



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

Laboratorio de Inmunobiología, Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6

**Tesis**

Que para obtener el título de

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A:**

**Christian Azucena Don López**

Director de tesis: Dr. Alberto Monroy García

MÉXICO, D. F. 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y fue realizado gracias al apoyo financiero apoyo CONACyT proyecto N° 84071 del cual fui becaria, CONACYT N° 106591, Proyecto CLIS IMSS N° R-2009-3602-8, FIS/IMSS/PROT/G09/762 y DGAPA-PAPIIT N°IN223010.

*“Sólo cerrando las puertas detrás de uno  
se abren ventanas hacia el porvenir”*

Francoise Sagan

*"No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba  
era la obligación de tener que escoger un camino.  
Escoger un camino significaba abandonar otros"*

Paulo Coelho

## AGRADECIMIENTOS

A ti **Padre** del cielo por darme vida y salud, y por acompañarme a cada paso que doy, gracias por permitirme lograr una meta más.

Al **Dr. Alberto Monroy García** por su apoyo, consejos y valiosa asesoría durante todo este tiempo.

A la **Dra. Ma. de Lourdes Mora García** por sus comentarios y aportaciones que fueron de gran ayuda para mejorar mi trabajo.

Al **M. en C. Jorge Hernández Montes** por sus revisiones y valiosos consejos que son muy motivadores y siempre me han hecho reflexionar y crecer un poquito más.

A los miembros del jurado

- Dr. Benny Weiss Steider
- Dr. Alberto Monroy García
- Dra. Ma. de Lourdes Mora García
- M. en C. Catalina Machuca Rodríguez
- M. en C. Edgar Ledesma Martínez

Por sus valiosas recomendaciones y aportaciones a este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mis queridos padres Fructuoso y Ma. Nieves, por su infinita paciencia, su cariño y amor, además de su apoyo incondicional ya que son ustedes el pilar en el que apoyo, gracias y este logro no solo es mío, también es de ustedes por que sin su ayuda esto no hubiera sido posible.

A mis dos abuelitas Vicky y Arcadia por su amor que me ha motivado a continuar y por su maravilloso ejemplo y por siempre creer en mí.

A Juan otro gran apoyo incondicional siempre animándome a no darme por vencida y que hace que hasta en el lugar más oscuro haya luz, gracias mi amor.

A Vianey por su gran ayuda que hizo posible este trabajo a pesar de todos los percances, y lo mas importante por su amistad que ha hecho mas fáciles las situaciones difíciles.

A Nancy por su amistad y apoyo en momentos difíciles, y por esas anécdotas divertidas que disfrutamos juntas.

A todos mis compañeros de laboratorio Carmen, Ivonne, Karyna, Yessica, Mariel, Selene, Francisco, Arturo y Luis, por sus comentarios y ayuda.

| <b>ÍNDICE</b>   | <b>PÁG.</b> |
|---|-------------|
| <b>ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE.....</b>                               | <b>1</b>    |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>2</b>    |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>3</b>    |
| <b>MARCO TEÓRICO</b>  |             |
| 1. Sistema Inmune.....  | 5           |
| 1.1 Inmunidad innata.....   | 6           |
| 1.2 Inmunidad Específica o Adquirida.....                               | 7           |
| 1.2.1 Inmunidad humoral.....  | 7           |
| 1.2.2 Inmunidad Celular.....  | 7           |
| 1.2.2.1 Células T reguladoras (Tregs).....                              | 9           |
| 2. El Cáncer Cérvico-uterino y su relación con el VPH.....              | 10          |
| 3. Virus del Papiloma Humano (VPH).....                                 | 11          |
| 3.1 Estructura del VPH.....   | 12          |
| 3.2 Establecimiento de la infección por VPH.....                        | 14          |
| 4. Células Estromales Mesenquimales (CEMs).....                         | 16          |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>                  | <b>20</b>   |
| <b>HIPÓTESIS.....</b>   | <b>21</b>   |
| <b>OBJETIVO GENERAL.....</b>  | <b>22</b>   |
| <b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>                                      | <b>22</b>   |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   |             |
| Células.....  | 23          |
| Ratones.....  | 23          |
| Inmunización e inoculación de células para la inducción de tumores..... | 23          |
| Medición de tumores.....  | 24          |
| Obtención de sueros.....  | 24          |
| Análisis de citocinas.....  | 25          |
| Detección de TGF- $\beta$ .....   | 25          |

Análisis estadístico.....26

**RESULTADOS**

Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 sin protección inmunológica y en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs).....27

Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 con protección inmunológica y en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs).....28

Análisis de citocinas Th1 y Th2 en suero de ratones sin protección inmunológica.....29

Análisis de citocinas Th1 y Th2 en suero de ratones con protección inmunológica.....33

**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....38**

**CONCLUSIONES.....42**

**PERSPECTIVAS.....43**

**BIBLIOGRAFÍA.....44**

**ANEXOS.....51**

## ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

|                     |  |
|---------------------|--|
| CEMs.....           | Células Estromales Mesenquimales         |
| CaCu.....           | Cáncer Cérvico Uterino                   |
| VPH.....            | Virus de Papiloma Humano                 |
| IL.....             | Interleucina                             |
| IFN- $\gamma$ ..... | Interferón gamma                         |
| TNF- $\alpha$ ..... | Factor de Necrosis Tumoral alfa          |
| TGF- $\beta$ .....  | Factor de Crecimiento Transformante beta |
| CNOR.....           | Cérvix Normal                            |
| MON.....            | Médula Ósea Normal                       |

---

---

## RESUMEN

Las Células Estromales Mesenquimales (CEMs) derivan de la médula ósea y posteriormente se diferencian hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos, adipocitos, etc. Tienen un papel muy importante en la renovación de tejido dañado y con base en evidencias recientes, se ha encontrado que migran a tumores, formando parte del estroma tumoral. Las CEMs encontradas en el microambiente del tumor favorecen el implante, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y la metástasis de las células malignas. Asimismo, se ha demostrado que son capaces de suprimir la respuesta inmune innata y adaptativa, generando tolerancia inmunológica. Nuestro equipo de trabajo ha logrado obtener y caracterizar CEMs a partir de tejido cervical humano normal y con Cáncer Cérvico Uterino (CaCu). En este trabajo, se analiza el efecto de CEMs derivadas de estos tejidos, en el crecimiento tumoral bajo condiciones normales y con protección inmunológica. Para lo cual se estableció un modelo *in vivo* con ratones hembra de la cepa C57BL/6 con haplotipo H2-D<sup>b</sup> de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (CPH-I). Se utilizaron 8 grupos de 6 ratones cada uno, a 4 de estos grupos se les inocularon 10<sup>5</sup> células tumorales TC-1 (positivas a la infección por VPH 16 y con el haplotipo H2-D<sup>b</sup> del CPH-I) bajo las siguientes condiciones: 1) TC-1 solas, 2) TC-1 + CEMs derivadas de tejido cervical normal; TC-1 + CEMs derivadas de CaCu y TC-1 + CEMs de médula ósea. A los 4 grupos restantes se les inmunizó previamente con 3 dosis de 100 µg cada una del péptido antigénico RAHYNIVTF, derivado de la proteína E7 de VPH tipo 16, y posteriormente se les inocularon las células tumorales TC-1 de manera similar a los primeros 4 grupos de ratones. Después de los tratamientos, se monitoreó el crecimiento tumoral cada tres días, durante 30 días y se analizaron las concentraciones séricas de las citocinas Th1 (IL-2, IFN-γ y TNF-α) y Th2 (IL-4 e IL-5) además de TGF-β en los grupos tratados. En los grupos de ratones tratados con células tumorales sin previa protección inmunológica, se observó que el crecimiento tumoral no mostró diferencias significativas entre los 4 grupos (P < 0.001). Sin embargo, cuando los ratones recibieron protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, previa a los tratamientos, se observó que la inmunización con el péptido evitó el crecimiento tumoral, mientras que la coinoculación de CEMs + TC-1 revirtió la protección inmune, permitiendo el establecimiento del tumor. Este proceso fue acompañado de un incremento importante en la concentración sérica de TGF-β, así como de la producción de citocinas inmunosupresoras Th2 (IL-4, IL-5) y un decremento de citocinas Th 1 en los ratones tratados.

De acuerdo a los resultados, se concluye que las CEMs participaron de manera importante en la supresión de la respuesta inmune de los ratones, favoreciendo el desarrollo de tumores bajo condiciones de protección inmunológica. Estos hallazgos revelan el papel potencial de las CEMs que se encuentran en el estroma del tumor, para favorecer el crecimiento y escape al reconocimiento inmune de las células malignas, lo cual es de suma importancia para proponer estrategias nuevas para combatir éste y otros tipos de cáncer.

---

---

## INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) es el segundo cáncer más común en el mundo. Cada año 450 000 mujeres son diagnosticadas con CaCu y 220 000 mueren a causa de esta enfermedad (Días *et al.*, 2005). Es también la segunda causa de mortalidad mundial debida a padecimientos oncológicos en mujeres, y tiene la mayor tasa de incidencia entre la población femenina de los países en vías de desarrollo (Parkin *et al.*, 1999); en México, representa también la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres, con un 14.4% del total (INEGI 2005).

Es reconocido por la Organización Mundial de la Salud que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH), ya que en el 99.7% de muestras analizadas puede encontrarse ADN de alguno de los tipos de VPH considerados de alto riesgo (Walboomers *et al.*, 1999, Bosch and Muñoz 2002).

El VPH ha evolucionado conjuntamente con los humanos durante mucho tiempo y por tanto, su ciclo replicativo es muy complejo, de tal forma que puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con un bajo perfil de expresión, lo que genera una muy pobre respuesta inmune innata (Tindle 2002). Posteriormente si la infección por VPH es persistente comienza a actuar la inmunidad adquirida, está es muy eficiente y por eso, aunque la tasa de infección es muy alta, no todas las infecciones progresan hasta CaCu. Cuando la infección es persistente y el sistema inmune está deprimido, puede darse lugar a la integración del genoma del VPH a la célula hospedera, lo que permitirá el desarrollo de neoplasias que pueden derivar hacia tumores avanzados y finalmente metástasis (Zur Hausen 2000).

La persistencia de VPH en el tracto genital, también se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos; así como por la inducción de linfocitos T reguladores (T regs) antígeno-específicos infiltrados en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser *et al.*, 2007; Molling *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007). La evidencia de reclutamiento de linfocitos Tregs al microambiente tumoral ha hecho que se proponga que las células estromales mesenquimales (CEMs) participan en dicho reclutamiento, debido a que éstas se caracterizan por tener *per se* actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y por que se ha visto que tienen la capacidad de inducir, reclutar y mantener la función reguladora de linfocitos Tregs (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007 y Di Ianni *et al.*, 2008).

Cuando las CEMs son trasplantadas o inyectadas, tienen la capacidad de migrar a una variedad de órganos y tejidos, esta capacidad se ve incrementada en sitios de inflamación y ciertas patologías, debido a su capacidad de reparación y remodelación de tejidos (Chapel *et al.*, 2003). Esta peculiaridad ha despertado recientemente un enorme interés en medicina regenerativa, debido a que éstas pueden ser detectadas hasta un año después del injerto (Selmani *et al.*, 2008). En el caso particular de los tumores, se ha demostrado que existen mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral similares a los producidos en heridas que proveen las condiciones propicias para el arribo de CEMs. A pesar de que existen varios avances en el tema, el papel de las CEMs en el microambiente tumoral aún es incierto. Algunos estudios han mostrado que

favorecen el implante y crecimiento tumoral, debido a sus propiedades inmunomodulatorias y pro-angiogénicas (Yen and Yen 2008; Karnoub *et al.*, 2007; Djouad *et al.*, 2003); mientras que otros estudios han descrito, ya sea un efecto de aparente, inhibición del crecimiento tumoral o mantenimiento de la sobrevivencia del tumor (Khakoo *et al.*, 2006).

Es por eso que resulta importante conocer el papel de las CEMs en el desarrollo tumoral y evasión de respuesta inmune en tumores, con dicho fin en el presente estudio se analizó la capacidad de CEMs humanas derivadas de Médula Ósea Normal (CEMs-MON), de Cérvix Normal (CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (CEMs-CaCu), para inducir crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D<sup>b</sup>) bajo condiciones normales y con previa protección inmunológica (por inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH 16), utilizando células tumorales TC-1 (H2-D<sup>b</sup> y positivas a E6/E6 de VPH-16). Además se analizaron los perfiles de secreción de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4 e IL-5) y TGF- $\beta$ . Los resultados obtenidos serían de gran ayuda para conocer la capacidad inmunosupresora de las CEMs encontradas en los tumores cervicales y su participación en la supresión inmunológica, lo cual será de gran utilidad para establecer estrategias terapéuticas encaminadas a favorecer la respuesta inmune específica contra células tumorales.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Sistema Inmune

El término inmunidad deriva de la palabra latina *immunitas*, que hace referencia a la exención de diversas obligaciones civiles y procesamientos legales ofrecida a los senadores romanos durante el desempeño de sus cargos. Desde el punto de vista histórico, inmunidad significa protección frente a las enfermedades, y más específicamente, frente a las enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta global coordinada a la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. Los mecanismos que normalmente protegen a los individuos de las infecciones y eliminan las sustancias extrañas son capaces, en ciertas circunstancias, de producir por sí mismos lesiones y enfermedades tisulares. Por lo tanto, una definición más completa de inmunidad es una reacción a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos así como macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, cualesquiera que sean las repercusiones fisiológicas o patológicas de esta reacción (Abbas y Lichtman 2004).

El sistema inmune tiene múltiples funciones y evolucionó para proteger a los animales de la invasión de los microorganismos patógenos y el cáncer. Tiene la capacidad de generar una enorme variedad de células y moléculas que pueden reconocer y eliminar de forma específica una diversidad casi ilimitada de invasores extraños (Goldsby *et al.*, 2004). Este sistema permite que a pesar de vivir en un ambiente densamente poblado de agentes microbianos potencialmente patógenos, sólo en pocas ocasiones suframos procesos infecciosos evidentes desde el punto de vista clínico. Sin duda la lucha es titánica y el resultado, frente a la mayoría de los patógenos, francamente favorable. Sin embargo no siempre es así en individuos inmunocompetentes (Fainboim y Gefner 2005).

Desde el punto de vista funcional, una reacción inmunitaria puede dividirse en dos actividades vinculadas: reconocimiento y respuesta. El reconocimiento inmunitario es notable por su especificidad. Este sistema está capacitado para reconocer diferencias químicas sutiles que distinguen un agente patógeno extraño de otro. Más aún, el sistema inmunitario incorpora diversas células y moléculas para oponer una respuesta apropiada, la llamada reacción efectora, que suprima o neutralice el agente patógeno. De esta manera, el sistema puede convertir el fenómeno de reconocimiento inicial en respuestas efectoras, cada una adaptada de manera única para anular un tipo particular de patógeno. La exposición ulterior al mismo microorganismo extraño induce una reacción de memoria, caracterizada por una respuesta inmunitaria más rápida y elevada que sirve para eliminar el patógeno y prevenir una enfermedad (Goldsby *et al.*, 2004).

La inmunidad es mediada por una variedad de diferentes células y moléculas, que son responsables de dos diferentes, pero relacionados sistemas, la Inmunidad Natural o Innata y la Inmunidad Específica o Adquirida (Figura 1) (Parham 2003).

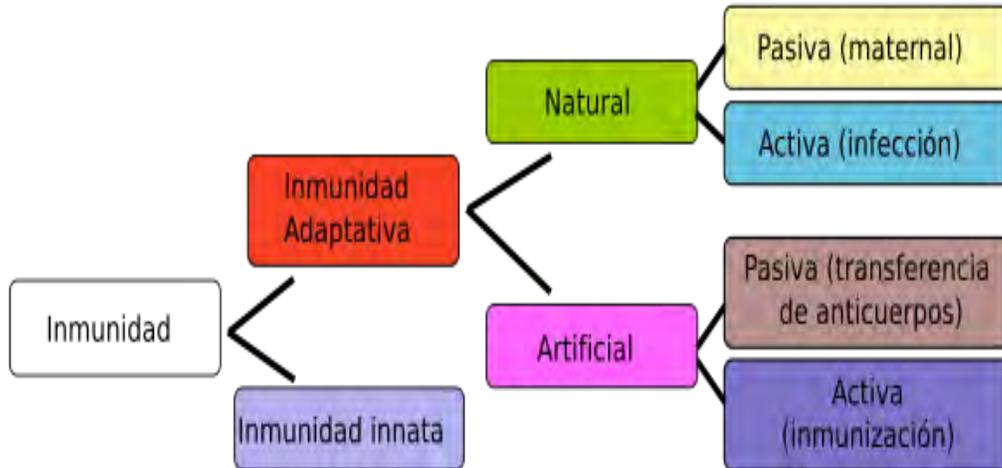


Figura 1. Esquema de clasificación para los tipos de inmunidad.

### 1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata o natural, se refiere a cualquier resistencia existente al nacimiento que se presenta la primera vez que se enfrenta a un patógeno; no requiere de una exposición previa y no se modifica de manera importante con exposiciones repetidas al patógeno durante la vida de un individuo (Medzhitov 2001).

La inmunidad innata comprende, en primer lugar, barreras físicas y anatómicas: la piel y los epitelios de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario. La integridad de estas barreras naturales impide la penetración de los patógenos en el organismo. Si la barrera impuesta por los epitelios a los microorganismos patógenos se supera, se establece en el organismo un foco infeccioso primario. A fin de hacerle frente, la inmunidad innata pone en marcha de inmediato un conjunto de mecanismos celulares y humorales. Entre los componentes celulares se destacan: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células NK (Natural Killer), células dendríticas, mastocitos, células endoteliales. Los mecanismos humorales involucran: el sistema del complemento, las proteínas de fase aguda, los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  (Fainboim y Gefner 2005).

La gran mayoría de los microorganismos infecciosos son eliminados en horas por las células y moléculas del sistema inmune innato, las cuales reconocen constituyentes comunes de muchos microorganismos y son activadas inmediatamente al contacto con los agentes invasores. Estas células y moléculas poseen la habilidad para distinguir lo infeccioso (o infectado) de lo no infeccioso (o no infectado), a través de receptores capaces de reconocer constituyentes comunes de microorganismos y activar su destrucción, o a través de mecanismos para reconocer constituyentes comunes de las células sanguíneas e inhibir su destrucción (Robertson 1998).

