



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS T
PERIFÉRICOS E INFILTRANTES DEL TUMOR EN PACIENTES
CON CÁNCER CERVICOUTERINO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (INMUNOLOGÍA)

PRESENTA

BIOL. CINTHYA ESTEFHANY DÍAZ BENÍTEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. VICENTE MADRID MARINA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis dos invaluable tesoros, Dara Vanessa y Jairo Isaac por ser mi mejor incentivo en la vida y en la culminación de este proyecto. Gracias por su sincero amor, por sus inolvidables sonrisas y abrazos, por comprender el no tener una madre disponible al 100%, pero que siempre los tiene presentes en su pensamiento y corazón, procurando estén bien en todo momento.

A dos grandes pilares en la vida, mis queridos padres Alfredo Díaz Pedroza y Maricela Benítez de Díaz por todo su amor y entrega para darme siempre lo que consideraron mejor. Gracias por su apoyo constante e incondicional en muchos sentidos. Gracias por ser mis padres.

A mis mejores amigos y queridos hermanos, Priscilla Díaz Benítez y Alfredo Díaz Benítez por su amor, apoyo y por ser también un incentivo en este difícil y largo proceso de formación académica.

A mi esposo Ismael Hernández Lucas, por su amor, comprensión y motivación en los momentos difíciles, por el apoyo académico, en la donación de reactivos; pero sobre todo por compartir conmigo el cuidado de nuestros hijos y permitirme así realizar el Doctorado.

A mi abuela Josefina Ortega por su amor y apoyo que también contribuyó en mi carrera como profesionista. A mis parientes y amigos por desatenderlos un poco en el afán de concluir con este proyecto.

A dos entrañables amigos, el Dr. Jesús Caballero Mellado que estuvo siempre pendiente de mi formación académica, mi trabajo y mi familia, y del que tendré siempre gratos recuerdos. Y a mi otro querido hermano Ramsés Hernández Lucas por su sincero amor y apoyo en muchos sentidos. También dedico esta tesis a personas que contribuyeron con el inicio de esta carrera y a las que aprecio mucho, la Dra. Yolanda Fuchs Gómez y el Dr. Marco A. Pardo.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Dr. Vicente Madrid Marina por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por permitirme continuar con mi formación académica al realizar un Doctorado directo, y por todas las experiencias obtenidas durante la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Yvonne Rosenstein Asoulay y el Dr. Hernández Pando; así como al Dr. José Moreno Rodríguez por permitirme hacer uso de sus laboratorios y reactivos. Por sus muy acertados comentarios y correcciones durante los tutorales o en la revisión del artículo, por su comprensión y apoyo, gracias.

A los Doctores miembros del Jurado de tesis: Sara Huerta Yopez, Alejandro Manuel García Carranca, Patricio Gariglio Vidal, Carlos Rosales Ledezma y Vicente Madrid Marina por su amable atención y valiosas correcciones.

Al Dr. Celso Ramos y Dr. Raúl Barrera por su permitirme muy amablemente hacer uso de equipo en su laboratorio. Al Dr. Felipe Uribe por su apoyo con el análisis estadístico. A los patólogos y médicos: Guillermina López, Ludwig González, Edgar Román, Patricia Alonso por su entusiasta participación para proporcionarme las muestras biológicas y el diagnóstico colposcópico o histopatológico. A las Dras. Guadalupe Ayala e Ivone castro por su comprensión y apoyo.

A mis amigos o compañeros de los diferentes laboratorios por su apoyo, comprensión y en algunos casos por proporcionar tips para llevar a cabo algunas técnicas de laboratorio: Janet Juárez, Flor Tavernier, Atala Flores, Karla Navarro, Jesús Martínez, Carla Contreras, Margarita Bahena, Guillermo Perales, Víctor Bermúdez, Alfredo Lagunas, Oscar Peralta, Gloria Fernández, del CISEI (INSP). Al actual director del INSP, el Dr. Mario Henry Rodríguez por su apoyo y comprensión. A Patricia Rojo y Gibrán Pérez del Centro Médico SXXI. Al Dr. Llorente, Milena Saki, Héctor Maldonado, Héctor Orozco y Diana Aguilar del INNSSZ. A la Lic. Natalia López y al personal de la biblioteca del INSP por su amable atención. Y a todas aquellas personas que por su compañerismo dieron apoyo moral en la realización de esta tesis o incluso donaron sangre para los experimentos.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la UNAM por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado en este programa de excelencia. Y al personal que lo constituye por todo el apoyo y orientación para la realización de mis trámites, especialmente a la Dra. Yolanda López Vidal y a la secretaria Evita Vargas. Me honra presentar esta tesis ante dicha Institución de gran prestigio internacional, y que dignamente representa uno de los más altos niveles académicos de nuestro país.

Agradezco de igual manera al Centro de Investigación sobre enfermedades infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP) por formar parte él, brindarme la oportunidad de estudiar en este posgrado, y por la infraestructura y financiamiento otorgado para la realización de la tesis. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SEP) por financiar el proyecto 49574-24483-M y por el apoyo económico otorgado para conseguir reactivos, asistir a Congresos y por la beca designada con el número 153082, los cuales fueron indispensables para mi formación académica y la realización de esta tesis.

INDICE

1	RESUMEN	6
2	ABSTRACT	7
3	INTRODUCCIÓN	8
3.1	Cáncer cervicouterino (CaCU)	8
3.1.1	<i>Aspectos epidemiológicos y generalidades</i>	8
3.1.2	<i>Histopatología</i>	9
3.1.3	<i>Manifestaciones clínicas y tratamiento</i>	11
3.1.4	<i>Factores de riesgo</i>	12
3.2	Virus del Papiloma Humano (VPH)	14
3.2.1	<i>Características y clasificación del VPH</i>	14
3.2.2	<i>Ciclo del VPH</i>	19
3.3	Respuesta inmune en lesiones del cérvix y CaCU	22
3.3.1	<i>Características generales de la inmunidad</i>	22
3.3.2	<i>Alteraciones provocadas por el VPH en la respuesta inmune local</i>	28
3.3.3	<i>Linfocitos T y CaCU</i>	32
3.4	Activación de linfocitos T y CaCU	35
3.4.1	<i>Receptor de células T</i>	35
3.4.2	<i>Señalización a través del TCR/CD3</i>	37
3.4.3	<i>CaCU y otras patologías relacionadas con la expresión de CD3ζ</i>	40
4	JUSTIFICACIÓN	41
5	HIPÓTESIS	41
6	OBJETIVOS	42
6.1	Objetivo general	42
6.2	Objetivos específicos	42
7	MATERIALES Y MÉTODOS	43
7.1	Reactivos y medios de cultivo	43
7.2	Selección de pacientes	43
7.3	Criterios de inclusión y exclusión	43
7.4	Recolección de muestras	43
7.5	Aislamiento de leucocitos periféricos e infiltrantes del tumor	44
7.6	Cuantificación de leucocitos	44
7.7	Digestión de tejido cervical con proteinasa K	45

7.8	Extracción de RNA total de leucocitos y biopsias	45
7.9	Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA).....	45
7.10	Extracción de DNA total de biopsias	46
7.11	Amplificación por PCR de una región conservada del VPH	46
7.12	Determinación del tipo de VPH	46
7.13	Citometría de flujo	47
7.14	Inmunohistoquímica	47
7.15	Ensayo de estimulación y proliferación de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor	48
7.16	RT-PCR de citocinas y CD3 ζ	48
7.17	Análisis estadístico	50
8	RESULTADOS	50
8.1	Determinación del tipo viral a partir de DNA de los tejidos cervicales	50
8.2	Proporción y localización de células T en biopsias cervicales de pacientes con CaCU	51
8.3	Respuesta proliferativa de linfocitos T en pacientes con CaCU	53
8.4	Patrón de citocinas en células T de pacientes con CaCU	56
8.5	Presencia del RNA mensajero de CD3 ζ en linfocitos periféricos e infiltrantes del tumor	60
9	DISCUSIÓN	64
10	CONCLUSIONES	68
11	PERSPECTIVAS	69
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
13	ANEXOS	92
13.1	Publicaciones generadas como productos de la realización de la presente tesis	92
13.1.1	<i>Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V, et al. CD3-ζ expression and T cell proliferation are inhibited by TGF-β1 and IL-10 in cervical cancer patients. Journal of Clinical Immunology 2009, 29:532-544.</i>	
13.1.2	<i>Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V, et al. TGF-β and IL-10 inhibit T lymphocytes proliferation and CD3-ζ Expression in cervical cancer women. UICC World Cancer Congress. Free Papers. Washington, DC., U.S.A. Medimond International Proceedings. 8-12 de Julio de 2006.</i>	

1 RESUMEN

El virus del papiloma humano es el agente causal del cáncer cervicouterino (CaCU). Alteraciones inmunológicas favorecen la persistencia viral y como consecuencia el desarrollo del CaCU. En el presente trabajo analizamos el comportamiento molecular y funcional de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor en mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas del cérvix o CaCU. Las células T fueron evaluadas mediante proliferación celular, presencia del RNAm de citocinas Th1, Th2, Th3, y de la cadena zeta del receptor de linfocitos T. También se determinó la proporción de linfocitos T CD4 y de CD8 por citometría de flujo e inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que al inicio de la enfermedad, la respuesta de las células T periféricas de mujeres con lesión intraepitelial es muy similar a la de mujeres sanas; excepto por la presencia del RNAm de la cadena zeta, cuya frecuencia disminuye significativamente conforme progresa la enfermedad. En mujeres con CaCU se observaron diversos cambios en la respuesta de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor tales como: baja respuesta proliferativa, disminución en la frecuencia del RNAm de citocinas Th1 y de la cadena zeta; así como prevalencia del RNAm de citocinas Th2 (IL-4) y Th3 (TGF-beta1). Además, la proporción de linfocitos T CD8 fue mayor que la de CD4 en muestras de sangre y biopsias cervicales de mujeres con cáncer. Estos resultados demuestran que los linfocitos T en mujeres con CaCU presentan múltiples alteraciones funcionales, las cuales impiden una respuesta inmunológica adecuada en contra del virus del papiloma humano. De acuerdo a lo anterior proponemos que la enfermedad progresa debido a estas alteraciones inmunológicas, sin duda inducidas por la acción de las oncoproteínas virales. Estos hallazgos constituyen una base de referencia para futuros estudios de inmunoterapia y desarrollo de vacunas en los cuales se requiere conocer el comportamiento molecular, la distribución y abundancia de linfocitos T en las diferentes etapas de evolución a CaCU.

2 ABSTRACT

The human papillomavirus is the etiologic and causal agent of cervical cancer (CC). Immunologic alterations favor viral persistence and consequent CC development. In this work, we analyzed molecular performance of peripheral and tumor infiltrating T lymphocytes in women with squamous intraepithelial lesions of the cervix or CC. T cells were evaluated by cellular proliferation, presence of mRNA for Th1, Th2, Th3 cytokines and of the CD3 zeta chain from the T cell receptor. The proportion of CD4 and of CD8 T cells was determined by flow cytometry and immunohistochemistry. The results demonstrated that at the beginning of the illness, peripheral T cells response in women with intraepithelial lesions is very similar to that observed in T cells from healthy women, except for the presence of CD3 zeta mRNA whose frequency diminished significantly according to the illness progression. Different changes were observed in peripheral and tumor infiltrating T cell response in women with CC such as low proliferation, diminished frequency of Th1 cytokines and CD3 zeta mRNA, as well as in the prevalence of Th2 (IL-4) and Th3 (TGF-beta1) cytokines mRNA. Additionally, the proportion of CD8 T lymphocytes was higher than CD4 cells in samples from blood and cervical biopsies of women with cancer. These results demonstrated that T lymphocytes in women with CC have functional alterations that cause an inefficient immunological response against the human papillomavirus. Based on this, we propose that CC progression is due to these immunological alterations undoubtedly induced by the action of viral oncoproteins. These findings will be useful for future studies in immunotherapy and vaccines that require knowledge of the molecular performance, distribution and proportion of T cells during different stages of CC.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer cervicouterino (CaCU)

3.1.1 Aspectos epidemiológicos y generalidades

El cáncer cervicouterino es considerado en el 2002 como el segundo cáncer común en mujeres de todo el mundo; con un registro de 493,000 casos y 274,000 muertes.¹

Figura 1. Se estima que de los 493,000 casos diagnosticados con CaCU; 83,400 provienen de países desarrollados y 409,400 de países en vías de desarrollo.²

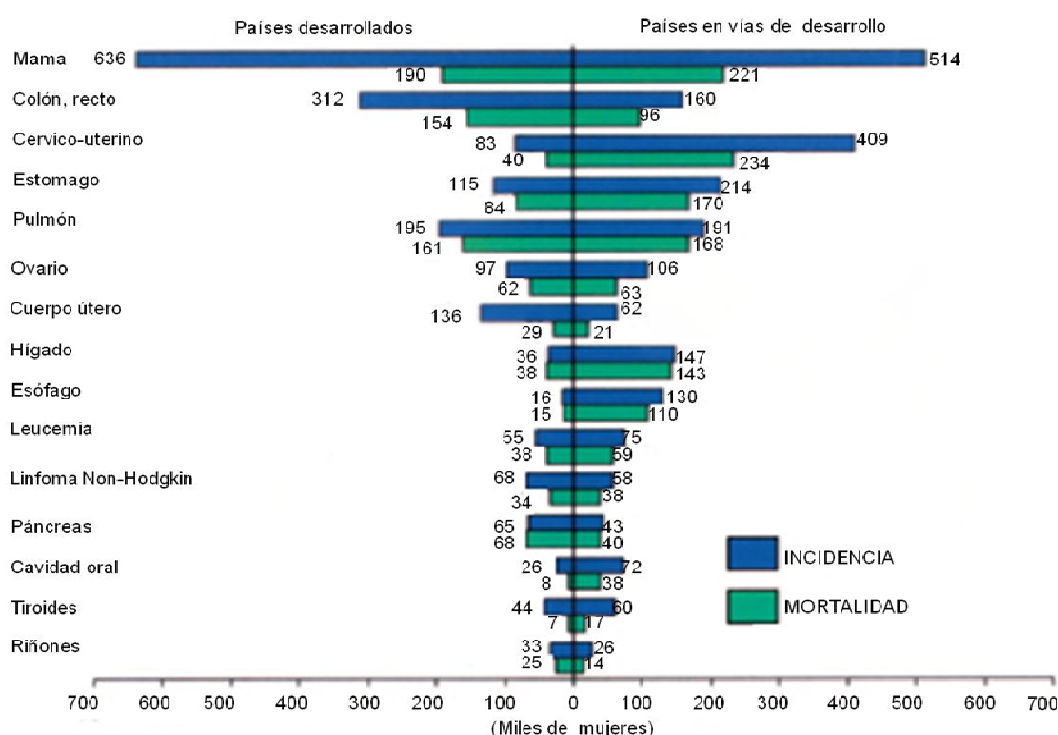


Figura 1. Números estimados de casos de cáncer (incidencia) y de muertes (mortalidad) en el 2002.¹

El análisis estadístico de tasas estandarizadas por edad en el 2008 ubica al CaCU en el tercer lugar de los cánceres más comunes en mujeres, con una estimación de 530,000 nuevos casos (76,000 en países desarrollados y 453,000 de países en vías de desarrollo) y 275,000 muertes. La prevalencia de este cáncer ha disminuido en los países desarrollados debido a la implementación de programas de diagnóstico temprano; sin embargo, continúa presentándose una alta incidencia en Oriente-Occidente y Sur de África, en Melanesia, Sur-Centro de Asia, América latina y en el Caribe (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp#MORTALITY>). En una

reunión convocada en Mayo del 2008 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el Instituto de Vacunas Sabin, y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), se estimó que 33,000 mujeres mueren cada año en América Latina y el Caribe por CaCU (<http://www.paho.org/spanish/dd/pin/ps080514.htm>). El número de casos en México para 1996 fue de 15,312; que represento el 18.1 % de los tumores malignos totales.³ En el 2000, se estimaron 6650 muertes en México, considerándose a este país como el segundo con más casos en Latinoamérica después de Brazil.⁴ Los nuevos casos y muertes para el 2008 fueron de 10,186 y 5061, respectivamente (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp#MORTALITY>).

