

Inhibición de la proliferación celular de la línea B16-10 por la región extracelular del receptor de IL-10 recombinante

Mayor M.C. Esaú **Floriano-Sánchez**,*

Tte. Cor. M.C. Ret. Jaime **Berumen-Campos**,* Dr. en C. Vianney **Ortiz-Navarrete****

Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Departamento de Medicina Molecular CINVESTAV-IPN.

RESUMEN

Introducción. Las citocinas son proteínas pequeñas secretadas por diversas células, tienen diversas funciones, entre otras, inducción del crecimiento y diferenciación celular, actividades citolíticas, apoptosis y quimiotaxis. Los términos linfocinas o monocinas, utilizados en el área inmunológica, sirven para designar el origen celular de la citocinas.

Material y métodos. Se realizó una construcción genética (p6EIL10R1), que codificó la región extracelular del receptor de la IL-10 (smIL-10R1), la cual afectó de manera estable la línea celular B16F0 (B16-SR), para esto se empleó la técnica Weter para analizar si la proteína fue secretada en el sobrenadante de la línea celular en cultivo.

Resultados. Se obtuvo una clona (p6EIL10R) que codificó la región extracelular del receptor (smIL-10R1 de mIL-10R1), subclonado en el vector pCDNA6“A”. Se demostró, además, que con un análisis de restricción el fragmento ADN clonado tuvo un tamaño apropiado de 744 pb, así como también que el fragmento extracelular del receptor de IL-10 (smIL-10R1) fue clonado en la orientación correcta; finalmente, no presentó ninguna mutación y el marco de lectura fue el correcto.

Conclusión. Se demostró que la región extracelular del receptor de la IL-10 murina inhibe los efectos de la IL-10 sobre la proliferación celular de la línea tumorigénica B16-10 *in vitro*.

Palabras clave: smIL-10R1, IL-10, proliferación celular, factor autócrino, crecimiento tumoral, inhibición.

Inhibition of the B16-10 line cellular proliferation by the extracellular region of the IL-10 recombinant receptor

SUMMARY

Introduction. Cytokines are small proteins secreted by diverse cells, have diverse functions, among others, growth induction and cellular differentiation, cytolytic activities, apoptosis and chemoattractant. The terms lymphocines or monocines, used in the immunological area, serve to designate the cellular origin of the cytokines.

Material and methods. A genetic construction (p6EIL10R1) was made, that codified the receptor of the IL-10 (smIL-10R1) extracellular region, which affected in a stable way cellular line B16F0 (B16-SR), for this was used the Weter technique to analyze if the protein were secreted in the cellular line supernatant in culture.

Results. We obtained a clone (p6EIL10R) that codified the receptor extracellular region (smIL-10R1 of mIL-10R1), subcloned in vector pCDNA6“A”. It was demonstrated, in addition, that with a restriction analysis the DNA cloned fragment had an appropriate size of 744 pb, as well as that the extracellular fragment of the IL-10 receptor (smIL-10R1) was cloned in the correct orientation; finally, it did not present any mutation and the reading frame was the correct.

Conclusion. It was demonstrated that the extracellular region of the murine IL-10 receptor inhibits the effects of the IL-10 on the cellular proliferation of the tumorigenic line B16-10 *in vitro*.

Key words: smIL-10R1, IL-10, cellular proliferation, autocrine factor, tumor growth, inhibition.

*Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México, D.F. ** Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Correspondencia:

Dr. Esaú Floriano-Sánchez

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, C.P. 11649, México, D.F. Tel./Fax: 5540-0759. Ext. 4 y 2.

Recibido: Febrero 9, 2007.

Aceptado: Enero 7, 2008.

Introducción

Las citocinas son proteínas secretadas por diversas células,¹ ejercen su acción en las mismas células que también producen citocinas (acciones autócrinas) o pueden actuar en otras células blanco (acción parácrina), tienen diversas funciones, incluyendo entre ellas inducción del crecimiento y diferenciación celular, actividades citolíticas, apoptosis, quimiotaxis. En el contexto inmunológico los términos linfocinas o monocrinas fueron utilizados en un principio para designar el origen celular de las citocinas,¹ adoptando este término por primera vez en 1974 por Stanley Cohen.² Por otro lado, el término “interleucina” (IL) se refiere a citocinas que son producidas por leucocitos y que actúan en otros leucocitos,³ están involucradas en funciones de defensa inmunológica del organismo donde tienen una acción predominante en leucocitos y generalmente local, no obstante, algunas interleucinas son producidas por otros tipos celulares

como son la IL-1 e IL-6 que actúan a su vez en otros tipos celulares; IL-7, por ejemplo, es producida predominantemente por el tejido estromal y no precisamente por algún tipo de leucocito.

Las citocinas son proteínas pequeñas que tienen un peso molecular 8-80 kilodalton (kDa), la producción de estas moléculas suele ser transitoria y se regula de forma estrecha, generalmente no se producen ni actúan de manera aislada, sino que lo hacen en el contexto de una red compleja en la cual la producción de una citocina modifica la producción o la respuesta ante otras, se unen con receptores específicos de la membrana celular, desencadenando una cascada de respuestas implicadas en la inducción, amplificación o inhibición de una serie de genes regulados por citocinas a nivel nuclear.⁴ Las citocinas desempeñan un papel central en la regulación positiva y negativa de las reacciones inmunitarias y en la integración de las mismas con otros compartimientos fisiológicos. Por otro lado, las células TH CD4* (lin-

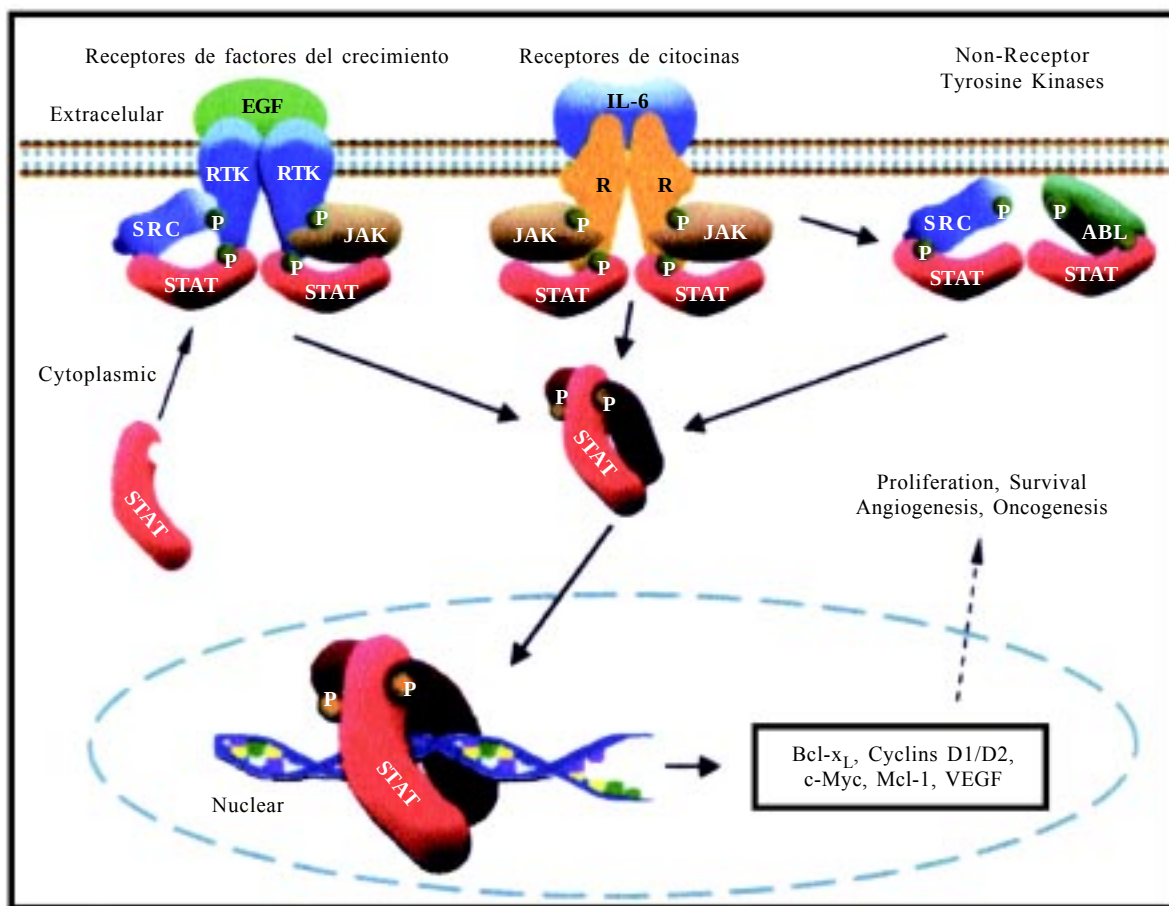


Figura 1. Vía oncogénica y normal de señalización de factores Stat. La estimulación celular por factores de crecimiento o citocinas inducen la dimerización de los receptores que llevan a la activación de las tirosin cinasas intrínsecas (EGF) o activación de Jaks asociadas (IL-6, IL-10). Ambos tipos de receptores fosforilados en su región intracelular, pueden fosforilar factores monoméricos e inducir, así el reclutamiento de los mismos. La fosforilación de los factores Stat induce su dimerización se transportan al núcleo y se une directamente al DNA, en los sitios de elementos de respuesta y regula directamente la expresión de determinado(s) gen(es). En células normales los factores Stat regulan la expresión del gen en forma transitoria y estrecha, cuando la activación es constante en los Stat, como Stat 1, Stat 3 y Stat 5 se asocia con cambios permanentes en la expresión del gen o los genes que controlan los procesos fundamentales y se desarrollan procesos oncogénicos, por medio de regulación positiva de genes que codifican inhibidores de la apoptosis (Bcl-xL, Mcl-1), reguladores del ciclo celular (Ciclinas D1/D2, d-Myc) e inductores de la angiogénesis.