## 1.2 Inmunidad Específica o Adquirida

En vertebrados, la inmunidad innata se complementa con la inmunidad adquirida, un sistema donde la clave es la capacidad de los linfocitos para producir anticuerpos que son específicos contra uno, o los muchos millones de agentes extraños que pueden invadir el cuerpo (Pasare *et al.*, 2005). Los antígenos que estimulan la producción de anticuerpos usualmente son proteínas y polipéptidos. La inmunidad específica tiene dos componentes: Inmunidad Celular e Inmunidad Humoral (Ganong 2002).

### 1.2.1 Inmunidad humoral

Los linfocitos B son las células encargadas de la inmunidad humoral, especializadas en una única función: la producción de anticuerpos, función que llevan a cabo una vez que se han diferenciado en células plasmáticas. Los anticuerpos constituyen un componente esencial de la inmunidad adaptativa. Con ellos se combate a los microorganismos que se replican en los espacios extracelulares y se previene la dispersión de los que se multiplican dentro de las células (Fainbom y Geffner 2005).

### 1.2.2 Inmunidad Celular

En la inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, participan los linfocitos T (Gostout *et al.*, 2003). Los linfocitos T se clasifican dependiendo de su receptor en: linfocitos T  $\gamma/\delta$  y linfocitos T  $\alpha/\beta$ . Estos últimos, dependiendo de la función que realizan, se subdividen en: cooperadores o *helper* (CD4+), citotóxicos (CD8+) y reguladores (CD4+ CD25+). Los linfocitos T *helper* se subdividen en Th1 y Th2 dependiendo del patrón de citocinas que secretan (Fernández *et al.*, 2009). Los linfocitos Th1 y Th2 no provienen de linajes diferentes de células T CD4+, se diferencian en uno u otro sentido según el perfil de citocinas presentes en el órgano linfático secundario, sitio donde las células dendríticas activan a los linfocitos T *naive* o vírgenes. La presencia de IL-12 y citocinas relacionadas promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en un perfil Th1, mientras que la presencia de IL-4, cuando la concentración de IL-12 es baja, conduce a la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en un perfil Th2. Estos dos subtipos de linfocitos, también difieren en el perfil de citocinas que secretan (Tabla1) (Fainboim y Gefner 2005).

Las células Th2 colaboran con los linfocitos B y permiten su correcta activación, expansión y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por lo tanto, cumplen un papel central en la respuesta inmune humoral y por consiguiente, en la inmunidad frente a bacterias extracelulares e infecciones virales. Por otra parte, tienen una función destacada en la inmunidad antiparasitaria en los tejidos periféricos al inducir la activación de eosinófilos, basófilos y mastocitos. Las células Th1 median la activación de los macrófagos y contribuyen, además, a la activación y expansión de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Participan así en la inmunidad frente a patógenos intravesiculares, mediante su capacidad de inducir la activación de los macrófagos y frente a las infecciones virales, por su capacidad de promover el desarrollo de respuestas T CD8+ citotóxicas (Fainboim y Gefner 2005).

Tabla 1. Actividades mediadas por las citocinas producidas por células Th1 y Th2.

| CITOCINA                     | PRODUCIDA POR:   | PRINCIPALES FUNCIONES  |
|------------------------------|--|--|
| PERFIL Th1                   |  |  |
| IL-2                         | Células Th1<br>Células T CD8+ citotóxicas<br>Células T CD4+ activadas  | Media la expansión clonal de linfocitos T activados.<br>Estimula la producción de células NK.  |
| IFN $\gamma$                 | Células Th1<br>Células T CD8+ citotóxicas<br>Células NK+NKT<br>Células T $\gamma\delta$<br>Macrófagos (?)<br>Células dendríticas (?) | Activa al macrófago.<br>Activa células NK.<br>Favorece la diferenciación de células T CD4+ en un perfil Th1 e inhibe su diferenciación en un perfil Th2.   |
| TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ | Células Th1<br>Células T CD8+ citotóxicas<br>Células NK<br>Células B<br>Macrófagos<br>Células dendríticas                            | Induce una respuesta inflamatoria local y sistémica actuando sobre diferentes tipos celulares.   |
| PERFIL Th2                   |  |  |
| IL-4                         | Células Th2<br>Mastocitos<br>Células NKT   | Favorece la diferenciación de células T CD4+ en un perfil Th2 e inhibe su diferenciación en un perfil Th1.<br>Estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B a plasmocitos secretores de anticuerpos.<br>Estimula la producción de mastocitos y eosinófilos. |
| IL-5                         | Células Th2  | Promueve la producción y activación de los eosinófilos.<br>Estimula la producción de anticuerpos IgA.  |
| IL-6                         | Células Th2<br>Macrófagos<br>Células dendríticas   | Induce una respuesta inflamatoria local y sistémica.<br>Estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B a plasmocitos secretores de anticuerpos.  |
| IL-9                         | Células Th2  | Induce proliferación y diferenciación de los precursores de los mastocitos.  |
| IL-10                        | Células Th2<br>Linfocitos B<br>Linfocitos T reguladores  | Favorece la diferenciación de células T CD4+ en un perfil Th2 e inhibe su diferenciación en un perfil Th1.<br>Inhibe la activación del macrófago.<br>Estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B a plasmocitos secretores de anticuerpos.                 |
| IL-13                        | Células Th2  | Favorece la diferenciación de células T CD4+ en un perfil Th2 e inhibe su diferenciación en un perfil Th1.<br>Estimula la producción de anticuerpos IgE.<br>Estimula la producción de mastocitos y eosinófilos.  |

(Tomado y modificado de Fainbom y Geffner 2005).

### 1.2.2.1 Células T reguladoras (Tregs)

Las células T CD4+ no solo existen bajo la forma de Th1 y Th2, si no también como células T reguladoras (Tregs), las cuales cumplen una función central en el control de la respuesta inmune adaptativa. A través de diferentes mecanismos, inhiben la activación, expansión y diferenciación de las células Th1, Th2 y T CD8+ citotóxicas (Fainbom y Geffner 2005). Las Tregs juegan un papel importante en controlar la respuesta hacia antígenos propios y en suprimir la excesiva respuesta inmune deletérea hacia el hospedero. Las Tregs son producidas en el timo como una subpoblación madura funcionalmente de células T, y las células T vírgenes en la periferia pueden también ser inducidas hacia células Tregs. Investigaciones recientes revelan las bases celulares y moleculares del desarrollo de las Tregs, su función y su implicación en la desregulación en enfermedades inmunológicas (Sakaguchi 2008).

Las Tregs suprimen la proliferación de células T vírgenes y su diferenciación a células efectoras *in vivo*. Estas también pueden suprimir la actividad efectora de células T diferenciadas CD4+ y CD8+, y la función de células NK, células B, macrófagos, osteoclastos, y células dendríticas. *In vitro* las Tregs suprimen la proliferación y producción de citocinas en células T efectoras cuando las dos poblaciones son cocultivadas y estimuladas por antígenos en la presencia de CPA (Sakaguchi 2008).

La eliminación de las Tregs produce la enfermedad inflamatoria de bowel, la cual resulta en una excesiva respuesta inmune hacia las bacterias que habitan en el intestino. La respuesta inmune específica contra virus y cáncer es controlada por varias Tregs y la remoción o reducción de Tregs CD25+CD4+ provoca una efectiva respuesta inmune antitumor. Las células Tregs CD41CD25hiCTLA41FoxP3 han mostrado mantener la tolerancia inmune contra autoantígenos y se ha visto un incremento en el número de Tregs circulantes en varios tipos de cáncer (Molling *et al.*, 2007). Por otro lado las Tregs suprimen las alergias, establecen tolerancia para la aceptación de órganos trasplantados, previenen la enfermedad huésped contra hospedero después de un trasplante de médula ósea, y promueven la tolerancia feto-materna. Se han propuesto muchos mecanismos por los cuales se lleva a cabo la supresión mediada por Tregs, y éstos incluyen la secreción de citocinas inmunosupresoras por parte de las Tregs, supresión dependiente del contacto célula-célula, y modificaciones funcionales o muerte de las CPA. El TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-  $\beta$ ) puede actuar como mediador directo de la supresión, condicionando a las células T efectoras a ser sensibles a la supresión y/o a mantener la expresión de FoxP3 y actividad supresora de las Tregs (Sakaguchi 2008).

---

Hasta la fecha se han identificado varios subtipos de Tregs con diferentes marcadores celulares y papeles en respuestas inflamatorias diferentes (Jaramillo *et al.*, 2006):

- a) Células T Reguladoras Naturales. Son células T CD4+CD25+ y, aproximadamente, son el 5% de la población total de células TCD4+. En ausencia de estas células se desarrollan enfermedades autoinmunes, lo que significa que las Tregs naturales son importantes controladores de la tolerancia inmunológica. Estas células tienen un marcador exclusivo que se expresa tanto en fase activa como en reposo; el gen FoxP3, ubicado en el cromosoma X, que codifica para una proteína de nombre escurfina. La deficiencia de este gen desencadena varios síndromes autoinmunes incluyendo la mala regulación inmune, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X. Su modo de supresión es mediante el contacto célula-célula.
- b) Tregs Th3. Son una población de células T CD4+CD25+, que producen TGF- $\beta$  como principal molécula efectora, y que actúan principalmente sobre células T efectoras. Típicamente son FoxP3 negativas.
- c) Células CD8 supresoras. Fueron las primeras células reguladoras consideradas para la respuesta inmune. Actúan principalmente sobre Células Presentadoras de Antígenos (CPA) y es posible que actúen sinérgicamente sobre otras Tregs bajo ciertas circunstancias produciendo IL-10. También se cree que induce la aparición de células presentadoras reguladoras marcadas por CD186.
- d) Células T NK reguladoras. Hacen parte de la respuesta inmune innata y adaptativa. Característicamente, reconocen moléculas de 2-galactosilceramida que les son presentadas por medio de moléculas Cd1b o CD1d y pueden activarse produciendo citocinas típicas de la respuesta Th1 o pueden secretar predominantemente IL-10, ejerciendo así su papel regulador. No está claro aún que estímulo hace que se diferencie al tipo regulador o al efector y es objeto de investigación actualmente

## 2. El Cáncer Cérvico Uterino y su relación con el VPH

El Virus de Papiloma Humano (VPH) causa un amplio rango de lesiones epiteliales, infecta el tejido epitelial cutáneo y mucoso del tracto anogenital, las manos, o los pies (Longworth and Laimins 2004), ocasiona verrugas genitales y está bien demostrado que es el agente sexualmente transmitido que se asocia a lesiones precancerosas y etiológicamente, es el principal factor asociado a Cáncer Cérvico Uterino (CaCu). Se estima que al menos la mitad de las mujeres en el mundo se ha infectado por VPH en algún momento en su vida. La infección por el VPH causa además otros carcinomas anogenitales, incluyendo el cáncer de pene, vagina, vulva y ano. Además, recientemente se ha implicado al VPH como posible agente causal de cánceres no anogenitales, como algunos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (García 2007).

La primera evidencia de la relación de VPH con el cáncer humano fue dada por estudios en los 70's, sobre cáncer de piel en pacientes con epidermodisplasia verruciformis, lesiones causadas

por tipos inusuales de VPH. En cerca del 20% de los pacientes estas lesiones progresan a cáncer de piel, usualmente en áreas expuestas al sol. Estos mismos virus han sido encontrados asociados a cánceres de piel en individuos inmunosuprimidos y pacientes con trasplante renal. La asociación entre VPHs y cáncer en humanos fue encontrado a mediados de los 80's con el descubrimiento del VPH 16 y VPH 18 en tumores cervicales, estos mismos VPHs de alto riesgo fueron encontrados en displasias preneoplásicas, reconocidos precursores de lesiones que progresan a cáncer cervical. Los tipos de VPH-16, -18, -31, -33, -35 y -39 han sido encontrados en carcinomas invasivos, o bien en displasias y carcinomas *in situ*, las cuales pueden progresar a lesiones malignas. Actualmente se ha visto que más del 95% de los cánceres cervicales humanos albergan un VPH de alto riesgo, usualmente integrado dentro del cromosoma del hospedero (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch and Muñoz 2002; Longworth and Laimins 2004; Howley 2006)

### 3. Virus del Papiloma Humano (VPH)

Existen cinco géneros de papilomavirus: gamma, mu, nu, alfa y beta. Los papilomavirus gamma, mu y nu generalmente causan papilomas cutáneos y verrugas que no progresan a cáncer, mientras que alfa y beta son los dos géneros de papilomavirus de más importancia por ser más frecuentemente detectados. Los beta papilomavirus están típicamente relacionados con infecciones cutáneas inaparentes en humanos (Harwood and Proby 2002; Pfister 2003), mientras que los alfa papilomavirus infectan las mucosas genitales y son los que se encuentran relacionados con el desarrollo de cáncer, aunque también incluyen a los virus cutáneos que sólo en raras ocasiones se asocian con desarrollo de cáncer (De Villiers *et al.*, 2004). Hasta ahora más de 100 tipos diferentes de VPHs que infectan el epitelio cervical han sido identificados, y cerca de una tercera parte de éstos infectan las células epiteliales en el tracto genital y están asociados con lesiones que pueden progresar a cáncer Cada uno de estos tipos está relacionado con infección en sitios específicos del epitelio (Singer *et al.*, 1995; Longworth and Laimins 2004; Muñoz *et al.*, 2006).

Los tipos virales que infectan el tracto genital se separan en 2 categorías: de alto riesgo y de bajo riesgo. Los de alto riesgo están asociados con el desarrollo de cánceres anogenitales, incluyendo aquellos que afectan el área del cérvix, mientras que las infecciones por VPHs de bajo riesgo inducen solo verrugas genitales benignas. Los tipos de alto riesgo más comunes incluyen VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, y VPH-45; y los tipos de bajo riesgo son frecuentemente VPH- 6 y VPH-11, aunque existen muchos otros como lo muestra la Tabla 2. Entre los VPHs de alto riesgo, el VPH-16 es el que prevalece entre la población y es responsable de aproximadamente el 50% de los cánceres cervicales (Singer *et al.*, 1995; Longworth and Laimins 2004).

| Clasificación de riesgo | Tipo de VPH  |
|-------------------------|--|
| Alto riesgo             | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 |
| Probable alto riesgo    | 26, 53, 66   |
| Bajo riesgo             | 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108          |
| Riesgo no determinado   | 34, 57, 83   |

Tabla 2. Clasificación de tipos de VPH según oncogenicidad cervical (García 2007).

Los restantes VPHs que infectan mucosas genitales son clasificados como intermedio o bajo riesgo dependiendo de la frecuencia con la cual son encontrados en lesiones malignas. Los VPHs de bajo riesgo como VPH-11, están asociados con cáncer cervical sólo en raras ocasiones, pero aún así son medicamente importantes por que causan verrugas genitales las cuales son la mayor enfermedad de transmisión sexual en muchos países y pueden afectar entre 1-2% de los adultos jóvenes (Persson *et al.*, 1996; Doorbar 2006).

### 3.1 Estructura del VPH

El virus del papiloma humano pertenece al genero *papillomavirus* de la familia *papilomaoviridae* (Dias *et al.*, 2005), tiene un diámetro de 55nm, una estructura icosaédrica no envuelta y ADN circular de doble cadena. Aunque el genoma viral puede variar ligeramente en tamaño entre los diferentes tipos de VPHs, típicamente contiene alrededor de 8000 pares de bases, y codifica ocho o nueve marcos de lectura abierta u ORFs (Open Reading Frames) (Figura 2), los cuales son una serie de bases nitrogenadas que se pueden leer en diferente secuencia, lo que conduce a la traducción de diferentes proteínas, según el marco de lectura en función (Modis *et al.*, 2002).

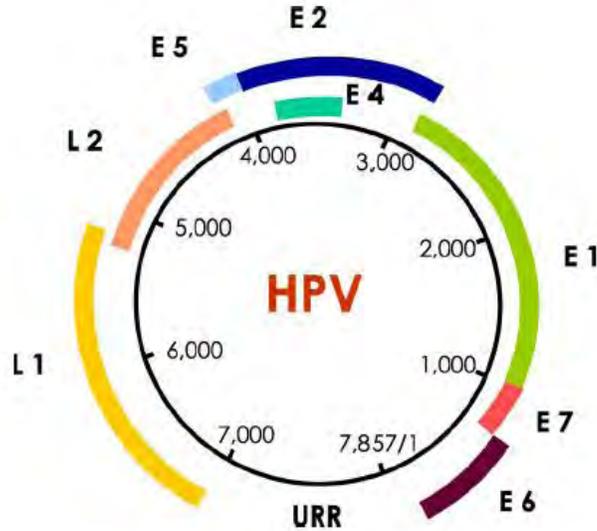


Figura 2. Esquema del genoma de VPH, disposición de los genes tempranos o no estructurales (E1, E2, E4-E7) y de los genes de la cápside (L1 y L2) (Muñoz *et al.*, 2006).

La cápside del virus está conformada por dos proteínas, la proteína L1 es el elemento estructural mayor, los viriones infecciosos contienen 360 copias de ésta, organizadas dentro de 72 capsómeros. L2 es el componente menor de los viriones, y se piensa que una sola molécula de L2 puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes como vértice del virión. Ambas proteínas juegan un papel importante en mediar la eficiente infectividad del virus (Trus *et al.*, 1997; Modis *et al.*, 2002). La proteína mayor de la cápside es expresada después de L2 para completar el ensamble de partículas infecciosas en la capa superior del epitelio (Doorbar 2005). El genoma viral tiene la capacidad de codificar para estas dos proteínas llamadas proteínas tardías, y además codifica para otras seis proteínas denominadas proteínas tempranas (Tabla 3), las cuales son necesarias para la replicación del ADN viral (E1), la transcripción (E2) y la transformación (E5, E6 y E7) (Serra-Baldrich 1993; Muñoz *et al.*, 2006).

Tabla 3. Genes del papilomavirus y sus funciones

| Genes | Funciones  |
|-------|--|
| E1    | Replicación de ADN, actividad de helicasa, enlace de ATP, ATPasa.  |
| E2    | Regulación de la transcripción y rol auxiliar en la replicación de ADN. Es requerido para mantener el genoma en infecciones persistentes.  |
| E3    | Ninguna todavía asignada.  |
| E4    | Proteína citoplasmática abundante en verrugas genitales. Rompe filamentos de queratina.  |
| E5    | Transformación. Previene disminución de receptores activados.  |
| E6*   | Transformación. Se enlaza a E6AP y promueve la ubiquitilación y degradación de p53. También se enlaza a otras proteínas celulares incluyendo paxilina e IRF3. Activa la transcripción de telomerasa celular. |
| E7*   | Transformación. Se enlaza e inactiva a pRB. Interfiere con la duplicación del centrosoma llevando a aneuploidia.   |
| E8    | Ninguna todavía asignada.  |
| L1    | Proteína mayor de la cápside.  |
| L2    | Proteína menor de la cápside.  |

\*E6 y E7 son los genes virales expresados en cánceres VPH positivos (Howley 2006).