3.1.2 Histopatología

El CaCU se origina como resultado de una serie de alteraciones genéticas que regulan la proliferación celular y apoptosis desestabilizando así la homeostasis celular. Esta neoplasia se genera en una zona de alto riesgo de transformación displásica, la zona escamocolumnar o de transición; en la que se unen el epitelio cilíndrico glandular del endocérvix y el epitelio plano pluriestratificado no queratinizado del ectocérvix. Este sitio de unión se caracteriza por tener una gran actividad de proliferación y de remodelación debido al continuo efecto de hormonas ováricas, coito, menarca, embarazo, reacciones inflamatorias, traumas físicos, que provocan un cambio del epitelio cilíndrico al epitelio plano denominado metaplasia.⁵

Normalmente el CaCU comienza con lesiones locales limitadas al epitelio que son anomalías histológicas denominadas lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) o neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC). De acuerdo al sistema de Bethesda, las LIE de bajo grado (LIEBG), corresponden a un condiloma, displasia leve, coilocito o NIC I; y las de alto grado (LIEAG) son la displasia moderada/severa, NIC II-III y carcinoma *in situ* (que presenta un aumento de células, núcleos atípicos y falta de diferenciación del tejido).⁶ Se estima que aproximadamente 20% de los NIC I progresaran a NIC II, y que el 30% de estas lesiones puede progresar a una lesión más severa si no se somete a un tratamiento. Además, el 40% de las NIC III puede progresar a CaCU.⁷ Cuando las células neoplásicas rompen la membrana basal se produce la invasión del estroma conocida como carcinoma invasor. Los estadios del CaCU se clasifican en I-IV de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO 2002, <http://www.biocancer.com/journal/211/cancer-de-cervix>). **Tabla 1, Figura 2.**

TABLA 1. ESTADIOS DEL CaCU.

TNM*	FIGO	DESCRIPCIÓN
Tis	Estadio 0	Carcinoma <i>in situ</i> , carcinoma intraepitelial.
T1	Estadio I	Carcinoma confinado estrictamente al cuello uterino (no debe tomarse en cuenta la extensión hacia el cuello uterino).
T1a	Estadio IA	Carcinomas preclínicos del cuello uterino, diagnosticados solo por microscopio.
T1a1	Estadio IA1	Invasión del estroma <3mm a partir de la base del epitelio, ya sea superficial o glandular desde el cual se origina y no >7mm de ancho.
T1a2	Estadio IA2	Invasión del estroma <3mm en profundidad pero no >5 mm, y no debe exceder de >7mm de ancho.
T1b	Estadio IB	Lesiones preclínicas de mayor extensión que el IA o tumores clínicos limitados al cérvix.
T1b1	Estadio IB1	Lesiones de 4 cm o menos.
T1b2	Estadio IB2	Lesiones que miden más de 4 cm (en forma de barril o bulky)
T2	Estadio II	El carcinoma se extiende más allá del cuello uterino, pero sin alcanzar la pared pélvica. El carcinoma afecta la vagina, sin llegar al tercio inferior de esta.
T2a	Estadio IIA	No hay afección paramétrica. Pueden afectarse hasta 2/3 superiores de la vagina.
T2b	Estadio IIB	Hay afección paramétrica manifiesta, sin llegar a la pared pélvica.
T3	Estadio III	El carcinoma se ha extendido hasta la pared pélvica (a la exploración rectal no se encuentra espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica), el tumor abarca al tercio inferior de la vagina, existe hidronefrosis o insuficiencia renal.
T3a	Estadio IIIA	No hay extensión hacia la pared pélvica, pero si a 1/3 inferior de la vagina.
T3b	Estadio IIIB	Extensión hacia la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal.
T4	Estadio IV	El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis verdadera o afecta desde el punto de vista clínico a la mucosa de la vejiga o recto. El edema bulloso, como tal, no permite que un caso se incluya IV.
N1	Estadio IVA	Extensión del crecimiento hacia los órganos adyacentes.
M1	Estadio IVB	Extensión hasta órganos a distancia.

*TNM equivale a las siglas de "Tumor, Node, Metastasis" de acuerdo al Comité Estadounidense de la Unión Internacional contra el Cáncer (American Joint Committee on Cancer, AJCC, 2002).

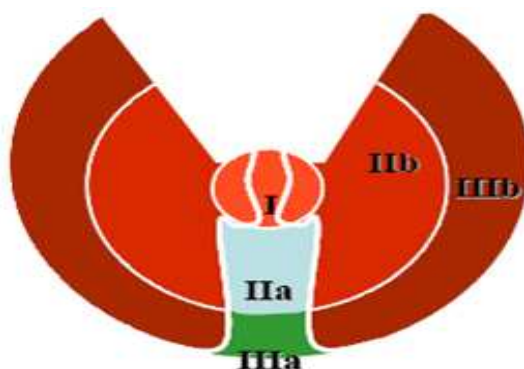


Figura 2. Clasificación de la FIGO. Representación de la extensión del CaCU. Estadio I: carcinoma confinado al cérvix. Estadio IIa y IIIa: carcinoma invasor en vagina. Estadio IIb y IIIb: carcinoma con infiltración de parametrios y extensión hacia pared pélvica. www.biocancer.com/journal/211/cancer-de-cervix.

En México, el tipo de CaCU más frecuente es el escamoso o epidermoide (>90%), que se inicia en la región del epitelio escamoso del ectocérvix. A este grupo pertenecen los carcinomas no queratinizantes de células grandes (70%), los queratinizantes (21%), y los de células pequeñas (~4%). El adenocarcinoma del endocérvix representa con este último el 4%.⁸

3.1.3 Manifestaciones clínicas y tratamiento

La enfermedad pre-invasiva puede ocurrir sin producir síntomas y generalmente es detectada en los estudios citológicos del cérvix por Papanicolaou y colposcopia. Cuando la enfermedad es invasiva, se presenta un sangrado vaginal anormal a veces oloroso después del coito o ducha vaginal. El dolor pélvico o por debajo de las costillas y por encima del íleon es signo probable de una hidronefrosis asintomática complicada con pielonefritis. También se presenta dolor en la ciática y edema en la pierna que están asociados con la metástasis del tumor. Las pacientes con tumores avanzados tienen hematuria o incontinencia de la fístula vesícula-vaginal causada por la invasión de la vejiga. Los casos de estreñimiento son debido a la compresión del recto por un tumor primario masivo. En estas pacientes, los estudios de Tomografía Axial Computarizada (TAC) de pelvis y abdomen, Cistoscopia, Rectoscopia, Radiografía de tórax, ayudan a definir el grado de avance de acuerdo al riesgo de diseminación.⁹

La elección del tipo de tratamiento para las lesiones pre-invasoras está determinada por el criterio clínico del especialista de acuerdo a la experiencia, los recursos, y la validación clínica de la paciente individual.¹⁰ Cuando existen lesiones pre-invasoras se puede utilizar crio-coagulación, diatermo-coagulación, conización en frío, conización asa LEEP (Loop Electrosurgical Excisional Procedure) y ablación con

láser. En casos de recidiva de una lesión de alto grado se realiza histerectomía. En lesiones invasoras se indica: conización (en casos etapificados como FIGO I A1, que desean preservar fertilidad), histerectomía radical, linfadenectomía pélvica, radioterapia externa con o sin quimioterapia concomitante, radioterapia intracavitaria.^{9, 11-12}

3.1.4 Factores de riesgo y alteraciones genéticas

La presencia del genoma del virus del papiloma humano (VPH) en más del 99% de las biopsias provenientes de pacientes con CaCU¹³ y la alteración en diferentes procesos celulares mediada por las proteínas del virus (ver **Tablas 2-5**), sugieren que el VPH es la principal causa del desarrollo de lesiones pre-malignas y malignas del cérvix. Evidencias epidemiológicas reportan que solo los casos con infecciones persistentes por el VPH pueden progresar a CaCU, mientras que los estudios *in vitro* demuestran que las oncoproteínas virales E6 y E7 cooperan con oncogenes celulares para inducir la inmortalización y la transformación de las células epiteliales normales del huésped. Por lo que la presencia del VPH aunada a la acción de otros factores contribuye a la carcinogénesis del cérvix.¹⁴ Aún se desconoce si el VPH es el inductor de los cambios que favorecen el desarrollo del CaCU o si se asocia a otros factores desencadenando la enfermedad.

Así, se ha demostrado que algunos cofactores exógenos y endógenos, junto con la infección por el VPH pueden influir en la progresión de la infección a CaCU; entre ellos, los partos múltiples, el tabaquismo y el uso de anticonceptivos orales por largos períodos.¹⁵ La co-infección con otros patógenos como el virus Herpes simplex y *C. trachomatis* también está asociada con el riesgo de CaCU en mujeres con infección persistente por el VPH de alto riesgo.¹⁶⁻¹⁸ Las personas inmunosuprimidas y las VIH positivas tienen mayor riesgo de infectarse con el VPH y desarrollar la enfermedad.¹⁹ La mayoría de edad, la carga viral alta, el inicio de la vida sexual a edad temprana, el número de parejas sexuales y el nivel socioeconómico bajo se asocian con un mayor riesgo de infección por VPH e indirectamente con el desarrollo de LIE y CaCU debido a la persistencia del virus.²⁰

Otros estudios sugieren que en infecciones persistentes por el VPH, los nutrientes pueden conferir un efecto protector de neoplasias cervicales como son los folatos, el retinol y la vitamina E; posiblemente también los vegetales, las vitaminas C y B₁₂, los alfa-carotenos, los beta-carotenos, el licopeno, la luteína/zeaxantina y la criptoxantina. Mientras que altos niveles de homocisteína en sangre se asocian con un alto riesgo de desarrollar neoplasias cervicales.²¹

Además de los factores anteriormente mencionados, diversos análisis moleculares y citogenéticos han demostrado que existen cambios genéticos que determinan el desarrollo del CaCU. Así, la pérdida de la función de genes es necesaria para originar una neoplasia. Se ha identificado pérdida de la heterocigosidad (mutaciones en ambos alelos del gene) en los brazos de los cromosomas 1q, 2q, 3q, 4p, 4q, 5p, 5q, 6q, 7q, 8p, 8q, 11q, 13q, 16p, 18p y 19p en el 20-33% de los tumores cervicales. Mientras que el porcentaje de tumores cervicales con pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 6p, 3p, 18q, 11p y 17p es del 43, 39, 35, 16 y 15% respectivamente.²² Cabe resaltar que en el cromosoma 11 se encuentra el protooncogén *H-ras-1*.¹⁴ Mutaciones de este gen dan lugar a proteínas alteradas que contribuyen a la transformación celular maligna al provocar un aumento de la capacidad de invasión y metástasis del tumor, así como disminución de la apoptosis; al regular positivamente los niveles de expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.²³⁻²⁵ Interesantemente, se observa que del 90% de los cánceres cervicales con fenotipo-genotipo alterado del HLA clase I (complejo mayor de histocompatibilidad, MHC, conocido como antígeno de leucocitos humanos), el 70% es debido a múltiples alteraciones genéticas en el cromosoma 6p21.²⁶

Así mismo, tres genes supresores de tumores se encuentran en la región terminal 5p15.3,²⁷ conocidos como *PDCD6* (cuya proteína ALG-2 es importante para el receptor de células T, de Fas, y de la muerte celular inducida por glucocorticoides),²⁸ el gen *TERT* (del componente de la transcriptasa reversa de la telomerasa cuya disfunción promueve la inestabilidad de los cromosomas),²⁹ y el gen *TRIP13* (cuya proteína interactúa con el receptor hormonal de la tiroides y se une a la proteína E1 del VPH16).³⁰ En esta misma región terminal se encuentra el gen *POLS* que codifica para la DNA polimerasa σ , la cual participa en la replicación del DNA y en la unión de las cromátidas hermanas.³¹ Los análisis por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) semicuantitativo en líneas celulares derivadas de CaCU no muestran cambios en la expresión de estos genes,²⁷ sin embargo, se ha visto que la delección genómica en el brazo 5p correlaciona con vías de inactivación genética o epigenética de *p53* (mutaciones y delecciones) y con infecciones del cérvix por el VPH.³²

Otros eventos encontrados en los estadios avanzados del tumor son la amplificación de los genes *PIK3CA*,³³ *c-myc*, *ErbB2*³⁴ y *clAP1*,³⁵ mutaciones en *ras*,³⁴ y expresión disminuida de *PTEN*³⁶ y *TSLC1*.³⁷ Cabe notar que existe una correlación en las alteraciones ocurridas entre *c-myc* y *ras*, que además son indicio de un pronóstico no favorable en las pacientes.³⁸⁻³⁹ Esta diversidad en los patrones de alteración genómica determinan los diferentes perfiles de riesgo y la patogénesis

moleculares necesarios en el desarrollo del CaCU, y por lo tanto en el pronóstico y desenlace de la enfermedad.³²

Sin embargo, cabe resaltar que la persistencia del VPH es crucial en el desarrollo del CaCU; ya que este virus para replicar su genoma modula el ciclo celular y a la vez ejerce mecanismos que le permiten escapar de la respuesta inmune del huésped, de la senescencia celular y de la apoptosis. De esta manera, el VPH contribuye directa o indirectamente a la inestabilidad genómica favoreciendo eventos genéticos de transformación y progresión hacia la malignidad.⁴⁰

3.2 Virus del papiloma humano (VPH)

3.2.1 Características y clasificación del VPH

Los virus del papiloma (VP) pertenecientes a la familia *Papillomaviridae* se han clasificado en base a las secuencias nucleotídicas del marco de lectura abierto del gen que codifica para la proteína L1 de la cápside viral. Se han descrito completamente 118 tipos de VP, de los cuales 96 infectan al humano.⁴¹ **Figura 3.**

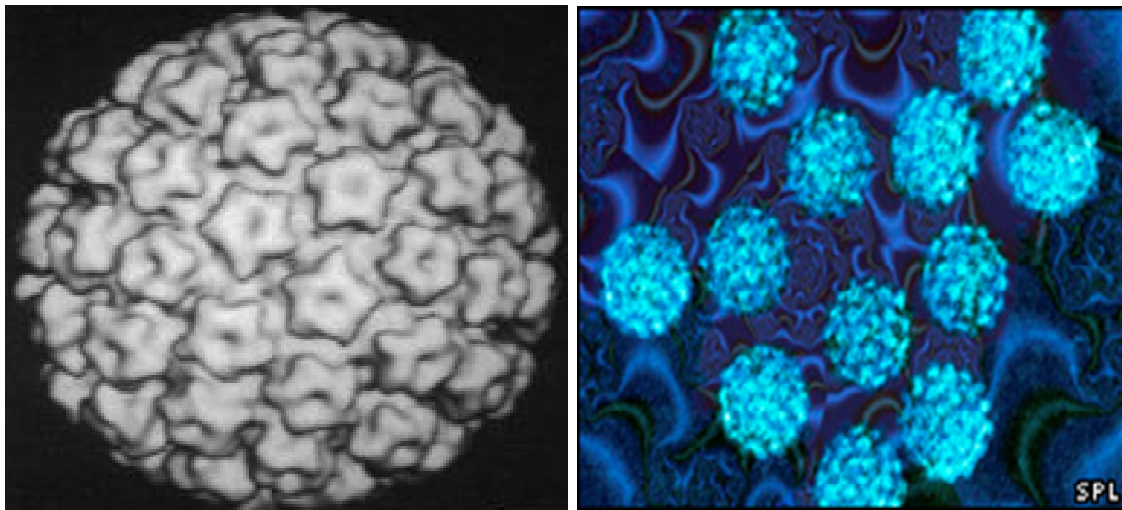


Figura 3. Electro-microfotografía del VPH. Superficie reconstruida del VPH-1 (izquierda) y representación de partículas virales (derecha) con los capsómeros en forma de estrella.⁴²
<http://images.search.yahoo.com/search/images?ei=UTF.8&fr=sfp&p=human+papillomavirus>

Las partículas del VP con diámetro de 52-55 nm, están compuestas por una cápside con simetría icosaédrica de 72 capsómeros, sin envoltura. Esta cápside consiste de dos proteínas estructurales: la mayor o L1 con peso molecular de 55 kDa (que representa ~80% de la proteína total del virus) y la proteína menor o L2 de ~70 kDa. La cápside contiene el genoma viral constituido por una molécula circular de DNA

de doble cadena de 7.8-8 kb dividido en 3 regiones: 1) una región no codificante conocida como región larga de control (LCR) o región regulatoria (URR) de ~1 kb; 2) una región temprana con marcos de lectura abierto de los genes E6, E7, E1, E2, E4, E5; y 3) una región tardía que codifica para L1 y L2 de la cápside.⁴³ **Figura 4.**