focitos T cooperadores) presentan dos perfiles distintos de producción de citocinas (TH1 y TH2)^{5,6} estos perfiles determinan el tipo de respuesta básica mediada por este tipo de células. Dentro de las citocinas típicas TH1 destacan el interferón- γ (IFN γ), el factor de necrosis tumoral- β (TNF β) la IL-2 y este tipo de perfil de secreción celular está implicado en las reacciones inflamatorias mediadas por células. Asimismo, varias citocinas del tipo TH1 activan reacciones citotóxicas, inflamatorias y de hipersensibilidad retardada, mientras que las células con perfil de secreción de citocinas TH2, producen IL-4 e IL-5 de forma característica, produciendo además con frecuencia IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 estimulando la producción de anticuerpos, en particular IgE. Las citocinas TH2 se asocian con la regulación de las respuestas alérgicas y de anticuerpos de gran magnitud. Las citocinas tipo TH1 inhiben las acciones de las TH2 y al contrario, por lo que la respuesta inmune suele ser de tipo TH1 o de TH2. La elección de TH1 o TH2 resulta fundamental para que la inmunidad sea eficaz y parece que múltiples factores condicionan esta decisión.⁷

Se incluyen como citocinas las interleucinas que van de la IL-1 a la IL-22, los interferones (IFN), los factores estimulantes de colonias (CSF), así como el factor de necrosis tumoral (TNF). De acuerdo a su estructura se clasifican en tipo I y tipo II, las tipo II están representadas principalmente por

una familia muy conservada, la familia de interferones (IFNs), pero la distinción entre citocinas tipo II y las citocinas tipo I, se basa en que las citocinas tipo II tienen receptores que comparten homologías estructurales.⁸ De acuerdo con la homología entre los receptores de citocinas tipo II, la interleucina-10 (IL-10) se clasifica como citocina de tipo II por compartir su receptor similitudes estructurales con el receptor de IFN γ .⁹

Por otro lado, la habilidad de las citocinas para influir en el curso de la diferenciación y el crecimiento de la célula blanco depende únicamente del reconocimiento y unión a receptores específicos, que desencadenan dentro de la célula mecanismos de amplificación de señales¹⁰ (Figura 1). La superfamilia de receptores de citocinas, se caracteriza por una región extracelular con homología estructural de unos 200 residuos de aminoácidos (a.a.) y a ella pertenecen los receptores para la IL-2 hasta la IL-9, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), además de receptores de factores cuya actividad no se produce a nivel inmune (Figura 2). Una segunda familia de receptores de citocinas relacionados, forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y comprende receptores para todos los tipos de IFNs e IL-10, además de los receptores para IL-1 y M-CSF. Una tercera familia la consti-

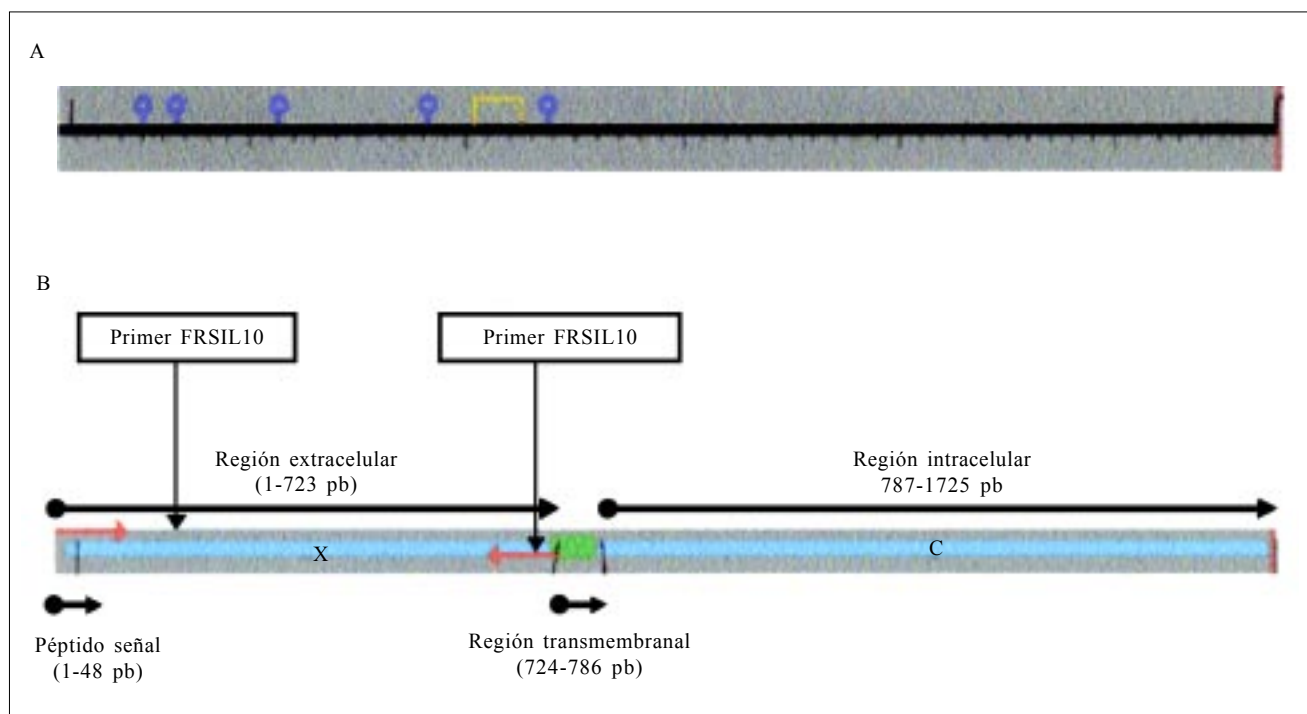


Figura 2. Receptor de IL-10 (mIL-10R1) y esquema de las regiones del cDNA que lo codifica. **A)** Representación de la proteína, figuras moradas representan azúcares, la figura amarilla es un enlace de disulfuro. N es una n-glicosilación, la línea negra más ancha representa la cadena primaria de residuos de a. a. En **B)** se representa a el cDNA (línea azul) que codifica la proteína representada en (A), indicando con flechas las regiones; de izquierda a derecha, péptido señal (1-48 pb), región extracelular (1-723 pb), región transmembranal (724-786 pb), región intracelular (787-1725 pb). Se diseñaron primers específicos (FRSIL10 RRSIL10) para amplificar la región extracelular como se muestra en la figura y el producto amplificado se insertó en un vector de clonación (ver materiales y métodos).

tuyen los receptores para TNF- α , TNF- β , linfotoxina (LT) y una serie de citocinas relacionadas como el factor de crecimiento nervioso y Fas (CD95). La mayor parte de los receptores de citocinas son glucoproteínas de membrana, con un único dominio transmembranaral, sin embargo, el receptor funcional comprende en general de dos o más subunidades. Como se ha afirmado,⁴ el primer paso en la comunicación por citocinas es la agregación de los diversos compo-

nentes del receptor inducida por la unión del ligando, las regiones intracelulares de las subunidades del receptor interactúan para iniciar una cascada de señales (Figura 3). Todas las superfamilias de receptores de citocinas, junto con algunos representantes de otras familias, se asocian con moléculas denominadas cinasas Janus.^{4,11,12} La activación del receptor induce la fosforilación de sus tirosinas y la activación de Jak_s y Stat_s que son necesarias para la

