucrada en proliferación; se sabe que JAK2 también regula la supervivencia celular (Belenkov et al. 2004).

Adicionalmente encontramos que la Epo es capaz de inducir la activación de JAK3 y STAT3 siendo este el primer reporte de la activación de estas cinasas en células de cáncer cervical tras la estimulación con Epo. Se ha identificado a STAT3 como una molécula río abajo del EpoR en melanoma (Mirmohammadsadegh et al. 2010), células eritroides (Wierenga et al. 2003) y eritroleucemias (Kirito et al. 1997). En adición, la activación de STAT3 se ha asociado con un mayor nivel de proliferación en células de eritroleucemia primaria (Kirito et al. 2002). Interesantemente, se ha reconocido que la expresión y activación de STAT3 es un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer cervical (Takemoto et al. 2009).

Por otro lado, mostramos evidencia que la Epo exógena no modificó el nivel de fosforilación de STAT1 sin embargo al inhibir la expresión endógena de Epo si observamos una disminución en la fosforilación de dicha proteína por lo que nuestros datos sugieren que la Epo endógena promueve al menos en parte la fosforilación constitutiva de STAT1. Este es el primer reporte de la activación de STAT1 por Epo en células de cáncer cervical. Interesantemente se ha reportado que la activación de STAT1 se asocia con un mayor nivel de proliferación en células de eritroleucemia primaria (Kirito et al. 2002).

En conjunto, nuestros datos indican que varios miembros de la vía JAK/STAT pueden actuar sinérgicamente para inducir la proliferación mediada por Epo en células de carcinoma cervical. Estas observaciones son relevantes debido a que la vía JAK/STAT es considerada como un potencial blanco terapéutico y actualmente existen numerosas estrategias farmacológicas enfocadas al tratamiento de neoplasias que presentan expresión y función aberrante de los miembros de esta vía de señalización.

La anemia es un padecimiento común en pacientes con cáncer cervical y la administración de Epo para tratar la anemia en estos pacientes ha demostrado tener efectos negativos en la sobrevida a 5 años así como en la reincidencia del tumor (Temkin et al. 2006). Estos hallazgos pueden explicarse en parte por nuestras observaciones que indican que la Epo es capaz de inducir proliferación celular tanto *in vitro*

como *in vivo*. En resumen, en este trabajo presentamos evidencia de la existencia de la estimulación autócrina/parácrina del eje Epo-EpoR en células de carcinoma cervical. Se demostró que la estimulación con Epo exógena induce la proliferación celular a través de la activación de diferentes miembros de la vía JAK/STAT sugiriendo que la Epo podría estar involucrada en el desarrollo y la progresión del cáncer cervical.








8. CONCLUSIONES.








- ⚠ Las células SiHa, HeLa y C33 derivadas de cáncer cervical expresan Epo y EpoR tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hipoxia.
- ⚠ Las líneas celulares derivadas de cáncer cervical presentan estimulación autócrina/parácrina del eje Epo-EpoR.
- ⚠ La estimulación del EpoR por Epo exógena induce la proliferación de las células derivadas de cáncer cervical tanto *in vitro* como *in vivo*.
- ⚠ La estimulación del EpoR por Epo induce la activación de JAK2, JAK3, STAT3, y STAT5 tanto *in vitro* como *in vivo*.
- ⚠ La Epo endógena induce parcialmente la fosforilación de STAT1 en células de cáncer cervical.









9. Perspectivas.








Los resultados presentados en este trabajo explican en parte los efectos adversos observados en los pacientes con cáncer que reciben tratamiento con Epo; sin embargo debido a que la Epo tiene funciones pleiotrópicas se hace indispensable que esta línea de investigación continúe con la realización de ensayos de permitan determinar si la Epo induce estas señales en células de cáncer cervical. Por ejemplo para evaluar el potencial metastásico inducido por la Epo se requieren de ensayos de invasividad en cámaras de matrigel. Por otro lado, se requiere evaluar la exposición de las células a diferentes fármacos en presencia de Epo para determinar si ésta confiere protección a las células o si existe una respuesta diferencial a los fármacos. Aunado a esto es indispensable correlacionar los datos que se puedan obtener de los experimentos *in vitro* e *in vivo* con el análisis de biopsias de pacientes. Los resultados obtenidos en su conjunto, podrán darnos una visión global del efecto de la Epo en la progresión del cáncer cervical y podrán en un futuro ser útiles para rediseñar protocolos de tratamiento.








10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.










-  Abels R. 1993. Erythropoietin for anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer*. 29A (Suppl 2): S2–S8.
-  Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res*. 61:3561-3565.
-  Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A. 2003. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol*. 162:1789-1806.
-  Acs G, Xu X, Chu C, Acs P, Verma A. 2004. Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma. *Cancer*. 100:2376-2386.
-  Arcasoy M, Jiang X, Haroon ZA. 2003. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 307(4):999-1007.
-  Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU. 1993. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem*. 41:335-341.
-  Belenkov A, Shenouda G, Rizhevskaya E, Cournoyer D, Belzile JP, Souhami L, Devic S, Chow TY. 2004. Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Mol Cancer Ther*. 3:1525-1532.








-  Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Osterborg A, Repetto L, Soubeyran P; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Taskforce for the Elderly. 2007. EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer: 2006 update. *Eur J Cancer*. 43:258–70.
-  Boogaerts M, Coiffier B, Kainz C; Epoetin beta QOL Working Group. 2003. Impact of epoetin beta on quality of life in patients with malignant disease. *Br J Cancer*. 88: 988–995.
-  Bose C, Udupa KB. 2008. Erythropoietin enhancement of rat pancreatic tumor cell proliferation requires the activation of ERK and JNK signals. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295(2):C394-405. Epub 2008 Jun 11.
-  Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TR. 2007. Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. *Stem Cells*. 25:718–22.
-  Bunn, H. 1994. Pathophysiology of the anemias. En: *Harrisons: Principles and practice of internal medicine*. Vol. 2, 13th ed. New York: McGraw-Hill, Inc., Health Professions Division; p. 1717-21.
-  Candelaria M, Cetina L, Dueñas A. 2005. Anemia in cervical cancer patients: implications for iron supplementation therapy. *Med Oncol*. 22(2):161-8.
-  Case D, Bukowki RM, Carey RW, Fishkin EH, Henry DH, Jacobson RJ, Jones SE, Keller AM, Kugler JW, Nichols CR. 1993. Recombinant human erythropoietin therapy for anemic cancer patients on combination chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 85:801–806.








-  Chapman, IM. 2006. Nutritional disorders in the elderly. *Med Clin North Am.* 90: 887-907.
-  Chen C, Sytkowski AJ. 2001. Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem.* 276(42):38518-26. Epub 2001 Aug 1.
-  Damen J, Wakao H, Miyajima A, Kros J, Humphries RK, Cutler RL, Krystal G. 1995. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and STAT5 activation. *EMBO J.* 14:5557-5568.
-  Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Perrotta S. 2007. Erythropoietin receptors on cancer cells: a still open question. *J Clin Oncol.* 25(13):1812-3; author reply 1815.
-  Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. 1998. Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group. *J Clin Oncol.* 16:3412-25.
-  Di Lieto A, De Rosa G, De Falco M. 2002. Relationship between platelet-derived growth factor expression in leiomyomas and uterine volume changes after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Hum Pathol.* 33:220-224.
-  Dixon D, Hong H and Haseman J. 2000. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect.* 108:795-802.
-  Dordal M, Wang F and Goldwasser E. 1985. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology.* 116:2293-2299.









-  Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG. 2006. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. **Blood**. 107:1892–5.
-  Faquin W, Schneider TJ, Goldberg MA. 1992. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. **Blood**. 79:1987-94.
-  Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. 2006. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. **Prostate**. 66(2):135-45.
-  Fraser JK, Lin F-K, Berridge MV. 1988. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. **Blood**. 71:104–9.
-  Gabrilove J, Cleeland CS, Livingston RB, Sarokhan B, Winer E, Einhorn LH. 2001. Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing. **J Clin Oncol**. 19:2875–82.
-  Gewirtz DA, Di X, Walker TD, Sawyer ST. 2006. Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs. **Clin Cancer Res**. 12(7 Pt 1):2232-8.
-  Glaspy J, Bukowski R, Steinberg D, Taylor C, Tchekmedyian S, Vadhan-Raj S. 1997. Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice. **Procrit Study Group. J Clin Oncol**. 15:1218–34.







-  Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Franklin Bunn H. 1987. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 84:7972–6.
-  Groopman J, Itri LM. 1999. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. ***J Natl Cancer Inst***. 91 :1616-1634.
-  Hamadmad S, Hohl R. 2007. Lovastatin suppresses erythropoietin receptor surface expression through dual inhibition of glycosylation and geranylgeranylation. ***Biochem Pharmacol***. 74:590–600.
-  Henke M. 2001. Correction of cancer anemia--impact on disease course, prognosis and treatment efficacy, particularly for patients undergoing radiotherapy. ***Onkologie*** 24:450-4.
-  Henry D, Brooks BJ, Case DC, Fishkin E, Jacobson R, Keller AM, Kugler J, Moore J, Silver RT, Storniolo AM, Abels RI, Gordon DS, Nelson R, Larholt K, Bryant E, Rudnick S. 1995. Recombinant human erythropoietin therapy for anemic cancer patients receiving cisplatin chemotherapy. ***Cancer J Sci Am***. 1:252–260.
-  Huang L, Gu J, Schau M, Bunn HF. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 95:7987-7992.
-  Jeong J-Y, Feldman L, Solar P, Szenajch J, Sytkowski AJ. 2008. Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. ***Int J Cancer***. 122:274–80.








-  Jeong JY, Hoxhaj G, Socha AL, Sytkowski AJ, Feldman L. 2009. An erythropoietin autocrine/paracrine axis modulates the growth and survival of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 7:1150–7.
-  Jones S, D'Andrea A, Haines L. 1990. Human erythropoietin receptor: Cloning, expression and biologic characterization. *Blood.* 76:31-35.
-  Katsuoka Y, McGonigle R, Rege AB, Beckman B, Fisher JW. 1983. Erythropoietin production in human renal carcinoma cells passaged in nude mice and in tissue culture. *Gann.* 74(4):534-41.
-  Kirito K, Uchida M, Yamada M, Miura Y, Komatsu N. 1997. A distinct function of STAT proteins in erythropoietin signal transduction. *J Biol Chem.* 272:16507–13.
-  Kirito K, Nagashima T, Ozawa K, Komatsu N. 2002. Constitutive activation of Stat1 and Stat3 in primary erythroleukemia cells. *Int J Hematol.* 75:51–4.
-  Kirkeby A, van Beek J, Nielsen J, Leist M, Helboe L. 2007. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *J Neurosci Methods.* 164:50–8.
-  Kohama T, Shinohara K, Takahara M, Inoue M. 2000. Large uterine myoma with erythropoietin messenger RNA and erythrocytosis. *Obstet Gynecol.* 96:826-828.
-  Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M. 1999. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 72:2565-2572.
-  Koury MJ, Bondurant MC. 1990. Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion.* 30(8):673-4.








-  Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR. 2005. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. ***Oncogene***. 24(27):4442-9.
-  Lambin P, Ramaekers Bram LT, van Mastrigt Ghislaine APG, van den Ende P, de Jong J, de Ruyscher Dirk KM, Pijls-Johannesma M. 2009. Erythropoietin as an adjuvant treatment with (chemo) radiation therapy for head and neck cancer. ***Cochrane Database Syst Rev***. 8:CD006158.
-  LaMontagne KR, Butler J, Marshall DJ, Tullai J, Gechtman Z, Hall C, Meshaw A, Farrell FX. 2006. Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. ***Mol Cancer Ther***. 5(2):347-55.
-  Landschulz K, Noyes AN, Rogers O, Boyer SH. 1989 Erythropoietin receptors on murine erythroid colony-forming units: Natural history. ***Blood***. 73:1476-1986.
-  Laugsch M, Metzen E, Svensson T, Depping R, Jelkmann W. 2008. Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. ***Int J Cancer***. 122:1005–11.
-  Lee S, Hong N, Park M. 2004. EPO receptor mediated ERK kinase and NFκ-B activation in erythropoietin promoted differentiation of astrocytes. ***Biochem Biophys Res Commu***. 320: 1087-1095.
-  Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Hockel M. 2006. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. ***Clin Cancer Res***. 12:6894–900.