Las primeras proteínas virales expresadas son los factores de replicación E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se enlaza a secuencias en el origen viral de replicación y actúa reclutando polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. Las funciones de E4 y E5 aún no son completamente entendidas; sin embargo, se ha propuesto que ambas pueden estar involucradas en la regulación de las funciones virales tardías. Las proteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas. La proteína E6 se enlaza a la proteína supresora de tumor p53 como parte de un complejo trimérico con la ubiquitina ligasa celular. E7 se une al retinoblastoma que forma parte de una familia de supresores de tumor, o bien con otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Longwort and Laimins 2004).

### 3.2 Establecimiento de la infección por VPH

La infección por papilomavirus requiere que las partículas virales entren al epitelio basal y accedan a las células en división (Patterson *et al.*, 2005) mediante una microabrasión en el epitelio estratificado (Doorbar 2005). Actualmente hay controversia acerca de la naturaleza precisa del receptor que requiere el virus para entrar a la célula, pero se piensa que los proteoglicanos de heparán sulfato pueden jugar un papel importante en el enlace inicial y/o la entrada del virus (Joyce *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2005). Al igual que otros virus, se ha visto que la infección por VPH requiere la presencia de receptores secundarios para que haya una infección eficiente, y esto ha sugerido la participación de la  $\alpha 6$  integrina (Mc Millan *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2005).

El ciclo de vida del VPH está ligado al programa de diferenciación de la célula hospedero, el queratinocito, con la producción de viriones maduros restringida a las células suprabasales

diferenciadas. Las células de la capa basal son células madre que están en constante división y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales. La infección de éstas células permite la activación de una cascada de expresión de genes virales que resulta en la expresión de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosomales del ADN viral por célula, número que se mantiene estable en las células basales indiferenciadas a lo largo del curso de la infección. Conforme las células basales infectadas con VPH se dividen, el ADN es particionado entre las células hijas, una de las cuales se separa y migra hacia el estrato granuloso y se diferencia. En el epitelio no infectado las células salen de ciclo celular cuando dejan la capa basal, esto frecuentemente trae como consecuencia la pérdida de núcleo en las capas suprabasales. Las células infectadas dejan la capa basal y entran nuevamente a ciclo celular por la acción de la proteína E7, la cual permite la retención del núcleo a través de todas las capas del epitelio infectado (Figura 3). Las oncoproteínas no sólo son necesarias para la inmortalización de las células y retención de la capacidad de entrar a ciclo celular, E6 y E7 han mostrado también ser necesarias para mantener una forma extracromosomal de VPH en las células basales indiferenciadas (Joyce *et al.*, 1999; Conger *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Longwort and Laimins 2004).

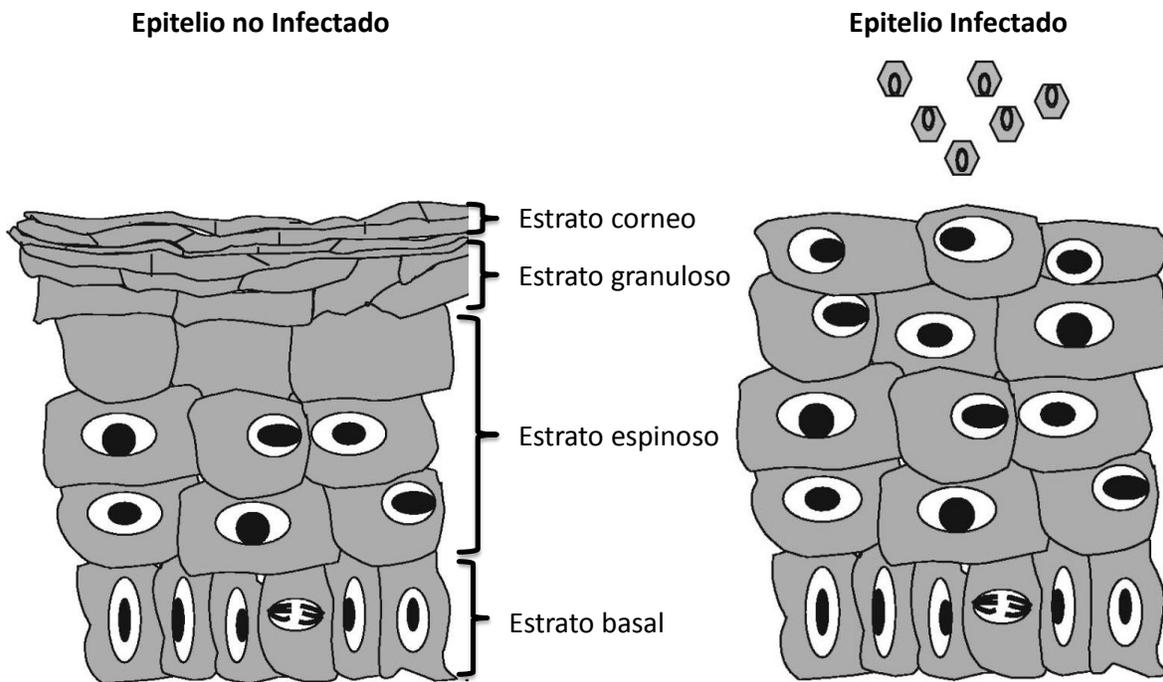


Figura 3. Esquema del epitelio infectado (derecha) y no infectado (izquierda) por VPH mostrando las capas diferenciadas y la producción de viriones (Tomado y modificado de Longwort and Laimins 2004).

En el epitelio no infectado, las células basales salen de ciclo celular y migran a través de las capas suprabasales donde sufren un proceso de diferenciación terminal. Los cambios incluyen el entrecruzamiento físico de filamentos intermedios de queratina, la formación de envoltura cornificada y la secreción de lípidos, los cuales junto con la superficie epitelial forman una barrera física contra el ambiente. Durante la infección con VPH, E7 (y presumiblemente

también E6) es expresada en estas células, la detención del ciclo celular es abolida y la diferenciación terminal normal es retardada. Se piensa que E6 y E7 trabajan juntas para adquirir estos efectos (Doorbar 2005).

Muchos tipos de VPHs sólo producen lesiones productivas seguidas a la infección y no están relacionadas con los cánceres humanos. En este tipo de lesiones los productos de la expresión de genes virales son cuidadosamente regulados, produciendo las proteínas virales en tiempos definidos y en niveles regulados, además de la migración de células infectadas hacia la superficie epitelial. La infección productiva puede ser dividida en distintas fases, con las diferentes proteínas virales jugando roles específicos. Los eventos que permiten la síntesis de virus en las capas superiores del epitelio, son comunes entre VPHs de bajo y alto riesgo (Doorbar 2006).

La infección del tracto genital por VPH puede inicialmente resultar en una lesión de bajo grado o NIC 1 (Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1). Estas lesiones exhiben patrones de diferenciación medianamente alterados y muchas de ellas son “limpiadas” por el sistema inmune en menos de un año. El mecanismo por el cual la respuesta inmune celular elimina las infecciones causadas por VPH aún no es claramente entendido. Algunas de estas lesiones, sin embargo, no son eliminadas por el sistema inmune y pueden persistir por períodos tan largos como décadas. La persistencia de infección por VPH de alto riesgo, es un gran factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades genitales como el carcinoma celular escamoso, o menos comúnmente, adenocarcinoma de cérvix (Longworth and Laimins 2004).

#### 4. Células Estromales Mesenquimales (CEMs)

Las Células Estromales Mesenquimales (CEMs) fueron caracterizadas inicialmente entre las décadas de los años 60's y 70's con los trabajos realizados por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein *et al.*, 1974). En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales; primero, adherencia en cultivo; segundo, expresión de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, capacidad de diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Paez *et al.*, 2007). Las CEMs expresan Complejo Principal de Histocompatibilidad clase 1 (CPH-I) pero no expresan moléculas CPH-II, B7-1, B7-2, CD40, o CD40L. Además, estas células secretan citocinas y moléculas reguladoras que juegan un papel importante en la proliferación y maduración de células madre hematopoyéticas (Locatelli *et al.*, 2007; Aggarwal and Pittenger 2005).

Debido a las características que presentan las CEMs, como son: su plasticidad, la secreción de citocinas y su baja inmunogenicidad, las hacen candidatas para terapia celular e ingeniería

celular, entre otras cosas (Figura 4) (Cárcamo y Trigueros 2008). Estudios recientes han

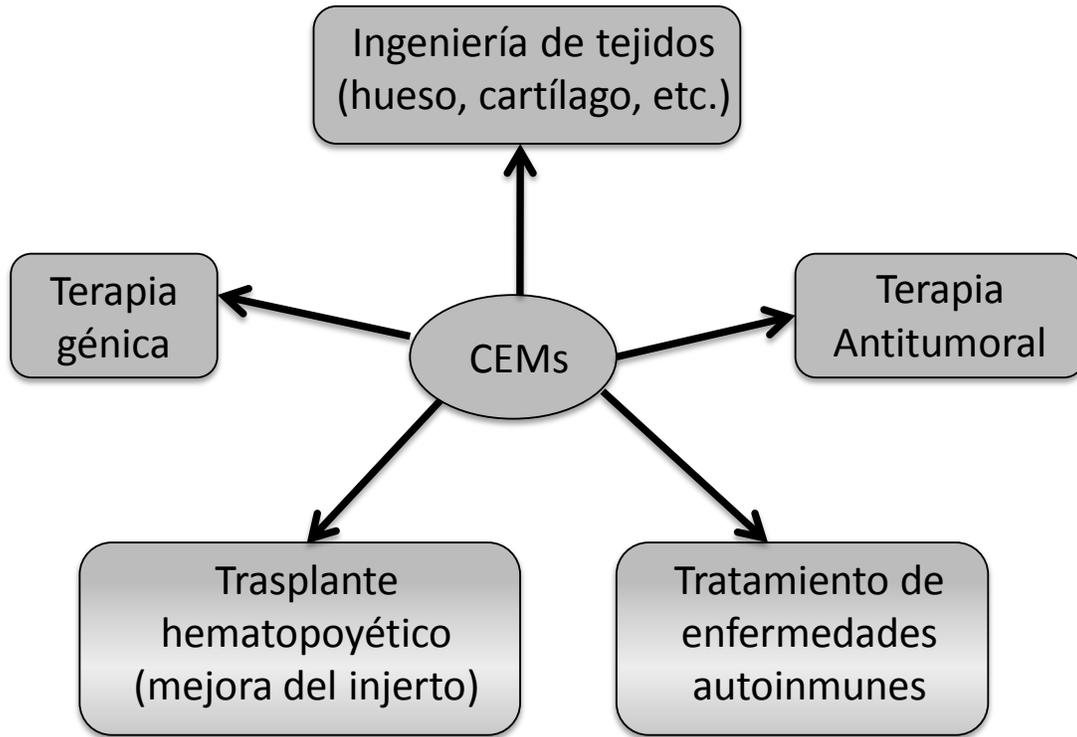


Figura 4. Aplicaciones terapéuticas de las Células Estromales Mesenquimales (Tomado y modificado de Cárcamo y Trigueros 2008).

Sin embargo otras características de las CEMs han sido investigadas, además de su potencial terapéutico. Estudios demuestran que las CEMs favorecen el crecimiento tumoral *in vivo* (Djouad *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006) También se ha reportado que CEMs o células parecidas a éstas, pueden ser aisladas de varios tumores, como linfomas y sarcomas de médula ósea (Cao *et al.*, 2009) y CaCu (Montesinos *et al.*, 2008). Con base en evidencias recientes, se ha encontrado que las CEMs pueden ser uno de los tipos celulares implicados, en la inducción de poblaciones de linfocitos T reguladores (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007 y Di Ianni *et al.*, 2008), el implante, la metástasis y supresión de la respuesta inmune en tumores malignos (Yen and Yen 2008).

Las CEMs suprimen la proliferación de células T *in vitro*, aún bajo condiciones de estímulo ya sea en presencia de mitógenos, aloantígenos o anticuerpos tales como anti-CD3 y anti-CD28 (Rasmusson *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007 y Di Ianni *et al.*, 2008), y se ha visto que la proliferación de linfocitos T citotóxicos puede ser suprimida de manera CPH independiente,

---

---

traspasando la barrera entre especies (Djouad *et al.*, 2003). Las CEMs pueden inhibir la activación de linfocitos T citotóxicos, aloantígeno específicos estando presentes en un radio más grande que el de células efectoras, en un radio más bajo éstas pueden decrementar o incrementar la actividad aloantígeno específica mediada por linfocitos T citotóxicos (Locatelli *et al.*, 2007). Durante la maduración de células dendríticas, las CEMs pueden inhibir la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos como CD1a, CD40, CD80, CD86 y HLA-DR, fenómeno mediado por la producción de citocinas, en particular HGF (Hepatocyte Growth Factor) y TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor-  $\beta$ 1), pero no por la inducción de apoptosis (Arévalo *et al.*, 2007). En cocultivos de células T y CEMs, la producción de FoxP3 aumenta mientras que la de CD127 disminuye, lo cual indica que las CEMs regulan el fenotipo (CD4+ CD25+ FoxP3+ CTLA-4+) y función de las células T regs (Di Ianni *et al.*, 2008). Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar CEMs de tejidos normales de cuello uterino y de tumores avanzados de Cáncer Cérvico Uterino. En estudios previos hemos encontrado que las CEMs obtenidas de tumores malignos de cuello uterino, al cultivarlas en contacto con linfocitos heterólogos de donadores normales, se favorece la inducción de poblaciones de linfocitos T regs CD4+ CD25+ FoxP3+ CTLA-4+ (Montesinos *et al.*, 2009).

Se sabe además que bajo circunstancias normales las CEMs trasplantadas migran a la médula ósea, pero en caso de algún daño las CEMs pueden preferencialmente movilizarse a los sitios de inflamación (Yen and Yen 2008). Lo anterior ha sido comprobado por varios autores inicialmente por Studeny *et al.*, en el 2002 en un modelo *in vivo* de ratones, al inyectar CEMs humanas marcadas con proteína verde fluorescente y mostrar su migración hacia tumores de melanoma implantados. Posteriormente Djouad *et al.*, en el 2003 encontró que el cotrasplante de CEMs con células de melanoma en ratones favorece el establecimiento y rápido crecimiento del tumor, resultado que persiste aún cuando éstas son trasplantadas a un sitio distante del tumor, investigaciones del mismo equipo de trabajo, muestran que la presencia de las CEMs facilita el crecimiento del tumor pero no tiene efecto en la metástasis, mientras que Karnoub *et al.*, 2007 encontró que cuando se administran CEMs y células tumorales se incrementa el potencial metastásico.

Los mecanismos precisos por los cuales las CEMs inmunosuprimen, aún no son claros. La supresión de la proliferación de las células T estimuladas por linfocitos alogénicos, células dendríticas y mitógenos, como concavalina A o fitohemaglutinina ha sido bien documentada (Barry and Murphy 2004). Tanto la vía contacto célula-célula (Beyth *et al.*, 2005) como la actividad de factores solubles también mostraron estar involucrados en este proceso (Tse *et al.*, 2003; Di Nicola *et al.*, 2002). Por otra parte han sido reportados datos que sugieren que la actividad inmunosupresiva de las CEMs no está asociada con la secreción de HGF (Hepatocyte Growth Factor) o TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor-  $\beta$ 1) (Beyth *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2003) y que la supresión inmune al menos en parte, se debe a la generación de células Tregs CD8+ (Djouad *et al.*, 2003). Otro mecanismo que también ha sido postulado es que el

mecanismo inmunosupresivo de las CEMs está basado en la actividad de la Indoleamin 2,3-Dioxigenasa (IDO) la cual impide la síntesis de proteínas mediante la depleción de aminoácidos esenciales del triptófano (Meisel *et al.*, 2004). Más recientemente, ha sido reportado que las CEMs inhiben la proliferación de células T a través del impedimento de la división celular (Glennie *et al.*, 2005). En otro estudio se muestra que las CEMs alteran el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, con un incremento en la secreción de Interleucina-10 (IL-10) e IL-4 y un decremento en la producción del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Aggarwal and Pittenger 2005). Finalmente ha sido postulado que las CEMs actúan suprimiendo la diferenciación de monocitos en células dendríticas maduras perjudicando la estimulación de células T (Beyth *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005). La mayoría de los mecanismos propuestos no son necesariamente exclusivos (Djouad *et al.*, 2007).

---

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres mexicanas con cáncer. Cada año se diagnostican alrededor de 11,000 casos nuevos de CaCu invasor en nuestro país (INEGI, 2008). La mayoría de las pacientes ingresan con enfermedad avanzada, con un mal pronóstico y representan una enorme pérdida de recursos humanos y económicos. Esta enfermedad se encuentra fuertemente asociada (cerca al 100%) con la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, en donde VPH-16 es el tipo de papiloma carcinogénico más comúnmente encontrado en los tumores de cuello uterino a nivel mundial (Walboomers *et al.*, 1999). La presencia de VPH en este tipo de cáncer genital, también se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos; así como por la inducción de linfocitos T reguladores antígeno-específicos y su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser *et al.*, 2007 y Molling *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007). Estas evidencias han sugerido que durante el desarrollo de la enfermedad se genera tolerancia inmunológica hacia el tumor, con la concomitante aparición de células inmunosupresoras. Se ha postulado que las Células Estromales Mesenquimales (CEMs) participan en la generación de linfocitos T reguladores en los tumores, debido a que éstas se caracterizan por tener *per se* actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función reguladora de linfocitos T reguladores (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007; y Di Ianni *et al.*, 2008).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar CEMs de tejidos normales de cuello uterino y de tumores avanzados de cáncer cérvico-uterino. Tomando en consideración la capacidad de las CEMs para generar inmunosupresión, en este trabajo se analiza el efecto de CEMs derivadas de tejidos cervicales (normales y tumorales) en la inducción del crecimiento tumoral bajo condiciones normales y con protección inmunológica en un modelo tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. Los resultados de este estudio serán de gran relevancia para conocer la capacidad inmunosupresora de las CEMs encontradas en los tumores cervicales y su participación en la supresión inmunológica, lo anterior será de gran utilidad para establecer estrategias terapéuticas encaminadas a favorecer la respuesta inmune específica contra células tumorales.