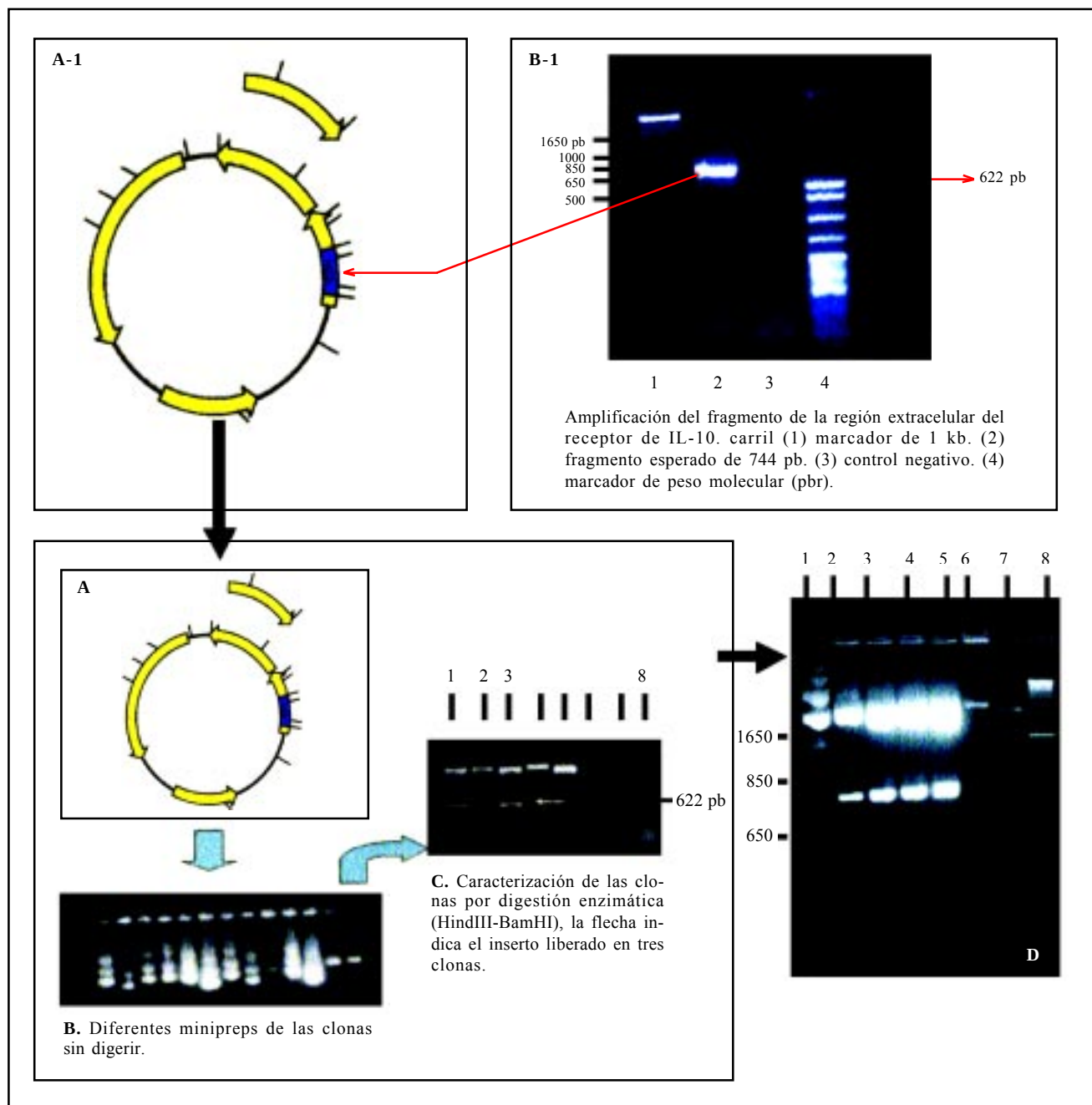


Figura 3. Amplificación, clonación y subclonación del cDNA que codifica la región extracelular de smIL-10R1. Clonación directa de producto de PCR del fragmento del carril 2 (**B-1**), en pBluescript II KS (+) (**A-1**). **A**) Esquema del vector de clonación con el inserto. **B**) Minipreps sin digerir de las diferentes clonas con el inserto. **C**) Caracterización de las clonas por digestión con enzimas HindIII y BamHI en forma secuencial, el fragmento es liberado en los carriles 1-3 (644 pares de bases) de las cinco clonas exploradas, carril 8 marcador de peso molecular PBR. **D**) Fragmentos liberados (carriles 2-5) del vector de expresión pCDNA6A banda de 644 pb (ver materiales y métodos).

mayoría, aunque no de todas las funciones del receptor (Figura 3).

La función principal de las citocinas es regular la agregación concomitante de su receptor y de las Jak_s. Posteriormente las cinasas Jak_s acoplan la unión del ligando con la fosforilación de las tirosinas de varias proteínas de comunicación, incluidas las transductoras de señales y las activadoras de la transcripción (Stat).¹³ Los dímeros de Stat se translocan al interior del núcleo, donde se unen directamente al ADN (Figura 3). La gama de respuestas de los factores Stat

es amplia, de manera que cada citocina activa a un grupo distinto de estos factores, los cuales están implicados en las respuestas funcionales de las citocinas, en el *cuadro 1* se indican los factores Jak y Stat que son activados por las citocinas.¹⁴⁻¹⁹

Los factores Stat^{18,19} comprenden una familia de factores de transcripción citoplasmáticos que transmiten señales, usualmente generadas en los receptores de la membrana celular, son dirigidos hacia el núcleo donde se unen a promotores específicos localizados en el DNA, regulando de esta

Cuadro 1. Familia de los factores Jak y Stat que son activadas por diversas citocinas.

Citocina	Stat activado	Jak activado
IFN- α/β	Stat1, Stat2	Jak1, Tyk2
IFN- γ	Stat1	Jak1, Jak2
Hormona del crecimiento	Stat5a, Stat5b	Jak2
Prolactina	Stat5a, Stat5b	Jak2
Eritropoietina	Stat5a, Stat5b	Jak2
Trombopoietina	Stat5a, Stat5b	Jak2
IL-10	Stat1, Stat3, Stat5b	Jak1 y Tyk2
IL-12	Stat4, Stat3	Jak2, Tyk2
G-CSF	Stat3	Jak1, Jak2
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	Stat5a, Stat5b, Stat3	Jak1, Jak3
IL-4	Stat6	
IL-13	Stat6	
IL-3, IL-5, GM-CSF	Stat5a, Stat5b	Jak2 ? Jak1
Familia gp130		Jak1, Jak2, Tyk2
IL-6, IL-11	Stat3	
Leptina	Stat3	

Factores Stats y Jak_s que son activados por las diferentes citocinas.

Cuadro 2. Factores Stat con actividad aumentada en diversos tumores humanos.

	Activated STAT
Blood tumors	
Multiple myeloma	Stat1, Stat3
Leukemias	
HTLV-I-dependent	Stat3, Stat5
Erythroleukemia	Stat1, Stat5
Acute lymphocytic leukemia	Stat1, Stat5
Chronic lymphocytic leukemia	Stat1, Stat3
Acute myelogenous leukemia	Stat1, Stat3, Stat5
Chronic myelogenous leukemia	Stat5
Megakaryotic leukemia	Stat5
Large granular lymphocyte leukemia	Stat3
Lymphomas	
EBV-related Burkitt's	Stat3
Mycosis fungoides	Stat3
HSV saimiri-dependent (T-cell)	Stat3
Cutaneous T-cell lymphoma	Stat3
Hodking's disease	Stat3
Solid tumors	
Breast cancer	Stat1, Stat3
SCCHN	Stat1, Stat3
Renal cell carcinoma	Stat3
Melanoma	Stat3
Ovarian carcinoma	Stat3
Lung cancer	Stat3
Prostate carcinoma	Stat3
Pancreatic adenocarcinoma	Stat3

Activación constitutiva de factores Stat en líneas celulares de cáncer y en tumores primarios en humanos.

manera la expresión de genes¹⁹ (Figura 3). Se conocen un total de siete diferentes factores de transcripción de esta familia, codificados en diferentes genes que ya han sido localizados en células de mamíferos.¹⁸

Por otro lado, la duración de la activación de un factor Stat en condiciones fisiológicas normales es temporal, usualmente de minutos a horas, no obstante en varios estudios se ha demostrado que hay una activación constitutiva de algunos factores Stat, en particular Stat 1, Stat 3 y Stat 5, en diversas líneas tumorales humanas.²⁰⁻²²

En el cuadro 2 se muestran los factores Stat, cuya actividad está aumentada en diversos tumores humanos, entre los que se incluyen neoplasias de la sangre (leucemias, linfomas y múltiples mielomas), así como tumores de tejidos sólidos (cabeza, cuello y cáncer de próstata),²³⁻²⁵ por otro lado, estos estudios muestran una fuerte evidencia de que las señalizaciones aberrantes por los factores Stat, particularmente Stat 1, Stat 3 y Stat 5, participan en el desarrollo y progresión de los tumores en humano por diversas vías de señalización, ya sea inhibiendo la apoptosis, induciendo la angiogénesis o la proliferación celular.²⁵

En el cuadro 1 se observa que hay citocinas que activan varios factores "Stat" que están implicados en las vías oncogénicas, que a su vez se relacionan con neoplasias malignas, entre las citocinas que están implicadas en esta vía se incluye en primer lugar a la IL-10.

La IL-10 es una interleucina de tipo TH2, que se produce espontáneamente en el sitio del tumor,²⁶ se ha reportado que su concentración sérica se incrementa en pacientes con ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, en tumores de ovario,²⁷⁻²⁹ diversos carcinomas,²⁹⁻³³ melanomas^{34,35} y linfomas/mielomas.³⁶ La IL-10 es secretada espontáneamente por las células tumorales,²⁶ lo que sugiere que su expresión induce, como factor o cofactor autócrino, la proliferación celular,²⁵ activando algunos de los factores Stat relacionados con la vía oncogénica (Cuadro 2), inhibiendo, por otro lado, la respuesta antitumoral.