-  Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group. 2003. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. ***Lancet Oncol.*** 4:459–60.
-  Littlewood T, Bajetta E, Nortier JW, Vercaemmen E, Rapoport B, Epoetin alfa study group. 2001. Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. ***J Clin Oncol.*** 19:2865–74.
-  Liu WM, Powles T, Shamash J, Propper D, Oliver T, Joel S. 2004. Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. ***Oncogene.*** 23(4):981-90.
-  Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, Birgegard G, Bokemeyer C, Gascón P, Kosmidis P, Krzakowski M, Nortier J, Olmi P, Schneider M, Schrijvers D. 2004. The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. ***Eur J Cancer.*** 40:2293-306.
-  Mannello F, Fabbri L, Ciandrini E, Tonti GA. 2008. Increased levels of erythropoietin in nipple aspirate fluid and in ductal cells from breast cancer patients. ***Cell Oncol.*** 30:51–61
-  Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R. 2000. The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. ***Am J Physiol Endocrinol Metab.*** 278:E1038-E1044.
-  Matsuzaki S, Canis M, Yokomizo R, Yaegashi N, Bruhat MA, Okamura K. 2003. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in peritoneal endometriosis. ***Hum Reproduc.*** 18:152-156.








-  Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Yokomizo R, Noda T, Kimura Y, Okamura K. 2001. Erythropoietin concentrations are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 16(5):945-8.
-  Matsuzaki S, Canis M, Yokomizo R, Yaegashi N, Bruhat MA, Okamura K. 2003. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod.* 18(1):152-6.
-  Maxwell PH, Osmond Mk, Pugh CW. 1993. Identification of the renal erythropoietin –producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* 44:1149-1162.
-  Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG. 1997. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int.* 51:393-401.
-  Miller C, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. 1990. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med.* 322 :1689-92.
-  Mirmohammadsadegh A, Marini A, Gustrau A, Delia D, Nambiar S, Hassan M, Hengge UR. 2010. Role of erythropoietin receptor expression in malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 130:201–10
-  Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW. 1995. Role of the antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood.* 86:4097-4104.
-  Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, Komatsu N. 2003. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol.* 195(2):290-7.









-  Nisolle M, Donnez J. 1997. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril.** 68(4):585-96.
-  Oberhoff C, Neri B, Amadori D, Petry KU, Gamucci T, Rebmann U, Nowrousian MR, Voigtmann R, Monfardini S, Armand JP, Herrmann R, Netter-Pinon J, Tubiana-Mathieu N, Zwierzina H. 1998. Recombinant human erythropoietin in the treatment of chemotherapy-induced anemia and prevention of transfusion requirement associated with solid tumors: a randomized, controlled study. **Ann Oncol.** 9: 255–260.
-  Osterbog A, Brandberg Y, Molostova V, Iosava G, Abdulkadyrov K, Hedenus M, Messinger D; Epoetin Beta Hematology Study Group. 2002. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human erythropoietin, epoetin Beta, in hematologic malignancies. **J Clin Oncol.** 20:2486-94.
-  Paragh G, Kumar SM, Rakosy Z, Choi SC, Xu X, Acs G. 2009. RNA interference-mediated inhibition of erythropoietin receptor expression suppresses tumor growth and invasiveness in A2780 human ovarian carcinoma cells. **Am J Pathol.** 174(4):1504-14.
-  Pollio F, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Persico F, De Falco M, Di Lieto A. 2005. Erythropoietin and erythropoietin receptor system in a large uterine myoma of a patient with myomatous erythrocytosis síndrome: posible relationship with the patogénesis of inusual tumor size. **Hum Patho.** 36:120-127.
-  Salceda S, Caro J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. **J Biol Chem.** 272:22642-22647.

-  Selzer E, Wacheck V, Kodym R, Schlagbauer-Wadl H, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B. 2000. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. ***Melanoma Res.*** 10:421-426.
-  Shi Z, Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP, El-Tanani M, Lappin TRJ. 2010. 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.*** 8:615–26.
-  Shenouda G, Mehio A, Souhami L, Duclos M, Portelance L, Belenkov A, Chow T. 2006. Erythropoietin receptor expression in biopsy specimens from patients with uterine cervix squamous cell carcinoma. ***Int J Gynecol Cancer.*** 16:752-756.
-  Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL. 1999. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. ***J Biol Chem.*** 274:22165-22169.
-  Silvestris F, Tucci M, Quatraro C, Dammacco F. 2003. Recent advances in understanding the pathogenesis of anemia in multiple myeloma. ***Int J Hematol.*** 78:121-5.
-  Sinclair AM, Rogers N, Busse L, Archibeque I, Brown W, Kassner PD, Watson JE, Arnold GE, Nguyen KC, Powers S, Elliott S. 2008. Erythropoietin receptor transcription is neither elevated nor predictive of surface expression in human tumour cells. ***Br J Cancer.*** 98:1059–67.
-  SSA. www.ssa.gob.mx fecha: 04/05/11. Sección: Estadísticas de mortalidad.


-  Suzuki M, Takamizawa S, Nomaguchi K. 2001. Erythropoietin síntesis by tumor tissues in a patient with uterine myoma and erythrocytosis. ***Br J Haematol.*** 113:49-51.
-  Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, Yamaguchi T, Terada A, Fujiyoshi N, Nishio S, Tsuda N, Ijichi M, Kakuma T, Kage M, Hori D, et al. 2009. Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. ***Br J Cancer.*** 101:967–72.
-  Takeuchi M, Takasaki S, Shimada M, Kobata A. 1990. Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cell. ***J Biol Chem.*** 265:12127-12130.
-  Taniguchi S, Dai CH, Price JO, Krantz SB. 1997. Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. ***Blood.*** 90 :2244-52.
-  Tas F, Eralp Y, Basaran M, Sakar B, Alici S, Argon A, Bulutlar G, Camlica H, Aydiner A, Topuz E. 2002. Anemia in oncology practice: relation to diseases and their therapies. ***Am J Clin Oncol.*** 25:371-9.
-  Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee YC, Abulafia O. 2006. Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation. ***Int J Gynecol Cancer.*** 16:1855–61.
-  Tsushima H, Urata Y, Miyazaki Y, Fuchigami K, Kuriyama K, Kondo T, Tomonaga M. 1997. Human erythropoietin receptor increases GATA-2 and Bcl-xL by a protein kinase C-dependent pathway in human


erythropoietin-dependent cell line AS-E2. *Cell Growth Differ.* 8(12):1317-28.


-  Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.
-  Waters JS, O'Brien ME, Ashley S. 2002. Management of anemia in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol.* 20:601-2.
-  Watowich S. 1999. Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization. *IJBCB.* 31:1075-1087.
-  Welch R, James RD, Wilkinson PM, Belli F, Cowan RA. 1995. Recombinant human erythropoietin and platinum-based chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Cancer J Sci Am.* 1:261-6.
-  Westenfelder C and Baranowski R. 2000. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int.* 58:647-657.
-  Wierenga AT, Vogelzang I, Eggen BJ, Vellenga E. 2003. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-,ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol.* 31:398-405
-  Witthuhn BA, Quelle F, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. 1993. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell.* 74:227-236.


-  Wojchowski D, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. 1999. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res.* 253:143-156.
-  Wood P, Hrushesky WJ. 1995. Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome. *J Clin Invest* 95:1650-59.
-  Wu X, Blanck A, Olovsson M, Möller B, Lindblom B. 2001. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF receptor 1 and FGF receptor 2 in uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle, after menopause and GnRHa treatment. *Acta Obstet Gynecol. Scand* 80:497-504.
-  Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. 1998. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem.* 273:25381-25387.
-  Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, Mori S, Matsuo T, Nakamura Y. 2001a. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *It J Anat Embryol.* 2:215-222.
-  Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. 2001b. Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer.* 84:836-843.
-  Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, Fujita H, Matsuo T, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. 2002. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis.* 23:1797-1805.
-  Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H,

Utsumi H. 2003. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis*. 24:1021-1029.

 Yokohama Y, Shinohara A, Hirokawa M. 2003. Erythrocytosis due to an erythropoietin-producing large uterine leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest*. 56:179-183.

 Yokomizo R, Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. 2002. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reproduc*. 8:441-446.

 Yoshida M, Koshiyama M, Fujii H. 1999. Erythrocytosis and fibroid. *Lancet*. 354:214.

 Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. 2006. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. 107(3):907-15. Epub 2005 Oct 4.

11. APÉNDICE.

11.1 Solución de azul tripano.

Dilución de azul tripano al 0.3% en PBS. Filtrar mediante el uso de un papel filtro # 2.

11.2 PBS.

8g de NaCl (Cloruro de sodio)

0.2g de KCl (Cloruro de potasio)

1.44g de Na₂HPO₄ (Fosfato dibásico de sodio)

0.24g de KH₂PO₄ (Fosfato monobásico de potasio)

Diluidos en 800ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl.

Aforar a 1L y esterilizar 20 minutos a 15lb/sq en ciclo líquido. Se sella la boquilla del recipiente con parafilm y se almacena a 4°C.

11.3 Solución de MTT.

Dilución de 1mg de MTT por mililitro de PBS. Filtrar mediante el uso de un papel filtro # 2 dentro de una campana de flujo laminar.

Sellar la boquilla del recipiente con parafilm y cubrir de la luz.

Almacenar a 4°C.

11.4 Buffer de incubación para citometría de flujo.

20gr BSA (Albumina) diluidos en 1L de PBS. Se almacena a 4°C.

11.5 Buffer Laemmli de carga.

0.025M de Tris-HCl (pH 6.8), 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0.02% de azul bromofenol.

11.6 PBS-T.

En 900ml de PBS se adicionan 100µl de Tween 20, se afora a 1L y se almacena a 4°C.

Uso de la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer cervical: riesgos y beneficios

Erythropoietin use to treat cervical cancer-associated anaemia: risk and benefits

Rocha-Zavaleta L y López Pérez TV.*

▷ RESUMEN

La anemia se presenta con frecuencia en pacientes con cáncer cervical, reduciendo significativamente la calidad de vida y la respuesta a quimiorradioterapia. La eritropoyetina es un factor que se está empleando para tratar la anemia en pacientes oncológicos. La presente es una revisión de las pruebas realizadas en humanos y en líneas celulares para estudiar los efectos de la administración de la misma. Los resultados publicados, indican que su administración incrementa los niveles de hemoglobina y mejora la respuesta a quimio-radioterapia, pero aumenta ligeramente el riesgo de eventos tromboembólicos. Los datos de estudios *in vitro* apuntan a la posibilidad de que la eritropoyetina induzca la proliferación, sobrevivencia y migración de células de tumores cervicales. Sin embargo, estos estudios son aún controversiales, por lo que se necesita mayor evidencia experimental para determinar el verdadero potencial de la eritropoyetina.

Palabras clave: eritropoyetina, cáncer cervical, anemia.

▷ SUMMARY

Anaemia frequently occurs in patients with cervical cancer. Anaemia impacts significantly on quality of life and reduces the response to chemo-radiotherapy. Erythropoietin is an agent which is used to treat cancer-associated anaemia. This review discusses data from clinical trials and in vitro studies on the effect of erythropoietin administration. Published results show that administration of erythropoietin increases the level of hemoglobin and improves the response to chemo-radiotherapy, but also induces a slight increment of thrombotic events. In vitro studies suggest that erythropoietin might induce proliferation, survival and migration of cells derived from cervical tumors. However, these studies are still controversial, thus more specific experimental data are needed to determine the risk-benefit of erythropoietin as a treatment for cancer-related anaemia.

Key words: erythropoietin, cervical cancer, anaemia.

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia: Dra. Leticia Rocha-Zavaleta. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Biología Molecular y Biotec-

nología, UNAM. Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510. México. Tel.: (55) 56 22 92 18, fax.: (55) 56 22 92 12. Correo electrónico: lrochaz@correo.biomedicas.unam.mx

▷ INTRODUCCIÓN

La anemia se presenta con frecuencia en pacientes con cáncer.¹ Una alternativa para su tratamiento es la administración de eritropoyetina recombinante humana. El objetivo de la presente revisión es presentar las evidencias experimentales que muestran los efectos, tanto benéficos como adversos, del uso de la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia asociada al cáncer cervical.