## **HIPÓTESIS**

Se sabe que las Células Estromales Mesenquimales (CEMs), están implicadas en la supresión de la respuesta inmune (Yen and Yen 2008). Asimismo, de acuerdo con evidencias recientes, las CEMs son capaces de favorecer el implante, crecimiento y metástasis de tumores malignos en sistemas singénicos, heterólogos e incluso xenogénicos, debido a que su actividad inmunosupresora es independiente de la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (Djouad *et al.*, 2003; Karnoub *et al.*, 2007). Entonces se espera que en ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1, la presencia de CEMs derivadas de tumores malignos de cuello uterino humano, favorezcan un óptimo crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 tanto en condiciones normales como con protección inmunológica.

## **OBJETIVOS**

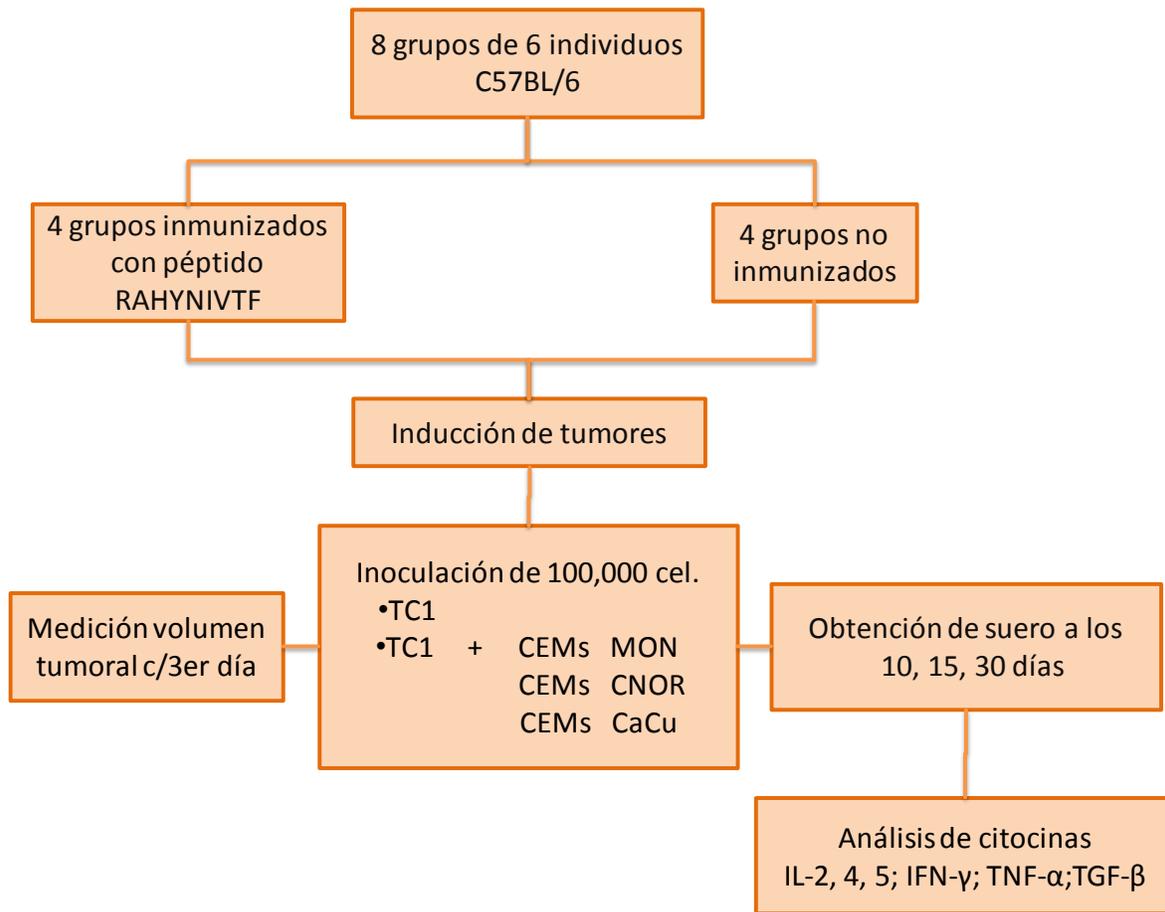
### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de CEMs derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción de inmunosupresión y crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Inocular ratones de la cepa C57BL/6 con células tumorales TC-1, en presencia y ausencia de protección inmunológica y de CEMs.
  
- Evaluar las cinéticas de crecimiento tumoral en los ratones inoculados.
  
- Evaluar la inducción de citocinas Th 1 y Th2 en suero de los ratones tratados.

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**



---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ➤ Células

Se utilizaron células tumorales TC-1 derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6 las cuales expresan de manera permanente los genes E6 y E7 de VPH-16 junto con el gen Ras. Estas células fueron cultivadas con medio de cultivo RPMI de GibcoBRL (Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies) al 10%. También se emplearon estirpes de CEMs (humanas), las cuales fueron previamente obtenidas de Médula Ósea Normal (CEMs-MON), Cérvix Normal (CEMs-CNOR) y con Cáncer Cérvico Uterino (CEMs-CaCu). Estas estirpes celulares fueron establecidas en colaboración con el Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales a cargo del Dr. Juan José Montesinos Montesinos, en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN SXXI. Todas las estirpes de CEMs utilizadas en este proyecto fueron caracterizadas bajo los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para definir a las CEMs (Dominici *et al.*, 2006) y que consisten en: ser adherentes en condiciones estándar de cultivo; expresan los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecen de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR en la membrana celular; y finalmente han sido caracterizadas por su capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Las CEMs fueron cultivadas con medio de cultivo consistente en DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies) al 15%. Antes de ser inoculadas, todas las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad saturante.

### ➤ Ratones

Para la inducción de tumores se usaron ocho grupos de seis ratones hembra cada uno, de la cepa C57BL/6 (Haplotipo H2-D<sup>b</sup>) de 6-8 semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con alimento y agua *ad libitum*, conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto 2001.

### ➤ Inmunización e inoculación de células para la inducción de tumores

Para inducir protección inmunológica en los ratones C57BL/6, se tomaron cuatro grupos de seis ratones cada uno y fueron inmunizados con tres dosis de péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 VPH 16) de 100µg cada una, vía cavidad peritoneal. El péptido aplicado fue disuelto en PBS (Solución Salina de Fosfatos) y emulsionado con Adyuvante Completo de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1 para la primera dosis, en las dosis subsecuentes se utilizaron 100 µg del péptido emulsionado con Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1, el tiempo transcurrido entre cada inmunización fue de 10-12 días.

Los cuatro grupos de ratones sin protección inmunológica y los cuatro grupos que recibieron previamente protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, fueron tratados con las células tumorales y/o CEMs de acuerdo con la siguiente tabla:

| TRATAMIENTOS | RATONES C57BL/6 |   |
|--------------|-----------------|---|
|              | NO INMUNIZADOS  | INMUNIZADOS CON EL PÉPTIDO <b>RAHYNIVTF</b> |
|              | TC-1:CEMs       | TC-1:CEMs                                   |
| (-)          | 100 000:0       | 100 000:0                                   |
| CEMs-MON     | 100 000:100 000 | 100 000:100 000                             |
| CEMs-CNOR    | 100 000:100 000 | 100 000:100 000                             |
| CEMs-CaCu    | 100 000:100 000 | 100 000:100 000                             |

Los ratones recibieron un refuerzo de células tumorales TC-1 15 días después de iniciado el tratamiento.

➤ Medición de tumores

El tamaño de los tumores fue evaluado cada tercer día, posterior a la aplicación del refuerzo de células tumorales. El volumen del tumor fue calculado en cada momento tras medir el largo y ancho del tumor con ayuda de un vernier y aplicando la siguiente fórmula:  $V = (R1 + R2)^2/2$ , donde R1 y R2 son los valores obtenidos a partir de la medición perpendicular del tumor (Paz de la Rosa *et al*, 2009).

➤ Obtención de sueros

Antes de la aplicación de los tratamientos correspondientes y después del refuerzo de células tumorales, los ratones fueron sangrados a los días 10, 15 y 30, mediante punción de la vena auricular usando tubos capilares sin anticoagulante y tubos eppendorf para colectar la sangre. Después de la formación del coágulo, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5000rpm durante 10 minutos, para colectar los sueros correspondientes y fraccionarlos en alícuotas de 50 µL cada uno. Los sueros fueron almacenados en ultra congelación a -70°C para su uso posterior en el análisis de citocinas.

➤ Análisis de citocinas

A partir de las muestras de sueros colectadas, se procedió a la cuantificación de las citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y Th2 (IL-4 e IL-5) mediante citometría de flujo utilizando el protocolo anexo al paquete para determinación de citocinas [kit Mouse Th1/Th2 Cytokine (BD™ Cytometric Bead Array (CBA)]. La detección de estas citocinas se basa en esferas con dos tipos de fluorescencia: la primera con anticuerpos específicos para cada tipo de citocina; y la segunda se basa en la intensidad del fluorocromo PE (por sus siglas en inglés *streptavidin-phycoerythrin*) la cual, con base en la diferencia en la intensidad de fluorescencia, nos permite calcular la cantidad de citocina unida a las perlas que contienen anticuerpos anti-citocina (la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de citocinas unidas a las perlas de detección).

De acuerdo al protocolo, primero se reconstituyó el estándar de citocinas Th1/Th2 de ratón en disolvente de ensayo y se hicieron diluciones seriales, usando el mismo disolvente. Posteriormente se mezclaron 10 $\mu$ l de cada tipo de esferas específicas para las citocinas, antes de colocarlas a las diluciones estándar o a las muestras de suero problema (50 $\mu$ l de esferas / tubo). En seguida se adicionó el reactivo PE de detección (50 $\mu$ l/muestra) y se incubaron los tubos por 2 horas a temperatura ambiente, protegiéndolos de la luz. Posterior a la incubación se lavaron las muestras con 1ml de buffer de lavado y se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de cada tubo de ensayo con 300  $\mu$ l de buffer de lavado y se analizaron las muestras, agitando 3 o 5 segundos cada muestra antes de colocarla en el citómetro de flujo (FACS-Calibur BD Biosciences) para determinar la intensidad media de fluorescencia dada por los fluorocromos utilizados (PE y FITC). La cantidad de citocina en cada muestra problema se calculó con base en la curva patrón obtenida de las lecturas realizadas a las diluciones seriales de cada estándar de citocinas.

➤ Detección de TGF- $\beta$

Para determinar la concentración de TGF- $\beta$ 1 en cada uno de los sueros problema se utilizó el protocolo anexo en el kit Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF- $\beta$ 1 Immunoassay (Quantikine® R&D Systems).

Este ensayo se basa en la técnica de sándwich de un inmunoensayo enzimático. Un anticuerpo monoclonal específico para TGF- $\beta$ 1 está fijado en una placa fondo plano de 96 pozos. La muestra estándar y los sueros problema se colocan dentro de los pozos, y si en las muestras existe presencia de TGF- $\beta$ 1 éste se enlazará al anticuerpo fijado en la placa. Posteriormente se lava cualquier sustancia que no se haya enlazado y se agrega a los pozos un anticuerpo ligado a una enzima, específico para TGF- $\beta$ 1. Después se realiza otro lavado para remover el anticuerpo ligado a enzima que no se unió, por último se adiciona una solución sustrato a los pozos y cada pozo desarrollará coloración directamente proporcional a la cantidad de TGF- $\beta$ 1 enlazado en el paso inicial. Se detiene esta reacción y se evalúa la intensidad de color en un lector de placas de ELISA (Molecular Device Emax) a una longitud de onda de 450 y 570nm.

De acuerdo al protocolo, inicialmente las muestras fueron activadas de la siguiente manera: a 40  $\mu$ l de cada uno de los sueros problema se le añadieron 10  $\mu$ l de HCl 1N, se mezcló y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 8  $\mu$ l de NaOH 1.2N/HEPES 0.5M para neutralizar la muestra acidificada. Cada muestra activada fue diluida con el diluyente calibrador RD5-53 (incluido en el kit), mezclando 10  $\mu$ l de la muestra activada con 590  $\mu$ l de diluyente calibrador RD5-53. En seguida a la placa de ensayo se le agregaron 50  $\mu$ l de diluyente de ensayo RD1-73 (incluido en el kit) y se procedió a adicionar 50  $\mu$ l de la solución estándar de TGF- $\beta$ 1, de los controles correspondientes y de las muestras problema previamente activadas y diluidas. Después de agitar ligeramente la placa durante 1 minuto, ésta se cubrió con la cinta adhesiva proporcionada y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 2 horas, se realizaron 4 lavados con 400  $\mu$ l de buffer de lavado (incluido en el kit) y se dejó que la placa se secara por completo. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l, a cada pozo, del anticuerpo específico para TGF- $\beta$ 1 conjugado a una enzima, se cubrió la placa con la cinta adhesiva y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 horas, pasado este tiempo se realizaron nuevamente 4 lavados con 400  $\mu$ l de buffer de lavado, se dejó secar la placa y se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de sustrato (incluida en el kit) a cada pozo, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz. Por último se paró la reacción con la solución específica incluida en el paquete de ELISA y después de agitar ligeramente, se determinó la densidad óptica de cada pozo con un lector de placas de ELISA (Molecular Device Emax) a 450 y 570 nm.

➤ Análisis estadístico

Los datos de volumen tumoral obtenidos durante el experimento fueron analizados con una prueba de U DE MANN - WHITNEY. La significancia fue determinada como  $P < 0.001$ .

---

---

## RESULTADOS

### **Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 sin protección inmunológica y en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs).**

El estroma de tumores sólidos como el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) está compuesto por una mezcla compleja de tipos celulares y tejidos, los cuales incluyen células endoteliales, células de la respuesta inmune, células estromales como fibroblastos no neoplásicos, vasos sanguíneos y matriz extracelular (Albini and Sporn 2007). Estos elementos estromales interactúan con células tumorales y el microambiente que les rodea a través de hormonas, citocinas, quimiocinas y proteasas (Udagawa *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 2008). Las células estromales que residen en el tumor pueden derivar: del reclutamiento, de ya sea, células troncales en el tejido dañado, de fibroblastos en el estroma tumoral, de células derivadas de la médula ósea provenientes de la circulación; o de la transición de epitelios a células mesenquimales en el parénquima tumoral (Dong *et al.*, 2004; Jodele *et al.*, 2005).

Tomando en consideración lo anterior, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar el papel de CEMs provenientes de tejido cervical normal (CEMs-CNOR), de tejido cervical tumoral (CEMs-CaCu) y de médula ósea normal (CEMs-MON), todas de origen humano, en la inducción de tumores en ratones de la cepa C57BL/6 tanto en condiciones normales, como con previa protección inmunológica antitumoral y su posible papel en la supresión de la respuesta inmune. Las estirpes de CEMs, como se mencionó en materiales y métodos, fueron previamente caracterizadas de acuerdo con los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Éstos criterios consisten en ser adherentes, tener los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecer de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR en la membrana celular, asimismo, por su capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Montesinos *et al.*, 2010, manuscrito en preparación). La inducción del crecimiento tumoral, se realizó en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo del complejo principal de histocompatibilidad clase I, H2-D<sup>b</sup>), a los cuales se les inocularon células tumorales TC-1, las cuales compartían el haplotipo H2-D<sup>b</sup> con la cepa de ratón, además de expresar las proteínas E6 y E7 de VPH tipo 16. Inicialmente 4 grupos de 6 ratones cada uno, fueron inoculados con 100 000 células tumorales TC-1 en la parte dorsal (lomo) del animal; en los grupos que recibieron CEMs, fueron inoculadas 100 000 de éstas, a través de la vena caudal. Los grupos tratados fueron los siguientes: 1) Sólo con células tumorales TC-1; 2) TC-1 + CEMs-CNOR; 3) TC-1 + CEMs-CaCu; 4) TC-1 + CEMs-MON. Al evaluar el crecimiento tumoral en los cuatro grupos de tratamiento se encontró que los ratones que recibieron células tumorales TC-1 junto con las CEMs mostraron un crecimiento tumoral total muy semejante al grupo inoculado solamente con células tumorales, no existiendo diferencia significativa entre ratones coinoculados y ratones que únicamente recibieron células tumorales TC-1 (Figura 5, Tabla anexa 4). Sin embargo en algunos ratones que recibieron células tumorales y CEMs como es el caso particular de CEMs-CaCu (en 4 de 6 ratones), fue posible detectar 2 o más tumoraciones de pequeño tamaño.

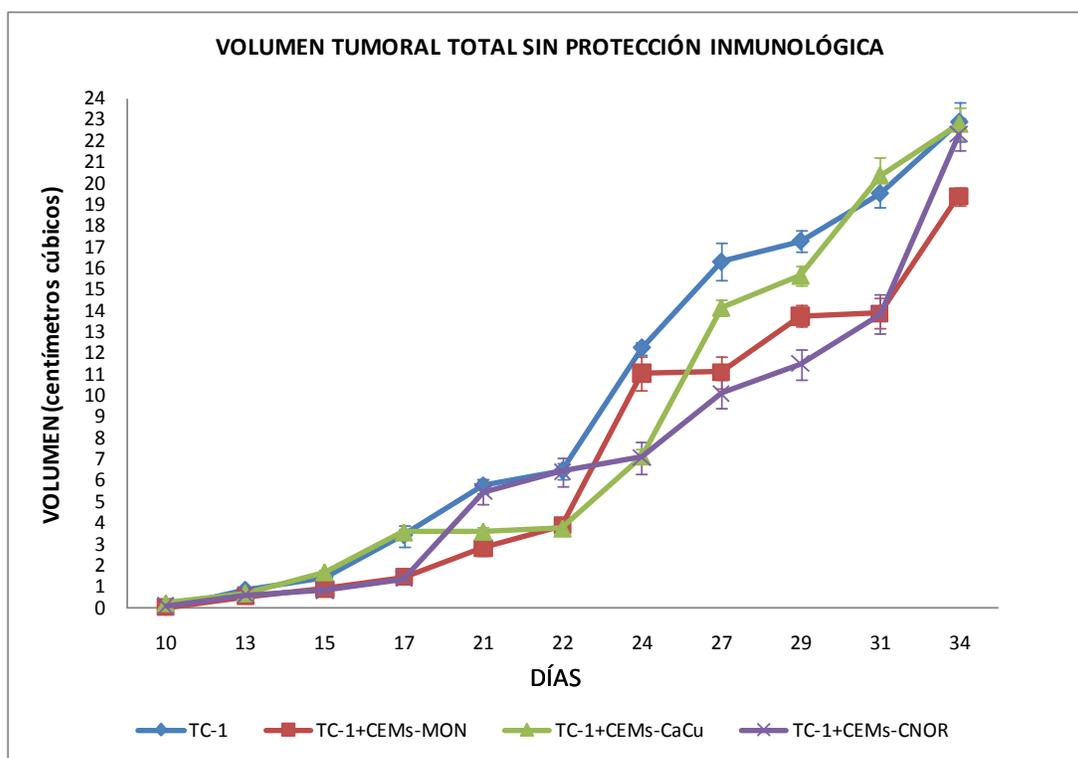


Figura 5. Inducción de tumores en ratones C57BL/6 bajo condiciones normales (sin protección inmunológica).  $10^5$  células TC-1 fueron inoculadas a ratones C57BL/6 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de  $10^5$  CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérnix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Se muestra el volumen tumoral total y la desviación estándar de la evaluación realizada cada tercer día durante 34 días después de la inoculación. \* Diferencia no significativa ( $P > 0.001$ ).

### Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 con protección inmunológica y en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs).

Por otro lado, varios trabajos han demostrado que las CEMs exhiben un gran potencial para modular la respuesta inmune, debido a su capacidad de suprimir la activación y proliferación de linfocitos T vírgenes e incluso de memoria específica a un péptido antigénico (Krampera *et al.*, 2003). Tomando como base lo anterior, en estudios previos realizados por nuestro equipo de trabajo, se ha demostrado que la inmunización de ratones C57BL/6 con el péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16) es capaz de generar respuesta específica de linfocitos T citotóxicos que lisan eficientemente las células tumorales TC-1 (Paz de la Rosa *et al.*, 2009). En consecuencia, para evaluar el papel de CEMs en la supresión inmune en este modelo experimental, se inmunizaron 4 grupos de 6 ratones C57BL/6 con el péptido RAHYNIVTF y después de 10 días fueron retados con las células tumorales TC-1 en ausencia o presencia de CEMs, de manera similar a los cuatro grupos anteriores. Interesantemente, se observó que el grupo de ratones que recibió reto tumoral con células TC-1 en ausencia de CEMs no mostró crecimiento tumoral después de 40 días de seguimiento, sin embargo, los grupos de ratones que recibieron células TC-1 junto con CEMs-CNOR y TC-1 con CEMs-CaCu, mostraron un crecimiento tumoral evidente después de 19 días de iniciado el reto tumoral y de manera significativa a los 40 días ( $P < 0.001$ ) respecto al grupo que

únicamente recibió células TC-1. De manera inesperada, el grupo de ratones que recibieron TC-1 junto con CEMs-MON no mostró crecimiento tumoral (Figura 6, Tabla anexa 5).

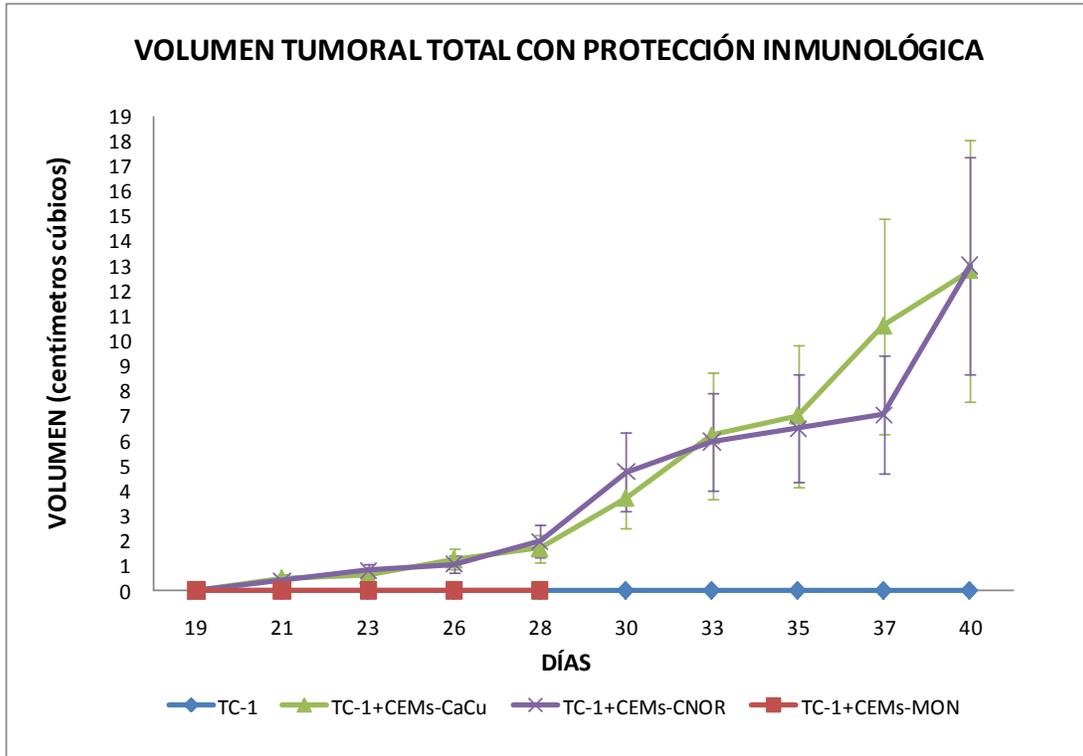


Figura 6. Inducción de tumores en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100ug del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con  $10^5$  células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de  $10^5$  CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Se muestra el volumen tumoral total y la desviación estándar de la evaluación realizada cada tercer día durante 40 días después de inicio del reto tumoral \* Diferencia significativa ( $P < 0.001$ ).

Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que las CEMs, al menos aquellas derivadas de Cérvix Normal y de CaCu, permiten el desarrollo tumoral aún bajo condiciones de protección inmunológica específica, lo cual sugiere que estas células puedan inducir un estado inmunosupresivo en el animal tratado.

### Análisis de citocinas Th1 y Th2 en suero de ratones sin protección inmunológica.

Por otra parte, se ha reportado que las CEMs secretan una gran cantidad de factores con actividad inmunosupresora, tales como TGF- $\beta$ 1, IL-4, IL-5 y HGF entre otros (Locatelli *et al.*, 2007; Selmani *et al.*, 2008; Rasmusson *et al.*, 2006). Asimismo, son capaces de alterar el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, con un incremento en la secreción de IL-10 e IL-4 y un decremento en la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Djouad *et al.*, 2007). Por tanto, con la

finalidad de saber si la presencia de CEMs en los ratones tratados inducía cambios en la respuesta inmune, resultó importante analizar la producción de algunas citocinas activadoras de la respuesta inmune celular Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) y supresoras de la misma Th2 (IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ ). Para llevar a cabo este análisis, se colectaron sueros al día 0 (Pre-Reto), antes de iniciados los tratamientos y durante el desarrollo tumoral a los días 10, 15 y 30.

La producción de citocinas Th1 fue muy baja en ratones sin protección inmunológica, en el caso de la IL-2, las cantidades de citocina detectada durante el desarrollo tumoral en los ratones que recibieron los diferentes tratamientos, fueron menores respecto a la detectada en los animales Pre-Reto (4pg/mL) (Figura 7, Tabla anexa 7). En el caso de IFN- $\gamma$ , no se encontraron niveles detectables de esta citocina (no mostrado). Sin embargo, en el caso particular de TNF- $\alpha$ , ésta se encontró incrementada en algunos grupos de animales que recibieron tratamientos con células tumorales junto con CEMs-CNOR y CaCu a los 10 días de tratamiento, sin embargo en los tiempos posteriores de tratamiento, esta citocina no fue detectada. En el caso de ratones que recibieron células TC-1 y CEMs-MON se encontró un pico de TNF- $\alpha$  cercano a 10pg/mL a los 15 días y posteriormente decayó a 2pg/mL al día 30 (Figura 8, Tabla anexa 10).

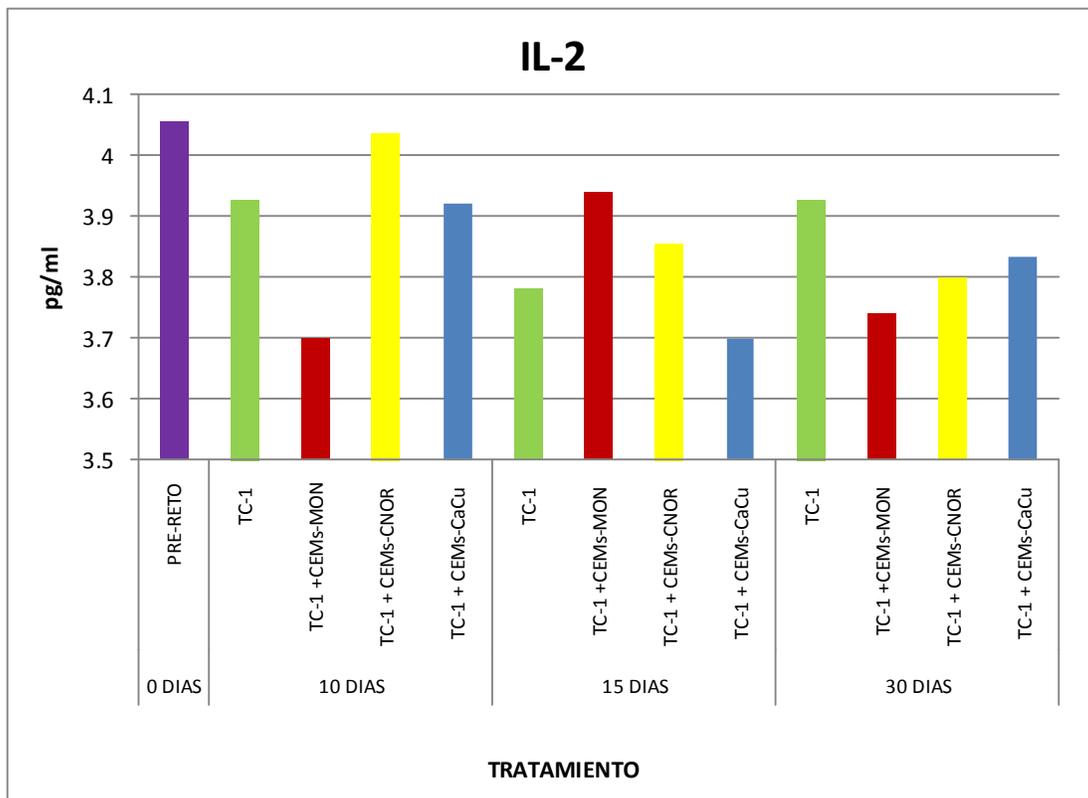


Figura 7. Producción de Interleucina 2 sérica en ratones C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

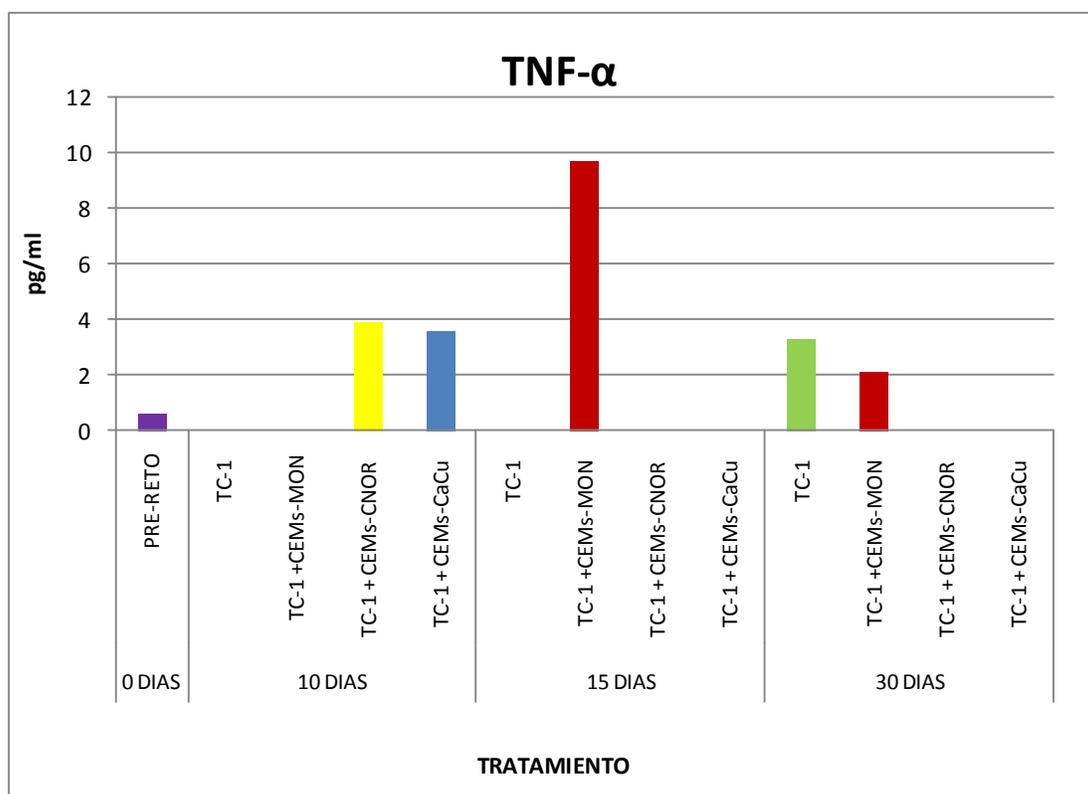


Figura 8. Producción de TNF- $\alpha$  sérica en ratones C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérnix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérnix Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

Las citocinas inmunosupresoras IL-4 e IL-5 no mostraron incremento en su producción durante el desarrollo de los tumores en los diferentes grupos de animales tratados, las cantidades de IL-4 se mantuvieron por debajo de la cantidad detectada en los animales Pre-Reto (1.2 pg/mL) (Figura 9, Tabla anexa 8). Por otra parte la IL-5 mostró una disminución paulatina en la concentración sérica de los animales de los diferentes grupos de tratamiento, de 3.5pg/ml en los primeros 10 días a una concentración cercana a 2pg/mL en el día 30 del desarrollo tumoral (Figura 10, Tabla anexa 9).

El TGF- $\beta$  mostró niveles incrementados durante el tiempo de desarrollo tumoral particularmente en los animales que recibieron células tumorales y CEMs en los primeros 10 días, en donde las cantidades de citocinas se incrementaron de 500pg/mL a 600pg/ml en ratones que recibieron células TC-1 con CEMs-MON y CEMs-CNOR, mientras que en el caso de los ratones que recibieron CEMs-CaCu, la concentración de citocina detectada fue de 1100pg/mL. Las cantidades de esta citocina fueron mantenidas a niveles superiores a las encontradas en los animales Pre-Reto, en la mayoría de los animales a los tiempos de 20 y 30 días de tratamiento (Figura 11, Tabla anexa 11).

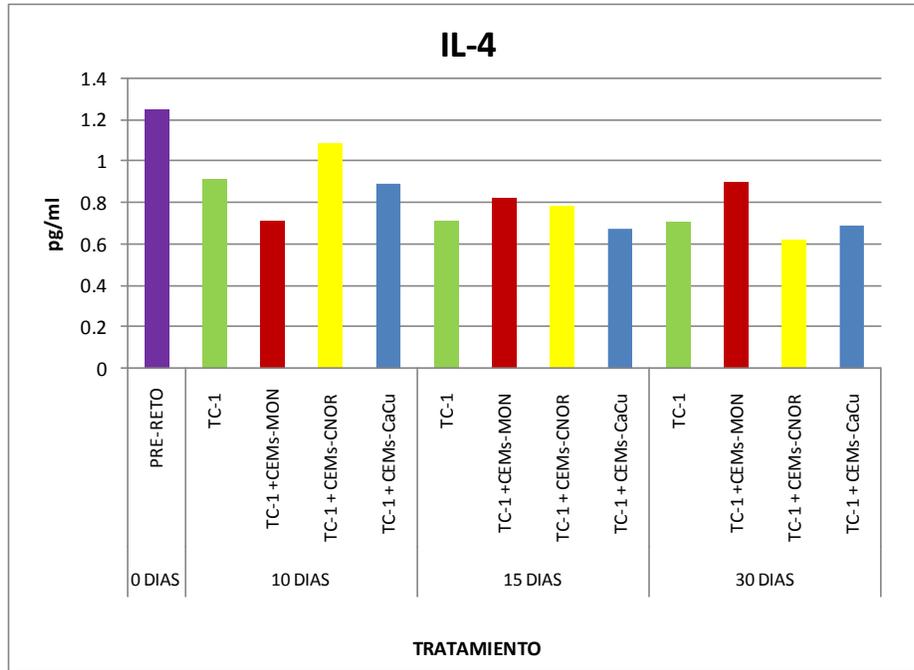


Figura 9. Producción de Interleucina 4 sérica en ratones C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

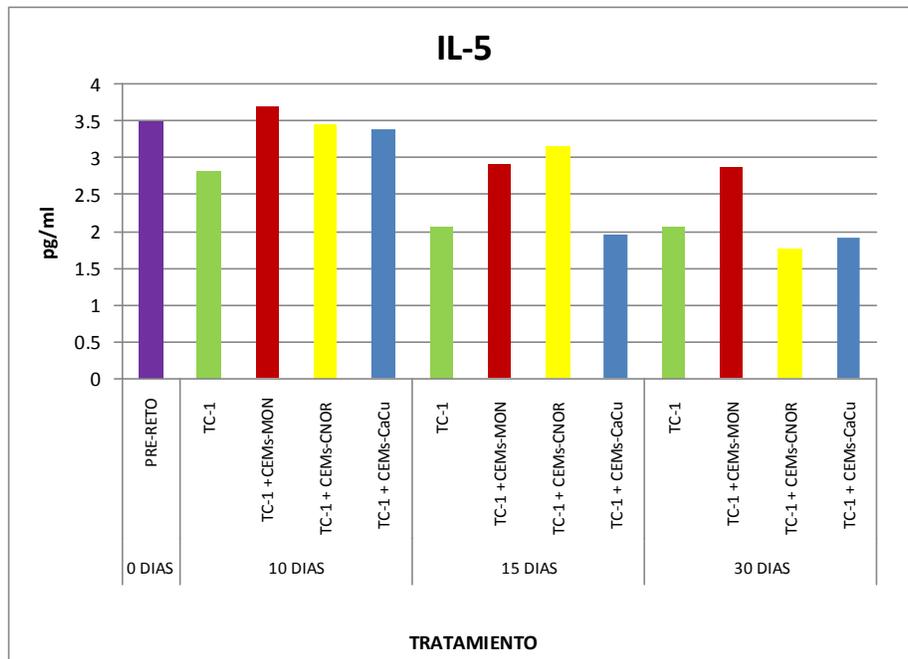


Figura 10. Producción de Interleucina 5 sérica en ratones C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