IL-10 es una proteína de 178 aminoácidos (a.a.), el gen se encuentra en el cromosoma uno, igual que en el ratón, hIL-10 e IL-10 de ratón (mIL-10) tienen un 73% de similitud en sus a.a. y pertenecen a la clase II de citocinas.³⁷

La función de la IL-10, en el sistema inmunológico es diverso y muy complejo, esta interleucina inicialmente fue considerada como un factor inhibidor de la síntesis de citocinas,³⁸ incluyendo IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral, interferón- α y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago, el cual es producido por macrófagos y células T activadas, afectando la capacidad presentadora de antígenos por parte de moléculas MHC de clase II por regulación negativa de la expresión en los monocitos/macrófagos.³⁹ IL-10 estimula el crecimiento y/o diferenciación de las células B, mastocitos y timocitos⁴⁰ e induce la secreción de IgM, IgG, IgA, IgG1 e IgG3,⁴⁰ IL-10 también ha mostrado ser responsable de la inhibición de la síntesis de IFN- γ por varias estirpes celulares del sistema inmune, ambas citocinas muestran efectos antagonista en varios en-

sayos biológicos.⁴¹ Se sabe que hIL-10 tiene potentes efectos inmunosupresores, así como propiedades antiinflamatorias,⁴¹ y es producida, como nos referimos arriba, por algunos tipos de tumores y líneas celulares. Por otro lado, se sabe que los diferentes efectos biológicos de IL-10 son mediados por su receptor nativo en la superficie de la célula blanco. Los receptores de hIL-10 y mIL-10 (hIL-10R1 o mIL-10R1) pertenecen a la clase II de receptores de interleucinas.⁴²⁻⁴⁴ El receptor hIL-10R1 se ha caracterizado química y estructuralmente, es una glicoproteína integrante de membrana⁴² de 578 a.a. Este receptor forma una estructura en forma de "V", las superficies de las láminas- β forman esta estructura para unir la superficie de la estructura en forma de diamante^{42,45} de la IL-10. Este receptor, como el del ratón, no presenta el segundo par de cisteínas conservadas en la región extracelular que presentan la clase II de receptores de citocinas (CRs).⁴²

Actualmente se sabe que el receptor de IL-10 lo forman dos subunidades, que son miembros de los receptores de la familia de IFNs. El complejo consiste en dos monómeros del receptor uniendo el homodímero de hIL-10,^{44,46,47} sin embargo, para que inicie la transducción de señal, vías Jak y Stat, es necesario que estén presentes las dos cadenas del receptor de IL-10, IL-10R1 y IL-10R2 (receptor orphan-CRF2-4),^{42,48,49} este último compartiendo dos cadenas monoméricas dentro del complejo.⁴⁸

De tal manera que el dominio extracelular del receptor, es responsable de la unión a IL-10; primero IL-10 se une con gran afinidad a IL-10R1 (500 pM),⁴⁷ después el complejo formado es reconocido con baja afinidad por IL-10R2,⁴⁸ de tal forma que el complejo consiste en dos dímeros de IL-10 y cuatro cadenas del receptor.⁴⁴⁻⁵⁰ El dominio intracelular de las cadenas IL-10R1/IL-10R2 activan a Jak 1, Stat 3, Stat 5 y Tyk-2, respectivamente.⁴⁸

IL-10 contribuye al crecimiento tumoral, actúa de diversas formas, como un potente inmunosupresor, así como factor o cofactor de crecimiento autócrino o causante de angiogénesis;⁵¹ su función, como un factor de crecimiento, se ve al estimular el crecimiento y la diferenciación de células B,⁴¹ así también su función como factor o cofactor autócrino de crecimiento tumoral se ve demostrado en ciertos tipos de linfomas de las mismas células,^{52,53} de igual manera esta actividad se ha observado en ciertos melanomas^{34,35,54} y en la proliferación de una línea celular de mielomas.⁵² Estos datos, de la contribución de IL-10 como factor autócrino de proliferación celular, se ven reforzados en experimentos en que se neutraliza la IL-10⁵¹ con un anticuerpo específico (Berumen y cols.). Por otro lado, un receptor soluble de hIL-10 recombinante⁴⁴ (shIL-10R1) ha sido expresado, y a concentraciones relativamente elevadas se demostró que ejerce propiedades antagonicas *in vitro* contra la IL-10. Este receptor soluble de hIL-10 (shIL-10R1) es capaz de formar un complejo shIL-10R1/hIL-10 e inhibir la actividad biológica *in vitro* de hIL-10, este antagonismo biológico es similar a los reportados con los receptores solubles de interleucina-4, interleucina-7, eritropoyetina, TNF e IFN- γ .⁵⁶⁻⁵⁸ Por otro lado, se ha demostrado que

el receptor completo de ratón (mIL-10R1) puede unir tanto a la hIL-10 como a la IL-10 de ratón.⁴⁴

Se ha sugerido previamente la contribución de varias citocinas inmunosupresoras a la progresión del crecimiento tumoral en varios tipos de cáncer,^{41,59} y se ha demostrado que la IL-10 contribuye como un factor autócrino a la proliferación de células tumorales,^{51,52,60} además se ha estudiado que dicho efecto se inhibe al neutralizar a la IL-10 con un anticuerpo anti IL-10⁵¹ y con un receptor soluble (shIL-10R1) que inhibe su actividad biológica *in vitro* tanto en macrófagos como en células “B”.⁴⁴ Es de interés demostrar que el cDNA que codifica la región extracelular del receptor de la IL-10 de ratón (smIL-10R1), puede ser expresado en forma soluble extracelular y que ésta proteína recombinante es capaz de inhibir los efectos autócrinos de proliferación celular *in vitro* en una línea tumoral que secreta la IL-10.

Materiales y métodos

Se realizó una construcción genética (p6EIL10R1), que codifica la región extracelular del receptor de la IL-10 (smIL-10R1), con la cual se transfectó de manera estable la línea celular B16F0 (B16-SR), se analizó si la proteína era secretada en el sobrenadante de la línea celular en cultivo, y se empleó para ello la técnica de Western Blot y se estudió el efecto de la proteína recombinante sobre la mIL-10, por medio del análisis de la proliferación celular de la línea tumorigénica de melanoma B16-10 al ser expuesta a la proteína recombinante.

Construcciones genéticas

Se aisló el RNA total, por medio de la técnica de trizol (Gibco BRL), de linfocitos de bazo de ratón de la cepa C57BL/6, dicho bazo se obtuvo previa aplicación de LPS intraperitoneal (Current Protocols in Immunology), y utilizando transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en un solo paso (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq) (Gibco BRL), se obtuvo el fragmento que codifica la región extracelular del receptor de mIL-10, empleando los siguientes oligonucleótidos que flanquean el fragmento deseado, que a la vez incorporan sitios de restricción en ambos extremos FRSIL10 (HindIII) 3' AGCA-AGCTTATGTTGTCGCGTTTGCTCCCATTCCTC5' y RRSIL10 (BamHI) 3' TATTTCACTGTGACCAACCTGAGCATCATTCTAGGCGA 5' respectivamente (Figura 2), la reacción se llevó a cabo en 50 µL utilizando ambos oligonucleótidos (FRSIL10-RRSIL10) a una concentración de 0.2 µM, 25 µL 2X Reaction Mix, 5 µL de RNA total, 1 µL de RT Platinum Taq Mix, 1.5 µL de 50 µM de MgSO₄, para la amplificación del cDNA se utilizó el termociclador 9600 (Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones, un ciclo de 54 °C por 30 minutos, 94 °C por dos minutos y para la amplificación (PCR), 94 °C por 15 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C por 40 segundos, por 40 ciclos y al final un ciclo de 72 °C por 20 minutos. El producto de RT-PCR se clonó íntegro como producto de PCR en el vector de clonación pBluescript II

SK (+), donado amablemente por el Dr. Nicolás Villegas del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV (IPN, México, D.F.), finalmente se verificó mediante secuenciación que no hubiera mutaciones en el fragmento. Se liberó el inserto (ver resultados) con las enzimas HindIII y BamHI 10U cada una y se purificó el fragmento con el sistema de resina comercial (Quiaex), para ser subclonado en los vectores de expresión eucariotas pCDNA6 “A” y pCDNA6 “A” LacZ (control positivo). La transformación se realizó en *E. coli* DH5α con 20 µL de volumen total de ligación, y posteriormente se seleccionaron las clonas positivas de las construcciones plasmídicas p6EIL10R1 y p6ZEIL10R1, por digestión enzimática con HindIII-BamHI (ver resultados), verificando por secuenciación que no hubiera mutaciones en el fragmento.

Líneas celulares y transfecciones genéticas

Se cultivó la línea murina tumorigénica melanoma-B-16F0, que fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville MD, USA), derivada de un tumor espontáneo de la cepa de ratón transgénico C57BL/6, la cual es tumorigénica al ser aplicada vía subcutánea (s. c.). Se cultivó también la línea B16-10 que fue obtenida por el Dr. J. Berumen y cols. tras la transfección de forma estable con el cDNA de mIL-10. Esta línea fue utilizada para el estudio de inhibición de la proliferación, debido que al secretar mIL-10 provoca una mayor proliferación celular comparada con la no transfectada (B16-F0).⁵¹ Se cultivaron en botellas de 30 cm², con Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), bajo en glucosa, con L glutamina 110 mg/L de piruvato de sodio, hidrocloreto de piridoxina y bicarbonato de sodio, penicilina-estreptomicina (Gibco BRL cat. 31600-034), suplementado a 10% con suero fetal bovino (SFB) y 600 µg/mL de antibiótico G418 (Boehringer-Mannheim; Mannheim, Germany). Las dos líneas celulares se expandieron y una parte de ellas se criopreservaron para posteriores estudios. Las células B16 expandidas, que se utilizaron para las transfecciones, se despegaron utilizando amortiguador PBS-tripsina-EDTA, se centrifugaron tres minutos a 1,200 rpm para resuspensión y conteo, se sembraron en cajas de seis pozos en medio DMEM.