▷ ANEMIA Y CÁNCER CERVICAL

En pacientes con cáncer cervical, la frecuencia de anemia está correlacionada directamente con la etapa clínica del tumor, presentándose en un promedio de 25% de pacientes en etapa I, 33% en etapa II y hasta 40% de pacientes en etapa III.² En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología se detectó que 37% de pacientes con cáncer cervical se presenta con niveles menores a 12 g/dL de hemoglobina.³

La anemia tiene consecuencias severas en la calidad de vida de las pacientes,⁴ e incide negativamente en el control local de la enfermedad y la sobrevida.⁵⁻⁷ Tradicionalmente, la anemia ha sido tratada mediante transfusiones sanguíneas. Sin embargo, las transfusiones presentan riesgos importantes,⁸ por lo que ha sido necesario desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de la anemia. Una de estas alternativas es la eritropoyetina recombinante humana.⁹

▷ ERITROPOYETINA

La eritropoyetina (Epo) es una hormona que controla la producción de eritrocitos¹⁰ regulando la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de los progenitores eritroides a través de la interacción con su receptor de membrana (EpoR).¹¹ La Epo recombinante humana, también conocida como epoetina α , es utilizada para incrementar los niveles de hemoglobina y reducir el uso de transfusiones sanguíneas en pacientes con anemia severa.¹²⁻¹⁴

Más de un centenar de estudios relacionados con la administración de Epo en pacientes oncológicos anémicos, han sido realizados en los últimos 10 años. En conjunto estos estudios han mostrado evidencias de un impacto positivo sobre los niveles de hemoglobina y hematocrito, lo cual ayuda a reducir la hipoxia local en los tumores,¹⁵ produciendo una mejor respuesta a la radioterapia y a quimiofármacos, sobre todo aquellos cuya función es dependiente de oxígeno, como la ciclofosfamida, carboplatino y doxorubicina.¹⁶ Asimismo, se ha observado que los requerimientos de transfusiones sanguíneas se reducen

significativamente con la terapia eritropoyética, y la calidad de vida de los pacientes experimenta un aumento significativo. Desafortunadamente, aún no hay suficientes datos para determinar el efecto del tratamiento con Epo en la sobrevida de los pacientes oncológicos. A pesar de los beneficios reportados, el tratamiento con Epo también presenta efectos adversos, ya que se ha detectado un ligero incremento del riesgo de eventos tromboembólicos e hipertensión en pacientes que reciben Epo.¹⁷

En el caso particular del cáncer cervical los estudios del efecto de la Epo en pacientes anémicas son escasos. En 1994 Dusenbery y cols., evaluaron la eficiencia de la Epo para revertir la anemia en pacientes con cáncer cervical que eran tratadas con radiación y cisplatino. En este estudio, se determinó que la Epo era bien tolerada y elevaba el nivel de hemoglobina.¹⁸ En un estudio fase II, que incluyó 53 pacientes de 26 instituciones diferentes, se estudió el efecto de la administración de Epo y hierro oral en pacientes con tumores cervicales en etapas IIB-IVA tratadas con radiación pélvica y cisplatino, seguido de braquiterapia intracavitaria. Los autores observaron que la administración de Epo y hierro oral incrementan gradualmente los niveles de hemoglobina en mujeres anémicas durante su tratamiento con quimiorradioterapia. Sin embargo, también detectaron una incidencia mayor de trombosis venosa profunda en estas pacientes.¹⁹ Resultados similares fueron obtenidos en un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 147 pacientes con tumores en etapas IB-IVA tratadas con quimiorradioterapia, en las que se observó una incidencia incrementada de trombosis venosa sintomática cuando recibieron Epo.²⁰ Recientemente, se llevó a cabo un estudio clínico fase III para evaluar el efecto de mantener los niveles de hemoglobina ≥ 12 g/dL mediante la administración de Epo en pacientes anémicas con cáncer cervical tratadas con cisplatino y radiación. Desafortunadamente, este estudio se dio por terminado prematuramente por el riesgo de eventos tromboembólicos, por lo que no pudo ser definido el impacto potencial de la Epo en la sobrevivencia total y sobrevida libre de enfermedad de las pacientes.²¹ Los datos reportados indican una prevalencia de trombosis en 2.7-7.7% de pacientes en tratamiento con quimio y/o radioterapia, mientras que la frecuencia aumenta a 13-22% en mujeres que además reciben Epo.

▷ EXPRESIÓN DE EPOR EN CÁNCER CERVICAL Y SUS CONSECUENCIAS

Resultados como los descritos han despertado un gran interés en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares activados por la Epo en las células de tumores

Tabla 1.

Expresión de Epo y EpoR en diferentes tipos de tumores humanos.

Tipo de tumor	EpoR	Epo	Referencia
Cáncer de Mama	+	+	22-24
Glioma	+	-	38
Cáncer cervical	+	+	38
Carcinoma de ovario	+	-	25
Carcinoma renal	+	+	26
Neuroblastoma	+	-	27
Cáncer de próstata	+	-	28
Glioblastoma	+	+	29
Cáncer gástrico	+	+	29
Coriocarcinoma de estómago	+	+	29
Cáncer de pulmón	+	+	29
Cáncer pancreático	+	+	29
Carcinoma de cabeza y cuello	+	+	30
Tumor hepático	+	+	31

EpoR: Receptor para eritropoyetina.

Epo: Eritropoyetina.

+: Indica la expresión positiva de Epo o EpoR.

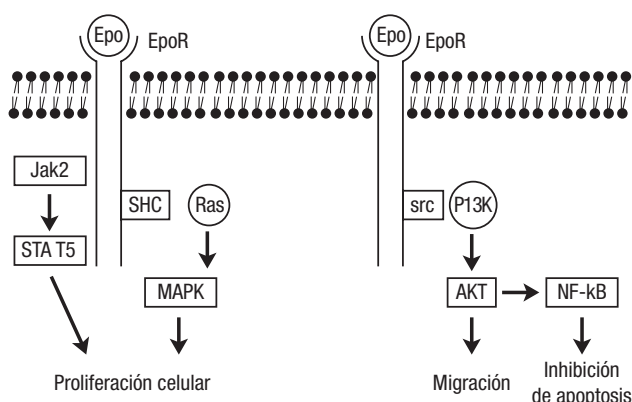
-: Indica que la expresión de Epo o EpoR no ha sido detectada.

cervicales. Hoy se sabe que las células de los tumores humanos expresan el EpoR²²⁻³¹ (tabla 1), y que las células derivadas de tumores cervicales además producen eritropoyetina,³²⁻³⁴ lo cual sugiere la existencia de un sistema autócrino de estimulación y abre la posibilidad de que sean capaces de responder a la presencia de Epo exógena. La unión de la Epo a su receptor en la membrana induce la activación de cascadas de señalización que estimulan la proliferación, sobrevivencia y migración celular (figura 1). Por tanto, es importante estudiar si estos efectos se producen también en células tumorales que expresan el EpoR. Algunos estudios han reportado incrementos en la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores de próstata,²⁸ riñón²⁶ y glándula mamaria.²² Sin embargo, otros estudios muestran resultados contrarios, incluso utilizando las mismas líneas celulares derivadas de cáncer de mama y riñón.³⁵⁻³⁷ Hasta el momento no se ha estudiado el efecto que la Epo podría ejercer en células derivadas de cáncer cervical.

La administración de Epo en pacientes anémicas parece tener un impacto en la regulación de la hipoxia tumoral, mejorando la respuesta a quimio y radioterapia. Sin embargo, Belenkov (2004), observó que la adición de 30 U/mL de Epo al medio de cultivo de células derivadas de cáncer cervical induce resistencia al tratamiento con radiación y cisplatino.³⁸ En un estudio independiente, se reportó que la combinación de cisplatino

Figura 1.

Vías de señalización activadas por la eritropoyetina. La unión de la eritropoyetina (EPO) a su receptor (EpoR) en la membrana celular, activa diferentes vías de señalización que inducen diferentes procesos fisiológicos. Las vías de JAK2-STAT5 y SHC-Ras-MAPK han sido involucradas en la inducción de proliferación. La vía src-PI3K-AKT puede inducir la migración celular, mientras que si activa al factor transcripcional NF-kB puede inhibir la apoptosis o muerte celular.



y Epo incrementa la sobrevivencia de células derivadas de un tumor cervical.³²

Por otro lado, se ha observado que la Epo puede actuar como un quimioatrayente de células de tumores cervicales. Usando sistemas de migración *in vitro*, Hamadmad y Hohl (2008), demostraron que la Epo incrementa el potencial migratorio de las células tumorales en una forma dependiente de la concentración y el tiempo.³⁹ Estas observaciones podrían tener implicaciones en la capacidad metastásica de las células tumorales.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A pesar de que el uso de Epo en pacientes con cáncer se remonta a más de una década, aún prevalecen dudas acerca de la conveniencia de su utilización. Los beneficios observados en las pacientes estudiadas, incluyendo la reversión de la anemia y el incremento en la calidad de vida, son claros y contrastan con lo observado en estudio con líneas celulares. En este sentido es muy importante considerar las diferencias en los sistemas experimentales. Se sabe que los niveles farmacológicos de Epo en el suero son de aproximadamente 1 U/mL después de la administración subcutánea de una sola dosis de 600 U/kg, lo cual corresponde a la dosis terapéutica máxima recomendada, por lo que es muy probable que las concentraciones reales del factor que pueden alcanzar y ser incorporadas por las células tumorales sean mucho más

bajas que aquellas que se utilizan en los ensayos con líneas celulares *in vitro*.

Otro factor a considerar es el microambiente que prevalece en una masa tumoral. Es ampliamente conocido que los tumores humanos desarrollan zonas hipóxicas, en las cuales la oxigenación es pobre. Algunas células tumorales son capaces de adaptar su metabolismo a esta condición y sobrevivir. Este fenómeno está asociado con el desarrollo de resistencia a fármacos y radiaciones ionizantes. La ausencia misma de oxígeno es un factor que desfavorece el tratamiento con algunos agentes quimioterapéuticos, cuya acción farmacológica depende de la presencia de moléculas de oxígeno. Por lo tanto, el aumento en el aporte de oxígeno como consecuencia del incremento del hematocrito por la administración de Epo, tendrá un efecto favorable en el tratamiento con quimiorradioterapia. En contraste, los experimentos realizados con células derivadas de cáncer cervical se llevan a cabo en condiciones normóxicas, o bien, en condiciones de hipoxia inducida sobre cultivos en monocapas. Estos sistemas están constituidos por un microambiente celular altamente artificial, por lo que poseen un valor predictivo limitado.

Finalmente, y tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos concluir que los estudios realizados hasta hoy proveen un panorama parcial de los posibles efectos de la administración de Epo en pacientes anémicas con cáncer cervical. Las evidencias experimentales parecen soportar con mayor fuerza el efecto benéfico de la Epo, sin embargo, es necesario realizar más y mejores experimentos *in vitro* que nos permitan entender en su debida magnitud los posibles efectos adversos que este factor eritropoyético podría tener en las células tumorales que expresan el EpoR.