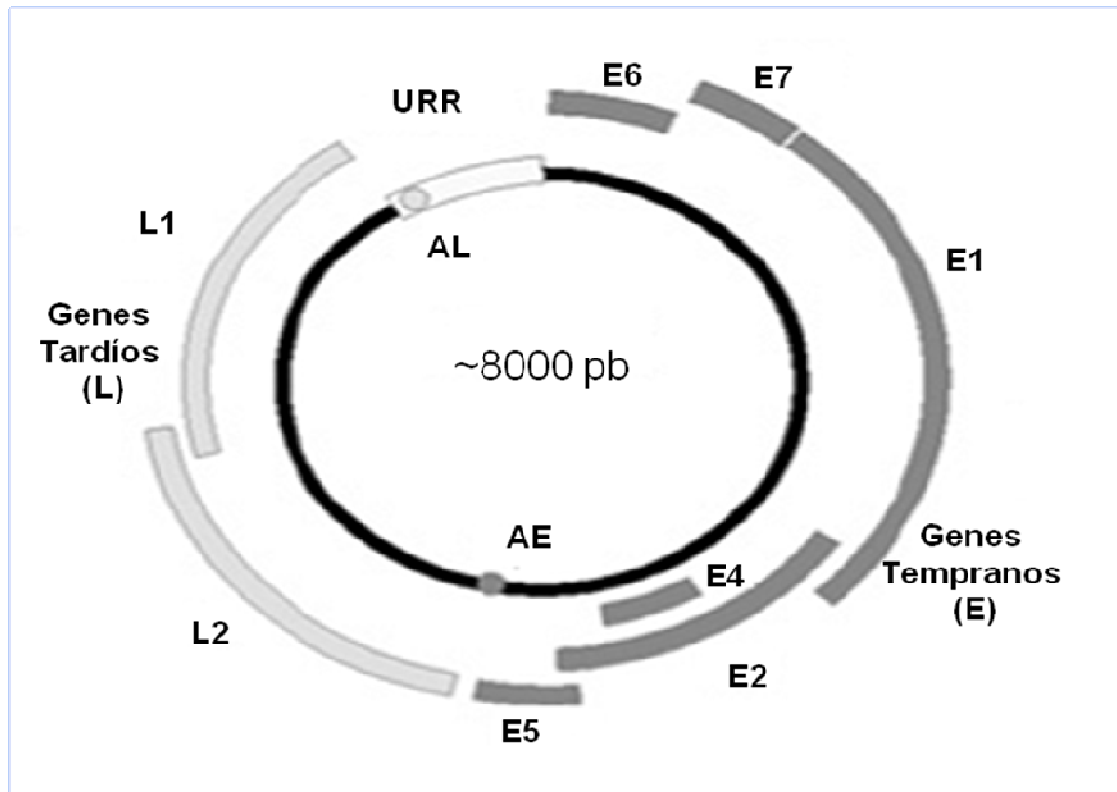


Figura 4. Organización del genoma del VPH16. El genoma de los diferentes tipos de VPH es altamente conservado. Las proteínas tempranas (E) son requeridas para la replicación del DNA y expresión de los genes virales. Las proteínas tardías (L) forman la cápside viral. Solo una de las dos cadenas de DNA sirve de plantilla para la expresión de los genes virales que codifican para varios transcritos de RNAm policistrónico. La transcripción es regulada por secuencias potenciadoras en la región regulatoria URR a la cual se unen factores celulares y la proteína E2 del virus. Los sitios de inicio de la transcripción varían dependiendo el tipo viral, pero todos los promotores dependen de la diferenciación de los queratinocitos.⁴⁴

Las proteínas virales de expresión temprana regulan la replicación del DNA viral, el control de la transcripción y contribuyen en la transformación celular. Mientras que las de expresión tardía participan en el ensamblaje viral.⁴⁴ **Tabla 2.**

TABLA 2. FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE VPH DE ALTO RIESGO.⁴⁴

ORF	FUNCIÓN
E1	Actividad de helicasa, ATPasa, proteína de unión de ATP esencial para la replicación viral.
E2	Factor de transcripción viral. Se une a E1 para facilitar la replicación del DNA viral importante en el encapsidamiento del genoma.
E4	Interactúa con las proteínas del citoesqueleto. Permite el ensamblaje viral.
E5	Actividad transformante débil. Regula (+) los receptores del factor de crecimiento en la membrana celular.
E6	Se une a p53 induciendo su degradación por ubiquitinación. Inmortaliza queratinocitos humanos junto con E7.
E7	Se une a pRB y desregula los puntos de control del ciclo celular en las fases G1/S.
L1	Proteína de la cápside mayor.
L2	Proteína de la cápside menor.

Especialmente, las proteínas E6, E7 y E1 regulan la expresión de genes heterólogos al interactuar con otras proteínas celulares, generando en conjunto con otros factores, un proceso de transformación e inmortalización de la célula epitelial.⁴⁵

Tablas 3-5.

TABLA 3. PROTEÍNAS CELULARES QUE SE UNEN A E6.⁴⁶

PROTEÍNA CELULAR BLANCO	FUNCIÓN CELULAR DE LA PROTEÍNA BLANCO	POSIBLES CONSECUENCIAS DE LA INTERACCIÓN PARA LA CÉLULA
AMF-1/Gps2	Incrementa la actividad de p300.	Supresión de Gps2. Activación de la transcripción.
Bak	Miembro de la familia Bcl-2; proteína pro-apoptótica.	Efecto anti-apoptótico
CBP/p300	Coactivador de p53. Activación de genes de control del ciclo celular, de la diferenciación y de la respuesta inmune.	Regulación negativa de la transcripción dependiente de p53.
c-Myc	Factor de transcripción; inducción de apoptosis.	Impedir la apoptosis dependiente de c-Myc.
E6AP	Regulación de la transducción de señales en células en proliferación mediante la degradación de la cinasa Blk de la familia src.	Desregulación de estas señales de transducción. Factor esencial para la actividad degradativa de E6.
E6TP1	Proteína activadora de la GTPasa (GAP) – Regulador negativo de Rab.	Inhibición de la señal mitogénica mediada por Rab.
ERC55 (E6BP)	Proteína de unión a calcio, participa en la diferenciación de las células epiteliales y en la inhibición de la apoptosis.	Inhibición de la diferenciación terminal de células epiteliales. Inhibición de la apoptosis independiente de p53.
hDLG/Sap97	Homólogo humano de la proteína supresora de tumores de los discos largos de <i>Drosophila</i> , importante en la formación de polaridad en células epiteliales en diferenciación. Formación y mantenimiento de las uniones intercelulares.	Afecta la adhesión celular, polaridad y proliferación, lo que contribuye a la actividad invasora de las células transformadas.
HScrib	Homólogo humano de la proteína supresora de tumores Scrib de <i>Drosophila</i> , que controla la formación de las uniones intercelulares epiteliales e inhibe el crecimiento celular.	Pérdida de la adhesión celular y de la polaridad.

Factor regulatorio 3 del interferón	Inducción del RNAm del interferón. Transactivador de los interferones.	Respuesta celular inadecuada a la infección viral (no hay interferencia con la replicación viral, ni incremento de MHC-I, ni activación de las células NK).
MAGI – 1/2/3	Proteínas de la unión estrecha; formación de complejo con β -catenina. Regulador del supresor de tumores PTEN.	Afecta la señalización Akt. Inhibición de la apoptosis independiente de p53.
Mcm7	Iniciación de la replicación del DNA.	Omisión del punto de arresto en G1. Posible modulación de la abundancia de Mcm7.
Mupp1	Proteína de andamio con múltiples sitios PDZ. Posible papel en la transducción de señales.	Ruptura del ensamblaje de los complejos de señalización en las membranas de las células epiteliales.
Paxilina	Proteína de adhesión focal; participa en la adhesión celular y en la regulación del citoesqueleto de actina.	Ruptura del citoesqueleto de actina y de las interacciones de la matriz celular.
p53	Proteína supresora de tumores. Presenta relación con la respuesta inmune celular al regular los eventos mitogénicos.	Pérdida del control del ciclo celular. Efectos anti-apoptóticos.
XRCC1	Proteína de reparación del DNA.	Interferencia con la eficiencia de reparación.

TABLA 4. PROTEÍNAS CELULARES QUE SE UNEN A E7.⁴⁶

PROTEÍNA CELULAR BLANCO	FUNCIÓN CELULAR DE LA PROTEÍNA BLANCO	POSIBLES CONSECUENCIAS DE LA INTERACCIÓN PARA LA CÉLULA
Miembros de la familia AP1	Factores de transcripción	Pérdida de la actividad de IRF-1
α -glucosidasa	Enzima del control glucolítico	Activación alostérica que consume las reservas de glucógeno. Promoción de hiperproliferación celular
Ciclina A, Ciclina E	Actividad de cinasa	Activación de ciclina A y E
Cinasa de la histona H1	Actividad de cinasa	Interferencia con la transición G2/M del ciclo celular
HTid-1	Homólogo al supresor de tumores de <i>Drosophila</i> Tid56 DnaJ, modulador de la apoptosis	Activación de los promotores que responden a E2F
IGFBP-3 (proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina)	Blanco transcripcional de p53 que limita la disponibilidad de IGF	Decremento en la cantidad de IGFBP
IRF-1 (Factor transcripcional inducido por el interferón- γ)	Regula la expresión de IFN- β	Inhibición de la activación del promotor del IFN- β mediada por el IRF-1, a través de una deacetilasa de histonas
Mi2 β	Deacetilasa de histonas	Pérdida de la actividad transcripcional de IRF-1
Mpp2	Factor de transcripción	Carente actividad de IRF-1
M2 piruvato-cinasa (M2-PK)	Modulación de la actividad de la enzima glucolítica M2	Cambio de la forma tetramérica de alta afinidad por su sustrato al estado dimerico de baja afinidad de la M2-PK
Prb	Regula el ciclo celular al unirse al factor de transcripción E2F	Fosforilación de pRB y subsecuente liberación de E2F que induce ubiquitinación y degradación
Proteínas pocket asociadas a Prb	Regula el control del ciclo celular	Pérdida del control del ciclo celular y activación de genes específicos para la progresión del ciclo celular
P21CIP-1	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P27KIP-1	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular

p48	Proteína reguladora de interferón (componente de unión al DNA de ISGF3). Proteína mensajera	Inhibición de las vías de señalización del interferón por medio de la translocación de p48 a núcleo debido a la estimulación con IFN- α
ATPasa subunidad 4	Subunidad S4 del proteosoma 26S	Degradación de pRB mediante la unión directa al proteosoma
TAF110 (Factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA)	Co-activador en la regulación del inicio de la transcripción	Modulación de la transcripción
TBP (Proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción	Interferencia con la activación de los promotores que responden a p53

TABLA 5. PROTEÍNAS CELULARES QUE SE UNEN A E1.⁴⁶

PROTEINA CELULAR BLANCO	FUNCIÓN CELULAR DE LA PROTEINA BLANCO	POSIBLES CONSECUENCIAS DE LA INTERACCION PARA LA CELULA
DNA Polimerasa α (DNA-P α), subunidades p70 y p180	Replicación	Atracción hacia el complejo de iniciación, una vez liberado E2 ESPECIE
RPA	Replicación	Estabilización de la cadena sencilla, una vez abierto el dúplex
Histona H1 (58)	Empaquetamiento de la cromatina	Descondensación de la cromatina por delante de la horquilla de replicación
Ini1/hSNF5 (59)	Regulación de la transcripción al remodelar la cromatina	Contribución de SWI / SNF en la replicación al remodelar la cromatina
Chaperona Hsp40 y Hsp70 (54)	Maduración de proteínas	Promoción de unión de E1 al DNA, formación de hexámeros dobles en el Ori

Todos estos reportes hacen evidente la implicación que tiene el VPH en el desarrollo de la enfermedad al interferir en diversos procesos celulares mediante la interacción de sus proteínas virales con proteínas del hospedero.

Los VPH son específicos de especie y con una historia natural de la infección diferente dependiendo del tipo viral.⁴⁷ El análisis filogenético de una región nucleotídica del gen *E6* de 24 VPH agrupa a estos virus de acuerdo a su tropismo por un tejido específico y al potencial oncogénico en 2 grupos: virus que infectan la piel y los que infectan las membranas de mucosas.⁴⁸ Mientras que la relación entre el grado de lesión en el cérvix y la presencia de un tipo de VPH define a los VPH en 4 categorías: los de bajo riesgo (VPH 6, 11, 42, 43, 44) presentes en lesiones cervicales de bajo grado; los de riesgo intermedio (VPH 31, 33, 35, 51, 52, 58) presentes en lesiones cervicales prioritariamente de alto grado; los de alto riesgo/VPH16 asociados con lesiones de alto grado y cáncer; y los de alto riesgo/VPH18 (VPH 18, 45 y 56) más frecuentes en carcinomas invasores.⁴⁹ De acuerdo a lo evaluado por la International Agency for Research on Cancer (IARC) en el 2005, los tipos virales involucrados en el desarrollo del CaCU son los virus HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66.

El VPH16 juega un papel causal en el cáncer de vulva, vagina, pene, ano, cavidad oral y orofaringe, y una limitada asociación con el cáncer de laringe y piel periungal.² Este virus se ha asociado con tumores queratinizantes de células grandes y una menor tasa de recurrencia. Mientras que el VPH18 se asocia más con adenocarcinomas o carcinomas adenoescamosos, pobremente diferenciados, con un comportamiento más agresivo; por lo que presenta una alta incidencia de metástasis hacia los nódulos linfáticos, pobre respuesta al tratamiento y una alta tasa de recurrencia de la enfermedad.⁵⁰⁻⁵⁴

La infección por el VPH es asintomática y puede pasar inadvertida clínicamente, e incluso desaparecer en varios meses, o persistir (en 15% de los casos). Dependiendo del tipo viral y de los tejidos infectados, la persistencia de los VPH puede conducir a diversas alteraciones entre ellas, la formación de verrugas, neoplasias intraepiteliales e incluso carcinomas.^{47, 55} A nivel celular, la infección por este virus se caracteriza por la presencia de coilocitos mono y binucleados, vacuolización citoplásmica prominente, disqueratocitos de citoplasma queratinizado con núcleos grandes e irregulares.⁵⁶

3.2.2 *Ciclo del VPH*

El ciclo viral está ligado al proceso de diferenciación de los queratinocitos. El virus infecta a estas células en las capas basales del epitelio, posteriormente estas células infectadas se diferencian en las capas intermedias del epitelio donde se producen altos niveles de proteínas virales y en las capas superficiales ocurre el ensamblaje del virus.⁵⁷

Al inicio de la infección, las abrasiones o lesiones microcutáneas favorecen que el VPH tenga acceso a las células basales del epitelio, que se encuentran en proliferación y son más susceptibles a la infección por este virus. Se ha demostrado que los viriones del VPH16 se unen al Heparán Sulfato ubicado en la superficie celular⁵⁸⁻⁶⁰ a través de la proteína viral L1.⁶¹ Esto desencadena cambios conformacionales en la proteína L2 de la cápside lo cual expone el extremo amino de esta proteína a la acción enzimática de la convertasa de pro-proteínas furina, conocida como PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme).⁶² La proteólisis de L2 expone sitios ocultos de L1 que son necesarios para que el virus pueda unirse a los receptores putativos de adhesión celular $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$, pertenecientes a la familia de las integrinas.⁶³⁻⁶⁴ El mecanismo de entrada a la célula de la mayoría de los VPH es por endocitosis mediada por clatrina; sin embargo, los VPH 16, 31 y 58 tienen diversos mecanismos de infección.⁶⁵⁻⁶⁷ Las partículas virales se desensamblan en los endosomas tardíos o lisosomas, y el DNA es conducido al núcleo con la ayuda de la

proteína viral L2. Los transcritos virales pueden detectarse 12 h después de la infección, incrementándose con los días. Posteriormente se lleva a cabo el ensamblaje y liberación de los viriones.^{66,68}