Las transfecciones de forma transitorias y estables se realizaron con el método de lipofectamina (Gibco BRL cat. No. 10964-013), con las construcciones genéticas p6EIL10R y p6ZEIL10R1 (control positivo); las transfecciones se llevaron a cabo al día siguiente de la siembra en cajas de seis pozos evitando el uso de antibiótico, para cada pozo se diluyeron 2 µg de ADN (construcciones plasmídicas) en 100 µL de medio libre de suero (SFB), se agregó 10 µL del reactivo plus al ADN diluido. Se incubó durante 15 minutos; en un segundo tubo se diluyeron 15 µL de lipofectamina en 100 µL de medio libre de suero (D-MEM), se combinó el precomplejo ADN-plus y lipofectamina, después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (TA) se agregó el precomplejo formado, reemplazando previamente el medio celular de cada pozo por medio nuevo de transfección, se mezcló gentilmente y se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ por cinco horas,

después se incrementó a volumen total el medio de cultivo en cada pozo. A las 48 horas de iniciadas las transfecciones se colectó el sobrenadante 1.5 mL agregando inhibidor de proteasas, otros pozos se tripsinizaron y las células obtenidas se contaron, centrifugaron y lavaron con PBS para ser procesadas con la técnica de trizol para la obtención de RNA total, a los cuales se les realizó RT-PCR para verificar la adecuada producción de los transcritos de ARN mensajero de las construcciones genéticas transfectadas. Para determinar la eficiencia de las transfecciones, se procedió a la detección *in situ* de la actividad de β -gal a las 48 horas; en las células transfectadas con el control positivo (p6ZEIL10R) se procedió primero a la eliminación de medio de cultivo, lavando las células adheridas con 2 mL/pozo D-PBS con calcio y magnesio (Gibco BRL cat. No. 144040-133), posterior a este lavado se le agregó 1 mL de medio de fijación, después de cinco minutos a TA se procedió a dos lavados con 2 mL de D-PBS para enseguida agregar 1 mL de solución de sustrato que se incubó por cuatro horas. Se lavó el pozo con 2 mL de D-PBS (Gibco BRL) y se observaron las células teñidas bajo microscopio invertido (*Figura 4*). La selección de las células estables se inició a 48 horas de la transfección, con una concentración de 7.5 μ g/mL de blasticidina después de 12 días de selección, se obtuvieron las células estables.

Detección del receptor soluble de IL-10 en el sobrenadante de células en cultivo

Las clonas obtenidas (B16F0); las transfectadas estables con el inserto (B16-SR), sin el inserto y las no transfectadas, fueron cultivadas por 48 horas a una densidad inicial de 2×10^6 células/caja de 30 cm², en 2 mL de medio DMEM libre de suero. El sobrenadante fue removido para precipitación de proteínas totales con ácido tricloroacético; a 1 mL de sobrenadante se le agregó 0.250 mL de ácido tricloroacético, tras agitación vigorosa se incubó en hielo por 30 minutos, centrifugación por 15 minutos a 14,000 rpm a 4 °C, se removió el sobrenadante, el botón obtenido se lavó cuatro veces con 0.300 mL de acetona fría (-20 °C), se secó el botón en termoblock a 95 °C por siete minutos y se resuspendió en 40 μ L de solución a 1% de SDS bajo calentamiento a 50 °C y finalmente para eliminar el resto de material insoluble se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se almacenaron las muestras a -20 °C para detección de la proteína por medio de la técnica de Western Blot.

El precipitado de proteínas fue analizado por Western Blot, utilizando los anticuerpos IL-10R (K-20 cat. sc-987), IL-10R (M-20 cat. sc-985) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) el primero reconoce la región extracelular amino terminal del receptor mIL-10R1, el segundo la región carboxilo terminal intracelular. Para análisis cuantitativo de la proteína recombinante, se colocaron muestras de albúmina (50 ng a 900 ng) y los resultados fueron analizados por densitometría con el programa KS300 (analizador de imágenes, Carl Zeiss axio-vision Inc.).

Inhibición de la proliferación celular de la línea tumorigénica B16-10 *in vitro*

La proliferación celular de la línea tumorigénica melanoma B16-10, fue medida con un Kit colorimétrico (incorporación de BrdU; Boehringer-Mannheim) de acuerdo CON las especificaciones del proveedor. Se tripsinizaron los cultivos celulares, lavando dos veces con PBS, y previo análisis de viabilidad y conteo, se sembraron en caja de 96 pozos cada uno con 3000 células en 200 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, después de 24 horas se les agregó para los ensayos de inhibición, el precipitado de proteínas, 1.5 μ g de proteínas totales por pozo (100 ng de smIL-10R1), de tres cajas de cultivo, para analizar el efecto, de la proteína recombinante en la proliferación celular. En otros pozos se agregó sólo medio (control negativo), precipitado de clona transfectada con plásmido vacío, precipitado de B16-0 y el anticuerpo anti-IL-10 que se tomó como control positivo (bloquea la actividad de la mIL-10); y en otro experimento en las mismas condiciones (para contrarrestar los efectos del receptor soluble), previa incubación de los mismos precipitados con el anticuerpo IL-10R (K-20), se agregó al medio de cultivo el precomplejo (receptor bloqueado) y en otro ensayo se agregó sólo medio. En todos los ensayos las células se incubaron por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurridas las 48 horas de incubación, se les agregó a cada pozo 20 μ L de BrdU por ocho horas, después de ser removido el medio de cada pozo y secado por 15 minutos las células fueron fijadas y el DNA desnaturalizado con el reactivo FixDenat por 30 minutos. Se removió el fijador y se agregó el anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa (anticuerpo monoclonal híbrido de ratón-clon BMG 6H8, Fab), se incubó por 90 minutos a TA, después se lavaron los pozos tres veces con solución de lavado. Se agregó 100 μ L de sustrato (tetrametil-benzidina) y la actividad de la peroxidasa fue detectada midiendo el cromógeno oxidado a 490 nm. Por otro lado, al terminar la medición óptica, se procedió al conteo celular de cada pozo tomando microfotografías (nueve por cada pozo) y analizándolas con el software KS300, para determinar si había o no diferencias en el número de células entre los diferentes pozos.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y repetidos independientemente en tres ocasiones, los datos mostrados son representativos de los ensayos realizados en este estudio. Los resultados de la concentración del receptor truncado y de las densidades ópticas (DO), se expresan como la media de (*n*) observaciones $\pm$ error estándar. Las diferencias en la proliferación celular de las líneas B16-10 y B16F0, fue determinada por análisis de varianza de dos vías (ANOVA). La diferencia fue considerada significativa con un valor de $p < 0.05$. Los datos se analizaron con el software SIGMA-STAT.

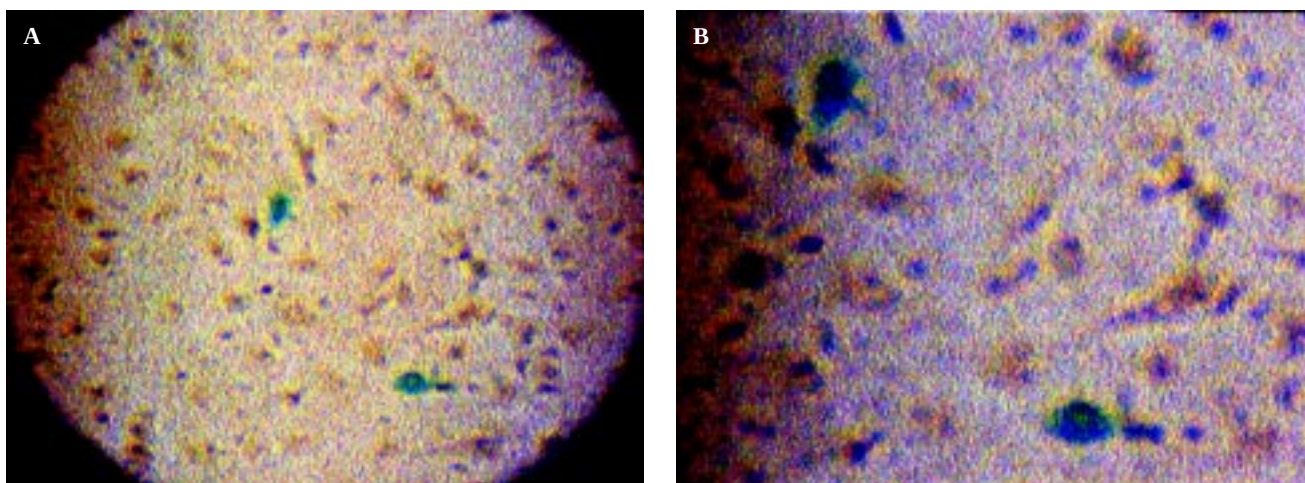


Figura 4. Detección “*in situ*” de la actividad de la proteína reportera (β -gal) en células B16F0, transfectadas con la construcción genética control. **A y B.** Microfotografías de cultivo celular línea B16F0, el color azul indica actividad de la proteína reportera β -gal en las células transfectadas en forma transitoria, estas células fueron transfectadas con la construcción genética p6ZEIL10R1 (control positivo) para determinar la eficiencia de transfección (conteo celular con el software KS300).