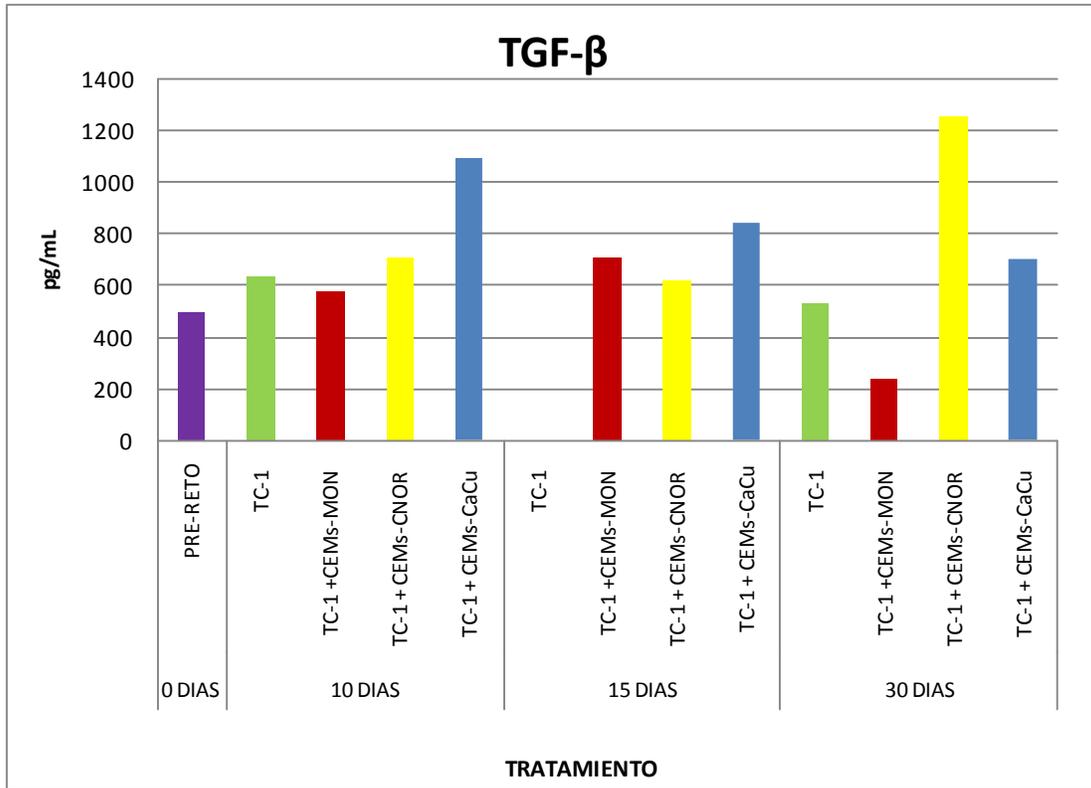


Figura 11. Producción de TGF- $\beta$  sérica en ratones C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérnix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérnix Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

### Análisis de citocinas Th1 y Th2 en suero de ratones con protección inmunológica.

En los animales que recibieron inmunización previa con el péptido antigénico RAHYNIVTF, se encontraron algunos cambios importantes en la producción de algunas citocinas de tipo Th1. En el caso de la IL-2, se encontró que las cantidades de esta citocina fueron mantenidas de manera constante durante el desarrollo tumoral, en un intervalo de 3-5 pg/mL de suero, muy parecido al encontrado en los animales que habían recibido únicamente la inmunización con el péptido (Pre-reto) (4pg/mL) (Figura 12, Tabla anexa 7). Por otro lado, el IFN- $\gamma$  mostró valores de 5 y 10pg/mL durante los 10 primeros días en ratones que recibieron las células TC-1 + CEMs-CNOR y CaCu respectivamente, éstos valores disminuyeron a 4 y 5pg/mL 30 días después de la inoculación de células tumorales y CEMs (Figura 13, Tabla anexa 6). En los ratones inmunizados con el péptido, antes de la inoculación de las células tumorales, no se encontraron cantidades detectables de IFN- $\gamma$ . El TNF- $\alpha$  fue detectado particularmente a los 10 y 15 días en los ratones que fueron inoculados con células TC-1 + CEMs-CNOR y CaCu, manteniendo las concentraciones de 5 y 25pg/mL respectivamente (Figura 14, Tabla anexa 10).

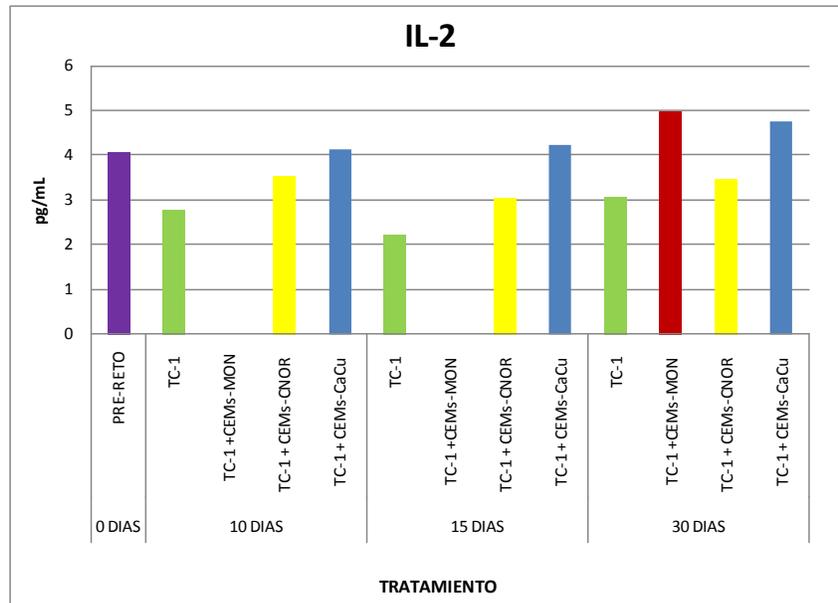


Figura 12. Producción de Interleucina 2 en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica y con reto tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100µg del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con  $10^5$  células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de  $10^5$  CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

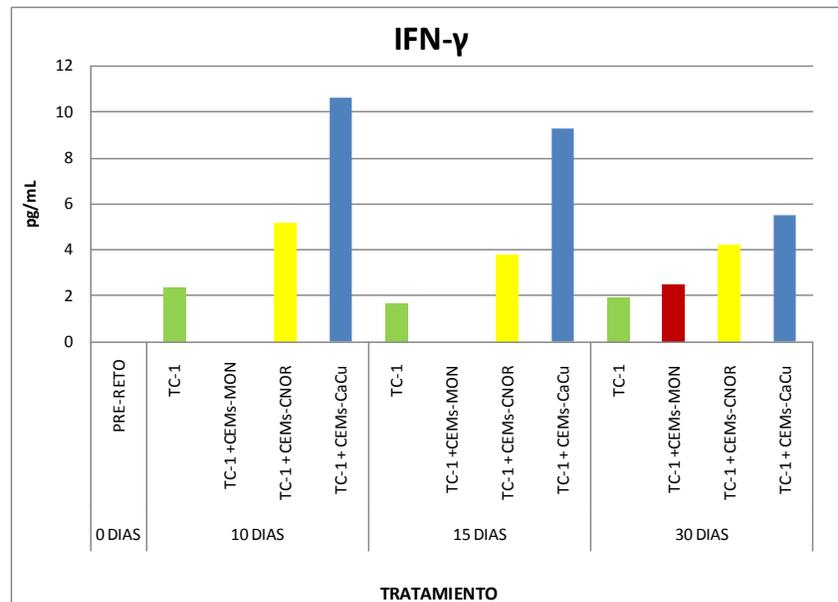


Figura 13. Producción de IFN-γ en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica y con reto tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100µg del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con  $10^5$  células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de  $10^5$  CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

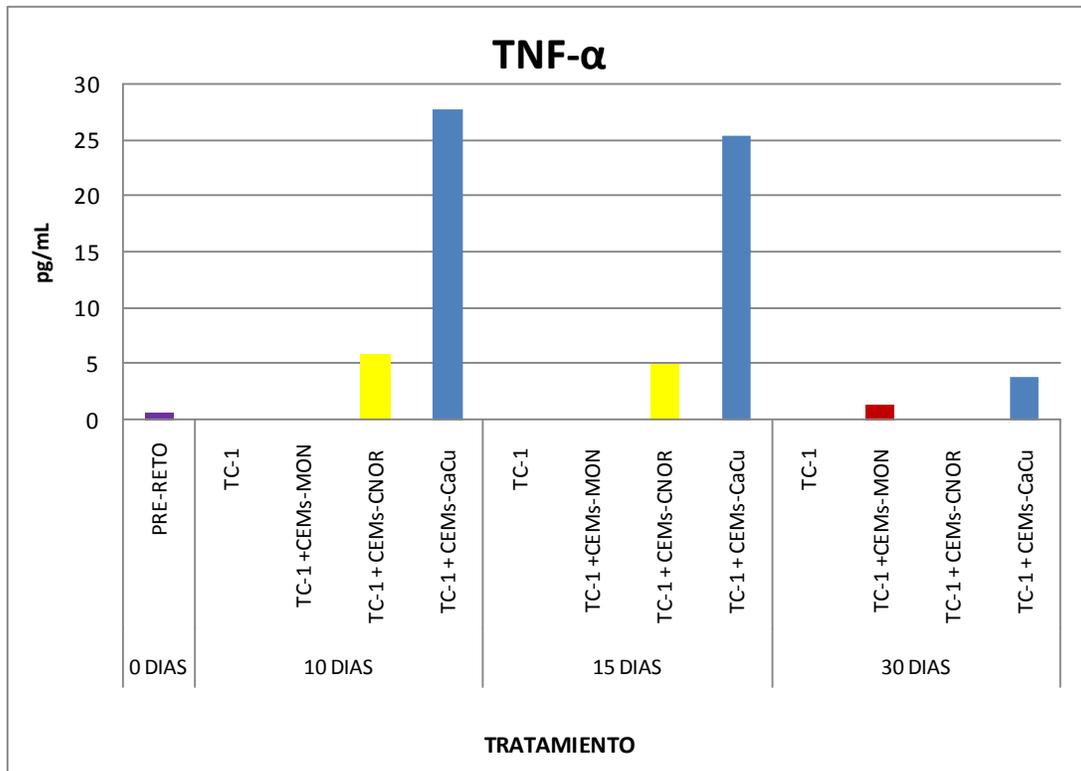


Figura 14 Producción de TNF- $\alpha$  en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica y con reto tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100 $\mu$ g del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con 10<sup>5</sup> células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de 10<sup>5</sup> CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

Por otra parte, al analizar las concentraciones de las citocinas con características inmunosupresoras (Th2) de la respuesta inmune celular, se encontraron incrementos importantes en los sueros de los animales que tuvieron reto tumoral en presencia de CEMs. En el caso de IL-4, los sueros de ratones que fueron sangrados antes del reto tumoral, mostraron valores de 1.25pg/mL de suero. Diez días después de iniciado el reto tumoral, los valores se incrementaron a 1.7pg/mL en ratones que recibieron células TC-1 y en ratones que recibieron células TC-1 junto con CEMs-CNOR y CEMs-CaCu los valores se incrementaron a 2 y 2.5pg/mL respectivamente. Los valores de estos últimos grupos incrementaron a 2 y 3pg/mL al día 30 de tratamiento (Figura 15, Tabla anexa 8). En el caso de IL-5, se encontraron ligeros incrementos en la concentración de esta citocina en algunos grupos que recibieron CEMs, como fue el caso de CEMs-CaCu y CEMs-MON, que incrementaron de 3.5pg/mL al inicio del tratamiento a 4.5 y 5.5pg/mL respectivamente al final del mismo (Figura 16, Tabla anexa 9). Por último, la concentración de TGF- $\beta$  fue incrementada notablemente después de 10 días de iniciada la inoculación de células TC-1 en presencia de CEMs-CNOR y CEMs-CaCu, debido a que las concentraciones de esta citocina incrementaron de 500pg/mL a 700 y 1000pg/mL respectivamente. En el caso de los ratones que recibieron únicamente células TC-1, se encontró un pico de 1000pg/mL a los 15 días del tratamiento, y en el caso de los ratones que recibieron CEMs-MON a los 30 días también mostraron un pico cercano a 1000pg/mL (Figura 17, Tabla anexa 11).

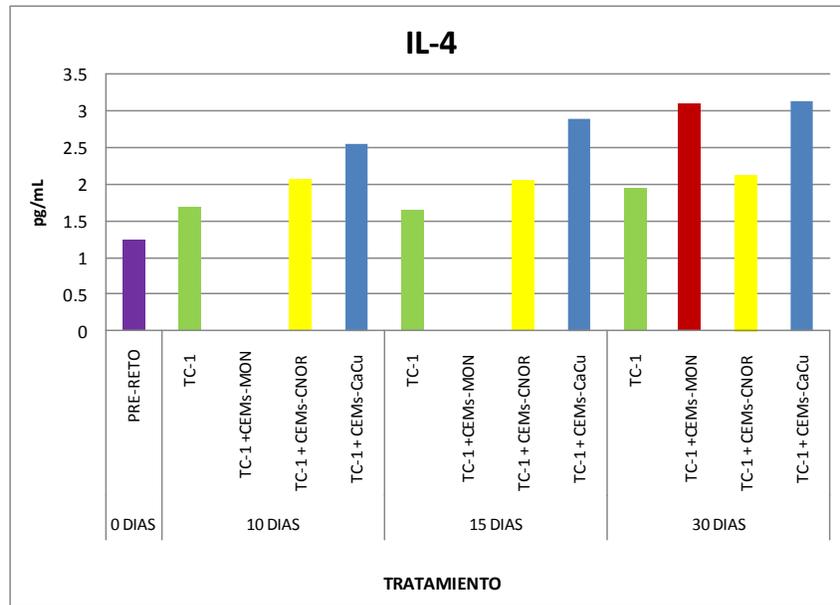


Figura 15. Producción de Interleucina 4 en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica y con reto tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100µg del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con  $10^5$  células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de  $10^5$  CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

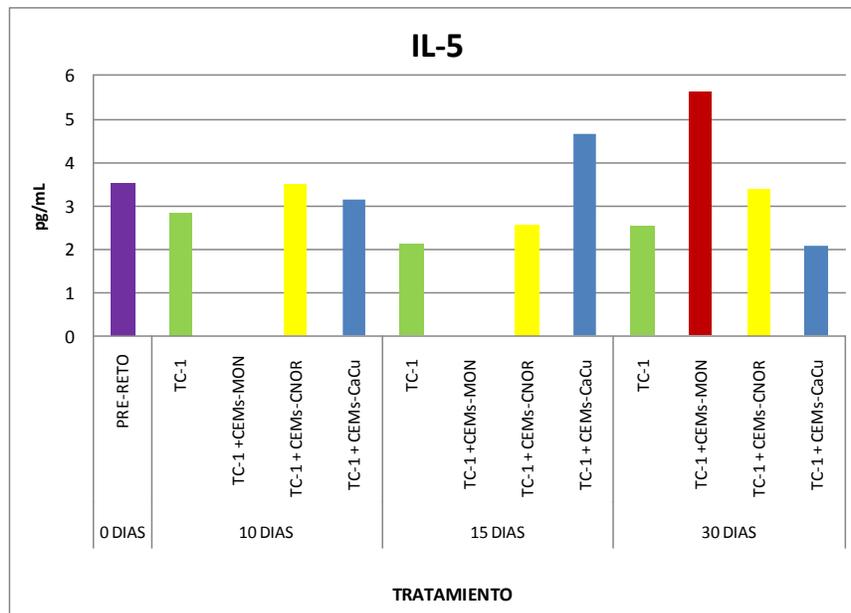


Figura 16. Producción de Interleucina 5 en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica y con reto tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100µg del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con  $10^5$  células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de  $10^5$  CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

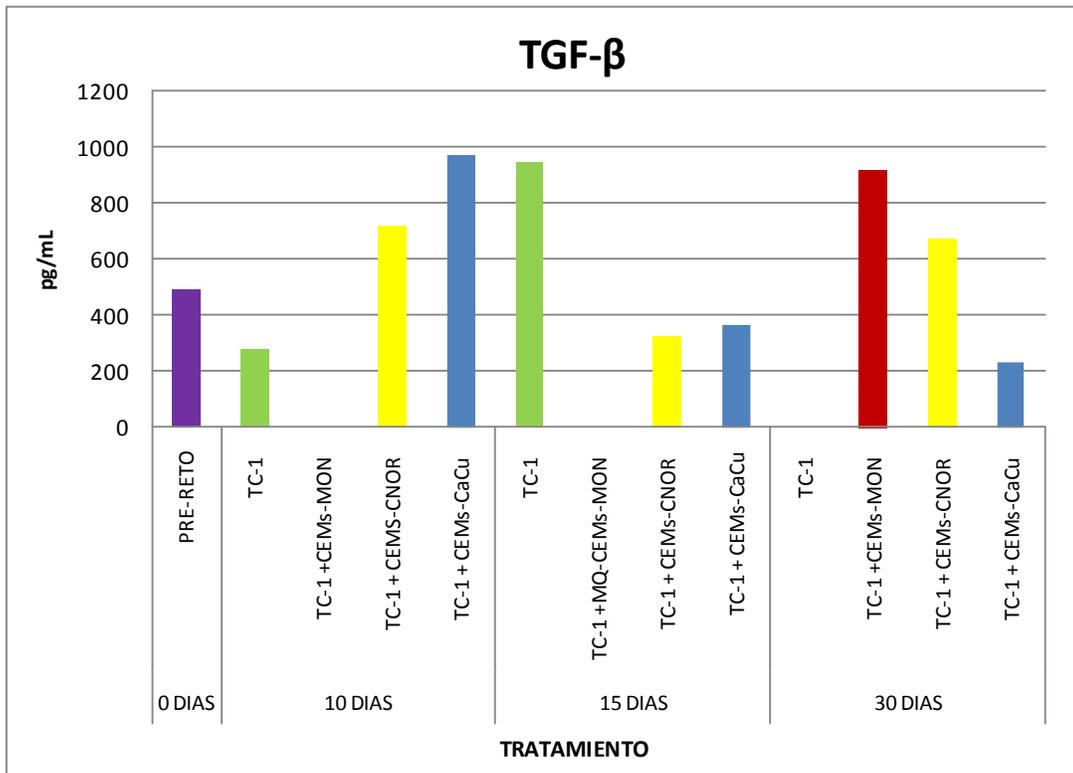


Figura 17. Producción de TGF- $\beta$  en ratones C57BL/6 bajo protección inmunológica y con reto tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100 $\mu$ g del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH 16), diez días después de la última inmunización, recibieron reto tumoral con 10<sup>5</sup> células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1), o en presencia de 10<sup>5</sup> CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+ CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Los ratones fueron sangrados al día 0 antes de recibir algún tratamiento (Pre-Reto) y posteriormente a los 10, 15 y 30 días (valores representativos).