El VPH inicia su ciclo infectivo con un DNA circular de bajo número de copias.⁵⁷ Manteniéndose así y probablemente en un estado de latencia en las células basales en división. Las células infectadas en las capas parabasales entran en una fase proliferativa en la cual el DNA viral está en forma episomal y la expresión de los genes virales tempranos es mínima, especialmente la de E6 y E7, que se encuentran reprimidos por E2.⁶⁹⁻⁷⁰ Al parecer, existe replicación del DNA viral durante la fase S del ciclo celular inducida por las proteínas tempranas del virus E1 y E2, que son las primeras en expresarse. Estas dos proteínas forman un complejo que se une al origen de replicación viral reclutando polimerasas y proteínas accesorias de la célula para que se lleve a cabo la replicación del DNA viral en sincronía con el de la célula.⁷¹⁻⁷³ El establecimiento del genoma viral está asociado con la expresión de transcritos tempranos del VPH que codifican para las oncoproteínas E6, E7 y E5 y para las proteínas E1 y E2.⁷⁴ E2 juega un papel crucial en la segregación del genoma generándose cerca de 50 a 100 copias virales por célula.⁷⁵ Durante la división de las células infectadas, una de las células hijas continua dividiéndose promoviendo la replicación del DNA viral en el estrato basal y parabasal; mientras que la otra célula migra a la región intermedia correspondiente al compartimento de diferenciación.^{57,74,69} Aquí, las proteínas E6 y E7 del virus al interactuar con las proteínas celulares p53 y pRB respectivamente, inhiben el arresto del ciclo celular y alteran el proceso normal de diferenciación activándose así el promotor del virus.⁷⁶ E7 reactiva la maquinaria de replicación de DNA de la célula huésped favoreciendo la replicación viral.⁷⁷ Así, existe mayor replicación del DNA viral, expresión masiva de los genes virales tempranos y tardíos; y amplificación del número de copias virales hasta al menos 1000 copias por célula.⁷⁸ Por último, en las capas superiores del epitelio, se observa que cesa la producción de las oncoproteínas virales E6 y E7 y se expresa la proteína E4, la cual participa con las proteínas L1 y L2 en el ensamblaje de las partículas virales. Posteriormente los viriones serán liberados por las células senescentes o en descamación.^{57,69,79-81} Por lo que el virus no requiere de lisis o necrosis a la célula para propagarse e infectar a nuevos individuos. **Figura 5.**

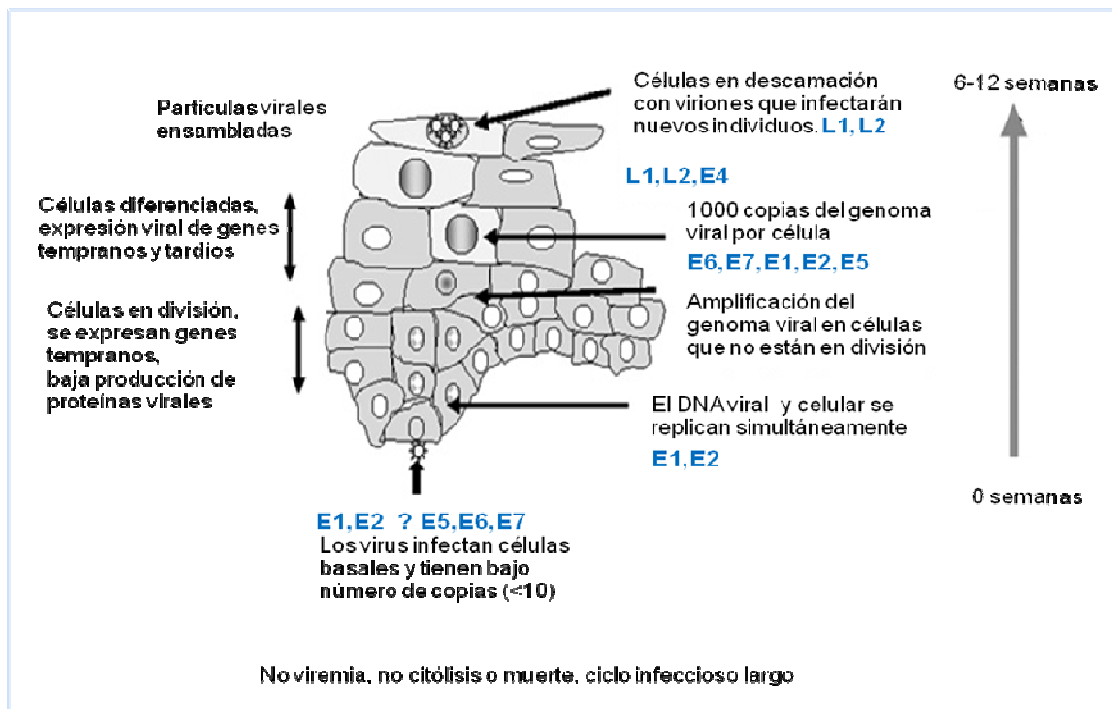


Figura 5. Ciclo productivo del VPH16. El ciclo infeccioso es dependiente del programa de diferenciación de los queratinocitos, los virus infectan la capa basal del epitelio y solo en los queratinocitos diferenciados se ensamblan las partículas virales.⁴⁴

Este ciclo de replicación viral ocurre en alrededor de tres semanas. Sin embargo, cuando la infección por el VPH de alto riesgo es persistente y no se completa el ciclo viral, se originan lesiones del epitelio en lapso de semanas o meses. En las LIEBG el genoma viral se encuentra generalmente en forma episomal, mientras que en lesiones avanzadas o cáncer se integra al DNA de la célula huésped.⁸² La integración del DNA viral ocurre frecuentemente con deleciones grandes de DNA,⁸³ lo cual rompe el marco de lectura de E2 que provoca la pérdida de su función transcripcional represora, por lo tanto, existe expresión desregulada de las oncoproteínas E6 y E7. Como se mencionó anteriormente, estas proteínas al unirse a diversas proteínas celulares favorecen la acumulación de cambios genéticos y en conjunto con otros factores el desarrollo del CaCU.⁸⁴⁻⁸⁵ Esto representa el fin del ciclo viral, debido a que ya no se producen viriones infecciosos y se puede observar que las células en proliferación y con presencia de E6 y E7 ocupan gran parte del epitelio en LIEAG severas.^{69,74} **Figura 6.**

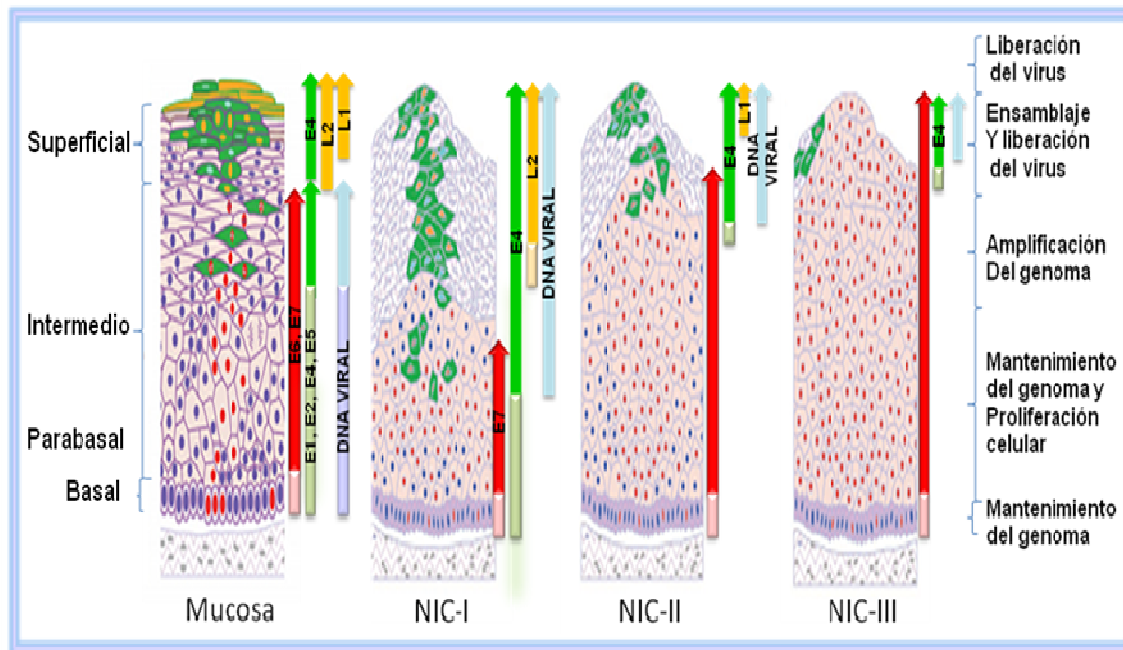


Figura 6. Modelo de la infección productiva y no productiva del VPH. El virus infecta las capas basales del epitelio. Las proteínas E6 y E7 se representan como círculos rojos y se expresan en las capas basales, parabasales e intermedias del epitelio. Los círculos azules representan los núcleos de células no infectadas o no permisivas. Las células en verde expresan E4. Los núcleos de células que expresan L1 se representan en naranja, mientras que los núcleos color turquesa solo contienen el DNA viral amplificado. Este modelo indica que al igual que en una infección productiva, en las capas superficiales de una LIEBG (NIC-I) se observan regiones con expresión de proteínas requeridas para el ensamblaje viral como E4, L1, L2; mientras que en LIEAG severas (NIC-III) en donde el ciclo viral no se completa, estas proteínas son escasas y existe mayor expresión de E6 y E7 en gran parte del epitelio.^{69,74,79}

3.3. Respuesta inmune en lesiones del cérvix y CaCU

3.3.1 Características generales de la inmunidad

El tracto genitourinario en mujeres al igual que los demás sistemas de mucosas, responde ante la constante presencia de antígenos extraños. El mecanismo exacto por el cual el VPH infecta el estrato basal del epitelio del cérvix y activa la respuesta inmune de mucosas y sistémica en las pacientes infectadas no se ha esclarecido. Sin embargo, se supone que la primera barrera de defensa ante el VPH en el tracto genital son las células epiteliales de la mucosa vaginal o queratinocitos;⁸⁶ que se encuentra reforzada por otros elementos de la inmunidad natural local como son los bacilos de Doderlein, la acidez vaginal, el moco cervico vaginal, y secreciones de β -defensinas (péptidos con actividad bactericida y antiviral) por las mismas células epiteliales.⁸⁷⁻⁸⁸ Estas células también producen citocinas (GM-CSF, IL-1 β , TNF- α e IL-10) y quimiocinas (MIP-3 α y RANTES) que ayudan a la migración, activación y diferenciación de células de la inmunidad innata (células de Langerhans, macrófagos, células asesinas naturales o NK, neutrófilos) y a la activación de la respuesta inmune

adaptativa específica mediada por células T y B.⁸⁹⁻³⁹³ En la activación de estas células también participan los receptores tipo Toll (TLR). Estos receptores se expresan en diversas células (células dendríticas, macrófagos, monocitos, células B y T, células epiteliales, fibroblastos), confiriéndoles capacidad para alertar al sistema inmune al reconocer patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs). Estos productos derivados de patógenos actúan como ligandos de los TLRs específicos para componentes de la pared celular, proteínas, ácidos nucleicos o compuestos químicos sintéticos.⁹⁴⁻⁹⁷

La infección por el VPH no produce un daño o alteración celular evidente, así, en mujeres aparentemente sanas, el virus se encuentra en un estado latente en el cual no se generan partículas virales que sean reconocidas por la respuesta inmune innata. Posteriormente, al final de la etapa productiva del virus, los viriones se liberan debido al proceso de descamación de las células epiteliales y pueden desencadenar una respuesta inmune innata y adaptativa. De esta manera la infección es detectada clínicamente.

De acuerdo a lo que se conoce sobre las infecciones virales, las células de Langerhans o dendríticas inmaduras de la epidermis son capaces de captar y procesar a los antígenos virales en el sitio de la infección. Posteriormente, estas células en proceso de maduración migran a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos cercanos. Ahí, las células dendríticas maduras actúan como células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) exponiendo en su superficie los péptidos antigénicos virales asociados al MHC. El reconocimiento de estos péptidos activa a las células T antígeno específicas las cuales después de un período de proliferación y diferenciación podrán ejercer su función para eliminar a las células infectadas.⁹⁸⁻¹⁰¹

La expresión del MHC es muy importante ya que de ello depende la presentación de antígenos por las CPA y el reconocimiento de estos por las células T. Las moléculas del MHC-I presentan preferentemente pequeños péptidos antigénicos derivados de proteínas endógenas, que son generados por la degradación de proteínas en el citosol, posiblemente por la acción del complejo proteosomal.¹⁰²⁻¹⁰³ Estos péptidos son translocados al retículo endoplásmico por los transportadores asociados con la presentación de antígenos (TAP).¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Posteriormente el complejo MHC-I/péptido es presentado en la superficie de las CPA a las células T CD8⁺, lo cual activa a estas células cuya actividad citotóxica eventualmente conducirá a la destrucción de la célula infectada.^{101-102,106}

La expansión de células T citotóxicas *in vivo* depende de IL-2 y otras citocinas producidas por las células T CD4⁺ ayudadoras (Th), las cuales son activadas al

reconocer antígenos endógenos o exógenos opsonizados asociados al MHC-II, el cual se expresa en las CPA. Los linfocitos T vírgenes CD4⁺ y CD8⁺, una vez activados son atraídos posteriormente al sitio de la infección en donde cumplen su función dependiendo de la estirpe celular.¹⁰¹ **Figura 7.**

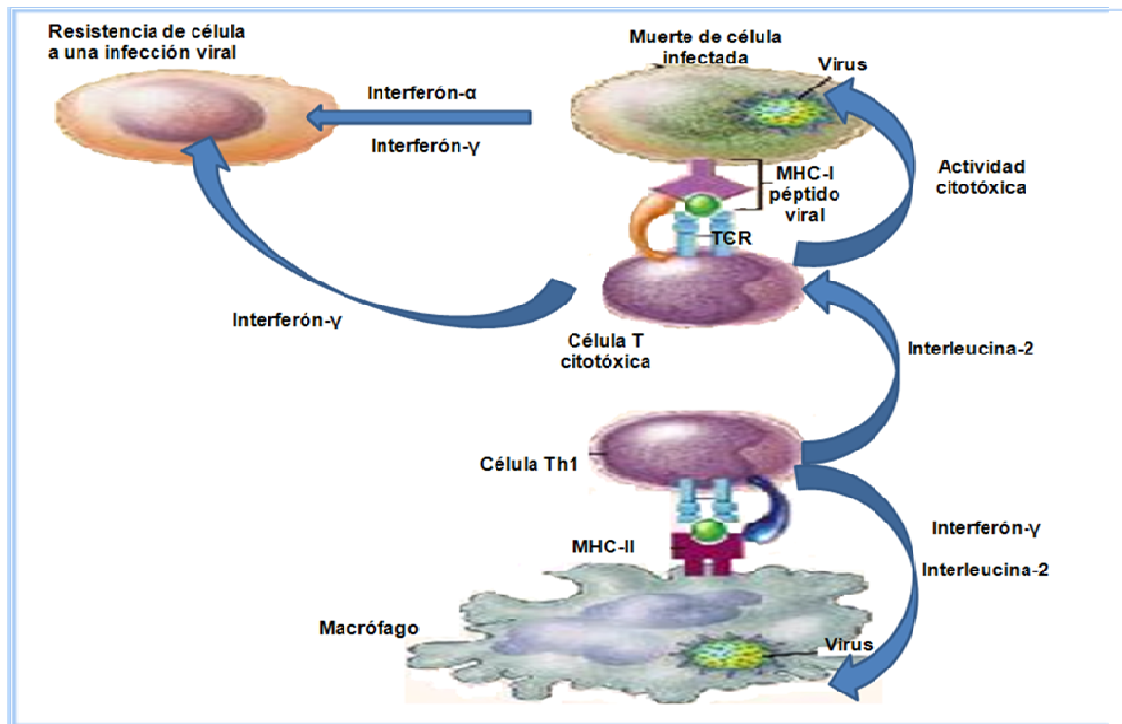


Figura 7. Reconocimiento de los antígenos virales y respuesta de células T. Los antígenos son procesados y presentados en asociación con el MHC por las CPA. Las células T CD4⁺ reconocen los péptidos procesados y se activan produciendo citocinas que activan tanto a las CPA como a las células CD8⁺. Estas últimas reconocen los péptidos virales asociados al MHC-I en las células infectadas, eliminándolas. Las células infectadas también secretan citocinas que ayudan a las células vecinas a evitar una infección por el virus.¹⁰¹

Las células T citotóxicas CD8⁺ eliminan a los tumores o células infectadas por virus mediante un mecanismo de citotoxicidad antígeno específico, induciendo a las células blanco al proceso de apoptosis mediante la liberación de gránulos de perforina y granzima (también se pueden liberar TNF-α y linfotóxina-“TNF-β”), o a través de la interacción de ligando de Fas (en el linfocito) y su receptor (en la célula blanco). La mayoría de las células T citotóxicas son CD8⁺, sin embargo, cerca del 10% son CD4⁺ y su mecanismo de citotoxicidad es principalmente a través de FasL. Mientras que las células NK utilizan sus gránulos.¹⁰⁷ **Figura 8.**