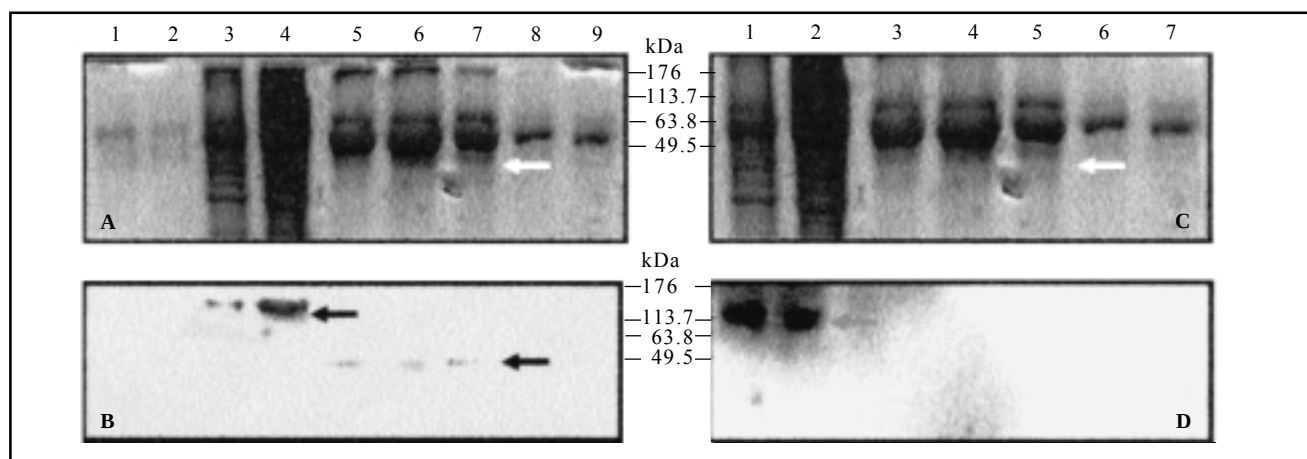


Figura 5. Detección de la proteína recombinante (smIL-10R1) en el sobrenadante de las células transfectadas estables. **A)** Gel de poliacrilamida desnaturalizante a 13%, carriles 1 y 2 banda de albúmina 200 y 100 ng, respectivamente, 3 y 4 precipitado de proteínas totales de leucocitos de bazo de ratón. 5, 6 y 7 precipitado de proteínas de los sobrenadantes de las células transfectadas con la construcción genética (clona B16-SR) se colocaron $\pm 1.5 \mu\text{g}$ de proteínas totales, la flecha indica la posible banda del receptor truncado. 8 precipitado de proteínas de sobrenadante de células B16F0 transfectadas con plásmido vacío, 9 precipitado de proteínas de sobrenadante de cels. B16F0 sin transfectar. En la figura “**B**” (después de transferir las proteínas de gel (**A**) a membrana de inmóvilom y revelado), Western Blot, donde se observa en carriles 3 y 4 banda revelada, señalada con la flecha, correspondiente al receptor completo de mIL-10R1 de 90 a 110 kDa, utilizando como anticuerpo primario Ab que reconoce la región amino-terminal extracelular (K-20), en carriles 5, 6 y 7 se ve la banda (indicada con la flecha) entre 35 y 45 kDa, que corresponde al receptor truncado de IL-10 utilizando el mismo anticuerpo. En los carriles 8 y 9 (controles negativos) no se detectó la proteína. **C)** Gel de poliacrilamida desnaturalizante a 13%, carriles 1 y 2 precipitado de proteínas totales de leucocitos de bazo de ratón. Carriles 3, 4, 5 precipitado de proteínas de los sobrenadantes de las células transfectadas con la construcción genética (clona B16-SR) se colocaron $\pm 1.5 \mu\text{g}$ de proteínas totales. Carril 6 precipitado de proteínas de sobrenadante de células B16F0 transfectadas con plásmido vacío, carril 7 precipitado de proteínas de sobrenadante de cels. B16F0 sin transfectar. En la figura “**D**” (después de transferir las proteínas del gel de la figura “**C**” a membrana de inmóvilom y revelado), Western Blot, donde se observa en carriles 1 y 2 banda revelada correspondiente al receptor de mIL-10R1 de 90 a 110 kDa, utilizando como anticuerpo primario (M-20) que reconoce la región carboxilo-terminal intracelular (ver materiales y métodos), en los demás carriles no se detectó la banda.

Resultados

Clonación y caracterización de la construcción genética que codifica la región extracelular del receptor de la IL-10 (smIL-10R1)

Se obtuvo una clona (p6EIL10R) que codifica la región extracelular del receptor (smIL-10R1) de mIL-10 (smIL-10R1),

subclonado en el vector pCDNA6⁺A” (Figura 3). Mediante análisis de restricción se demostró que el fragmento de DNA clonado fue del tamaño esperado (744 pb; Figura 5-D) y por secuenciación se demostró que el fragmento extracelular del receptor de IL-10 (smIL-10R1) estaba clonado en la orientación apropiada, no presentaba ninguna mutación y presentaba el marco de lectura correcto.

Para investigar si la construcción genética p6EIL10R expresaba el transcrito esperado, se transfeció la línea celular B16F0 en forma transitoria y se exploró mediante la técnica de RT-PCR. Como se observa en la *figura 6*, la construcción p6EIL10R codifica la región extracelular del receptor de IL-10 (banda de 744 pb). Posteriormente en el sobrenadante de las células transfectadas en forma transitoria, se exploró la pre-

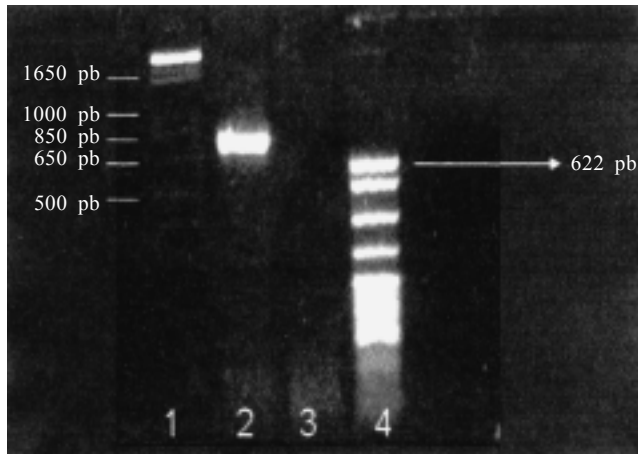


Figura 6. Detección del RNAm que codifica el receptor truncado (smIL-10R1) en la célula transfectada con la construcción creada. Por medio de la técnica de trizol, se extrajo RNA total de un pelet de las células B16F0 transfectadas en forma estable con el cDNA que codifica la región extracelular del receptor de la IL-10 y por medio de RT-PCR en un solo paso, se detectó la banda de el RNAm que codifica la proteína recombinante. (1) Marcador de 1 kb, (2) Banda de 744 pb., muestra de RNA total de cels. Transfectadas, (3) control donde se agregó RNA total de cels.

sencia del receptor truncado mediante la técnica de Western Blot, utilizando anticuerpos contra la región amino-terminal del receptor de la IL-10 (K-20; detecta la región extracelular) y como control un anticuerpo contra la región carboxilo-terminal (M-20) que detecta la región intracelular. En varios experimentos realizados no se detectó la banda del receptor truncado de IL-10 en el sobrenadante de las células transfectadas en forma transitoria. Dado que la eficiencia de la transfección fue de sólo 5% (*Figura 4*; ver materiales y métodos), la falta de la detección de la banda del receptor truncado pudiera ser explicado por esta baja eficiencia. Por tal motivo se transfectaron células en forma estable con la clona p6EIL10R1. Como se observa en la *figura 5*, cuando se utiliza el anticuerpo K-20 se detecta una banda de 45 kDa en el sobrenadante de las células transfectadas (ver carriles 5, 6 y 7; *figura 5-B*). En cambio, en los extractos proteicos de leucocitos que se utilizaron como control, muestran con este anticuerpo (K-20) una banda de 120 kDa (ver carriles 3, 4; *figura 5-B*); esta banda corresponde al peso molecular del receptor completo de IL-10. Para confirmar que en el sobrenadante de las células transfectadas no existe la región intracelular del receptor completo, exploramos los mismos sobrenadantes con el anticuerpo que detecta la región intracelular (M-20). Como se observa en la *figura 5-D*, no se detecta ninguna banda con este anticuerpo (ver carriles 3, 4 y 5; *figura 5-D*), en cambio, los extractos proteicos de leucocitos explorados con el anticuerpo M-20 presentan una banda del mismo tamaño que la detectada con el anticuerpo (K-20) (ver carriles 3 y 4 de *figura 5-B* y carriles 1 y 2 de *figura 6-D*). Estos datos indican claramente que la construcción p6EIL10R1, transfectada de forma estable en las células B16F0, induce la secre-