---

---

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El papel de CEMs en el microambiente tumoral aún es incierto, sin embargo, algunos estudios con modelos tumorales singénicos, alogénicos y xenogénicos, han mostrado que favorecen el implante y crecimiento tumoral (Yen and Yen 2008; Karnoub *et al.*, 2007; Djouad *et al.*, 2003.).

En el presente estudio se analizó la capacidad de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (CEMs-MON), de Cérvix Normal (CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (CEMs-CaCu) de humano, para inducir el crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D<sup>b</sup>). Para ello se utilizaron células tumorales TC-1 del mismo haplotipo H2-D<sup>b</sup> y positivas a E6/E7 de VPH-16, bajo condiciones normales y con previa protección inmunológica con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH 16. De acuerdo a los resultados obtenidos, este modelo tumoral *in vivo*, nos permitió revelar los siguientes hallazgos: 1) la inoculación de CEMs en animales inmunizados, revirtió el efecto protector del péptido antigénico RAHYNIVTF, ya que favoreció el crecimiento de tumores; 2) en ratones que recibieron protección inmunológica, aunque el patrón de las citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) se encontró ligeramente incrementado, predominó la producción de citocinas inmunosupresoras Th2 (IL-4, IL-5) y TGF- $\beta$  durante el desarrollo tumoral; 3) el crecimiento de tumores inducidos por las células TC-1 no fue incrementado significativamente por la aplicación de las CEMs en los ratones bajo condiciones normales y; 4) en los ratones que no recibieron protección inmunológica se encontraron bajos o nulos niveles de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  respectivamente; y altos niveles de la citocina inmunosupresora TGF- $\beta$  principalmente en ratones que recibieron TC-1 y CEMs. Estas observaciones nos permiten sugerir que las CEMs de CaCu y cérvix normal participaron de manera importante en la supresión de la respuesta inmune de los ratones, favoreciendo el desarrollo de tumores bajo condiciones de protección inmunológica.

En este estudio se determinó el volumen tumoral como un parámetro para comparar el efecto ejercido por la aplicación de CEMs en el crecimiento de tumores en ratones C57BL/6. Aunque no se verificó la presencia de CEMs en los tumores inducidos, la inyección de estas células por vía sistémica, a través de la vena caudal, nos permitió asegurar que parte de ellas tuvieron como destino, el sitio en donde las células tumorales fueron inoculadas. Esta aseveración se basa en el hecho de que en varios modelos experimentales, utilizando varias vías de administración de las CEMs en tumores primarios o metastásicos, se ha observado que las CEMs tienen alta capacidad de dirigirse, injertar y permanecer en el sitio tumoral formando redes estromales (Spaeth *et al.*, 2009; Nakamizo *et al.*, 2005; De Palma *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2008). Este fenómeno se ha atribuido a que el microambiente tumoral, a comparación de otros tejidos, es un promotor ideal para que las CEMs se injerten y recluten *in situ*, debido a la liberación de varios factores solubles que promueven el crecimiento tumoral y contribuyen a la microvascularización. Entre estos factores se encuentran: el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor derivado de células estromales -1a (SDF-1a), IL-8, IL-6, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), factor de crecimiento hematopoyético (HGF), factor de crecimiento transformante- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1), activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) (Honczarenko *et al.*, 2006; Birnbaum *et al.*, 2007; Feng and Chen 2009). También es conocido que las CEMs funcionalmente expresan receptores de quimiocinas tales como

---

CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, y *cmet*, los cuales pueden ser importantes en el proceso de reclutamiento en el sitio tumoral (Feng and Chen 2009). Una vez establecidas en el tumor, las CEMs se integran en el estroma para formar parte de la arquitectura del tumor, además compiten con los precursores mesenquimales locales del tumor para proliferar (Feng and Chen 2009; Studeny *et al.*, 2002).

En nuestro sistema experimental, encontramos que la inoculación de CEMs-MON, CEMs-CNOR y CEMs-CaCu en los ratones que no recibieron inmunización previa, no incrementó la masa tumoral comparada con la inducida únicamente por las células TC-1 (Figura 5). Este mismo fenómeno fue observado por Karnoub *et al.*, 2007, quien usó un modelo xenogénico coinyectando 4 tipos distintos de células de cáncer de mama con CEMs de médula ósea humanas en ratones, con este modelo pudo observar, en por lo menos uno de los 4 grupos coinyectados, una cinética de crecimiento más acelerada gracias a la presencia de CEMs. En otro estudio se encontró que al inocular CEMs por vía sistémica, éstas muestran un potente efecto antitumor, esto en el caso de la coinyección con células de Sarcoma de Kaposi, y el efecto es conservado a pesar de que se inoculen al mismo tiempo o después de que el tumor se ha establecido (Khakoo *et al.*, 2006). Otros estudios adicionales, han mostrado un crecimiento *in vivo* de las líneas celulares K6 (derivada de CEMs anormales) y SW480 (de un cáncer de colon) cuando fueron trasplantadas con CEMs normales (Zhu *et al.*, 2006; Kidd *et al.*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que células estromales derivadas de médula ósea tienen la capacidad de iniciar cáncer gástrico, al ser reclutadas en el sitio de inflamación crónica inducida por infección por *helicobacter pylori* en el estómago (Houghton *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2008). En otro reporte, CEMs derivadas de tejido adiposo, fueron implicadas en el incremento de la proliferación y sobrevivencia de células tumorales (Yu *et al.*, 2008; Kidd *et al.*, 2008).

Por otro lado, el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, el cual es conocido como un determinante antigénico importante para la activación de linfocitos T citotóxicos, ha sido previamente evaluado en varios modelos experimentales en ratón (haplotipo H-2D<sup>b</sup>) y en vacunas a base de péptidos en humanos para favorecer la respuesta antitumoral (Feltkamp *et al.*, 1993; Khammanivong *et al.*, 2003). En nuestro modelo experimental fue utilizado para conferir protección en los ratones C57BL/6 contra las células tumorales TC-1. De acuerdo con nuestras observaciones, este péptido fue efectivo al inhibir el crecimiento tumoral cuando únicamente se inocularon las células tumorales TC-1 (Figura 6). Sin embargo, de manera muy interesante, se observó que ratones que recibieron CEMs-CNOR y CEMs-CaCu además de las células TC-1, mostraron crecimiento tumoral a pesar de haber tenido la protección inmunológica con el péptido. El crecimiento tumoral en este caso, fue percibido de manera más tardía (19 días), comparado con el observado en los ratones que no recibieron inmunización previa (10 días), no obstante este comportamiento no fue observado al utilizar CEMs derivadas de médula ósea (Figura 6). En trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha observado que las CEMs-MON no afectan la proliferación de células tumorales TC-1 *in vitro*, pero si son capaces de disminuir la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (Gutierrez 2010 manuscrito en preparación), lo anterior probablemente explica el fenómeno apreciado *in vivo* en el cual no se detecto crecimiento tumoral a lo largo del experimento.

Por otra parte, si bien es aceptado que la proliferación de células malignas es causada por la “inmunoparálisis” del huésped, las CEMs, pueden participar en la inhibición de las respuestas inflamatorias al promover la producción de citocinas anti-inflamatorias que favorecen un “microambiente inmunosupresivo” propicio para el crecimiento y la metástasis tumoral (Djouad *et al.*, 2003; Feng and Chen 2009). Además, como es sabido, la respuesta inmune celular en las poblaciones de linfocitos T CD4 inducidas por la estimulación de antígenos, pueden ser caracterizadas por distintos patrones en la producción de citocinas, por ejemplo las células Th1 producen IL2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que se caracterizan por activar la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos; mientras que las células Th2 las cuales producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, que al igual que TGF- $\beta$ , antagonizan la función de las citocinas Th1. En consecuencia, resultó importante analizar la producción de algunas de estas citocinas en el suero de los ratones tratados, y se encontró, que en ratones que no recibieron inmunización, los patrones de las citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , fueron muy bajos o nulos en la mayoría de los grupos experimentales, sin embargo hubo un predominio en la producción de TGF- $\beta$ , particularmente en los ratones que recibieron CEMs (Figuras 7-11). Por otro lado, en ratones que recibieron inmunización previa con el péptido antigénico, el patrón de las citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) se encontró ligeramente incrementado, pero predominó la producción de citocinas inmunosupresoras Th2 (IL-4, IL-5) principalmente TGF- $\beta$  durante el desarrollo tumoral (Figuras 12-17). Estos resultados nos permiten sugerir que las CEMs de CaCu y cérvix normal, indujeron un ambiente inmunosupresor capaz de promover el crecimiento tumoral, en los ratones previamente inmunizados. Lo observado en ratones con protección inmunológica resulta muy interesante ya que estos tipos de CEMs fueron capaces de inhibir la aparente respuesta celular que se estaba efectuando. Según los datos encontrados para producción de citocinas del perfil Th1 como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Figuras 13 y 14) éstas fueron detectadas en mayor cantidad que en animales Pre-Reto, este aumento fue detectado hasta los 15 días, en el análisis hecho al día 30 la producción de citocinas proinflamatorias decae drásticamente lo cual coincide con el inicio de crecimiento tumoral en estos ratones y el aumento en la cantidad de citocinas como TGF- $\beta$  y del perfil Th2 como IL-4 (Figuras 17 y 15) Esta aseveración se basa en que experimentalmente se ha demostrado que las CEMs suprimen la respuesta proliferativa y activación de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ a antígenos alogénicos y xenogénicos (Feng and Chen 2009; Glennie *et al.*, 2005), esencialmente mediante factores solubles tales como TGF- $\beta$ , HGF, IL-10, IL-4 y prostaglandina E2 (PGE2) e indoleamina-2, 3 deshidrogenasa (IDO). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Angoulvant *et al.*, 2004, quien demostró que CEMs humanas derivadas de médula ósea, pueden disminuir la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos Th1 e incrementar la secreción de IL-4 por los linfocitos Th2. Además se tiene reportado que las CEMs no son sensibles a la citotoxicidad mediada por linfocitos T citotóxicos y son capaces de inhibir la actividad citotóxica de linfocitos T en una manera dependiente del tiempo y de la dosis ante linfocitos T pre-estimulados con antígeno (Angoulvant *et al.*, 2004; Feng and Chen 2009). Por otro lado, es claro que mientras los linfocitos T citotóxicos son células efectoras importantes para eliminar células infectadas por virus como el de VPH (Benton *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2008), y los linfocitos T CD4+ son importantes en controlar las lesiones asociadas con

---

---

VPH (Iwatsuki *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 2008), entonces el balance de citocinas inclinado hacia el tipo Th2, además de inducir inmunosupresión, también conduce al incremento en la proporción de linfocitos T reguladores (Tregs). Como se sabe, los Tregs son los encargados de mantener la tolerancia inmune para evitar la respuesta hacia lo propio, así como para desregular la respuesta inmune en varias patologías. Existen varias evidencias de que los linfocitos T CD4+ CD25+ Tregs juegan un papel importante en suprimir la respuesta mediada por linfocitos T contra la infección por muchos tipos virales en humanos (Marshall *et al.*, 2003; Aandahl *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2004; Suvas *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008). En el caso particular de infecciones persistentes por VPH-16 se ha observado que pacientes que desarrollan neoplasias intraepiteliales (NICs) mantienen cantidades incrementadas de Tregs (Molling *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). Además, la falla en la respuesta inmune de estos pacientes, puede ser naturalmente programada y relacionada a una subpoblación específica de linfocitos T regs. Visser *et al* entre otros autores, han encontrado un incremento en la generación de linfocitos T reguladores CD4+ CD25+<sup>alto</sup> y su influjo en el tumor y nódulos linfáticos en las pacientes a medida que la enfermedad avanza (Visser *et al.*, 2007; Molling *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007). Algunas otras evidencias han demostrado que la presencia de cantidades incrementadas de T regs en pacientes con cáncer cervical, se asocian con la supresión de la respuesta inmune específica a la infección por VPH, por ejemplo en pacientes con positividad a VPH-16, la depleción *in vitro* de células T CD25+, resultó en un incremento de células T productoras de IFN- $\gamma$  contra péptidos de E6 y E7 de VPH-16 (Visser *et al.*, 2007). Aunque la generación de Tregs resulta aún incierta, se ha reportado que las CEMs, pueden ser uno de los candidatos celulares implicados en la inducción de estas células inmunosupresoras, debido a su capacidad de reclutar y mantener la función reguladora de linfocitos T reguladores (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008; Selmani *et al.*, 2008). Por tanto, la presencia de CEMs en tumores cervicales, pueden contribuir de manera muy importante en la supresión de la respuesta inmune local y sistémica, debido ya sea a sus capacidades intrínsecas de generar inmunosupresión, o a la de inducir T regs.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, nos permiten sugerir que las CEMs de Cérvix Normal y CaCu participaron de manera importante en la supresión de la respuesta inmune de los ratones, favoreciendo el desarrollo de tumores en condiciones de protección inmunológica. Lo anterior remarca el papel de las CEMs en el crecimiento de tumores y su posible papel en el escape inmunológico. Por lo que al igual que las células tumorales, estas células resultan ser blancos específicos para proponer estrategias para revertir el crecimiento tumoral y la supresión inmunológica que genera a nivel local y sistémico.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

- 1) La inoculación de CEMs derivadas de Cérvix Normal y CaCu revirtió el efecto protector del péptido antigénico RAHYNIVTF en los animales que fueron previamente inmunizados, ya que favoreció el crecimiento de tumores.
- 2) En ratones que recibieron protección inmunológica, el patrón de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) se encontró ligeramente incrementado, pero predominó la producción de citocinas inmunosupresoras Th2 (IL-4, IL-5) y TGF- $\beta$  durante el desarrollo tumoral.
- 3) El crecimiento de tumores inducidos por las células TC-1 no fue incrementado significativamente por la aplicación de las CEMs en los ratones bajo condiciones normales-, y
- 4) En los ratones que no recibieron protección inmunológica se encontraron bajos o nulos niveles de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  respectivamente; y altos niveles de la citocina inmunosupresora TGF- $\beta$  principalmente en ratones que recibieron TC-1 y CEMs

## **PERSPECTIVAS**

De acuerdo a nuestros resultados, se encontró que las CEMs tienen un papel importante en la supresión de respuesta inmune antitumor, lo cual se vio reflejado en el cambio de perfil de secreción de citocinas y el establecimiento de tumores en ratones con inmunización previa, con estos datos resulta necesario saber el efecto de las CEMs sobre linfocitos T citotóxicos, por lo que sería conveniente evaluar la funcionalidad de estos durante el crecimiento tumoral. Por otra parte, la inmunosupresión causada por las CEMs en este experimento se atribuye a la secreción de factores solubles pero es importante conocer si las CEMs son capaces de arribar al sitio del tumor, así que se debe monitorear el trayecto de las CEMs marcándolas antes de inocular y realizando cortes histológicos de los tumores generados en los ratones para saber si las CEMs inoculadas se encuentran infiltradas.

Además en este caso las células tumorales y las CEMs se inocularon al mismo tiempo, sin embargo existen varios reportes de que las CEMs son reclutadas por quimiocinas secretadas durante procesos inflamatorios o provenientes del microambiente tumoral, lo que resultaría importante averiguar la presencia de receptores específicos para quimiocinas en las CEMs.

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aandahl E, Michaelsson J, Moretto W, Hecht F, Nixon D. 2004. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *Virology*. 78: 2454-2459.
- Abbas A y Lichtman A. 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª ed. Ed. Elsevier. España. 563 pp.
- Aggarwal S and Pittenger M. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105: 1815-1822.
- Albini A and Sporn M. 2007. The tumor microenvironment as a target for hemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 7: 139-147.
- Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, Eljaafari A. 2004. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology*. 41:469.
- Arévalo J, Páez D, Rodríguez V. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Publicación científica en ciencias biomédicas*. 5(8): 177-184.
- Barry F and Murphy J. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Biochem Cell Biol*. 36: 568-584.
- Benton C, Shahdullah H, Hunter J. 1992. Human papillomavirus in the immunocompromised. *Papillomavirus Rep*. 3: 23-26.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105: 2214-2219.
- Birnbaum T, Roider J, Schankin C, Padovan C, Schichor C, Goldbrunner R, Straube A. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Neurooncol*. 83: 241.
- Bosch F and Muñoz N. 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*. 89: 183-190.
- Bossis I, Roden R, Gambhira R, Yang R, Tagaya M, Howley P, Meneses P. 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *Virology*. 79: 6723-6731
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi R, Rosen H, Liu C, Nelson D. 2004. An immunomodulatory role for CD4 (+) CD25 (+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 40: 1062-1071.
- Cao H, Xu W, Qian H, Zhu W, Yan Y, Zhou H, Zhang X, Xu X, Li J, Chen Z, Xu I. 2009. Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer*. 274: 61-71.
- Cárcamo I y Trigueros C. 2008. Células madre mesenquimales y trasplante hematopoyético. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 30: 3-6.
- Chapel A, Bertho J, Bensidhoum M, Fouillard L, Young R, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin N, Gourmelon P, Thierry D. 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *Gene Med*. 5: 1028-1038.