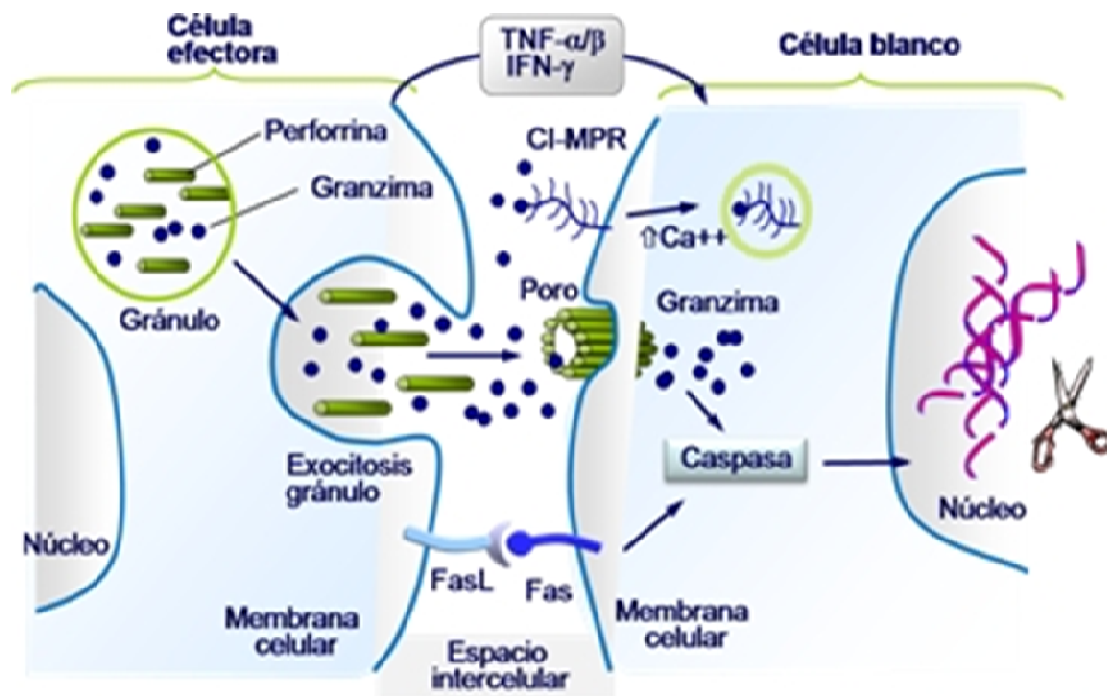


Figura 8. Mediadores de la fase lítica de linfocitos T. Después del reconocimiento de antígeno a través del TCR se pueden activar dos vías independientes de citotoxicidad mediada por células T, que finalmente conducen a la muerte de la célula blanco: la liberación de granulos que contienen perforina y granzima; y la activación de apoptosis a través de FasL-Fas. TNF e IFN- γ pueden contribuir a este efecto citotóxico.¹⁰⁷ www.inmunologiaenlinea.com
Editor: José Peña Martínez

Por otra parte, dependiendo de la respuesta inmune primaria, del microambiente y de las señales recibidas de ciertas citocinas, las células T CD4⁺ se pueden diferenciar a su vez en tres o cuatro clases diferentes y secretar diversos patrones de citocinas regulando una respuesta inmune eficiente contra el patógeno **Figura 9.** Así, las citocinas IFN- γ e IL-12 inducen la diferenciación de células CD4⁺ Th1 productoras de IFN- γ , lo cual favorece la eliminación de patógenos intracelulares. Sin embargo, en presencia de IL-4 se diferencian células Th2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13 y median una respuesta inmune contra helmintos.¹⁰⁸ Cuando predominan IL-6 en conjunto con TGF- β e IL-23 se genera un linaje recién descrito denominado Th17, que induce la producción de quimiocinas por células epiteliales y del estroma para reclutar neutrófilos al sitio infectado por bacterias extracelulares y hongos.¹⁰⁹ En ciertas condiciones, TGF- β o IL-10 inducen la diferenciación de células T CD4⁺ reguladoras (Treg), que regulan la respuesta inmune por diferentes mecanismos.¹¹⁰⁻¹¹²

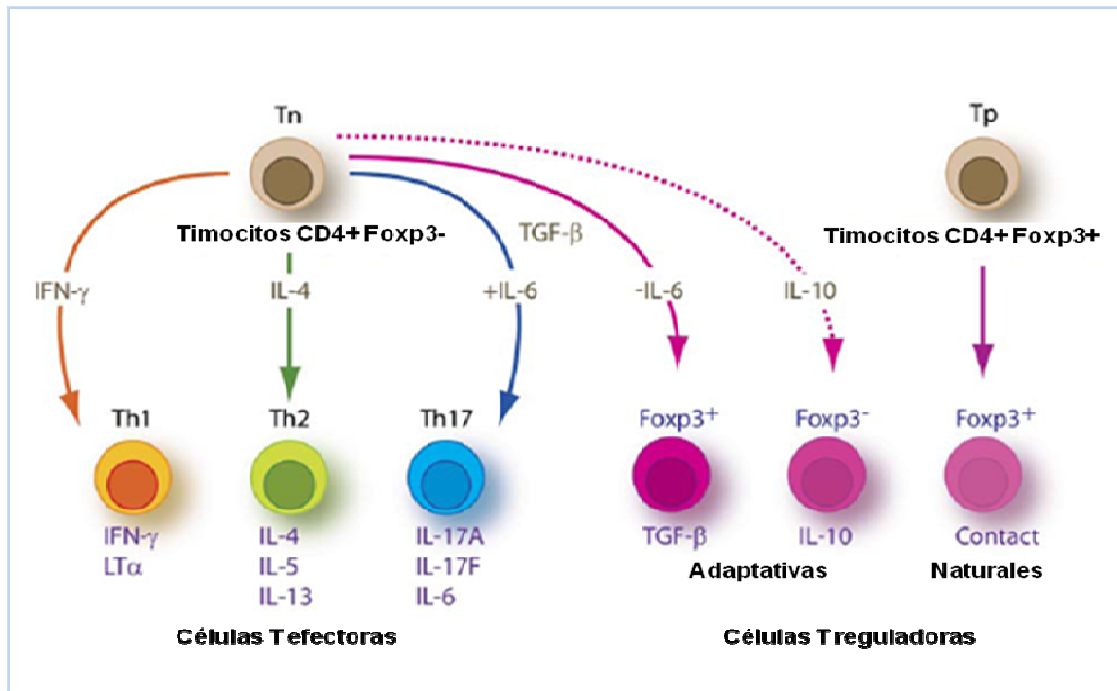


Figura 9. Diversificación de linfocitos T CD4⁺. Las células vírgenes post tímicas, precursoras de linfocitos T CD4 (Tn) y las células precursoras tímicas (Tp) se diferencian en diversos linajes de linfocitos T CD4 dependiendo del predominio de ciertas citocinas (flechas). Las células diferenciadas dependiendo de la estirpe celular producen citocinas efectoras o supresoras. Particularmente las células T reguladoras naturales (nTreg) presentan un mecanismo de supresión contacto dependiente. La flecha punteada representa un linaje aún no definido.¹⁰⁹

Otro componente de la respuesta inmune adaptativa que se activa por una infección viral son los linfocitos B, los cuales se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en células de memoria capaces de reconocer al virus en posteriores infecciones. Los anticuerpos neutralizan al virus al unirse a él e impedir su entrada a la célula blanco; y promueven el proceso de fagocitosis o internalización del virus opsonizado en CPA. El cambio de tipo de inmunoglobulinas en células B está regulado por el origen de estas células, la presencia de citocinas y otras señales recibidas por ellas. Así, en ratón, IL-4 induce IgG1 e IgE (IgE e IgG4 en humano), IL-5 aumenta la producción de IgA, IFN-γ induce IgG3 e IgG2a, mientras que TGF-β induce IgG2b e IgA. IL-2 e IL-6 inducen o aumentan la cantidad de los diferentes tipos de IgG dependiendo de otras señales recibidas.¹¹³⁻¹¹⁶

La presencia de anticuerpos neutralizantes en suero de mujeres VPH16⁺ predomina en mujeres sin lesión, disminuye de acuerdo al grado de LIE y es nula en mujeres con CaCU. Por lo que estos anticuerpos determinan la regresión de las LIE de bajo grado.¹¹⁷ Sin embargo, la detección de estos anticuerpos es mayor en suero (78%) que en lavados cervicales (38%) de mujeres VPH16⁺.¹¹⁸ La detección de anticuerpos contra partículas virales L1 del VPH 16, 18, 31 y 45 en secreciones

cervico-vaginales y de VPH16 en suero ha permitido observar que la presencia de IgA e IgG varía dependiendo del compartimento en estudio, la infección persistente por el virus y el grado de avance de la enfermedad. Las IgA e IgG séricas que reconocen L1 de VPH16 son inducidas en mujeres con infección por el VPH16. También se encuentran presentes en mujeres con VPH 31,33, 35,58 pero no en aquellas positivas para VPH18 o 45.¹¹⁹ Las IgG séricas se pueden considerar como marcadores de una exposición continua al VPH16 a lo largo de la vida, mientras que la IgA lo es de una infección reciente o actual.¹²⁰ También en las secreciones vaginales, la IgA está presente cuando existen infecciones actuales por VPH, mientras que la IgG se encuentra en pacientes de 40 a 49 años de edad, con infecciones persistentes del VPH y en aquellas con LIE o CaCU.¹²¹ Sin embargo, solo el 60-70% de las mujeres con infección o LIE presentan anticuerpos IgG anti-VPH16.^{119,122-123} La magnitud y frecuencia de IgA cervicales específicos contra VPH16 es más elevada en mujeres infectadas o con LIEAG.¹²⁴ Interesantemente, la seroprevalencia de anticuerpos anti-VPH16 se presenta entre el 46 y 59% de mujeres con citología normal que fueron positivas para el DNA viral.^{122,125-127} Esta conversión se encuentra asociada con una mayor exposición antigénica, la cual está determinada por una carga viral alta (riesgo relativo de 5.7 para IgG) o por la infección persistente con el virus (riesgo relativo de 3.4 para IgA). El promedio de duración de ambos anticuerpos es de 36 meses.¹²⁸ En mujeres con CaCU, la detección de anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 de VPH16 o 18 es detectada en 53% de las muestras de suero. Interesantemente, la seroreactividad VPH específica coincide con el tipo viral detectado en las biopsias cervicales.¹²⁹

Generalmente, la respuesta inmune local es capaz de controlar la infección por el VPH de manera que no se generan lesiones en el cérvix ni existen manifestaciones clínicas, o de lo contrario, estas pueden revertir sin desarrollarse un CaCU.¹³⁰⁻¹³² Solo una pequeña fracción de las personas contagiadas, denominadas portadores crónicos o persistentes no elimina al virus y desarrolla CaCU.¹³³ Esto es claramente demostrable en mujeres con inmunodeficiencia.¹³⁴ Sin embargo, a pesar de los diferentes mecanismos de defensa que presenta el organismo para eliminar al virus, existen condiciones particulares, algunas de ellas mencionadas anteriormente, que determinan una infección persistente; entre ellas la acción de las oncoproteínas virales.

3.3.2 Alteraciones provocadas por el VPH en la respuesta inmune local

Las oncoproteínas de los VPH de alto riesgo pueden interferir con la respuesta inmune local al alterar la expresión de proteínas como citocinas, quimiocinas y componentes del procesamiento de antígeno. Normalmente se pensaría que los queratinocitos infectados por el VPH activen el mecanismo de defensa antiviral mediado por los interferones tipo 1, IFN- α e IFN- β ; con efecto anti-proliferativo, anti-angiogénico e inmunoestimulador, que sirve como conexión entre la respuesta inmune innata y la adaptativa.¹³⁵ Sin embargo, en LIE y CaCU, los VPH de alto riesgo pueden regular negativamente la expresión de genes inducidos por IFN- α .¹³⁶ Esto es claramente observado en ratones transgénicos con E6 de VPH16 en los que se inhibe la expresión de los genes homólogos *Ifi203*, *Ifi202a*, *Irf1*, *Ifit2*, *Mx1* (myxovirus, gen de resistencia al virus de la influenza 1) y *Oas2* (2'-5' oligo A de la familia de la sintetasa, que media el decaimiento del RNA como parte de la vía de inmunidad innata antiviral); así como del gen de la subunidad α del receptor de IFN- α (IFNAR2).¹³⁷

E7 inhibe las señales de transducción mediadas por IFN- α al unirse al complejo P48/IRF-9 (factor regulador de interferón-9) previniendo así la formación del complejo transcripcional ISGF-3 (gen del factor-3 estimulado por interferón, o activador transcripcional inducido por IFN- α con múltiples cadenas polipeptídicas) que normalmente se une a los elementos de respuesta específicos para interferón (ISRE) en el núcleo.¹³⁸ Además, la unión de E7 con IRF-1, favorece el reclutamiento de histonas deacetilasas al promotor de *IFN- β* .¹³⁹ Esto se asocia con la baja expresión de genes inducidos por IRF-1 como *TAP1* (del transportador asociado con la presentación de péptidos antigénicos-1), *IFN- β* y *MCP-1* (de la proteína quimiotáctica de monocitos-1).¹⁴⁰ Interesantemente IL-10 (citocina anti-inflamatoria cuya expresión aumenta en CaCU) puede regular positivamente la transcripción de E7.¹⁴¹

E6 inhibe la señalización mediada por IFN- α al unirse a Tyk2 e impedir su unión a la región citoplásmica del receptor;¹⁴² y al unirse a IRF-3 inhibiendo la transcripción del RNAm de *IFN- α* .¹⁴³ Además, esta oncoproteína reconoce indirectamente elementos reguladores en el promotor humano de TGF- β , citocina anti-inflamatoria con abundante expresión en los tumores cervicales¹⁴⁴⁻¹⁴⁵ que actúa como potente inmunosupresor de la respuesta inmune innata y adaptativa. Esta citocina presenta actividad inhibitoria de la proliferación epitelial, induce la expresión de genes que codifican para la matriz extracelular e inhibe la expresión de genes de metaloproteasas.¹⁴⁶ E6 también puede inhibir la expresión de *IL-18* y la señalización a través del receptor.¹⁴⁷ IL-18 tiene diferentes funciones biológicas como son la estimulación de la actividad citotóxica de células T y NK, de proliferación de células T, inducción de IFN- γ , IL-2 y de GM-CSF por células T activadas.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ IL-12 e IL-18

actúan sinérgicamente en células T para inducir la producción de IFN- γ por lo que juegan un papel importante en la respuesta inmune contra el tumor y en los efectos protectores contra la infección de patógenos intracelulares incluyendo los virus.^{150-151.}

Ambas proteínas virales, E6 y E7, regulan negativamente tanto el promotor de *IL-8* (quimiocina que atrae células T y neutrófilos) al disociar el complejo transcripcional;¹⁵² como la expresión de IFN- γ (inducida por IL-18) en células mononucleares y NK de sangre periférica al unirse a la porción extracelular de la cadena- α del receptor de IL-18.¹⁵³ También las oncoproteínas virales suprimen la expresión de MCP-1¹⁵⁴ e inhiben la transcripción del gen *TLR9* (al reconocer una región reguladora del promotor),¹⁵⁵ en líneas celulares y cáncer primario de células epiteliales del cérvix. TLR9 es un receptor presente en células B y células dendríticas plasmocitoides, que reconoce motivos CpG en DNA de doble cadena de bacterias y algunos virus, incluyendo DNA de E6 de VPH16. La señalización a través de este receptor induce la activación del factor transcripcional NF- κ B y de factores reguladores de interferón (IRFS) regulando así la expresión de genes de citocinas como IFN- α/β .¹⁵⁵⁻¹⁵⁶ Por lo que las oncoproteínas virales además de favorecer el desarrollo de las células tumorales al unirse a diferentes proteínas de estas células, también pueden intervenir en procesos de maduración, diferenciación, función y migración de células de la respuesta inmune innata y adaptativa al regular la expresión de ciertas citocinas, quimiocinas y TLRs.