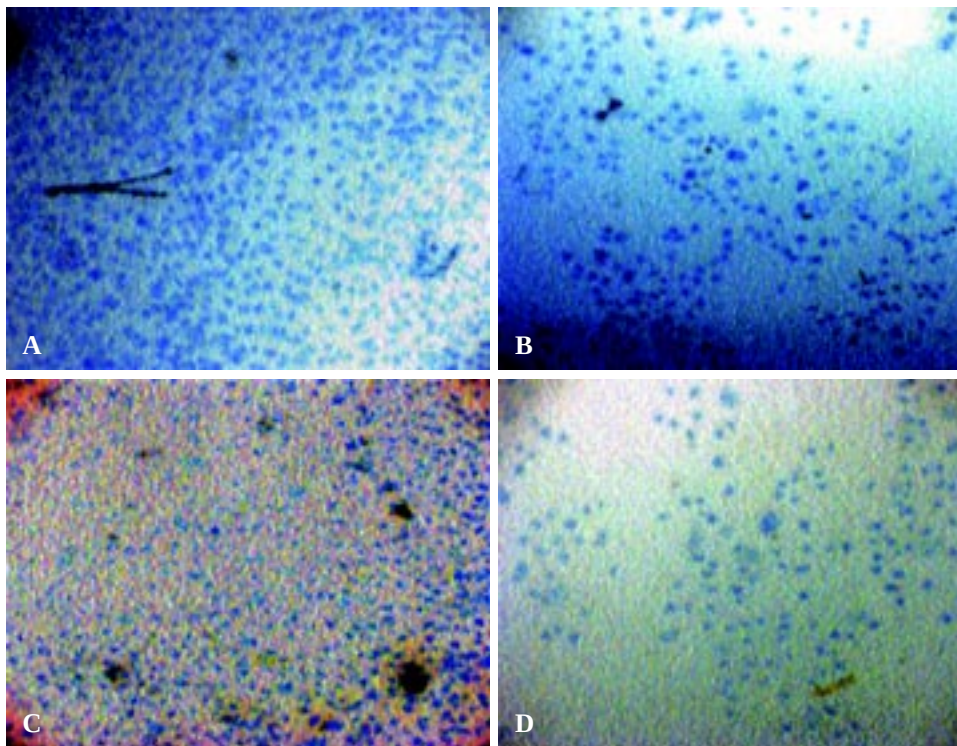


Figura 7. Inhibición de la proliferación celular de la línea B16-10 por el receptor truncado. En las cuatro microfotografías los puntos azules es ADN marcado del núcleo de las células B16-10. **A)** La línea celular B16-10 después de 48 horas de cultivo al que no se le agregó el receptor truncado. **B)** Control positivo, 48 horas después de haber agregado al medio de cultivo el anticuerpo anti-IL10. **C)** Después de 48 horas de cultivo, al que se le agregó el precipitado de proteínas de sobrenadante con la proteína recombinante. a la que antes de agregar al medio, se neutralizó con el anticuerpo antireceptor (K20) (ver materiales y métodos). **D)** Después de 48 horas de haber agregado el precipitado de proteínas de sobrenadante con el receptor soluble.

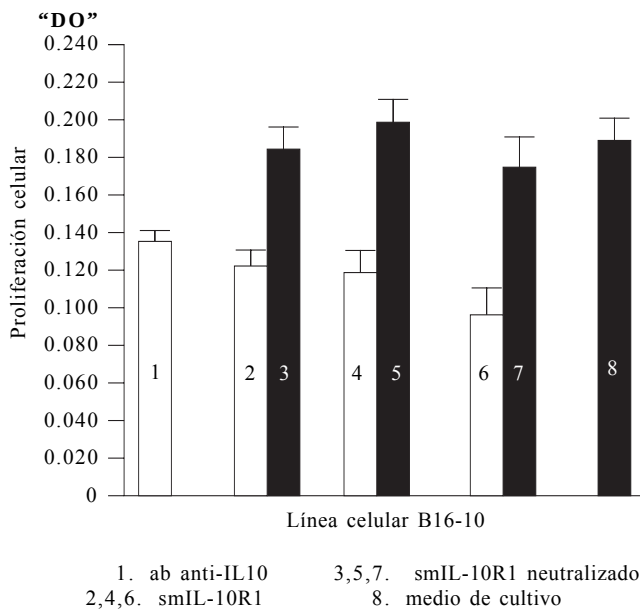


Figura 8. Inhibición de la proliferación celular de la línea B16-10 por el receptor truncado. La proteína recombinante (smIL-10R1) inhibe la proliferación celular de B16-10 cuando se agrega al medio de cultivo, como se ve en las barras 2, 4 y 6, dicha proliferación (2,4,6) se comporta como en 1, en que se neutraliza a IL-10 con un anticuerpo específico ($p \geq 0.05$), la inhibición de la proliferación es de 37% comparada con el control (solo medio) (barra 8) células a las que no se les agregó el receptor truncado ($p \leq 0.05$). El efecto mostrado por el receptor truncado se revierte, cuando se neutraliza el receptor truncado (smIL-10R1) (ver materiales y métodos) barras 3, 5 y 7, comportándose la proliferación celular similar al control como se ve en la barra 8 ($p \geq 0.05$). En todos los ensayos se determinó la proliferación por incorporación de BrdU marcada (ver materiales y métodos).

ción de la región extracelular del receptor de la IL-10 (smIL-10R1).

Para determinar la concentración de receptor truncado (smIL-10R1) secretado, se realizó un estudio cuantitativo mediante densitometría de las bandas obtenidas en el gel de poliácridamida utilizado para el Western Blot, utilizando una curva con la proteína de albúmina (ver materiales y métodos). Se encontró una concentración de 150 ng (± 6), el resultado se tomó como la secreción en 2 mL de medio de cultivo por 48 horas de 1.5×10^6 células.

El receptor truncado de IL-10 inhibe la proliferación celular de la línea tumorigénica B16-10 *in vitro*

Para investigar si el receptor smIL-10R1 inhibe la proliferación celular inducida por IL-10, se obtuvo un precipitado de proteínas totales del sobrenadante obtenido de las células transfectadas establemente con la construcción p6EIL10R1 y se agregó a un cultivo de células tumorales B16-10 que secretan IL-10. La proliferación celular de las células B16-10 disminuye en 47% ($p \leq (0.0002-0.0004)$) cuando se agrega el precipitado de proteínas con el receptor truncado (smIL-10R1; Figuras 7, 8 y 9), no observándose cambios cuando se agrega el precipitado proteico obtenido del control negativo (Figura 7-A). La disminución en la proliferación celular fue similar a la que se observa cuando se agrega el anticuerpo

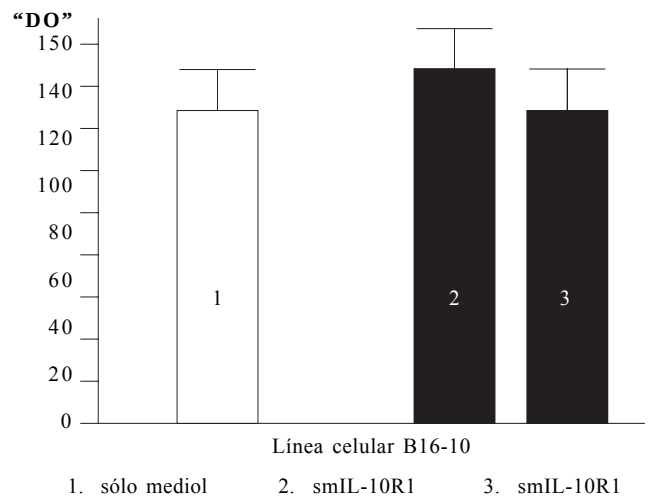


Figura 9. La proliferación celular de B16F0 no es afectada por el receptor truncado. Al cultivo celular de B16F0 se le agregó un precipitado de proteínas totales con el receptor truncado (smIL-10R1) barras 2 y 3, y en otro ensayo como control sólo se le agregó medio de cultivo, no hubo diferencias en la proliferación celular ($p \geq (0.454-0.552)$), la proliferación se analizó con la incorporación de BrdU y se midió la densidad óptica (DO) índice indirecto de incorporación del nucleótido, ver materiales y métodos.

anti-IL10 (30%) (Figuras 7-B) ($p \leq (0.0002-0.0005)$). Estos datos sugieren que el receptor truncado inhibe el efecto autócrino de la proliferación celular ejercida por la IL-10. Para confirmar que la inhibición de la proliferación celular inducida por el receptor smIL-10R1 no se debió a un efecto diferente al bloqueo de la IL-10, se expuso la línea B16-F0, que no secreta IL-10, al precipitado de proteínas con el receptor truncado (smIL-10R1). En la figura 9 se observa claramente que el receptor truncado de IL-10 (smIL-10R1) no disminuye la proliferación de esas células ($p \geq (0.454-0.552)$). La inhibición de la proliferación celular de la línea B16-10 ejercido por el receptor truncado, se revirtió hasta 100% cuando se neutralizó el receptor recombinante con un anticuerpo específico contra la región amino-terminal del receptor (K-20; figura 7-C y barras 3, 5 y 7; figura 8).

Discusión

En este trabajo se construyó un clon recombinante que codifica e induce la secreción de la región extracelular del receptor de la IL-10 (smIL-10R1), capaz de inhibir la proliferación celular inducida por la IL-10 *in vitro*.

Aunque no se hicieron ensayos para investigar la capacidad de unión del receptor smIL-10R1 con la IL-10, la inhibición de la proliferación celular mediada por la IL-10 sugiere fuertemente que el receptor truncado une y secuestra a IL-10. Asimismo, estos datos y el hecho que el anticuerpo K-20, que reconoce solamente la región extracelular amino-terminal, reconozca similarmente al receptor truncado soluble y al receptor completo en los ensayos de Western Blot (Figura 5), sugieren que la estructura tridimensional del receptor truncado soluble es similar a cuando esa región se

encuentra formando parte del receptor completo anclado a la membrana.