Bibliografía

1. Auclerc G, Meric JB, Pommeyrol A, Rixie O, Khayat D. Anemia in cancer patients before treatment. *Bull Cancer* 2003;90:S128-S132.
2. Marchal C, Rangedard L, Brunaud C. Anemia impact on treatments of cervical carcinomas. *Cancer Radiother* 2005;9:87-95.
3. Candelaria M, Cetina L, Dueñas-Gonzalez A. Anemia in cervical cancer patients. *Med Oncol* 2005;22:1-8.
4. Cella D, Kallich J, McDermott A, Xu X. The longitudinal relationship of hemoglobin, fatigue and quality of life in anemic cancer patients: results from five randomized clinical trials. *Ann Oncol* 2004;15:979-986.
5. Vigarío G, Kurohara SS, George FW. Association of hemoglobin levels before and during radiotherapy with prognosis in uterine cervix cancer. *Radiology* 1973;106:649-652.
6. Kapp DS, Fischer D, Gutierrez E, Kohorn EI, Schwartz PE. Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariate analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983;9:445-455.
7. Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, Campana F, Cosset JM, Petit C *et al*. Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: results of a retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:37-42.
8. Goodnough LT. Risks of blood transfusion. *Crit Care Med* 2003;31 (Suppl 12):S678-S686.
9. Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Zinder SA, Broadwater G, Farell F, Jolliffe L *et al*. Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effect on hemoglobin. *Cancer Res* 2003;63:6162-6165.
10. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998; 83:724-732.
11. Tilbrook PA, Klinken SP. Erythropoietin and erythropoietin receptor. *Growth Factors* 1999;17:25-35.
12. Henry DH, Bowers P, Romano MT, Provenzano R. Epoetin alfa. Clinical evolution of a pleiotropic cytokine. *Arch Intern Med* 2004;164:262-276.
13. Rodgers GM 3rd, Cella D, Chanan-Khan A, Chesney C, Cleeland C, Coocia PF *et al*. Cancer and treatment-related anemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2005;3:772-789.
14. Rizzo JD, Lichtin AE, Wolf SH, Seidenfeld J, Bennett CL, Cella D *et al*. Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. *J Clin Oncol* 2002;20:4083-4107.
15. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001;18:243-259.
16. Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *The Oncologist* 2004;9(Suppl 5):31-40.
17. Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Osterborg A *et al*. EORTC guidelines for the use of erythropoietin proteins in anaemic patients with cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:2201-2216.
18. Dusenbery KE, McGuire WA, Holt PJ, Carson LF, Fowler JM, Potish RA. Erythropoietin increases hemoglobin during radiation therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:1079-1084.
19. Lavey RS, Liu PY, Greer BE, Robinson WR 3rd, Chang PC, Wynn RB, *et al*. Recombinant human erythropoietin as an adjunct to radiation therapy and cisplatin for stage IIB-IVA carcinoma of the cervix: a Southwest Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2004;95:145-151.
20. Wun T, Law L, Harvey D, Sieracki B, Scudder SA, Ryu JK. Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin. *Cancer* 2003; 98:1514-1520.
21. Thomas G, Ali S, Hoebbers FJ, Darcy KM, Rodgers WH, Patel M *et al*. Phase III trial to evaluate the efficacy of maintaining hemoglobin levels above 12.0 g/dL with erythropoietin vs above 10.0 g/dL without erythropoietin in anemic patients receiving concurrent radiation and cisplatin for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2007;108:317-325.
22. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K *et al*. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3561-3565.
23. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* 2002;95:969-981.
24. Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA *et al*. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* 2002;82:911-918.
25. McBroom JW, Acs G, Rose GS, Krivak TC, Mohyeldin A, Verma A. Erythropoietin receptor function and expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;99:571-577.
26. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 2000;58:647-657.
27. Wollman Y, Westphal G, Blum M, Simantov R, Blumberg S, Peer G *et al*. The effect of human recombinant erythropoietin on the growth of a human neuroblastoma cell line. *Life Sci* 1996;59:315-322.
28. Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate* 2006;66:135-145.
29. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A *et al*. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003; 24:1021-1029.
30. Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A *et al*. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:4442-4449.
31. Nakamatsu K, Nishimura Y, Suzuki M, Kanamori S, Maenishi O, Yasuda Y. Erythropoietin/erythropoietin-receptor system as an angiogenic factor in chemically induced murine hepatic tumors. *Int J Clin Oncol* 2004;9:184-188.
32. Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A *et al*. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling 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.

33. Shenouda G, Mehio A, Souhami L, Duclos M, Portelance L, Belenkov A *et al.* Erythropoietin receptor expression in biopsy specimens from patients with uterine cervix squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:752-756.
34. Leo C, Horn L-C, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G *et al.* Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:6894-6900.
35. Mundt D, Berger MR, Bode G. Effect of recombinant human erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Micro-titer-tetrazolium assay. *Arzneimittelforschung* 1992;42:92-95.
36. Rosti V, Pedrazzoli P, Ponchio L, Zibera C, Novella A, Lucotti C *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. *Haematologica* 1993;78:208-212.
37. Liu WM, Powles T, Shamash J, Propper D, Oliver T, Joel S. Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. *Oncogene* 2004;23:981-990.
38. Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E, Courmoyer D, Belzile J-P, Souhami L *et al.* Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1525-1532.
39. Hamadmad SN, Hohl RJ. Erythropoietin stimulates cancer cell migration and activates RhoA protein through a MAPK/Erk-dependent mechanism. [en prensa] *J Pharmacol Exp Ther*.

Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells

Tania V. Lopez¹, Terence R.J. Lappin², Perry Maxwell², Zhazhong Shi², Rebeca Lopez-Marure³, Cecilia Aguilar¹ and Leticia Rocha-Zavaleta¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomedicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM, Mexico City, Mexico

² Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast, Northern Ireland, United Kingdom

³ Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez," Departamento de Biología Celular, Mexico City, Mexico

Erythropoietin (Epo) regulates erythropoiesis by binding to its receptor (EpoR) and promoting cell proliferation, differentiation and inhibition of apoptosis. Epo is widely used to treat cervical cancer-related anaemia. However, there are data suggesting that administration of Epo is associated with an increment in recurrence rate, and decreased disease-free and overall survival. In the present study, we investigated the expression of Epo and EpoR on cervical cancer cell lines. We observed that both EpoR and extracellular Epo are constitutively expressed in cervical cancer cells. Inhibition of either Epo or EpoR expression with siRNA attenuated cell proliferation, whereas addition of exogenous Epo led to a significant increase in cell growth, both *in vitro* and *in vivo*. Epo-induced proliferation was associated with the activation of JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5 but not JAK1 and STAT1. Our results are consistent with the existence of a functional, endogenous Epo/EpoR system in cervical cancer with the capacity to activate the transduction of signals resulting in an increased proliferation potential.

Erythropoietin (Epo) is a glycoprotein hormone that binds to the homodimer Epo receptor (EpoR) on the surface of the erythroid precursor cells promoting proliferation, differentiation and protecting erythroid progenitors from apoptosis.¹ Binding of Epo to its receptor induces a conformational change of the intracellular domains resulting in activation of

Key words: cervical cancer, erythropoietin, JAK-STAT, proliferation

Abbreviations: DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; ECL: enhanced chemiluminescence; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Epo: erythropoietin; EpoR: erythropoietin receptor; FBS: foetal bovine serum; JAK: janus kinase; PBS: phosphate-buffered saline; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; siRNA: small interfering RNA; STAT: signal transducer and activator of transcription

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); **Grant numbers:** CB-2005-01-49167, 195193; **Grant sponsor:** Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT); **Grant number:** IN210507 and IN216810; **Grant sponsor:** PAEP
DOI: 10.1002/ijc.25935

History: Received 18 May 2010; Accepted 29 Nov 2010; Online 20 Jan 2011

Zhazhong Shi's present address is: School of Life Sciences, Kingston University, London, UK

Correspondence to: Leticia Rocha-Zavaleta, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM, Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacan, Mexico D.F. C.P. 04510, Mexico, Tel.: (5255)-5622-9218, Fax: (5255)-5622-9212, E-mail: lrochaz@correo.biomedicas.unam.mx

the EpoR-associated janus kinase 2 (JAK2) by reciprocal tyrosine phosphorylation. Activated JAK2 mediates phosphorylation of tyrosine residues of the EpoR, which function as docking sites for intracellular signal molecules, such as the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5).² EpoR-mediated activation of STAT5 leads to cell proliferation.³ In addition, it has been demonstrated that STAT1 and STAT3 are also downstream molecules of EpoR, and their activation induces a proliferative response of human leukaemia cells.⁴

Expression of Epo and EpoR has been documented in many non-haematopoietic cell types and tumours.⁵ Moreover, functional autocrine/paracrine Epo/EpoR systems have been identified on human breast carcinoma,⁶ melanoma⁷ and prostate cancer cells,⁸ suggesting that the Epo/EpoR axis may contribute to tumour growth and progression. In the human female reproductive tract, expression of Epo has been detected in cells of the cervix, endometrium and ovary, whereas EpoR has been found in glandular and surface epithelial cells, follicles and endometrial cells.⁹ Likewise, Epo and EpoR have been identified in dysplastic cervical epithelium, and cervical carcinoma specimens.¹⁰⁻¹² Furthermore, the expression of Epo and EpoR has been shown to correlate with the severity of dysplasia,¹⁰ suggesting that endogenous Epo/EpoR system may play a crucial role in cervical carcinogenesis. However, the biological relevance of Epo/EpoR expression in cervical cancer remains unclear, since recent studies have provided contrasting results regarding the functionality of the receptor in cervical cancer-derived cell lines.¹³

In this study, we investigated the expression of Epo and EpoR on cervical cancer cell lines. We present evidence showing the expression of EpoR at the mRNA and protein levels,

as well as the expression of intra- and extracellular Epo. Inhibition of either Epo or EpoR expression with siRNA attenuated cell proliferation, whereas addition of exogenous Epo led to a significant increase in cell growth, both *in vitro* and *in vivo*. Epo-induced proliferation was abrogated by independently inhibiting Epo with a neutralizing antibody, or EpoR cell surface expression with Lovastatin. Additionally, we show that Epo-induced proliferation was associated with the activation of JAK2. In addition to JAK2, Epo stimulation prompted the activation of JAK3, STAT3 and STAT5 but not JAK1. Interestingly, STAT1 was found to be constitutively phosphorylated, and silencing of Epo significantly reduced the level of STAT1 activation. Our results are consistent with the existence of a functional, endogenous Epo/EpoR system in cervical cancer with the capacity to activate the transduction of signals resulting in an increased proliferation potential.

Material and Methods

Cell lines and culture

Cervical cancer-derived HeLa, SiHa and C33 cells (American Type Culture Collection, Manassas VA) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitro, Mexico DF, Mexico) supplemented with 2% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA). The human hepatoma HepG2 cells (ATCC), the mouse embryonic fibroblast 3T3 (ATCC) and the K-562 human chronic myelogenous leukaemia cell line (donated by Dr. Juan J. Montesinos, Centro Medico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico) were maintained in RPMI 1640 (Invitro) containing 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen). HepG2 cells were used as a positive control for intracellular expression of Epo,¹⁴ 3T3 cells were used as a negative control for expression of human Epo, and K-562 cells were used as a positive control for expression of EpoR.¹⁵ The MCF-10A human mammary epithelial cell line (provided by Dr. M. J. Ibarra-Sanchez, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico) was maintained in DMEM/F-12 (1:1 v/v) supplemented with 10% FBS (Invitrogen), 20 ng/ml epidermal growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ), 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MS) and 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich). MCF-10A were used as negative control for EpoR expression.¹⁶ All cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂.

Analysis of EpoR expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the protocol of the manufacturer. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* system (Qiagen). Oligonucleotides for EpoR amplification were: EpoR forward 5'-GGC AGT GTG GAC ATA GTG GC-3', and EpoR reverse

5'-AGC AGG ATG GAT TGG GCA GA-3', which amplify a 497 bp fragment corresponding to nucleic acids 1304–1801. Reverse transcription was performed at 50°C for 30 min. The PCR protocol for EpoR amplification was: 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. Internal control was performed by amplifying the β-actin gene using the forward 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3', and reverse 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' oligonucleotides under the conditions described for EpoR RT-PCR. RNA from K-562 human chronic myelogenous leukaemia cells was used as positive control. RNA from MCF-10A human mammary cells was included as negative control.

Analysis of Epo expression by immunocytochemistry

Cells were fixed in 95% ethanol overnight at room temperature. After washing with phosphate-buffered saline (PBS) the cells were incubated overnight at 4°C with the rabbit polyclonal anti-human Epo (Sigma-Aldrich) diluted 1:100 in PBS. After washing, the slides were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Zymed Laboratories, Invitrogen) diluted 1:500 for 1 hr at 37°C. The slides were finally incubated with the 3,3'-diaminobenzidine chromogen (Biocare Medical, Concord, CA), rinsed with water, counterstained with haematoxylin (Biocare Medical) and mounted. 3T3 mouse fibroblasts and human hepatoma HepG2 cells were included as negative and positive controls, respectively.