Otra de las proteínas del virus, E5, interacciona con la subunidad de la ATPasa vacuolar H⁺ inhibiendo la acidificación de los endosomas y la degradación del receptor del factor de crecimiento epidermal en los compartimentos endosomales durante la endocitosis del receptor después de la estimulación con el ligando.¹⁵⁷ Esta proteína viral también alcaliniza el complejo de Golgi interfiriendo con el transporte y expresión en la superficie celular del HLA-A y HLA-B que presentan los péptidos virales a los linfocitos T citotóxicos, pero no la de HLA-C y HLA-E, que son los ligandos que inhiben a las células NK.¹⁵⁸ Incluso interfiere con la presentación de antígenos por el MHC-II al inhibir la degradación en los compartimentos endocíticos de la cadena invariante (Ii), que es una chaperona requerida para que el acoplamiento del péptido antigénico al MHC¹⁵⁹ Por lo tanto, se observa que los péptidos inmunogénicos de E6 y E7 no son procesados ni presentados eficientemente por las células tumorales VPH⁺. Esto correlaciona con alteraciones en la maquinaria del procesamiento de antígeno como son expresión disminuida del HLA-I, de las proteínas 2 y 7 de bajo peso molecular que forman la subunidad del proteosoma (LMP); y de TAP 1 y 2 en líneas celulares y biopsias de carcinoma cervical.¹⁶⁰⁻¹⁶⁴ La pérdida parcial del HLA-I y la total de TAP1 se asocia con una menor sobrevida, mientras que la baja expresión de las subunidades

del proteosoma (excepto LMP10, calnexina y calreticulina) está asociada con un menor riesgo de metástasis linfogénica.¹⁶⁴ Interesantemente, la progresión de las LIE en las pacientes se encuentra asociada con la pérdida del HLA.¹⁶³

Así, las proteínas virales pueden regular directa o indirectamente la función y migración de células de la respuesta inmune; lo cual constituye otro mecanismo de evasión tumoral debido a la presencia del virus. Así, se observa que conforme progresa la enfermedad, la presencia de macrófagos infiltrantes del epitelio en el cérvix es casi nula.¹⁶⁵ Esto correlaciona con una menor expresión del RNAm de la quimiocina MCP-1 y con la expresión del RNAm de E6 y E7 del VPH.¹⁶⁶⁻¹⁶⁷ Sin embargo, la presencia de macrófagos en el estroma del cérvix contribuye a la angiogénesis que favorece la metástasis hacia ganglios linfáticos de pacientes con CaCU.¹⁶⁸

La síntesis de TNF- α (potente activador de células de Langerhans) disminuye cuando hay infecciones por VPH y esto se asocia con la menor expresión de la molécula coestimuladora B7.1 debido a la escasa presencia de células de Langerhans durante la infección y en lesiones premalignas del cérvix.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Se ha reportado que las proteínas E6 y E7 del VPH inhiben la transcripción de MIP-3 α , quimiocina que atrae a células de Langerhans inmaduras.¹⁷²

La baja expresión de moléculas de MHC-I en los tumores cervicales debido a la acción de E7¹⁷³ impide la presentación de péptidos virales a las células T CD8⁺, lo cual teóricamente facilitaría la acción de células NK. Estas células con capacidad citolítica, producen citocinas (IFN- γ y TNF- α) que les permiten eliminar a las células tumorales o infectadas sin requerir presentación de antígenos.¹⁰⁷ **Figura 10.**

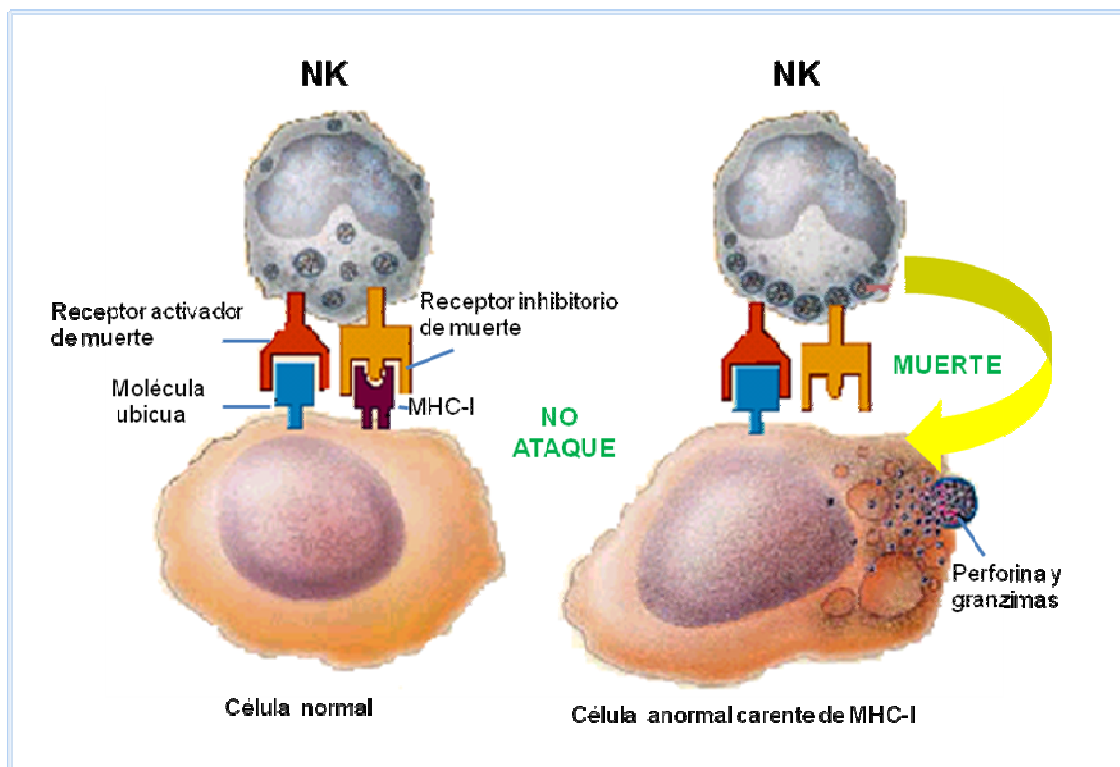


Figura 10. Función de células NK. Estas células presentan dos receptores, uno activador y otro inhibitorio (KIR). Los receptores KIR reconocen al MHC-I en la célula blanco e inhiben la señal de citotoxicidad. Así las células NK solo ejercen su efecto citotóxico en células blanco que no presenten en su superficie el MHC-I.¹⁰⁷

Sin embargo, se observa que en pacientes con estadios más avanzados del CaCU las células NK presentan menor actividad citotóxica.¹⁷⁴ Esto podría explicarse por la disminuida expresión de receptores de activación en estas células como NKG2D, NKp30, NKp46, y por la abundante presencia en suero del ligando soluble de NKG2D, MICA.¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ La acumulación de MICA en suero puede facilitar la internalización del receptor y su degradación en el lisosoma.¹⁷⁷ Además, los receptores de las células NK pueden ser inhibidos por diferentes moléculas que se encuentran sobre-expresadas en los tumores cervicales como TGF- β , indolamina-2,3 dioxigenasa, prostaglandina E₂, y por la acción de corticosteroides, 17-beta-estradiol y especies de oxígeno reactivas.¹⁷⁸⁻¹⁸² Así, la regulación negativa de NKp30, NKp46 y NKG2D representa un mecanismo de evasión asociado a la baja actividad de las células NK, a la infección por VPH 16 y a la progresión del CaCU.¹⁸³ De esta manera el virus puede evadir la respuesta de células NK, células T citotóxicas CD8⁺ y células T ayudadoras CD4⁺.

3.3.3 Linfocitos T y CaCU

Como se menciono anteriormente, el VPH está implicado mediante la función de sus oncoproteínas en múltiples mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune innata y adaptativa; entre ellos se encuentra la alterada expresión del MHC. En este mismo contexto, existen alteraciones genéticas que se caracterizan por la pérdida del haplotipo HLA asociado con pérdida de heterocigosidad (50%), que incluye la pérdida de alelos A o B debido a mutaciones, y mutación en el gen β 2-microglobulina. También se observa pérdida del antígeno total del HLA-I y retención de heterocigosidad (ROH, 10%), y regulación negativa del locus B o del HLA-A/B asociado con ROH y/o desbalance alélico (10%).²⁶ Así, la expresión del HLA-I disminuye en 60% de las metástasis cervicales, mientras que la expresión del HLA-II aumenta en un 50% de estos casos.¹⁸⁴ Esto repercute en la activación de los linfocitos T y su respuesta ante las células tumorales. Además, la presencia de TGF- β e IL-10 en los tumores provee un microambiente que no permite la diferenciación de células Th1,¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ por lo que existe menor expresión de citocinas Th1 y mayor expresión de citocinas Th2 en el cérvix.¹⁸⁸ TGF- β e IL-10 también afectan la producción de citocinas, la diferenciación y actividad citotóxica de células T CD8⁺, e inhiben la proliferación de células T dependientes de IL-2.¹⁸⁹⁻¹⁹⁰ Lo cual se refleja en una menor infiltración de las células Th1 y en la carente actividad funcional de las CD8⁺ en el microambiente tumoral del epitelio cervical.¹⁹¹ A nivel periférico también hay menor expresión de IL-2 e IFN- γ y mayor presencia de IL-10; mientras que existe controversia en la presencia de IL-4.¹⁹²⁻¹⁹³ Este patrón de citocinas favorece una respuesta humoral más que la respuesta celular necesaria para la eliminación del tumor.

También se observa que el fenotipo y función de las células T varía dependiendo del sitio anatómico donde se encuentren, del reto antigénico al que son expuestas y del grado de avance de la enfermedad. La proporción de células T CD4⁺ respecto a la de CD8⁺ es mayor en sangre periférica y ganglios linfáticos. Esta relación se invierte en el tejido tumoral.¹⁹⁴ Inicialmente en lesiones NIC-I regresivas, las células T CD4⁺ predominan en el estroma y epitelio cervical, siendo el índice CD4⁺/CD8⁺ más alto que en lesiones persistentes NIC-I, NIC-II-III y CaCU. En lesiones con NIC-III ambas poblaciones se organizan en estructuras foliculares linfoides; mientras que en CaCU predominan las células T CD8⁺ y células de memoria CD45RO⁺ con respecto a las CD4⁺.¹⁹⁵ Los resultados encontrados pueden variar de acuerdo al tiempo en que se toman las biopsias durante la enfermedad o por el marcador utilizado para detectar a las células. Así, se observa al inicio de un estudio longitudinal, mayor número de células NK y de linfocitos T CD8⁺ (ambos granzima B positivos) que de células T CD4⁺ y FOXP3⁺ en el epitelio de mujeres con LIEBG cuya lesión desaparece

posteriormente. Mientras que en el estroma prevalecen linfocitos T CD8⁺ respecto a células CD4⁺, FOXP3⁺ y NK. Al año de seguimiento hay más células CD8⁺ en el epitelio; predominio de células CD4⁺ y disminución de células FOXP3⁺ en el estroma.¹⁹⁶ Interesantemente el aumento de células T reguladoras FOXP3⁺ en LIEAG y CaCU se asocia con persistencia de la lesión y con la respuesta de células T a E7 de VPH16.¹⁹⁷⁻¹⁹⁸ Cuando la lesión persiste o progresa a LIEAG, predominan las células CD8⁺ en epitelio y CD4⁺ en el estroma; pero el número de células granzima B⁺ disminuye en ambas regiones cuando la lesión progresa. Lo anterior demuestra que en lesiones regresivas existe una eficiente respuesta citotóxica de células NK y linfocitos T CD8⁺ en el epitelio, mientras que en lesiones persistentes o progresivas se encuentran principalmente linfocitos T CD8⁺ pero con baja actividad citotóxica.¹⁹⁶

Las células Th tienen un papel crucial en la amplificación de respuestas citotóxicas específicas de las células T CD8⁺, por lo que la inadecuada activación de células Th específicas o su escasa presencia en el tumor conduce a una falla en la respuesta inmune antitumoral.¹⁹⁹ Clínicamente se observa que las mujeres con bajas proporciones de células T CD4⁺ periféricas tienen mayor riesgo de desarrollar CaCU,²⁰⁰ mientras que en aquellas con CaCU la disminución correlaciona con un crecimiento rápido del tumor, metástasis hacia los ganglios linfáticos²⁰¹ y una menor supervivencia de las pacientes.²⁰² Por el contrario, el aumento en la densidad intratumoral de células T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ disminuye el riesgo de recurrencia en pacientes con estadio IB y IIA de CaCU que recibieron tratamiento.²⁰³ Especialmente un mayor número de células CD3⁺ infiltrantes del tumor se asocia con una mejor supervivencia después del tratamiento.²⁰⁴ Mientras que la presencia de células CD8⁺ intratumorales en CaCU correlaciona con la ausente metástasis hacia nódulos pélvicos e indirectamente con un mejor pronóstico.²⁰⁵

Otras características diferenciales son que las células T en ganglios linfáticos presentan el marcador de activación temprana CD25 (receptor de IL-2) y el de activación tardía HLA-DR; mientras que en el ambiente tumoral del cérvix son principalmente HLA-DR⁺.¹⁹⁴ Respecto a la producción de citocinas, los linfocitos T periféricos de mujeres con CaCU presentan un patrón Th1; sin embargo, existe controversia en el patrón de citocinas que presentan los linfocitos infiltrantes del tumor.^{185,194} La presencia de estos marcadores de activación en linfocitos T infiltrantes del tumor indican que estas células han recibido un reto antigénico y señales quimiotácticas que inducen su migración desde los ganglios linfáticos hasta el sitio de la lesión.

Por lo anterior, diversos autores han tratado de esclarecer *ex vivo* si la respuesta de células T CD4⁺ periféricas específica para las proteínas completas o

péptidos virales de los antígenos E2, E5, E6, E7 y L1 del VPH16 está asociada con la regresión o progresión de la enfermedad en mujeres sanas o con LIE. También se han utilizado partículas semejantes al virus.²⁰⁶⁻²²¹ La capacidad de respuesta se determina generalmente en base a la producción de IL-2, IFN- γ o IL-4.^{192, 210-211, 215, 222-225}

La mayoría de estos estudios sugieren que la respuesta proliferativa y de producción de citocinas Th1 en células T CD4⁺ es deficiente en mujeres con CaCU comparada con lo observado en mujeres sanas que han eliminado la infección o lesión cervical. Se sabe que la respuesta de linfocitos T periféricos se eleva cuando la carga viral disminuye.²²⁶ Sin embargo, cuando las respuestas son prioritariamente Th2, se asocian a disminución en la sobrevida libre de enfermedad, y por lo tanto son indicativas de un mal pronóstico o recurrencia.²²⁷

Algunos autores reportan que ciertos epítopes de las proteínas virales desencadenan una respuesta protectora VPH específica que se asocia con un pronóstico favorable de la enfermedad. Así, cuando los linfocitos T CD4⁺ periféricos de mujeres con CaCU son estimulados *in vitro* con péptidos sintéticos de la región carboxilo terminal de E7 de VPH16 (aa 67-98), se observa que esta región es altamente inmunogénica, con un alto potencial de diagnóstico y terapéutico.^{211,215,222-225} Interesantemente, la respuesta de estas células a los péptidos (aa 71-85) de E7 de VPH16 correlaciona con la regresión de LIEAG. Estas células reconocen a los péptidos endógenos asociados al complejo HLA-DQB1*02 y presentan un fenotipo Th1 debido a que secretan IFN- γ y TNF- α , y en menor cantidad IL-2; IL-4 o IL-10 no son secretados.²²⁸ Sin embargo, en mujeres con CaCU después del tratamiento con radioterapia, el aumento en la respuesta a E7 de linfocitos T CD4⁺ (con producción de IFN- γ), no se asocia con una respuesta clínica exitosa, más bien podría considerarse como indicador de la gravedad del CaCU.²²⁷ Notablemente, otros autores demuestran que las células T CD4⁺ con respuesta proliferativa y nula producción de citocinas Th1/Th2 ante E7 de VPH16, se encuentran en pacientes VPH16⁺ con LIEAG persistente o recurrente.^{214,229} Lo cual indica que a pesar de reconocer el antígeno específico, estas células T de pacientes con LIEAG presentan una respuesta alterada e ineficiente; que se explica ahora por la presencia de células T reguladoras.²²⁹ La permanencia de estas células requiere del continuo reto antigénico ya que la respuesta proliferativa disminuye en pacientes IgG⁺ que han eliminado la infección.^{214,223}

La producción de IFN- γ por células T en respuesta a E6 de VPH16 se ha asociado a la infección y eliminación reciente de este virus.²³⁰ Sin embargo, en LIEBG la respuesta a E6 se asocia con persistencia de la lesión. Mientras que la respuesta a E2 (con producción de IFN- γ) está asociada con regresión.^{231,232} Las LIEBG que

progresan a LIEAG no presentan respuesta a E2 ni a E7; pero en infecciones persistentes con el VPH16 se observa una baja frecuencia en la respuesta a estas oncoproteínas.²³¹ Por lo tanto, la respuesta específica de linfocitos T en presencia de E6 y E7 de VPH16 es marginal y no correlaciona con la regresión de LIEAG.²³³

Hasta el momento no se ha logrado esclarecer si estas respuestas generadas *in vitro* son primarias o de memoria, lo cual sería un indicio de la evolución de la enfermedad. Una inmunidad viral efectiva esta caracterizada por una bien balanceada producción de citocinas Th1 y Th2, mientras que las infecciones virales crónicas frecuentemente se acompañan de una respuesta prioritariamente Th2.²³⁴⁻²³⁵ En lesiones cervicales avanzadas, los queratinocitos presentan aumento en la expresión del MHC-II y ausencia de señales coestimuladoras que resultan en la activación preferentemente de células Th2, lo cual interfiere con una respuesta antiviral efectiva Th1 y citotóxica.²³⁶⁻²⁴⁰

También se ha detectado en pacientes con infección previa o actual con el virus, respuesta de células T CD4⁺ o CD8⁺ citotóxicas específicas contra péptidos de las proteínas E6, E7 y E2 del VPH16, unidos a la superficie de diversas células blanco. Sin embargo, esto pudiera estar seleccionando clones de células que no representen una infección natural debido a que solo se utilizan ciertos péptidos asociados a determinados HLA. De manera que la re-estimulación con proteínas completas y naturalmente procesadas del VPH pudiera ser más exitosa. Así, se demuestra que existen células citotóxicas específicas para E6 y E7 del VPH16 en mujeres sanas o con CaCU. Sin embargo, en estas últimas es poco frecuente encontrar este tipo de células. Además, la ausente respuesta citotóxica ante estos antígenos virales se asocia con la persistencia del virus o progresión de las lesiones cervicales.^{206,241-258} Poco se conoce sobre la respuesta citotóxica a otras proteínas completas del virus, entre ellas E2.^{254,258}

3.4 Activación de linfocitos T y CaCU

3.4.1 Receptor de células T

Como se menciona anteriormente, los linfocitos T vírgenes localizados en ganglios linfáticos, reconocen el complejo Ag-HLA que se encuentra en la superficie de las CD maduras originarias del sitio infectado. El complejo es reconocido por el receptor de antígenos de las células T (TCR-CD3) vírgenes CD4⁺ o CD8⁺.