En un reporte previo Jimmy y cols. demostraron que la región extracelular del receptor (shIL-10R1) de la IL-10 humano es capaz de unir a la IL-10 humana en ensayos de Scatchard y que además inhibe los efectos de IL-10 sobre los macrófagos y monocitos.⁴⁴ Igualmente en ese trabajo se demostró que el receptor completo de IL-10 de ratón es capaz de unir a la IL-10 humana. Dado que la región clonada del receptor truncado en este trabajo tiene 89% de homología con la descrita en el reporte arriba mencionado, la inhibición de la IL-10, por el receptor truncado en la proliferación celular de B16-10, mostrado en el presente trabajo sugiere que el receptor truncado (smIL-10R1) es capaz de unir a la IL-10. Este antagonismo biológico del receptor truncado soluble de la IL-10 también se ha reportado para los receptores solubles de las interleucinas IL-4,⁵⁶ IL-7⁵⁷ y el de la eritropoyetina.⁵⁸ De igual manera, la afinidad de las mencionadas citocinas a sus receptores solubles es similar a la que presentan con su receptor intacto anclado en la membrana.

Dado que la IL-10 induce la proliferación tumoral en varios modelos animales por diversos mecanismos^{41,51,52,60} y es secretada en muchos tumores humanos,³⁷ pudiera jugar un papel importante en el crecimiento en los tumores en humanos, va a ser interesante para esta línea de investigación probar el efecto de la construcción genética que codifica al receptor smIL-10R1 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*.

En un estudio previo, se bloqueó con un anticuerpo la actividad biológica de la IL-10 inhibiendo el crecimiento del tumor en un modelo murino;⁵¹ sin embargo, la inyección sistémica del anticuerpo, bloquea otras funciones biológicas de la IL-10, con efectos colaterales inesperados. La utilización de un vector de expresión (ADN desnudo) de terapia génica que inhiba la función de la IL-10 específicamente en el sitio del tumor sería deseable, ya que se evitaría los efectos del bloqueo sistémico de la IL-10.

Conclusiones

En este estudio se demostró que la región extracelular del receptor de la IL-10 murina inhibe los efectos de la IL-10 sobre la proliferación celular de la línea tumorigénica B16-10 *in vitro*.

La línea celular de melanoma-B16F0 transfectada de forma estable, con la construcción p6EIL10R1, que codifica la región extracelular del receptor de la IL-10 murina, es capaz de inducir la secreción de la proteína correspondiente.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de la Defensa Nacional de México, llevado a cabo en el Laboratorio Multidisciplinario de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Referencias

1. Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Matthew M, Morley J, Howson WT. Lymphokines: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte action. *Nature* 1969; 224: 38.
2. Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 1974; 12: 150.
3. Oppenheim JJ, Gery I. From lymphokine to interleukin 1 (IL-1). *Immunol Today* 1993; 14: 232.
4. Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51: 391.
5. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond HW, Giedlin MA, Cosffman RL. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
6. Mosmann TR, Coffman RL. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
7. Romagnani S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995; 15: 121-9.
8. Bazan JF. Shared architecture of hormone binding domains in type I and type II interferon receptors. *Cell* 1990; 61: 753.
9. Sprang SR, Bazan JF. Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr Opin Struc Biol* 1993; 3: 815.
10. Nicola NA. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 45-77.
11. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996; 84: 331.
12. Leonard WJ. Stats and cytokine specificity. *Nature Med* 1996; 2: 968.
13. Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, et al. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-g inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J* 1996; 15: 799.
14. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264: 1415.
15. Wilks AF, Oates AC. The JAK/STAT pathway. *Cancer Surv* 1996; 27: 139.
16. Leonard WJ. Stats and cytokine specificity. *Nature Med* 1996; 2: 968.
17. Leonard WJ, Oshea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 293-322.
18. Decker T, Kovarik P. Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1535-46.
19. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science (Wash DC)* 1997; 277: 1630-5.
20. Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000; 19: 6613-6626.
21. García R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci* 1998; 5: 79-85.
22. Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. *Signal transducer and activator of transcription. Curr Opin Oncol* 1999; 11: 490-6.
23. Bowman T, García R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-88.
24. García R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci* 1998; 5: 79-85.
25. García R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20: 2499-513.
26. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp, Silber J, Liu F, Chen M, Albino AP, Bander NH. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin 6 expression. *Int J Cancer* 1993; 55: 96-101.
27. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, His-ing C, Bucht A, Gerdin B, Kiessling R. Selective expression of interleukin-10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7708-12.

28. Gotlieb WH, Abrams JS, Watson JM, Velu TJ, Berek JS, Martinez-Maza O. Presence of interleukin 10 (IL-10) in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. *Cytokine* 1992; 4: 385-90.

29. Loercher AE, Nash MA, Kavanagh JJ, Platsoucas CD, Freedman RS. Identification of an IL-10 producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *J Immunol* 1999; 163: 6251-60.

30. Chau GY, Wu CW, Lui WY, Chang TJ, Kao HL, Wu LH, King KL, Loong CC, Hsia CY, Chi CW. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000; 231: 552-8.

31. Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, Fan GK, Saito H. IL-10 expression is associated with the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 136: 1-9.

32. Smith DR, Kunkler SL, Burdick MD, Wilke CA, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 18-25.

33. Wittke F, Hoffmann R, Buer J, Dallmann I, Oevermann K, Sel S, Wandert T, Ganser A, Atzpodien J. Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 1182-4.

34. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Lev-erkus M, Moll T, Brocker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5: 67-8.

35. Ekmekcioglu S, Okcu MF, Colome-Grimmer MI, Owen-Schaub L, Buzaid AC, Grimm EA. Differential increase of Fas ligand expression on metastatic and thin or thick primary melanoma cells compared with interleukin-10. *Melanoma Res* 1999; 9: 261-72.

36. Khatri VP, Caligiuri MA. A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 46: 239-44.

37. Josephson K, DiGiacomo R, Indelicato SR, Ayo AH, Nagabhushan TL, Parker MH, Walter MR. Design and Analysis of an Engineered Human Interleukin-10 Monomer. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 13552-7.

38. Florentino DF, Bond MW, Mosmann TM. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clone. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-95.

39. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-90.

40. Rousset F, García E, Defrance T, Peronne C, Hsu D-H, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1890-3.

41. Salazar-Onfray F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol* 1999; 16: 86-94.

42. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6934.

43. Yue Ho AS, Liu Y, Khan TA, Hsu DH, Bazan JF, Moore KW. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11267-71.

44. Tan JC, Braun S, Rong H, DiGiacomo R, Dolphin E, Baldwin S, Natura SK, Zavodny PJ, Chou ChCh. Characterization of recombi-

nant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. *J Biol Chem (JBC)* 1995; 270: 12906-11.

45. Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 Receptor Signaling through the JAK-STAT Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 1651-21.

46. Hoover DM, Schalk-Hihi C, Chou ChCh, Menon S, Wlodawer A, Zdanov A. Purification of receptor complexes of interleukin-10. *Eur J Biochem* 1999; 262: 134-41.

47. Liu Y, Wei SHY, Ho ASY, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression Cloning and Characterization of a Human IL-10 Receptor. *Journal of Immunology* 1994; 152: 1821-9.

48. Kotenko SV, Krause ChD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *The EMBO Journal* 1997; 16: 5894-903.

49. Josephson K, DiGiacomo R, Indelicato SR, Ayo AH, Nagabhushan TL, Parker MH, Walter MR. Design and analysis of an engineered human interleukin-10 monomer. *J Biol Chem* 2000; 275: 13552-7.

50. Beatty PR, Krams SM, Martinez OM. Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol* 1997; 158: 4045-51.

51. García Hernández ML, Hernández Pando R, Gariglio P, Berumen J. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* 2002; 105: 231-43.

52. Es KD, Aoki Y, Chang Y, Moore PS, Yarchoan R, Tosato G. Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 1999; 94: 2871-9.

53. Masood R, Zhang Y, Bond MW, Scadden DT, Moudgil T, Law RE, Kaplan MHY, et al. Interleukin-10 is an autocrine growth factor for acquired immunodeficiency syndrome-related B-cell lymphoma. *Blood* 1995; 85: 3423-30.

54. Yue FY, Dummer R, Geersten R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I. HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997; 71: 630-7.

55. Lu ZY, Zhang XG, Rodríguez C, Wi-jdenes J, Gu ZJ, Morel-Fournier B, Harousseau JL, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Blood* 1995; 85: 2521-7.

56. Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, VandenBos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J, Wignall JM, Smith C, Gallis B, Sims JE, Urdal D, Widmer MB, Cosman D, Park L. *Cell* 1989; 59: 335-48.

57. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Cower SK, March CJ, Namen AE, Park LS. *Cell* 1990; 60: 941-51.

58. Yet MG, Jones SS. *Blood* 1993; 82: 1713-9.

59. Stearn ME, García FU, Fudge K, Rhim J, Wang M. Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta 1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Cancer Res* 1999; 5: 711-20.

60. Beatty PR, Krams SM, Martinez OM. Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol* 1997; 158: 4045-51.