Quantitative determination of extracellular Epo

Cells were incubated in serum-free DMEM (Invitrogen) for 48 hr. Conditioned medium was harvested, freeze-dried and reconstituted in 1 ml ultra-pure water (Invitrogen). Quantitative determination of erythropoietin in conditioned medium was performed using the EPO ELISA photometric system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) according to the protocol of the manufacturer. Briefly, 20 µl conditioned medium were incubated with 50 µl of immunoreagent containing a peroxidase-conjugated monoclonal anti-human Epo, for 3 hr at room temperature under constant shaking at 300 rpm. After washing three times with washing buffer, 100 µl tetramethylbenzidine substrate was added, and incubated at room temperature for 20 min under constant shaking at 300 rpm. Absorbance values were measured at 450 nm in a plate reader ELx800 (Bio Tek Instruments, Winooski, VT).

siRNA inhibition of Epo and EpoR expression

For inhibition of Epo and EpoR expression, commercially available small interfering RNAs (siRNA) reagent systems were used (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). For transient knockdown of gene expression, pools of three target-specific 19-25 nucleotide siRNA (Santa Cruz, catalogue no. sc-37220, and sc-37092 for Epo and EpoR, respectively) were used to transfect cells following the instructions of the

manufacturer. Cells were transfected with scrambled RNA as negative control. Briefly, cells were cultured in antibiotics-free culture medium, at 37°C for 24 hr. siRNAs were diluted in transfection medium, mixed with transfection reagent, and incubated at room temperature for 30 min. The mixture was overlaid onto cells previously washed with transfection medium. The cells were incubated at 37°C. After 7 hr, 1 ml of DMEM containing a double concentration of FBS and antibiotics was added to the cells without removing the transfection mixture. Cells were further incubated for 24 hr. The medium was discarded and replaced with fresh DMEM supplemented with 10% FBS and assayed 48 hr after the addition of fresh medium. Expression of Epo and EpoR was examined by Western blotting.

To show the specificity of siRNA in targeting EpoR gene, we performed a rescue assay by transiently transfecting EpoR-silenced cells with an expression vector pcDNA3.1EpoR for wild-type human EpoR.¹⁷ A total of 5×10^4 EpoR-silenced cells were transfected with 1 µg pcDNA3.1EpoR or empty pcDNA3.1 vector by using the TurboFect *in vitro* transfection reagent (Fermentas, MA) according to the protocol of the manufacturer. In addition, to demonstrate the specificity of Epo siRNA silencing, cultures of Epo-silenced cells were supplemented with 30 U/ml human recombinant Epo (Sigma-Aldrich). Rescued and supplemented cells were assayed in the proliferation and inhibition experiments.

Cell proliferation and inhibition assays

Cells were stimulated with different concentrations of human recombinant Epo (Sigma-Aldrich) (2, 5, 7.5, 10, 20, 30 and 50 U/ml) or left untreated. Proliferation was measured by the colorimetric MTT assay at 24, 48, 72 and 96 hr. For the proliferation inhibition assays, 30 U/ml human recombinant Epo was pre-incubated with a neutralizing anti-human Epo antibody (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for 2 hr at 37°C. To inhibit expression of EpoR on the cell surface, cells were incubated with 20 µM Lovastatin (Sigma-Aldrich), which is a selective inhibitor of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase, for 20 hr at 37°C. Depletion of receptor surface expression was evaluated by flow cytometry. For the phosphorylation inhibition assay, cells were incubated with 150 µM Tyrphostin AG 490 (Sigma-Aldrich) for 16 hr at 37°C. Inhibition of JAK2 phosphorylation was evaluated by Western blotting.

Flow cytometry

Cells were harvested, fixed in 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and stained with the goat-anti-human EpoR antibody, or a goat isotype (IgG) control antibody (Abcam, Cambridge, MA), diluted 1:50 in PBS 0.5% BSA for 1 hr. Cells were washed and incubated with a FITC-conjugated rabbit anti-goat IgG (Abcam) diluted 1:300 for 1 hr. Flow cytometry and data analysis was done using a FACScalibur with Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Immunohistochemistry

Tumour samples were fixed, paraffin-embedded and cut into 4-µm sections. The sections were deparaffinised in xylene, rehydrated in graded concentrations of ethanol and microwaved in 10 mM citrate buffer (pH 6.2) for 20 min for antigen retrieval. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubating the sections in 3% hydrogen peroxide in absolute methanol for 5 min, and nonspecific protein binding was blocked by incubating the sections in 10% rabbit serum. For the detection of proliferating cells, tissue sections were incubated overnight with the monoclonal anti-human Ki67 nuclear antigen (Abcam). The slides were then incubated with a biotinylated secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Dako). For the detection of apoptotic cells, the slides were incubated as described with the polyclonal anti-active caspase 3 antibody (Abcam), followed by incubation with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Zymed). Staining was visualised by using freshly prepared 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Biocare Medical).

A total of 1000 cells were counted on each slide. The proliferation index (PI) and the apoptosis index (AI) were expressed as the percentage of cells showing positive immunoreactivity for Ki67 and active caspase 3, respectively.

In vivo cell proliferation assays

The effect of Epo on the proliferation of human tumour cells was assessed by using a xenograft model. Groups of five *nu/nu* female, 6–8-week-old mice were implanted with 1×10^5 HeLa and SiHa cells. Cells were inoculated subcutaneously (s.c.) in the back of the mice and monitored for tumour formation. Tumour size was measured by calliper, and recorded periodically. After 15 days, when tumours reached an average of 0.5 cm², mice received 4 doses of 300 U/kg Epo in PBS vehicle or 100 µl PBS vehicle administered s.c. on an every-other-day schedule. Two days after the fourth inoculation mice were sacrificed, individual tumours were dissected, measured and weighed.

Immunoprecipitation and 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 of Complete Protease Inhibitors Cocktail (Roche Applied Science), and 10 µl/ml of phosphatases inhibitor (Sigma-Aldrich). For the isolation of membrane proteins, cells were resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.05% SDS) containing proteases and phosphatases inhibitors. For the isolation of proteins from xenograft tumours, tissue samples were cut into small pieces and resuspended in lysis buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.0; 10% glycerol; 5% β-mercaptoethanol; 2% SDS; 0.0025% bromophenol blue) containing proteases and phosphatases inhibitors. Total protein content was determined using the

DC Protein Assay Kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA). For the immunoprecipitation, 500 μ g of protein was incubated with protein A-agarose beads (Invitrogen) previously coupled to a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10 antibody (Upstate, Lake Placid, NY). Proteins were resolved by 10% SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA). Membranes were incubated overnight with specific antibodies, washed and incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Zymed Laboratories). Proteins were detected by chemiluminescence using the Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). The following antibodies were used in this study: Rabbit polyclonal anti-JAK1, anti-JAK2, anti-JAK3, rabbit polyclonal anti-STAT1, anti-STAT3, anti-STAT5 (all from Abcam) and mouse monoclonal anti- β -actin (Abcam). For the detection of human EpoR a goat anti-human EpoR antibody (Sigma-Aldrich), which was produced using purified recombinant human erythropoietin soluble receptor as immunogen, was used.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between treatment groups were analysed using the ANOVA test, and Tukey–Kramer post test. Ninety-five percent confidence intervals (CI) and p values were calculated. The tests considered a basic significance level of $p \leq 0.05$.

Results

Cervical cancer cell lines express EpoR and Epo

Expression of EpoR was investigated by RT-PCR. EpoR mRNA was expressed by all cervical cancer cells (Fig. 1a). The amplified fragments were of identical size to those observed in the positive control K562. As expected, the negative control MCF-10A cells did not express the EpoR mRNA. We next investigated the expression of EpoR at the protein level. Since EpoR must be present as a cell surface receptor to be functional, we investigated the presence of EpoR in membrane protein extracts. As shown in Figure 1b, a band of the predicted molecular weight for EpoR (65 KDa) was identified in the cervical cancer cells and in the K562 positive control cells, but not in the MCF-10A negative control cells. (Supporting Information Fig. 1).

Expression of endogenous Epo has been previously documented in cervical tumour biopsies.^{10,11} Therefore, we evaluated the expression of Epo in the cell lines by immunocytochemistry. A strong granular cytoplasmic Epo immunostaining was observed in the three cervical cancer cell lines (Fig. 1c). Similar intracellular immunoreactivity was confirmed in the positive HepG2 cells. In contrast, immunostaining was absent in the negative control 3T3 cells. We then explored if endogenous Epo was secreted to the extracellular medium. As shown in Figure 1d, concentrations of Epo ranging from 2.5 to 2.8 mU/ml were detected in conditioned medium of the cell lines. The mean concentration of Epo produced by the cell lines was higher than that observed in FBS (1.7 mU/ml). In all cases,

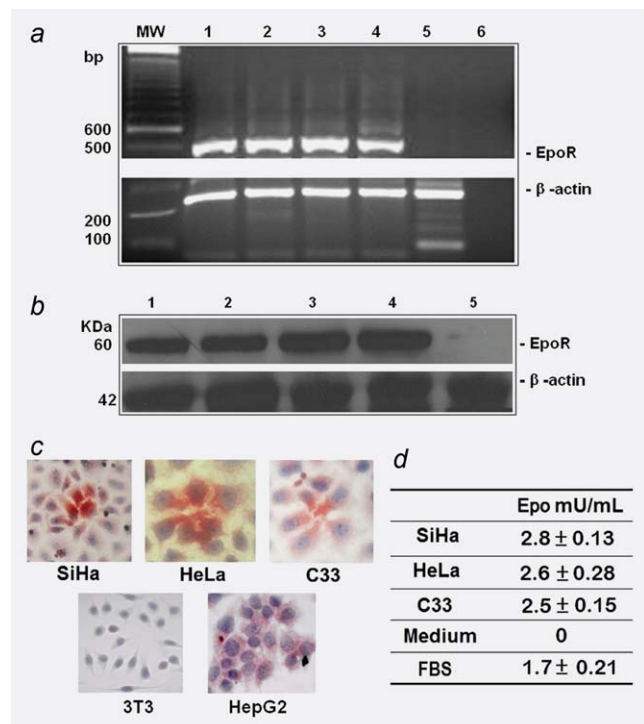


Figure 1. Expression of human EpoR and Epo in cervical cancer cells. (a) Expression of EpoR was investigated by RT-PCR analysis of total RNA from HeLa (1), SiHa (2) and C33 (3) cells. Human leukaemia K562 cells (4) and human mammary epithelial MCF-10A cells (5) were used as positive and negative control, respectively. As an additional negative control a reaction containing purified water instead of RNA was set (6). Expression of the β -actin gene was included as internal control. MW: molecular weight marker. (b) Expression of the EpoR protein was assessed by Western blotting of membrane protein fractions isolated from HeLa (1), SiHa (2) and C33 (3) cells. K562 cells (4) and MCF-10A cells (5) were used as positive and negative control, respectively. Expression of the β -actin protein was included as loading control. (c) Endogenous expression of Epo was demonstrated by immunocytochemistry in cervical cancer cells. Human hepatoma cells HepG2, and 3T3 mouse fibroblasts were included as positive and negative control, respectively. Note the granular cytoplasmic immunostaining in cervical and hepatoma cell lines. (d) Secretion of endogenous Epo was evaluated by quantitative ELISA. SiHa, HeLa and C33 cells were cultured in serum-free medium for 48 hr. Extracellular Epo was measured in cell-conditioned medium, serum-free medium (medium) as negative control, and FBS as positive control. Values represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

concentration values were above the lower limit of detection of the assay (≥ 0.24 mU/ml).