El TCR-CD3 es uno de los receptores transmembranales más complejos. Las señales enviadas a través de este receptor son requeridas para el desarrollo de células T en el timo, la inducción de respuestas inmunes contra agentes infecciosos y para la diferenciación de células T efectoras y de memoria con propiedades

funcionales discretas.²⁵⁹ Este receptor está formado por seis diferentes proteínas transmembranales tipo I. TCR $\alpha\beta$: CD3 $\delta\epsilon$: CD3 $\gamma\epsilon$: $\zeta\zeta$.²⁵⁹⁻²⁶⁰ Las cadenas TCR α y TCR β (o TCR γ , TCR δ), forman heterodímeros de 40-45 kDa unidos por enlaces disulfuro que reconocen directamente el complejo Ag-HLA. Además de cuatro proteínas del complejo CD3 que se asocian en forma no covalente con el TCR; la cadena γ (26 kDa), la δ (21 kDa), dos subunidades de ϵ (25 kDa) y dos cadenas ζ (16 kDa). CD3 ζ se expresa normalmente como homodímeros ζ - ζ , pero puede formar heterodímeros ζ - η (10-20%).²⁶¹⁻²⁶² **Figura 11.** En total, estas proteínas del CD3 presentan 10 motivos de tirosinas y leucinas (D/Ex₀₋₂YxxL/I-X₆₋₈-YXXL/I)²⁶³ conocidos como ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) que se encuentran unidos por enlaces disulfuro y son fosforilados cuando ocurre activación a través del TCR/CD3. Esto desencadena la acción de diversos componentes de la señalización intracelular^{259,264-265} que inducen la expresión de genes esenciales para la función de la célula T activada,²⁶⁶ como proliferación celular, actividad citotóxica y producción de citocinas.

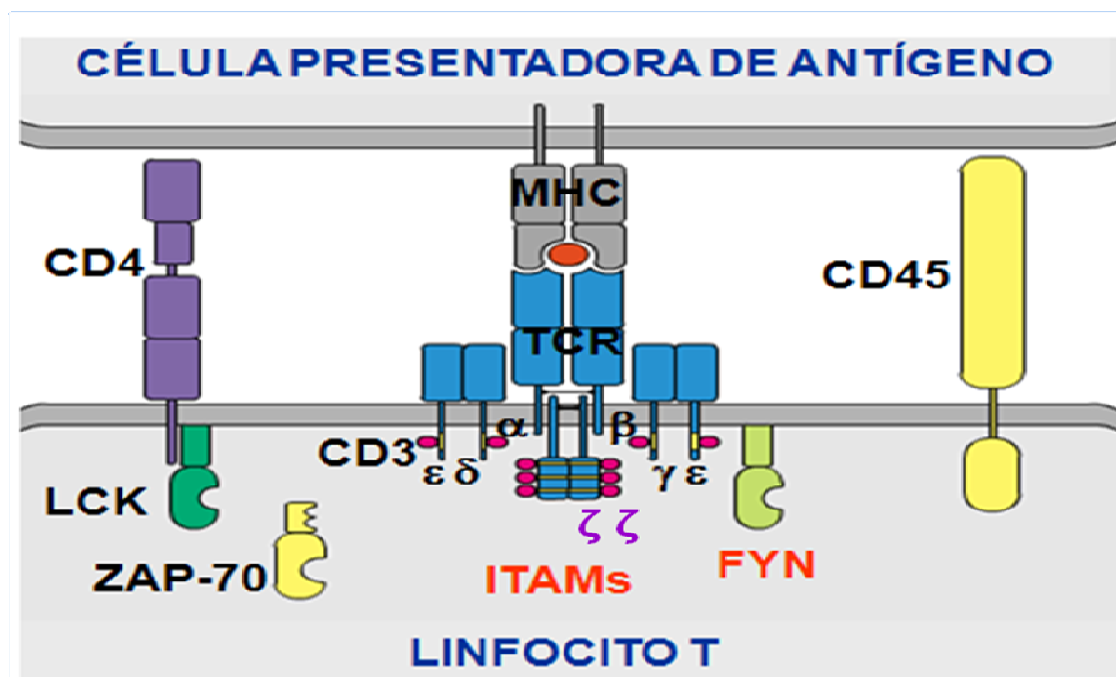


Figura 11. Receptor de células T (TCR) y complejo CD3. Este receptor está formado por la asociación de 2 cadenas polipeptídicas polimórficas ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) que reconocen al antígeno asociado al MHC en la célula presentadora de antígeno. La señal de reconocimiento es transmitida por las cadenas ζ y el complejo CD3 que se encuentran unidas al TCR. www.youtube.com/watch?v=dd5S10sW-4M

3.4.2 Señalización a través del TCR/CD3

Durante el reconocimiento del antígeno, el TCR se une al complejo MHC-Ag; al mismo tiempo los receptores CD4 y CD8 de los respectivos linfocitos T se unen a las regiones no polimórficas del MHC-II o MHC-I respectivamente en la CPA (“primera señal de activación”). Esta interacción, que activa a ambos tipos celulares, se potencia con la unión de otras moléculas de adhesión (LFA-3 y CD2, ICAM-1 y LFA-1) y coestimuladoras como B7-1 o B7-2 y CD28 (“segunda señal”); generando así la respuesta inmune primaria de linfocitos T.²⁶⁷⁻²⁶⁸ **Figura 12.**

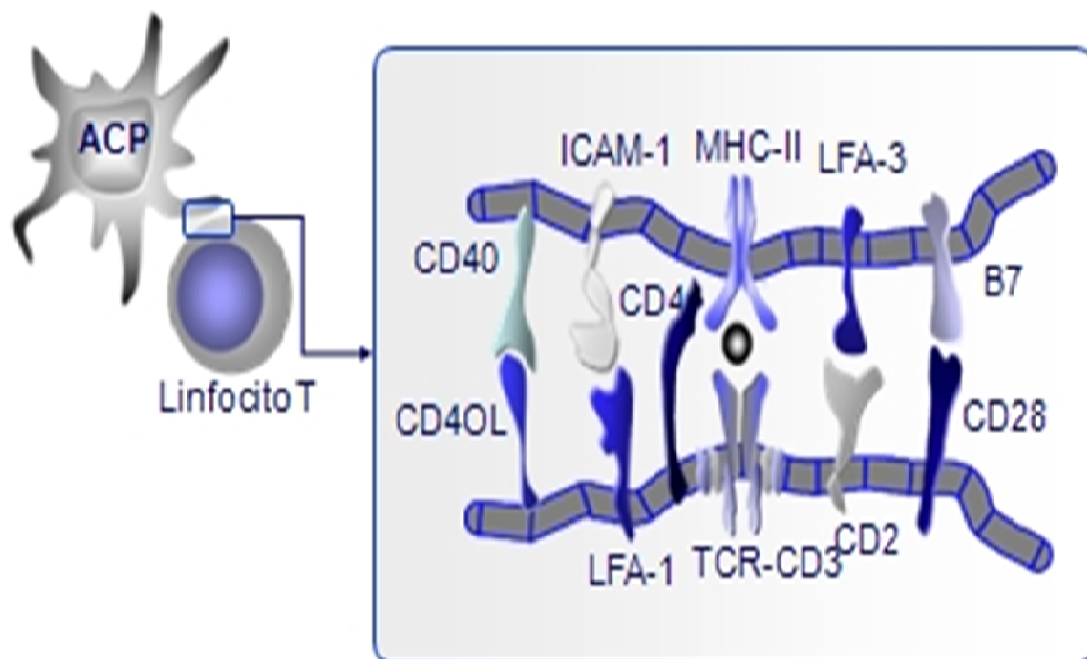


Figura 12. Moléculas que participan en la sinapsis entre linfocitos T y CPA durante la presentación de antígeno. La interacción entre estas moléculas es conocida como la 1^{ra}. (TCR-MHC-Ag, CD4 o CD8) y 2^{da} señal (moléculas de adhesión y coestimuladoras), requeridas para la correcta activación de los linfocitos T. www.inmunologiaenlinea.com # Editor: José Peña Martínez

A nivel intracelular, la tirosina cinasa p56^{lck} de la familia Src de las PTKs (Protein Tyrosine Kinases), se encuentra unida a las colas citoplásmicas del CD4 o CD8 y se activa por autofosforilación (después de la defosforilación por la fosfatasa CD45), actuando así sobre los ITAMs del complejo CD3. La tirosina cinasa Fyn también juega un papel similar. Los ITAM fosforilados del CD3 ζ son sitios de unión de la tirosina cinasa ZAP-70 a través de sus dos dominios SH2 (Src homology-2). ZAP-70 es fosforilada por Lck, adquiriendo su propia actividad de tirosina cinasa. A su vez, ZAP-70 fosforila proteínas adaptadoras importantes para la activación de las células T

como LAT (Linker Activation of T cell) y SLP-76 (SH2 domain-containing Leukocyte Protein). Una vez fosforiladas, estas proteínas se unen a otras proteínas. LAT se une a Grb-2 (SH2 domain-containing adapter protein) que a su vez es fosforilada por ZAP-70 convirtiéndose así en un sitio para Sos, factor de intercambio de GTP/GDP. Así, Ras-GDP es convertido a Ras-GTP activando la vía de las MAP cinasas (Mitogen Activated Proteins), siendo el prototipo ERK (Extracellular Receptor-activated Kinase). En paralelo actúa la vía Rac-GTP que también activa a las MAP cinasas, entre ellas c-Jun del amino terminal (JNK) o proteína activada por estrés (SAP). Ambas vías dan lugar a la producción de los componentes Fos y c-Jun del factor transcripcional AP-1.

LAT también recluta hasta la membrana celular a la isoforma $\gamma 1$ de la enzima fosfolipasa C (PLC- $\gamma 1$), de esta manera ayuda a que ZAP-70 la fosforile. Así PLC- $\gamma 1$ cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol 3, 5 bifosfato (PIP₂) generando dos productos: inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ produce un aumento del Ca²⁺ citosólico el cual forma un complejo con la calmodulina. Dicho complejo activa fosfatasas de serina y treonina como la calcineurina que a su vez activa al factor transcripcional nuclear de células T activadas (NFAT) requerido para la expresión de IL-2, IL-4, TNF y otras citocinas. Por otra parte, el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) la cual parcialmente participa en la activación del factor transcripcional NF- κ B esencial para la expresión de genes de citocinas y sus receptores.²⁶⁴ **Figura 13.**

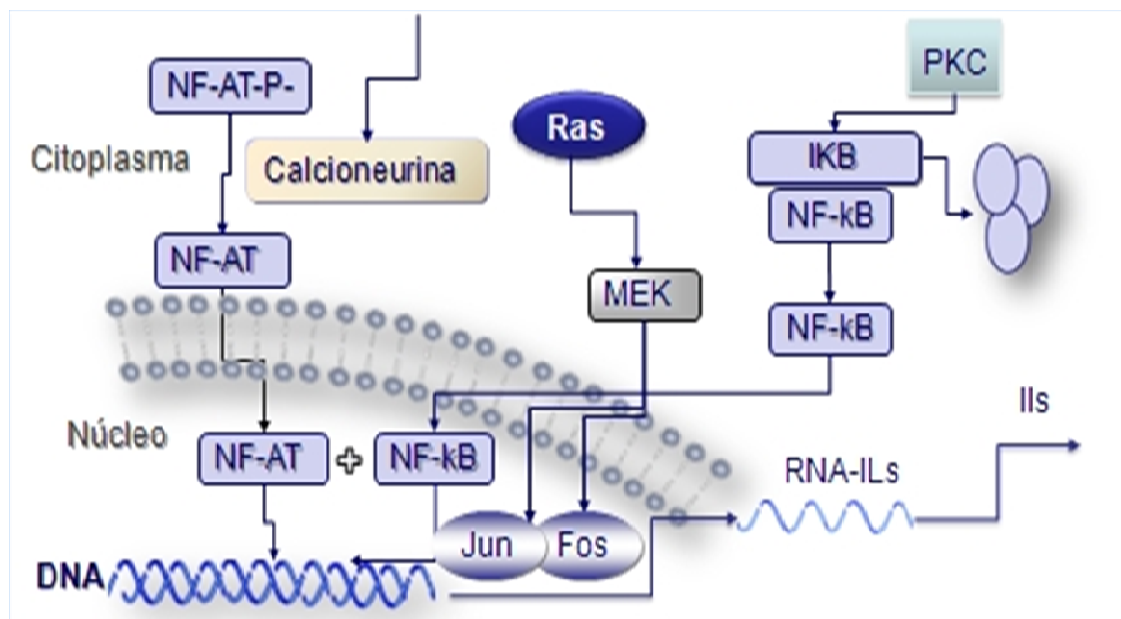
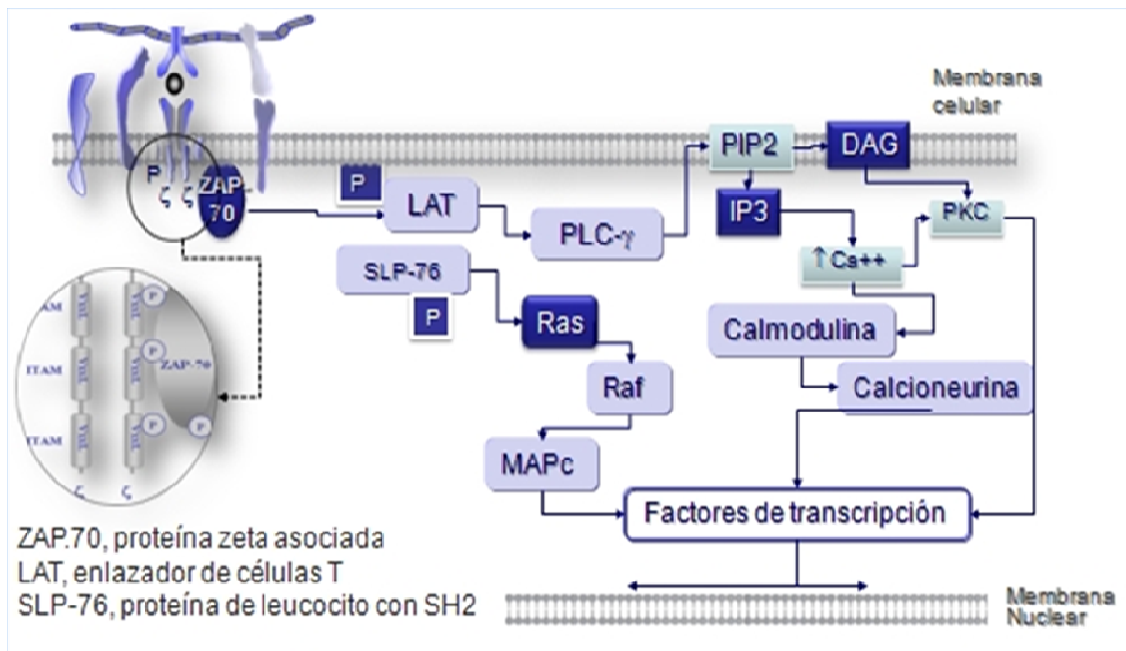


Figura 13. Cascada de señalización durante la activación de linfocitos T. Diversos eventos bioquímicos se generan después de la interacción entre Ag-TCR. En un inicio, las tirosinas cinasas fyn y lck fosforilan la cadena ζ del complejo CD3. Estas cadenas fosforiladas sirven como sustrato de las cinasas ZAP-70 y fyn, las cuales van a activar una serie de cascadas de señalización mediadas por cinasas, entre ellas las MAP cinasas y la fosfolipasa C, lo cual conduce a la activación de factores transcripcionales que actúan sobre genes cuyos productos son requeridos para la proliferación, diferenciación y actividad efectora de los linfocitos T. www.inmunologiaenlinea.com # Editor: José Peña Martínez

3.4.3 CaCU y otras patologías relacionadas con la expresión de CD3ζ

Como se mencionó anteriormente, la infiltración de células T en las lesiones cervicales juega un papel relevante en la respuesta inmune específica a nivel local. Sin embargo, en pacientes con CaCU esta respuesta es nula o deficiente a pesar del aumento de células T citotóxicas CD8⁺.