- Conger K, Liu J, Kuo S, Chow L, Wang T. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.* 274: 2696–2705.
- De Palma M, Venneri M, Roca C, Naldini L. 2003. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 9: 789-795.
- De Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H. and Zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
- Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini Z, Sportoletti P, Falzetti F, y Tabilio A. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 36: 309-318.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99: 3838-3843.
- Dias D, Van Doren J, Schlottmann S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, Boerckel P, Kessler J, Antonello JM, Green T, Brown M, Smith J, Chirmule N, Barr E, Jansen KU and Esser MT. 2005. Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(8): 959-969.
- Djouad F, Charbonnier L, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. 2007. Mesenchymal Stem Cells Inhibit The Differentiation Of Dendritic Cells Through An Il-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells.* 10(1634): 1-16.
- Djouad F, Pence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 102: 3837-3844.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 8: 315-317.
- Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang W, Bai W, Yu L, Kowalski J, Liang X, Fuh G, Gerber H, Ferrara N. 2004. VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO.* 23: 2800-2810.
- Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Clin Virol.* 32: 7-15.
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science.* 110: 525-541.
- Fainboim L, y Geffner J. 2005. Introducción a la inmunología humana, 5ta ed., Ed. Medica Panamericana, Argentina, 484pp.
- Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Johgh BM, Brijfhout JW, Ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Immunol.* 23: 2242-2249.
- Feng B and Chen L. 2009. Review of Mesenchymal Stem Cells and Tumors: Executioner or Coconspirator?. *Cancer Biother Radiopharm.* 24: 6.

- Fernández E, González A, Lorenzo S, Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales, recuperado 13 Febrero 2009, de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1252689>.
- Friedenstein A, Chailakhyan R, Latsinik N, Panasyuk A and Keiliss-Borok I. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. Transplant. 17: 331–340.
- Ganong W. 2002. Fisiología Médica. 17a ed., Ed. Manual Moderno, Colombia, 994pp.
- García PJ. 2007. Que hay en el horizonte sobre el virus de papiloma humano, vacunas y el control del cáncer cervical. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 24(3): 272-279.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E, Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood. 105: 2821.
- Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2004. Inmunología. 5ta ed. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México D.F. pág. 665.
- Gostout B, Ferber M, Thorland E, Brink A, Rapp A, Phillips L, Mc Govern R, Cheung T, Chung T, Fu W, Smith D. 2003. Preferential integration of human Papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. Oncogene. 46:7233-7242.
- Harwood C and Proby C. 2002. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. Curr. Opin. Infect. Dis. 15: 101-114.
- Honczarenko M, Lea Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek A, Silberstein L. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. Stem Cells. 24: 1030.
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers ABCarlson J, Li H, Cai X, Fox J, Goldenring J, Wang T. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. Science. 306: 1568-1571.
- Howley P. 2006. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses Amer Clin and Climatol Assoc. 117: 113-127.
- INEGI. 2005. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
- INEGI. 2008. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
- Iwatsuki K, Tagami M, Takigawa M, Yamada M. 1986. Plane warts under spontaneous regression. Immunopathologic study on cellular constituents leading to an inflammatory reaction. Arch Dermatol. 122: 655-659.
- Jaramillo F, Gómez L, Anaya J. 2006. Células T reguladoras, infección y autoinmunidad: implicaciones en terapéutica. Infectio. 10(3): 178-185.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang S, Wu Y, Yu X, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 105: 4120-4126.
- Jodele S, Chantrain C, Blavier L, Lutzko C, Crooks G, Shimada H, Coussens L, Declerck Y. 2005. The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma is matrix metalloproteinase-9 dependent. Cancer Res. 65: 3200-3208.
- Joyce J, Tung J, Przysiecki C, Cook C, Lehman E, Sands J, Jansen K, Keller P. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like

- particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 5810–5822.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. 2007. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 449: 557-563.
  - Khakoo A, Pati S, Anderson S, Reid W, Elshal M, Rovira I, Nguyen A, Malide D, Combs C, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers T, Stetler-Stevenson W, Frank J, Reitz M, Finkel T. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *Exp Med.* 203:1235-1247.
  - Khammanivong V, Liu X, Liu W, Rodda S, Leggatt G, Tindle R, Frazer I, Fernando G. 2003. Paucity of functional CTL epitopes in the E7 oncoprotein of cervical cancer associated human papillomavirus type 16. *Immunol Cell Biol.* 81:1-7.
  - Kidd S; Spaeth E; Klopp A; Andreeff M; Hall B; Marini Fc. 2008. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy.* 10 (7): 657-667.
  - Koyama H, Kobayashi N, Harada M, Takeoka M, Kawai Y, Sano K, Fujimori M, Amano J, Ohhashi T, Kannagi R, Kimata K, Taniguchi S, Itano N. 2008. Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment. *Pathol.* 172: 179-193.
  - Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 101: 3722-3729.
  - Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?. *Hematol.* 92(07): 872-877.
  - Longworth M and Laimins L. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol and Mol Biol Rev.* 68(2): 362-372.
  - Marshall N, Vickers M, Barker R. 2003. Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *Immunol.* 170: 6183-6189.
  - McMillan N, Payne E, Frazer I and Evander M. (1999) Expression of the  $\alpha 6$  integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 261: 271-279.
  - Medzhitov R. 2001. Toll-like receptor and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1 (2): 135-145.
  - Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 103: 4619-4621.
  - Modis Y, Trus B and Harrison S. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO.* 21: 4754-4762.
  - Molling J, de Gruijl T, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer C, Van Den Eertwegh A, Scheper R, von Blumberg M, Bontkes H. 2007. CD4 (+) CD25 (hi) regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 121: 1749-1755.

- Montesinos J, Flores E, Castillo S, Flores P, Hernández E, Fajardo G, Orozco S, Mayani H. 2009. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*. 11(2):163-176.
- Montesinos J, Flores E, Flores P, Gutiérrez G, Arana R, Castillo S, Pérez A, Hernández E, Arriaga L, Mayani H. 2008. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk*. 32(9):1407-1416.
- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, Gissmann L. 2006. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24S3: 1-10.
- Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 65: 3307-3318.
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 2007. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer*. 98(6):874-881.
- Páez D, Arévalo J, Rodríguez Y. 2007. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 5 (8): 101-212.
- Parham P. 2003. Innate Immunity: The unsung heroes. *Nature*. 423 (6935): 20.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *Cancer Clin*. 49: 33-64.
- Pasare C. 2005. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 560: 11-18.
- Patterson N, Smith J, Ozbun M. 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Virology*. 79: 6838-6847
- Paz de la Rosa G, Monroy Garcia A, Mora Garcia M, Reynaga Pena C, Hernandez Montes J, Weiss Steider B, Gomez Lim M. 2009. An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virology*. 6(1):2.
- Persson G, Andersson K, Krantz I. 1996. Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 75: 287-290.
- Pfister H. 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *Natl. Cancer. Inst. Monogr*. 31: 52-56.
- Piersma S, Jordanova E, Van Poelgeest M, Kwappenberg K, Van der Hulst M, Drijfhout J, Melief C, Kenter G, Fleuren G, Offringa R, Van der Burg S. 2007. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer*. 67: 354-361.
- Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284: 143-147.
- Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. 2007. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 92: 881-888.

- 
- 
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplant.* 76: 1208-1213.
  - Robertson M. 1998. Innate Immunity. *Current Biology Magazine.* 8 (17):595-597.
  - Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, and Ono M. 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 133: 775-787.
  - Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella E, Deschaseaux F. 2008. Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *Stem Cells.* 26: 212-222.
  - Serra-Baldrich E. Lesiones anogenitales por papilomavirus. Monografía comentada de D.A. Payne, P.F. Rockley, S.K. Tying. 1993. Diagnostic approaches to human papillomavirus-associated disease. *Current Opinion in Dermatol.* 277-284.
  - Singer A, Ho L, Terry G, Kwie T. 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer. In A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection.* Edward Arnold, London, United Kingdom. p. 105–129
  - Spaeth E, Dembinski J, Sasser K, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. 2009. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *Plos one.* 4: 1-11.
  - Studeny M, Marini F, Champlin R, Zompetta C, Fidler I, Andreeff M. 2002. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 62: 3603-3608.
  - Suvas S, Azkur A, Kim B, Kumaraguru U, Rouse B. 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *Immunol.* 172: 4123-4132.
  - Thomas J, Hubert W, Ruesch M, Laimins L. 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8449–8454.
  - Tindle R. 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2: 1-7.
  - Trus B, Roden R, Greenstone H, Vrhel M, Schiller J, Booy F. 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three dimensional reconstruction to 9A resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4: 413–420
  - Tse W, Pendleton J, Beyer W, Egalka M, Guinan E. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplant.* 75: 389-397.
  - Udagawa T, Puder M, Wood M, Schaefer B, D'Amato R. 2006. Analysis of tumor-associated stromal cells using SCID GFP transgenic mice: contribution of local and bone marrow-derived host cells. *FASEB.* 20: 95-102.
  - Visser J, Nijman H, Hoogenboom B, Jager P, Van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, Van der Zee A, and Daemen T. 2007. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 150: 199-209.

- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol.* 189: 12-19.
- Xu Y, Zhu K, Zhu N, Jiang D, Chen X and Cheng H. 2008. Expression of Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells and Th1/Th2, Tc1/Tc2 profiles in the peripheral blood of patients with condyloma acuminatum. *Clin and Exp Dermatol.* 34: 229-235.
- Yen B and Yen M. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer- for better or for worse. *Cancer Mol.* 4: 5-9.
- Yu J, Jun E, Bae Y, Jung J. 2008. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells.* 17:463-473.
- Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol.* 80: 267-274.
- Zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Nat Can Inst.* 92: 690-698.

## ANEXOS

Tabla 4. Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 sin protección inmunológica y en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs), valores de volumen tumoral total.

|     |    | TRATAMIENTOS |               |                |                |
|-----|----|--------------|---------------|----------------|----------------|
|     |    | TC-1         | TC-1+CEMs-MON | TC-1+CEMs-CaCu | TC-1+CEMs-CNOR |
| DÍA | 10 | 0.00095      | 0.0042        | 0.21215        | 0.0697         |
|     | 13 | 0.7931       | 0.5186        | 0.68045        | 0.58885        |
|     | 15 | 1.40805      | 0.8575        | 1.66905        | 0.77865        |
|     | 17 | 3.3882       | 1.43945       | 3.55055        | 1.34125        |
|     | 21 | 5.7289       | 2.7934        | 3.58625        | 5.462          |
|     | 22 | 6.44085      | 3.8583        | 3.7355125      | 6.4092         |
|     | 24 | 12.2597      | 11.05365      | 7.13825        | 7.07115        |
|     | 27 | 16.31465     | 11.1193       | 14.16295       | 10.0897        |
|     | 29 | 17.2965625   | 13.75185      | 15.66785       | 11.4923        |
|     | 31 | 19.55765     | 13.88885      | 20.4059        | 13.85225       |
|     | 34 | 22.9287      | 19.4051       | 22.8444        | 22.3338        |

Tabla 5. Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 con protección inmunológica y en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs), valores de volumen tumoral total.

|     |    | TRATAMIENTOS |                |                |               |
|-----|----|--------------|----------------|----------------|---------------|
|     |    | TC-1         | TC-1+CEMs-CaCu | TC-1+CEMs-CNOR | TC-1+CEMs-MON |
| DÍA | 19 | 0            | 0.00005        | 0.00005        | 0             |
|     | 21 | 0            | 0.5008         | 0.38725        | 0             |
|     | 23 | 0            | 0.60905        | 0.79385        | 0             |
|     | 26 | 0            | 1.24805        | 1.03685        | 0             |
|     | 28 | 0            | 1.68745        | 1.96025        | 0             |
|     | 30 | 0            | 3.7098         | 4.74325        | 0             |
|     | 33 | 0            | 6.1952         | 5.95205        | 0             |
|     | 35 | 0            | 6.9938         | 6.48405        | 0             |
|     | 37 | 0            | 10.58          | 7.0353         | 0             |
|     | 40 | 0            | 12.8018        | 13.0178        | 0             |

### Análisis de citocinas Th1 y Th2 en suero de ratones con protección inmunológica

Tabla 6. Producción de IFN- $\gamma$  en ratones C57BL/6 con y sin inmunización previa y con reto tumoral (valores representativos).

| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> |                  | SIN INM. | CON INM. |
|--------------------------------|------------------|----------|----------|
| 0 DIAS                         | PREINMUNE        | 0        | 0        |
| 10 DIAS                        | TC-1             | 0        | 2.390405 |
|                                | TC-1 + CEMs-MON  | 0        | 0        |
|                                | TC-1 + CEMs-CNOR | 0        | 5.210918 |
|                                | TC-1 + CEMs-CaCu | 0        | 10.65343 |
| 15 DIAS                        | TC-1             | 0        | 1.662531 |
|                                | TC-1 + CEMs-MON  | 0        | 0        |
|                                | TC-1 + CEMs-CNOR | 0        | 3.788255 |
|                                | TC-1 + CEMs-CaCu | 0        | 9.263854 |
| 30 DIAS                        | TC-1             | 0        | 1.952026 |
|                                | TC-1 + CEMs-MON  | 0        | 2.497932 |
|                                | TC-1 + CEMs-CNOR | 0        | 4.234905 |
|                                | TC-1 + CEMs-CaCu | 0        | 5.508685 |

Tabla 7. Producción de IL-2 en ratones C57BL/6 con y sin inmunización previa y con reto tumoral (valores representativos).

| <b>IL-2</b> |                  | SIN INM.   | CON INM.   |
|-------------|------------------|------------|------------|
| 0 DIAS      | PREINMUNE        | 4.05415162 | 4.05415162 |
| 10 DIAS     | TC-1             | 3.92779783 | 2.765517   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 3.70036101 | 0          |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 4.03610108 | 3.524138   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 3.92057762 | 4.141379   |
| 15 DIAS     | TC-1             | 3.77978339 | 2.217241   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 3.93862816 | 0          |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 3.85559567 | 3.027586   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 3.70036101 | 4.210345   |
| 30 DIAS     | TC-1             | 3.92779783 | 3.065517   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 3.7400722  | 4.996552   |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 3.79783394 | 3.458621   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 3.83393502 | 4.737931   |

Tabla 8. Producción de IL-4 en ratones C57BL/6 con y sin inmunización previa y con reto tumoral (valores representativos).

| <b>IL-4</b> |                  | SIN INM.   | CON INM.   |
|-------------|------------------|------------|------------|
| 0 DIAS      | PREINMUNE        | 1.25162171 | 1.25162171 |
| 10 DIAS     | TC-1             | 0.91020826 | 1.676012   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 0.71511486 | 0          |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 1.08579232 | 2.074766   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 0.89069892 | 2.542056   |
| 15 DIAS     | TC-1             | 0.71023753 | 1.638629   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 0.82241623 | 0          |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 0.77852022 | 2.043614   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 0.67121885 | 2.900312   |
| 30 DIAS     | TC-1             | 0.70536019 | 1.950156   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 0.90045359 | 3.096573   |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 0.61756816 | 2.127726   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 0.68585085 | 3.127726   |

Tabla 9. Producción de IL-5 en ratones C57BL/6 con y sin inmunización previa y con reto tumoral (valores representativos).

| <b>IL-5</b> |                  | SIN INM.   | CON INM.   |
|-------------|------------------|------------|------------|
| 0 DIAS      | PREINMUNE        | 3.50698642 | 3.50698642 |
| 10 DIAS     | TC-1             | 2.83311862 | 2.838645   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 3.68536319 | 0          |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 3.45743732 | 3.476096   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 3.37815876 | 3.13745    |
| 15 DIAS     | TC-1             | 2.07006243 | 2.121514   |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 2.92230701 | 0          |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 3.14032306 | 2.559761   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 1.95114458 | 4.661355   |
| 30 DIAS     | TC-1             | 2.06015261 | 2.50996    |
|             | TC-1 + CEMs-MON  | 2.86284808 | 5.62749    |
|             | TC-1 + CEMs-CNOR | 1.75294817 | 3.396414   |
|             | TC-1 + CEMs-CaCu | 1.9115053  | 2.081673   |

Tabla 10. Producción de TNF- $\alpha$  en ratones C57BL/6 con y sin inmunización previa y con reto tumoral (valores representativos).

| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> |                  | SIN INM.   | CON INM.   |
|--------------------------------|------------------|------------|------------|
| 0 DIAS                         | PREINMUNE        | 0.61491161 | 0.61491161 |
| 10 DIAS                        | TC-1             | 0          | 0          |
|                                | TC-1 + CEMs-MON  | 0          | 0          |
|                                | TC-1 + CEMs-CNOR | 3.92006149 | 5.842697   |
|                                | TC-1 + CEMs-CaCu | 3.53574174 | 27.70787   |
| 15 DIAS                        | TC-1             | 0          | 0          |
|                                | TC-1 + CEMs-MON  | 9.72328978 | 0          |
|                                | TC-1 + CEMs-CNOR | 0          | 5.05618    |
|                                | TC-1 + CEMs-CaCu | 0          | 25.4382    |
| 30 DIAS                        | TC-1             | 3.24750192 | 0          |
|                                | TC-1 + CEMs-MON  | 2.07532667 | 1.292135   |
|                                | TC-1 + CEMs-CNOR | 0          | 0          |
|                                | TC-1 + CEMs-CaCu | 0          | 3.820225   |

Tabla 11. Producción de TGF- $\beta$  en ratones C57BL/6 con y sin inmunización previa y con reto tumoral (valores representativos).

| <b>TGF-<math>\beta</math></b> |                  | SIN INM. | CON INM. |
|-------------------------------|------------------|----------|----------|
| 0 DIAS                        | PREINMUNE        | 494      | 494      |
| 10 DIAS                       | TC-1             | 634      | 275      |
|                               | TC-1 + CEMs-MON  | 581      | 0        |
|                               | TC-1 + CEMs-CNOR | 710      | 720      |
|                               | TC-1 + CEMs-CaCu | 1094     | 974      |
| 15 DIAS                       | TC-1             | 0        | 944      |
|                               | TC-1 + CEMs-MON  | 711      | 0        |
|                               | TC-1 + CEMs-CNOR | 619      | 324      |
|                               | TC-1 + CEMs-CaCu | 843      | 364      |
| 30 DIAS                       | TC-1             | 533      | 0        |
|                               | TC-1 + CEMs-MON  | 238      | 920      |
|                               | TC-1 + CEMs-CNOR | 1256     | 670      |
|                               | TC-1 + CEMs-CaCu | 704      | 233      |