Endogenous stimulation of Epo/EpoR increases cell proliferation

Our results indicate that cervical cancer cells constitutively express Epo and EpoR. Thus, to investigate whether stimulation

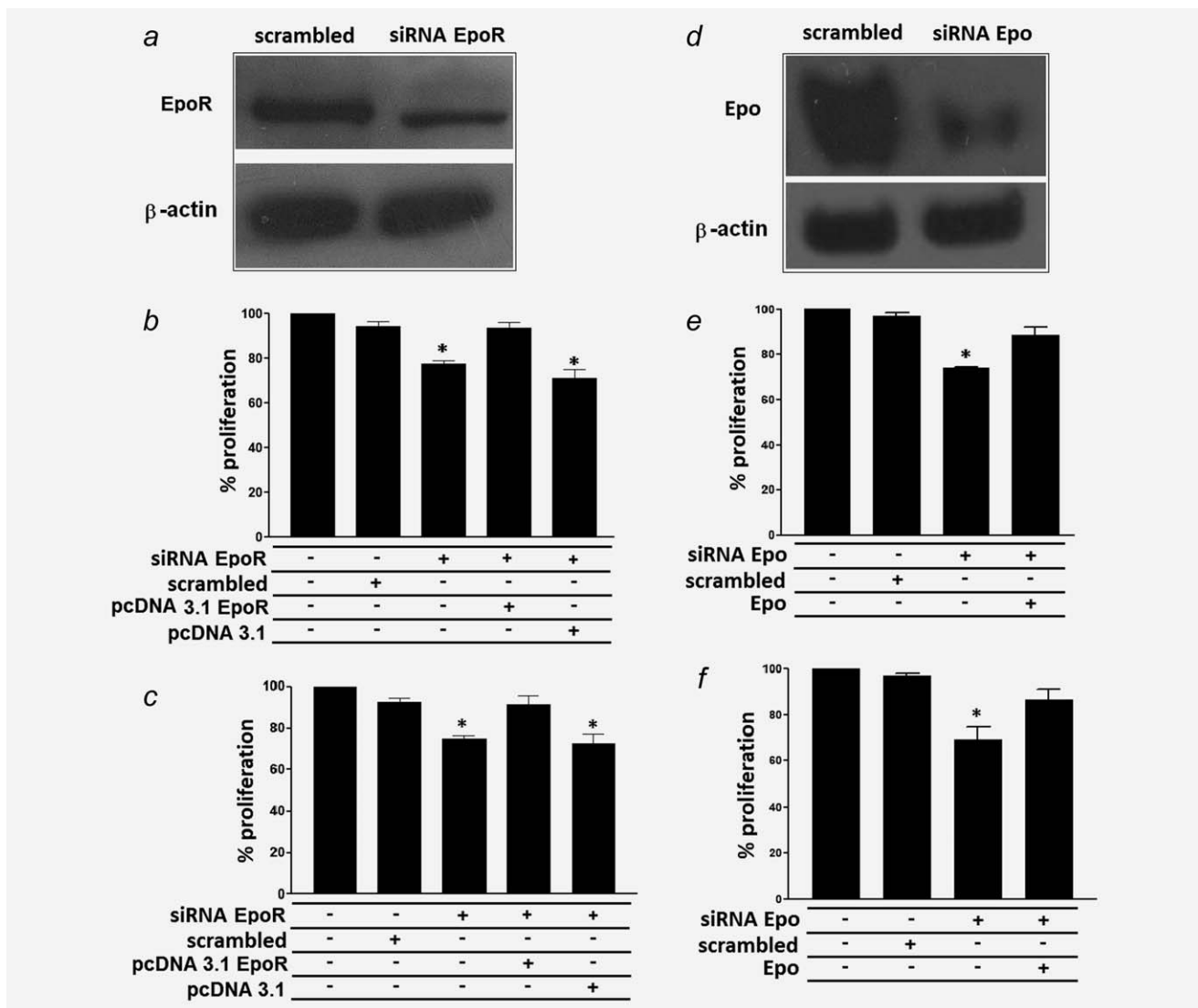


Figure 2. Endogenous Epo/EpoR system stimulates proliferation of cervical cancer cells. HeLa and SiHa cells were transfected with EpoR-specific (siRNA EpoR), Epo-specific (siRNA Epo) small interfering RNA or with scrambled RNA as negative control. Expression of EpoR (a) and Epo (d) was assayed in HeLa cells by Western blot 48 hr after siRNAs transfection. Cell proliferation of transfected and control cells was determined using the MTT assay. EpoR-mediated effect on cell proliferation was rescued by transfecting EpoR-silenced HeLa (b) and SiHa (c) cells with the expression vector pcDNA3.1EpoR for human EpoR, or with the empty pcDNA3.1 vector as negative control. The effect of endogenous Epo on cell proliferation was rescued by supplementing Epo-silenced HeLa (e) and SiHa (f) cells with 30 U/ml exogenous, human recombinant Epo (Epo). Error bars indicate the standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. untreated control values (Tukey–Kramer test).

of this endogenous Epo/EpoR system may modulate cell proliferation, we interrupted the Epo/EpoR axis by independently silencing the expression of Epo and EpoR genes in HeLa and SiHa cells with specific siRNAs. As shown in Figure 2a, EpoR expression was significantly reduced 24 hr after transfection with specific EpoR siRNAs but not after treatment with control scrambled RNA. Silencing of EpoR resulted in a significant reduction of HeLa (Fig. 2b) and SiHa (Fig. 2c) cells proliferation as compared with cells transfected with scrambled RNA ($p < 0.05$). To show the specificity of EpoR siRNAs in targeting EpoR, we performed a rescue assay by transfecting the cells with

the expression vector pcDNA3.1EpoR for human EpoR or empty pcDNA3.1vector. The effect of EpoR silencing on cell proliferation was completely reverted by the reexpression of EpoR in both, HeLa (Fig. 2b) and SiHa (Fig. 2c) cells. In contrast, the level of proliferation was not recovered by transfecting the cells with the empty vector. To analyse the effect of endogenous Epo on cell proliferation, we treated HeLa and SiHa cells with specific Epo siRNAs. Transfection of cells with Epo siRNAs induced a significant decrease in Epo expression as compared with the treatment of the same cells with control RNA (Fig. 2d). Epo silencing resulted in a significant reduction of proliferation

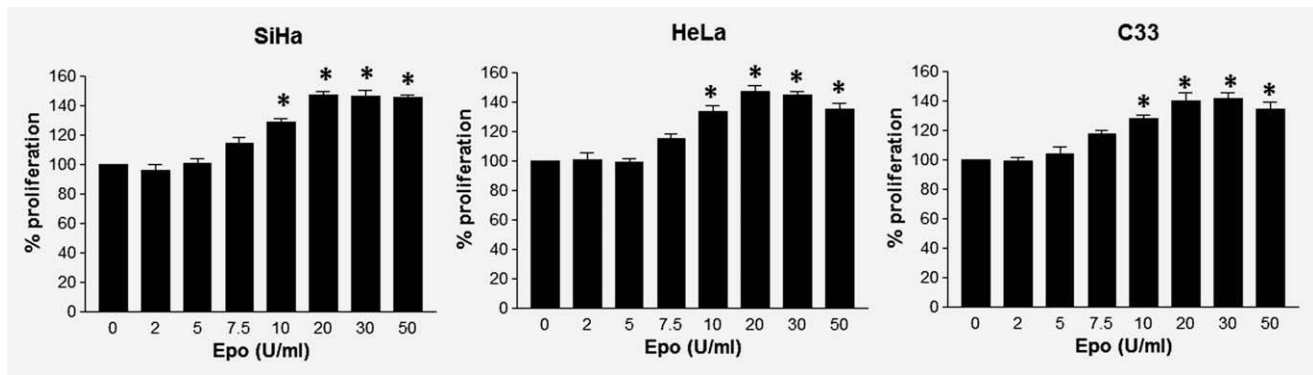


Figure 3. Exogenous Epo induces proliferation of cervical cancer cells. SiHa, HeLa and C33 cells were treated with increasing concentrations of Epo as indicated. Cell proliferation was assessed at 48 hr using the MTT assay. All values reported represent the average of three independent tests. Error bars indicate the standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. untreated control values (Tukey–Kramer test).

in both HeLa (Fig. 2e) and SiHa cells (Fig. 2f) as compared with cells transfected with scrambled RNA ($p < 0.05$). To determine whether the effect of Epo silencing on cell proliferation was triggered by endogenous Epo depletion, we evaluated the effect of supplementation with 30 U/ml exogenous Epo on Epo siRNA-transfected HeLa and SiHa cells. The level of proliferation was completely restored by Epo supplementation in both HeLa (Fig. 2e), and SiHa (Fig. 2f) cells. Taken together, these observations strongly suggest that endogenous Epo/EpoR stimulation contributes to cervical cancer cells growth *in vitro*.

Exogenous Epo induces proliferation of cervical cancer cells

To address the question of whether activation of EpoR induces proliferation of cervical cancer cells, the cell lines were incubated in the presence of increasing concentrations of Epo. As shown in Figure 3, administration of Epo caused a dose-dependent increase in cell proliferation, which was significantly higher than untreated controls from doses over 7.5 U/ml. The maximum effect was reached with 20 U/ml Epo, thus we decided to use this concentration in subsequent experiments. The growth kinetics of HeLa cells after Epo treatment showed that the proliferative effect was evident from 48 hr ($p \leq 0.001$) (Fig. 4a). The proliferative effect was reverted by pre-incubating Epo with a neutralizing anti-Epo antibody (Fig. 4b). To confirm that proliferation was mediated by EpoR, cells were pre-incubated with Lovastatin, after which the proportion of cells showing surface expression of EpoR was reduced from $87 \pm 4.9\%$ to $53 \pm 9.3\%$ (Fig. 4c). Incubation with Lovastatin resulted in a significant reduction in cell proliferation ($p = 0.01$) (Fig. 4b). Similarly, cell proliferation was significantly decreased after incubation with Tyrphostin AG 490 ($p = 0.01$), a specific inhibitor of JAK2 (Fig. 4b). As seen in Figure 4d, Tyrphostin AG490 suppressed Epo-induced JAK2 phosphorylation, suggesting that the effect of Epo on the proliferation of cervical cancer cells may be mediated by the activation of this kinase.

Stimulation of EpoR induces activation of different members of the JAK-STAT signalling pathway

It is known that binding of Epo to EpoR induces the activation of the receptor-associated JAK2. The results above indicate that JAK2 contributes to Epo-induced cell proliferation. Thus, to ascertain the participation of the JAK-STAT signalling pathway in Epo-induced proliferation, we examined the phosphorylation of JAK1, JAK2 and JAK3 after stimulation with Epo. Results in Figure 5a show that Epo does not induce phosphorylation of JAK1. In contrast, an increment in phosphorylation of JAK2 and JAK3 was evident at 3 and 10 min of treatment, respectively. We also investigated the activation of STAT1, STAT3 and STAT5 after stimulation with Epo. As seen in Figure 5b, phosphorylation of STAT1 was not modified by the activity of exogenous Epo. Unlike STAT1, phosphorylation of STAT3 and STAT5 was clearly induced by Epo. Activation of STAT3 was detected at 5, 10, 30 and 60 min after treatment. Phosphorylated STAT5 was only detected at 5 and 10 min of treatment, showing a maximum of expression at 10 min. As seen in Figure 5b, phosphorylated STAT1 was detected before treatment with exogenous Epo. Thus, to determine whether phosphorylation of STAT1 is activated by endogenous Epo, we analysed the expression and phosphorylation of STAT1 in cells transfected with specific Epo siRNAs or with control RNA. As shown in Figure 5c, Epo silencing resulted in a significant reduction of STAT1 phosphorylation as compared with that observed in control RNA-transfected cells. The expression of STAT1 remained unchanged after Epo silencing. This observation suggests that endogenous Epo promotes the constitutive activation of STAT1 in cervical cancer cells.

Epo promotes the growing of tumours in vivo

To examine the proliferative effect of Epo, *in vivo* xenograft human cervical tumours were established in mice. Animals were treated with Epo or vehicle, as shown in Figure 6. As seen in Figure 6a, the growth of both HeLa and SiHa tumours was dramatically increased after the treatment with

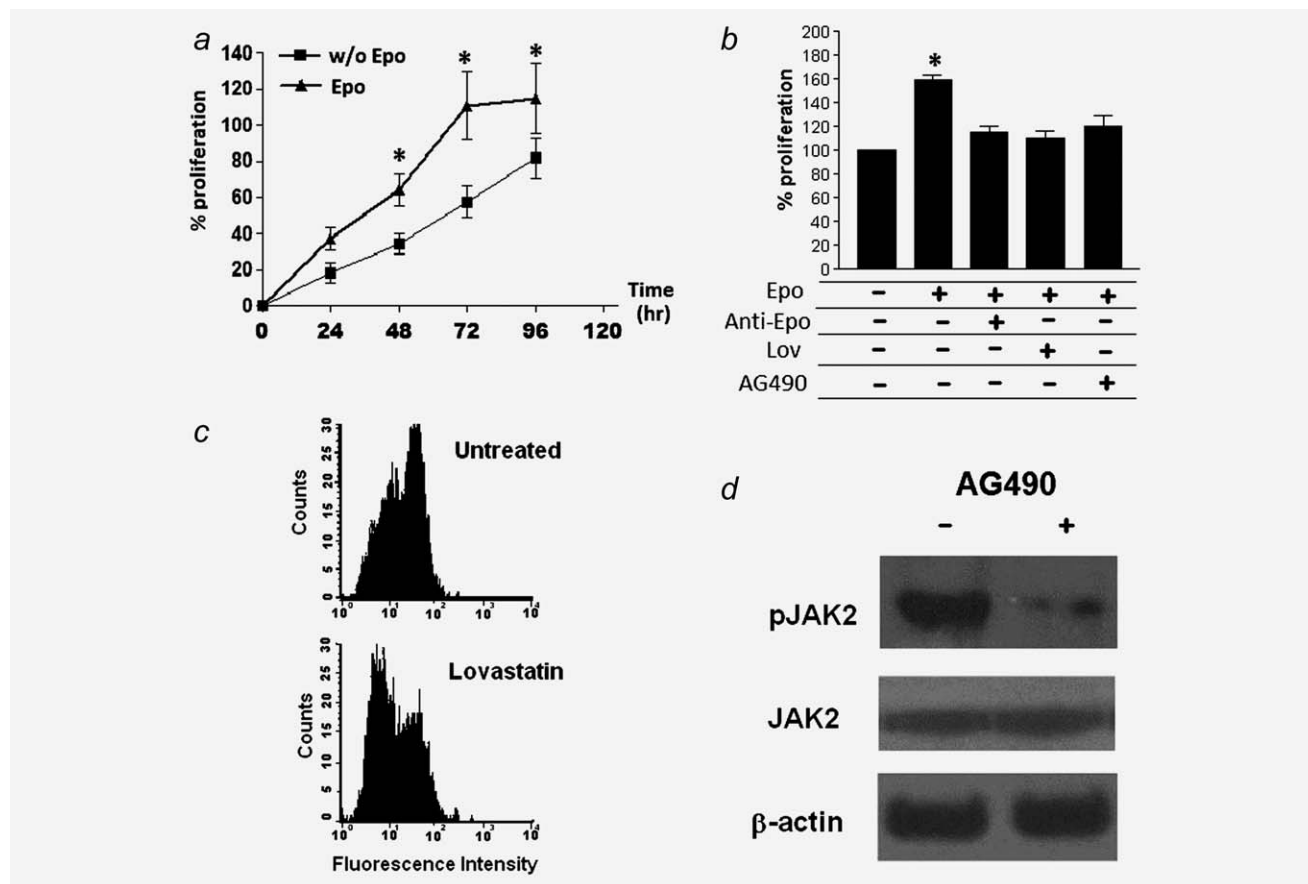


Figure 4. Cell growth kinetics of Epo-treated cells, and inhibition of proliferation. (a) HeLa cells were treated with 20 U/ml Epo, cell proliferation was evaluated by the MTT assay at the indicated time points. Each point represents the average of three independent determinations. Error bars indicate the standard error of the mean. (b) HeLa cells were stimulated with 20 U/ml Epo (Epo), with Epo + a neutralizing anti-human Epo antibody (Anti-Epo), or pre-treated with 20 μ M Lovastatin (Lov), or 150 μ M Tyrphostin AG490 (AG490). Pre-treated cells were further incubated for 48 hr in the presence of 20 U/ml Epo. Cell proliferation was assayed by MTT. Values represent the mean of three independent experiments. Error bars indicate the standard error of the mean. * $p < 0.05$ vs. untreated control values (Tukey-Kramer test). (c) Cell surface expression of EpoR was analysed in control cells (untreated) and cells treated with Lovastatin (Lovastatin) by flow cytometry. (d) The effect of Tyrphostin AG490 on Epo-induced phosphorylation of JAK2 was analysed by Western blot.

Epo. At the end of the experiment, tumours dissected from Epo-treated animals were significantly larger compared with the control group ($p = 0.01$) (Fig. 6d). The frequency of proliferating cells in tumours from Epo-treated animals was significantly higher than that observed in untreated controls ($p < 0.05$). In contrast, we found no differences in apoptotic rates between the groups ($p = 0.13$) (Fig. 6d). Moreover, SiHa and HeLa tumours from Epo-treated mice were 2.08-fold and 2.49-fold heavier than the corresponding untreated tumours (Fig. 6c), suggesting that Epo is also able to mediate proliferation of cervical cancer cells *in vivo*.

We next assessed the expression and activation of JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5 in xenograft human cervical tumours from Epo-treated and untreated mice. As seen in Figure 6b, administration of Epo activated the phosphorylation of JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5. The level of total JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5 remained unchanged. These

observations confirm that Epo is able to induce activation of various members of the JAK-STAT signalling pathway.

Discussion

Epo is widely used to treat cancer-related anaemia. However, an early study of the effect of Epo in patients with breast cancer, showed an increased incidence of disease progression that led to higher mortality in Epo-treated patients as compared with untreated controls.¹⁸ Accordingly, the use of Epo as an adjuvant during radiation therapy in patients with head and neck cancer has a negative influence on outcome in comparison with radiotherapy alone.¹⁹ Additionally, it has been reported that administration of Epo during primary radiation treatment of patients with cervical carcinoma is associated with an increment in recurrence rate, and decrease disease-free and overall survival.²⁰ As a consequence, the European Organisation for Research and Treatment of Cancer

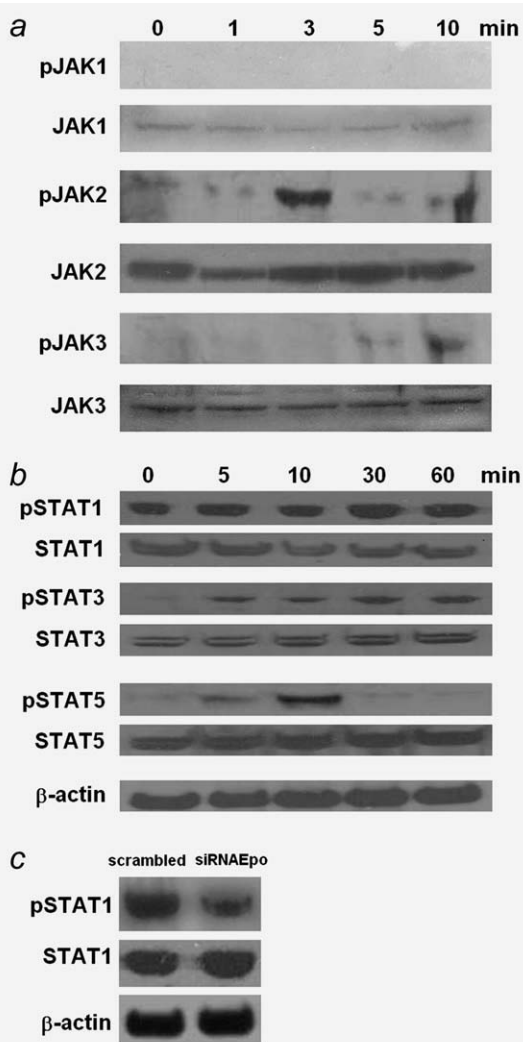


Figure 5. Exogenous Epo activates the JAK-STAT signalling pathway in cervical cancer cells. HeLa cells were stimulated with 20 U/ml Epo for different times. (a) Phosphorylation levels of JAK1 (pJAK1), JAK2 (pJAK2) and JAK3 (pJAK3) were evaluated at 1, 3, 5 and 10 min by Western blot. (b) Phosphorylation levels of STAT1 (pSTAT1), STAT3 (pSTAT3) and STAT5 (pSTAT5) were determined at 5, 10, 30 and 60 min by Western blot. (c) Endogenous Epo promotes the constitutive phosphorylation of STAT1. HeLa cells were transfected with Epo-specific (siRNA Epo) small interfering RNA or with scrambled RNA as negative control (scrambled). The expression and phosphorylation of STAT1 were assessed by Western blot. The figure shows a representative image of three independent experiments. β -actin was included as loading control.

recognised the need for additional clinical trials and basic studies to define the optimal doses and to determine cost and benefits of using Epo in anaemic patients with cancer.²¹ In the present study, we investigated the expression and function of EpoR and Epo in cervical cancer cells.

Reports on the expression of EpoR in cervical tumour cells have been questioned because some of the antibodies

used as detection reagents lack specificity and affinity for the receptor.^{22–24} Here, we have demonstrated the presence of EpoR transcripts in three cervical cancer cell lines. This is in agreement with previous studies showing the detection of EpoR mRNA in HeLa^{13,25} and SiHa cells.¹⁰ Interestingly, quantitative analysis of EpoR mRNA demonstrated very low levels of transcripts in HeLa cells compared with Epo-dependent UT7/Epo cells.²⁵ Although the levels of EpoR transcripts were not quantified in our work, we did observe that the expression of EpoR protein was rather weak in the cell lines assessed. It has been suggested that EpoR mRNA detection in solid tumours is not a good predictor of surface expression of EpoR protein, which may be trapped in the cytoplasm and may not be trafficked to the surface of the cells.²⁵ For that reason, we analysed membrane proteins finding evidence of the presence of EpoR at the cell surface. Moreover, inhibition of post-translational modifications of EpoR by Lovastatin, inhibited detection of EpoR on the surface of non-permeabilized cells by flow cytometry, suggesting that EpoR undergoes efficient maturation and is expressed on the surface of these cells.

Here, we found that cervical cancer cells produce and secrete Epo to the extracellular medium under normoxic conditions, suggesting a potential autocrine/paracrine system. The human female reproductive organs are non-classical sites for the expression of both, Epo and EpoR.⁹ However, the physiological role of a potential Epo-EpoR loop remains unclear. It has been suggested that the Epo-EpoR system may be involved in proliferation and differentiation of endometrial glandular epithelial cells throughout the menstrual cycle.²⁶ Other studies have shown the ectopic synthesis and secretion of Epo by uterine leiomyoma cells.^{27,28} Interestingly, concomitant expression of EpoR within leiomyoma tissue and increased levels of ectopic Epo production have been associated with unusually large myomas, suggesting that an autocrine/paracrine Epo-EpoR system may be regulating the proliferation of these cells.²⁹ Additionally, concomitant expression of Epo and EpoR in cervical intraepithelial neoplasia,¹⁰ and cervical tumours^{10,11,30} seem to indicate that an Epo-EpoR loop may contribute to the development of cervical cancer. To test this hypothesis, we blocked the theoretical loop by silencing the expression of either Epo or EpoR genes, in both cases a significant reduction of cell proliferation was observed. Chemical blocking of post-translational modifications of EpoR induced a similar decrease of cell proliferation. These observations demonstrate that an Epo-EpoR autocrine/paracrine system is functional in cervical cancer cells and prove that this system is involved in the regulation of cell proliferation. In this context, it has been reported that inhibition of endogenous Epo signalling by means of injecting an anti-Epo antibody, induces apoptosis of human cervical tumours transplanted in nude mice.³¹ This becomes relevant because high levels of Epo have been detected in patients with several carcinomas,^{30,32,33} leaving open the discussion on whether this endogenous production of Epo is sufficient to regulate the microenvironment of the tumour.

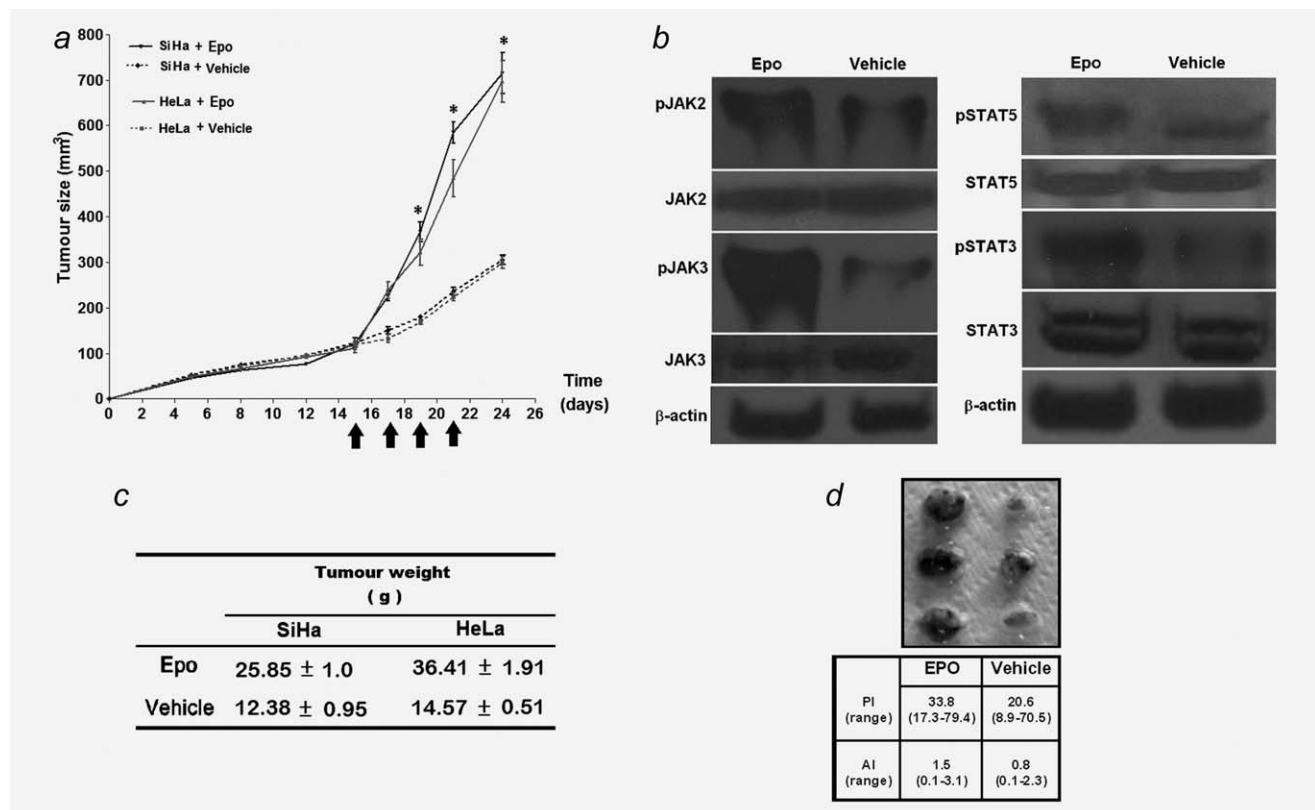


Figure 6. Epo induces the growth of xenograft cervical cancer tumours *in vivo* and activates the phosphorylation of various members of the JAK-STAT signalling pathway. Female *nu/nu* mice were implanted subcutaneously (s.c.) with 1×10^5 HeLa and SiHa cells. After 15 days, four doses of 300 U/kg Epo or vehicle (arrows) were administered (s.c.). (a) Tumour growth before and after the administration of Epo or vehicle. Data represent the means of five animals per group. * $p < 0.05$ vs. control mice treated with vehicle (Tukey–Kramer test). (b) Total protein extracts were obtained from tumours dissected at the end of the treatment. Phosphorylation levels of JAK1 (pJAK1), JAK2 (pJAK2), JAK3 (pJAK3), STAT1 (pSTAT1), STAT3 (pSTAT3) and STAT5 (pSTAT5) were evaluated in mice treated with Epo or vehicle by Western blot. The figure shows a representative image of three independent experiments. β -actin was included as loading control. (c) Mean weight of tumours dissected at the end of treatment with Epo or vehicle. (d) Representative images showing the tumours from Epo-treated (Epo) and untreated controls (vehicle). Tumour samples were analysed for the expression of Ki67 nuclear antigen and active caspase 3 by immunohistochemistry. PI and AI were expressed as the percentage of cells showing positive immunoreactivity for Ki67 and active caspase 3, respectively.

The biological relevance of EpoR expression in cervical cancer remains unclear because reports on the function of EpoR in cervical cancer cells are controversial. There is evidence suggesting that hypoxia enhances EpoR expression in cervical cancer cells, and that exogenous Epo stimulates phosphorylation of the receptor,¹⁰ and induces the activation of different signalling pathways.³⁴ Nevertheless, recently reported data seem to indicate that EpoR expressed in cervical cancer cells is not functional.¹³ Here, we showed that activation of EpoR by exogenous Epo induces cell proliferation in a dose-dependent manner, and that inhibition of EpoR by chemical or genetic means prevents the cells from proliferating in the presence of exogenous Epo. Therefore, our results support the idea that EpoR on cervical cancer cells is functional.

In this report, we have presented evidence that stimulation of EpoR by exogenous Epo induces the activation of different

members of the JAK-STAT signalling pathway. Addition of Epo increased the phosphorylation of JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5 both, *in vitro* and *in vivo*. Phosphorylated JAK2 and STAT5 have been detected in biopsies of cervical tumours by immunohistochemistry.³⁰ It has also been demonstrated that tyrosine phosphorylation of JAK2 and STAT5 in cervical cancer cells is highly dependent on the activation of EpoR by its ligand.³⁰ Accordingly, we found that exogenous Epo induced phosphorylation of both JAK2 and STAT5, and that activation of JAK2 increased proliferation of cervical cancer cells. JAK2 is a specific, early effector of the EpoR signalling pathway that may not only be involved in proliferation, but also in the survival of cervical cancer cells.³⁵ We also observed that endogenous Epo promotes, at least in part, the constitutive phosphorylation of STAT1. We also found that Epo induces activation of JAK3 and STAT3. STAT3 has been identified as a downstream molecule of

EpoR in melanoma,³⁶ erythroid³⁷ and erythroleukaemia cells.³⁸ Moreover, activation of STAT3 is associated with increasing cell proliferation levels in human erythroleukaemia cells.³⁹ Interestingly, expression of STAT3 has been proposed as a poor prognostic factor in cervical cancer.⁴⁰ Therefore, it is very likely that various members of the JAK-STAT family may act synergistically to induce Epo-mediated cell proliferation in cervical cancer. These observations are relevant because the JAK-STAT pathway is considered a potential therapeutic target for the treatment of neoplasms presenting aberrant expression and function of members of this pathway.

Cancer-related anaemia is very common in patients with cervical cancer. Administration of Epo to treat anaemia in these patients has shown a negative effect on progression-free and overall survival times.²⁰ These findings could be explained in part by our observations that Epo induces proliferation both, *in vitro* and *in vivo*. However, Epo is a pleio-

tropic cytokine, showing pro-angiogenic and tissue-protective activities along with the potential to stimulate cell migration. Therefore, in our laboratory a wider analysis of the potential biological effects of Epo is actually in progress with the aim of obtaining a more comprehensive perspective of the potential role of Epo during cervical cancer progression.

In conclusion, we have presented evidence for a functional Epo/EpoR autocrine–paracrine axis in cervical cancer cells. We showed that Epo promotes proliferation on these cells through the activation of various members of the JAK-STAT signalling pathway, suggesting that Epo may be involved in the development and progression of cervical cancer.

Acknowledgements

T.V.L. was supported by grants from CONACyT and PAEP. The authors thank Georgina Diaz Herrera and Marcela Ramirez Yarza for technical assistance.

References

- Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990;248:378–81.
- Klingmuller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8324–8.
- Damen JE, Wakao H, Miyajima A, Kros J, Humphries RK, Cutler RL, Krystal G. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J* 1995;14:5557–68.
- Kirito K, Nakajima K, Watanabe T, Uchida M, Tanaka M, Ozawa K, Komatsu N. Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 2002;99:102–10.
- Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):18–30.
- Acs G, Chen M, Xu X, Acs P, Verma A, Koch CJ. Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;214:243–51.
- Kumar SM, Acs G, Fang D, Herlyn M, Elder DE, Xu X. Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. *Am J Pathol* 2005;166:823–30.
- Jeong JY, Hoxhaj G, Socha AL, Sytkowski AJ, Feldman L. An erythropoietin autocrine/paracrine axis modulates the growth and survival of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1150–7.
- Yasuda T, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, Mori S, Matsuo T, Nakamura Y. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol* 2001;106(2 Suppl 2):215–22.
- Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling 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;162:1789–806.
- Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Hockel M. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:6894–900.
- Shenouda G, Mehio A, Souhami L, Duclos M, Portelance L, Belenkov A, Chow T. Erythropoietin receptor expression in biopsy specimens from patients with uterine cervix squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:752–6.
- Lausch M, Metzner E, Svensson T, Depping R, Jellmann W. Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. *Int J Cancer* 2008;122:1005–11.
- Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Franklin Bunn H. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7972–6.
- Fraser JK, Lin F-K, Berridge MV. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. *Blood* 1988;71:104–9.
- Jeong J-Y, Feldman L, Solar P, Szenajch J, Sytkowski AJ. Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2008;122:274–80.
- Shi Z, Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP, El-Tanani M, Lappin TRJ. 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;8:615–26.
- Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 2003;4:459–60.
- Lambin P, Ramaekers Bram LT, van Mastrigt Ghislaine APG, van den Ende P, de Jong J, de Ruysscher Dirk KM, Pijls-Johannesma M. Erythropoietin as an adjuvant treatment with (chemo) radiation therapy for head and neck cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;8:CD006158.
- Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee YC, Abulafia O. Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1855–61.
- Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Osterborg A, Repetto L, Soubeyran P; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Taskforce for the Elderly. EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer: 2006 update. *Eur J Cancer* 2007;43:258–70.
- Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 2006;107:1892–5.

23. Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TR. Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. *Stem Cells* 2007;25:718–22.
24. Kirkeby A, van Beek J, Nielsen J, Leist M, Helboe L. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *J Neurosci Methods* 2007;164:50–8.
25. Sinclair AM, Rogers N, Busse L, Archibeque I, Brown W, Kassner PD, Watson JE, Arnold GE, Nguyen KC, Powers S, Elliott S. Erythropoietin receptor transcription is neither elevated nor predictive of surface expression in human tumour cells. *Br J Cancer* 2008;98:1059–67.
26. Yokomizo R, Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2002;8:441–6.
27. Suzuki M, Takamizawa S, Nomaguchi K, Suzu S, Yamada M, Igarashi T, Sato I. Erythropoietin synthesis by tumour tissues in a patient with uterine myoma and erythrocytosis. *Br J Haematol* 2001;113:49–51.
28. Yokoyama Y, Shinohara A, Hirokawa M, Maeda N. Erythrocytosis due to an erythropoietin-producing large uterine leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest* 2003;56:179–83.
29. Pollio F, Staibano S, Mansueto G, de Rosa G, Persico F, de Falco M, Di Lieto A. Erythropoietin and erythropoietin receptor system in a large uterine myoma of a patient with myomatous erythrocytosis syndrome: possible relationship with the pathogenesis of unusual tumor size. *Hum Pathol* 2005;36:120–7.
30. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, Fujita H, Matsuo T, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 2002;23:1797–805.
31. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagano M, Sasaki R, Nakamura Y. Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer* 2010;84:836–43.
32. Katsuoka Y, McGonigle R, Rege AB, Beckman B, Fisher JW. Erythropoietin production in human renal carcinoma cells passaged in nude mice and in tissue culture. *Gann* 1983;74:534–41.
33. Mannello F, Fabbri L, Ciandrini E, Tonti GA. Increased levels of erythropoietin in nipple aspirate fluid and in ductal cells from breast cancer patients. *Cell Oncol* 2008;30:51–61.
34. Hamadmad SN, 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* 2008;324:1227–33.
35. Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E, Cournoyer D, Belzile JP, Souhami L, Devic S, Chow TY. Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1525–32.
36. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Gustrau A, Delia D, Nambiar S, Hassan M, Hengge UR. Role of erythropoietin receptor expression in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130:201–10.
37. Wierenga AT, Vogelzang I, Eggen BJ, Vellenga E. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol* 2003;31:398–405.
38. Kirito K, Uchida M, Yamada M, Miura Y, Komatsu N. A distinct function of STAT proteins in erythropoietin signal transduction. *J Biol Chem* 1997;272:16507–13.
39. Kirito K, Nagashima T, Ozawa K, Komatsu N. Constitutive activation of Stat1 and Stat3 in primary erythroleukemia cells. *Int J Hematol* 2002;75:51–4.
40. Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, Yamaguchi T, Terada A, Fujiyoshi N, Nishio S, Tsuda N, Ijichi M, Kakuma T, Kage M, Hori D, *et al.* Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. *Br J Cancer* 2009;101:967–72.