En diversas patologías como la del CaCU, en las que existe una persistente estimulación de la respuesta inmune, se observa que tanto en células T como en células NK periféricas y en linfocitos infiltrantes del tumor, el estado de tolerancia se encuentra relacionado con alteraciones en la maquinaria de transducción de señales. Entre ellas están la disminuida expresión de CD3ζ, CD3-ε, ZAP-70, p56^{lck}, p59^{fyn} y aumento en la expresión de la MAP cinasa fosfatasa-I (MKP-I) que inactiva a la MAP cinasa.²⁶⁹⁻²⁷⁷ Así, en comparación con células T periféricas de mujeres sanas, se observa menos expresión de CD3ζ en linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor, y en células NK de pacientes con CaCU,²⁷¹⁻²⁷² cáncer colorectal,^{273,278-279} ovárico,²⁷⁴ de mama,²⁷⁷ de células renales,^{271,276} de cabeza y cuello²⁷⁰, y de melanoma.²⁸⁰ La cercanía con el tumor determina un mayor grado de alteración en los linfocitos T infiltrantes respecto a los periféricos,^{272-273,275-276,278} mientras que en linfocitos T de nódulos linfáticos pélvicos de mujeres con o sin metástasis no se encuentra dicha alteración.²⁷² Lo cual sugiere que existen factores en el microambiente tumoral que interfieren con la actividad funcional. Esto se comprueba en algunos casos donde la expresión de CD3ζ se restaura cuando las células son cultivadas *in vitro* por varios días en presencia de IL-2 y otros mitógenos (PHA, anti-CD3, anti-CD2) o con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28.^{273,275,279}

Además, existe una correlación inversa entre los niveles de expresión de esta proteína, el estadio de la enfermedad^{273,279} y la tasa de supervivencia entre pacientes con un crecimiento tumoral más rápido.²⁸⁰ Incluso, en diversos cánceres se han correlacionado estas alteraciones en células T con la baja respuesta proliferativa y la capacidad para producir citocinas.^{274, 276, 280-282}

4 JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el CaCU continúa siendo un problema de salud pública en los países subdesarrollados. En la búsqueda por erradicar este tipo de cáncer, se ha realizado investigación básica, epidemiológica y clínica que nos ha permitido entender más sobre esta enfermedad. Se ha estudiado ampliamente la asociación que existe entre el CaCU y otros factores causales, tales como, la infección por el VPH, alteraciones genéticas y de la respuesta inmune. Sin embargo, persisten dudas sobre la respuesta inmune en los diferentes estadios del CaCU. Por lo tanto se requiere generar conocimiento sobre la respuesta inmune durante la progresión del CaCU, especialmente del papel que desempeñan las células T periféricas e infiltrantes del tumor en las distintas etapas del CaCU. Los resultados generados de estas investigaciones son relevantes tanto para el tratamiento actual de las mujeres con esta enfermedad así como para el diseño de vacunas preventivas que sean aplicadas a futuras generaciones.

5 HIPÓTESIS

Diversos estudios han demostrado que el desarrollo del CaCU depende de la persistencia del VPH así como de factores genéticos e inmunológicos. Así, se conoce que durante el transcurso de la enfermedad el aumento de citocinas inhibitoras de linfocitos T como IL-10 y TGF- β ha correlacionado con la progresión de las lesiones en cérvix hacia CaCU, por lo anterior se espera que en estadios avanzados de la enfermedad se presenten cambios moleculares y funcionales en los linfocitos T que impidan una correcta respuesta inmunológica para eliminar a las células dañadas o tumorales.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Identificar cambios moleculares y funcionales de los linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor en mujeres con lesiones en cérvix y CaCU.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar la localización de linfocitos T CD3⁺/CD4⁺ y de linfocitos T CD3⁺/CD8⁺ en biopsias de cérvix de pacientes con LIE o CaCU.
2. Establecer el patrón de proliferación de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de pacientes con LIE o CaCU.
3. Analizar la presencia del RNAm de citocinas Th1, Th2 y Th3 en linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de pacientes con LIE o CaCU.
4. Determinar la presencia del RNAm de CD3ζ del TCR/CD3 en linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de pacientes con LIE o CaCU.
5. Demostrar si existe asociación entre las diferentes variables analizadas (proliferación, citocinas, CD3ζ, edad, estadios de la enfermedad).

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Reactivos y medios de cultivo

El anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) fue producido a partir de un hibridoma de la línea ATCC CRL-800-1 donada por el Dr. José Moreno. El colorante azul de tripano, el medio de cultivo RPMI, el suero bovino fetal (SBF), la penicilina-estreptomicina (100 U/ml), el reactivo de TRIzol y todos los reactivos para RT-PCR fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies Inc. San Diego, CA. La fitohemaglutinina (PHA-M) y el Ficoll-hypaque (Hystopaque) fueron comprados a Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

7.2 Selección de pacientes

Se obtuvieron muestras de sangre periférica y biopsias de cérvix de mujeres con lesiones intraepiteliales o cáncer en cérvix de 69 pacientes del Hospital General de la Cd. de México y del Hospital General Parres de la Cd. de Cuernavaca (Morelos). El diagnóstico histopatológico de las biopsias cervicales fue obtenido de los departamentos de Patología o archivos clínicos en los respectivos hospitales. Se seleccionaron para el análisis estadístico de los datos solo muestras de 57 pacientes que reunieron los criterios de inclusión y exclusión. El grupo de estudio estuvo constituido por un total de 29 mujeres con CaCU, 26 de ellas con carcinoma escamoso del cérvix (estadios IA1-IIIB) y tres con adenocarcinoma (edad de 23-66 años, promedio de edad 46); y por 28 mujeres con LIE de bajo y alto grado (edad de 19-61, promedio de edad 34). Como controles se incluyeron a 32 mujeres sanas (edad de 21-61 años, promedio de edad 34) de las cuales se obtuvieron solo muestras de sangre periférica. Las pacientes firmaron su consentimiento informado sobre la toma de muestras para el estudio.

7.3 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión para la selección de las pacientes fueron los siguientes: presencia de LIE o CaCU, estar exentas de algún tratamiento que afecte la respuesta inmune como inmunosupresores, quimioterapia o radioterapia al momento de tomar las muestras, y carecer de alguna otra enfermedad. Los criterios de exclusión de las muestras fueron: incorrecto diagnóstico, muestra insuficiente, resultados erróneos.

7.4 Recolección de muestras

Las muestras de sangre periférica (20 ml) fueron colectadas con dispositivos Vacutainer con heparina como anticoagulante (Becton Dickinson, BD, Franklin Lakes,

N.J.) antes de cualquier intervención médica. Se colectaron raspados cervicales de pacientes con LIEBG y biopsias de 2 mm³ (antes del tratamiento por conización) de pacientes con LIEAG para la determinar la presencia del VPH. Se obtuvieron biopsias de 5-10 mm³ durante la histerectomía radical en 13 mujeres con CaCU para la purificación de linfocitos infiltrantes del tumor (LIT). Las biopsias cervicales fueron inmediatamente colocadas en tubos Falcón de 15 ml con medio RPMI suplementado al 10% con SBF, y antibióticos. Se transportaron en hielo.

7.5 Aislamiento de leucocitos periféricos e infiltrantes del tumor

Las células mononucleares de sangre periférica (CMP) se obtuvieron por gradiente de Ficoll-hypaque (Hystopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Brevemente, se diluyó la sangre heparinizada 2:1 con solución de fosfatos (PBS) en tubos Falcón estériles de 50 ml y se agregó a tubos Falcón de 15 ml conteniendo 3.5 ml de Ficoll-hypaque por cada 10 ml de sangre diluida. Se centrifugaron los tubos a 1800-2000 rpm durante 30 min a 20°C en una centrifuga Eppendo rf 5804R con rotor de columpio A4-44. Se recuperó la fase intermedia del gradiente (la cual contiene los leucocitos) y se colocó en tubos Falcón de 50 ml con 20 ml de PBS. Se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Se repitió este lavado dos veces. Se decantó el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en RPMI al 10%.

Las biopsias de histerectomía fueron cortadas finamente con bisturí en cajas Petri estériles y digeridas con 2% colagenasa en RPMI al 10% durante 1-2 h, con una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C. El tejido disociado fue lavado con RPMI y filtrado en mallas de nylon. Los LIT fueron aislados por gradiente de Ficoll-hypaque al 100%-75% como se mencionó anteriormente.²⁸³

7.6 Cuantificación de leucocitos

Se agregaron 20 µl de una dilución 2:1 de los leucocitos con azul de tripano a una cámara de Neubauer de 0.100 mm (Marienfeld). Se cuantificaron las células de los cuatro cuadrantes de la cámara en un microscopio invertido utilizando el objetivo de 40X. Se calculó la cantidad de leucocitos/ ml de sangre mediante la siguiente fórmula: La sumatoria de las células/4 cuadrantes x dilución x factor de corrección de la cámara (10⁴)= células/ ml. Si se multiplica por el total de mililitros en los que se resuspendieron los leucocitos se obtiene el número de células totales por mililitro de sangre. La viabilidad de los linfocitos periféricos e infiltrantes fue de >99% y ≥90% respectivamente.

7.7 Digestión de tejido cervical con proteinasa K

Se lavaron las biopsias o raspados cervicales con PBS para eliminar los restos de sangre. Se colocó el tejido en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml al cual se agregaron 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 300 µl de su respectivo buffer (Tris HCl 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.5%). Se mantuvo a 56°C toda la noche. Se centrifugó la muestra a 2000 rpm por 5 min a 4°C en una centrifuga 5804R con un rotor Eppendorf HE040. Se decantó y la pastilla se homogenizó con 1 ml del reactivo de TRIzol (solución monofásica con fenol e isotiocianato de guanidina). Se extrajo el RNA y el DNA de las muestras como se menciona posteriormente.

7.8 Extracción de RNA total de leucocitos y biopsias

Los homogenizados de las muestras con TRIzol se colocaron en hielo por cinco minutos y se extrajo el RNA total por el método de Chomczynski²⁸⁴ como a continuación se describe: Se agregaron 200 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIzol. Se homogenizó durante 20 s en vortex-2 genie. Se colocaron los tubos en hielo durante 3 min y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en una centrifuga 5804R con rotor Eppendorf HE040. Se transfirió la fase acuosa incolora (RNA) a otro tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml y se almacenó la fase orgánica blanca (DNA-proteínas) a -20°C para obtener posteriormente el DNA total. Se agregaron 500 µl de isopropanol a la fase acuosa. Se homogenizó con vortex durante 15 s y se mantuvo a -20°C por 10 min. Se centrifugaron los tubos por 10 min como se mencionó anteriormente, se decantó, y la pastilla se resuspendió con etanol al 75% con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA). Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, se decantó y se colocaron los tubos cerca de un mechero Bunsen para secar la pastilla. Se resuspendió en 15 µl de agua con DEPC y se colocaron los tubos en baño (de) maría a 56°C por 10 min. Se almacenó el RNA a -70°C.

7.9 Síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA)

Se adicionaron 2.5 µg de RNA total y 1 µl de oligo dT (0.025 µg, Roche) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se homogenizó con vortex por 15 s, y se mantuvo la reacción en baño (de) maría a 70°C por 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 11 µl de la mezcla de reacción (Buffer de Transcriptasa Reversa (RT) 1x, 10mM DTT, 200µM dNTPs, 10 U inhibidor de RNAsa y 100 U TR). Se homogenizó, y se colocaron los tubos a 37°C por una 1 h en baño (de) maría. Se almacenó el cDNA a -20°C.

7.10 Extracción de DNA total de biopsias

A las muestras procesadas con TRIzol que contienen DNA-proteína se les agregó 300 µl de etanol al 100%. Se mezclaron por inversión y se mantuvieron por 5 min a 4°C. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Se precipitaron las pastillas con 1 ml de 0.1 M de citrato de sodio en etanol al 10%. Se colocaron los tubos a temperatura ambiente con agitación por 30 min y se centrifugaron nuevamente. Se decantó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron con 1.5 ml de etanol al 75%. Se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 min con agitación en vortex, se centrifugaron, y se dejaron secar las pastillas cerca de un mechero. Se resuspendieron en 30 µl de agua estéril y se colocaron los tubos en baño (de) maría a 90°C por 10 min. El DNA se almacenó a -20°C.

7.11 Amplificación por PCR de una región conservada del VPH

Se determinó si existía DNA del VPH en las muestras del cérvix obtenidas al amplificar por PCR la región conservada de L1 del DNA viral, utilizando los siguientes oligonucleótidos ya reportados:²⁸⁵

Sentido 5' CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT 3'

Anti-sentido 5' TACCCTAAATACTCTGTATTG 3'

La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo: 1 µg de DNA, 0.2 mM deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30 pmol de cada uno de los oligonucleótidos, buffer de reacción 1X, 1.5 mM MgCl₂, y 2 U de Taq DNA polimerasa recombinante. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un Mastercycler PCR Gradient (Eppendorf, Germany) con las siguientes condiciones: 5 min a 95°C; después 40 ciclos a 95°C por 1 min, 4 8°C por 90 s y 72°C por 2 min. Por último, un ciclo de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR de ~260 pb fueron separados por peso molecular en geles de poliacrilamida (PAGE) al 6% teñidos con bromuro de etidio y visualizados por UV.

7.12 Determinación del tipo de VPH

Los productos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción y el tipo viral se determinó en base a los patrones de digestión enzimática (RFLP) reportados por Yoshikawa 1991.²⁸⁵ **Tabla 6.**

TABLA 6. TIPIFICACIÓN DE ALGUNOS VPH POR RFLP.

Enzimas	VPH 6	VPH 11	VPH 16	VPH 18	VPH 31	VPH 33	VPH 42	VPH 52	VPH 58
Rsa I	-	204, 40	-	-	216, 40	141, 62, 40,13	-	190, 70	195, 65
Dde I	-	-	169, 84	216, 37	-	-	-	180, 80	170, 90
Hae III	207, 37	207, 37	200, 53	210, 43	122, 91, 43	112, 91, 43,10	140, 60	190, 50	200, 40
Hinf I	-	147, 97	-	141, 112	-	-	-	-	-
Xba I	143, 101	143, 101	-	146, 107	-	-	-	-	-
Acc I	-	-	193, 60	-	196, 60	-	-	-	-
Pst I	-	-	-	190, 63	-	-	-	-	-
Kpn I	-	-	-	-	-	218, 38	-	-	-

*Productos de restricción en pares de bases (pb)

7.13 Citometría de flujo

Para corroborar la presencia de linfocitos T infiltrantes del tumor en algunas biopsias obtenidas, se determinó por citometría de tres colores, la proporción de células T CD3⁺ que presentaran los marcadores de superficie CD4⁺ o CD8⁺. $\leq 5 \times 10^5$ CMSP y $\leq 2 \times 10^5$ LIT fueron teñidos con el anticuerpo Opticlone CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PECY5 (Coulter, Marseille, France). Se utilizó un control de isotipo respectivo obtenido de BD Biosciences, San José, CA and Coulter. Después de incubar las células con los anticuerpos a 4°C por 30 min, se lavaron con buffer de lavado y se fijaron con paraformaldehído al 1%. La citometría de flujo se realizó en un aparato FACS Calibur de BD. Los datos fueron adquiridos con un software Cell Quest utilizando los parámetros de forward and side scatter con 10,000 eventos. Se utilizó la región leucocitaria para medir la proporción de células T. El programa WinMDI versión 2.8 fue utilizado para analizar los resultados.

7.14 Inmunohistoquímica

La presencia y localización *in situ* de células T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ fue analizada por inmunohistoquímica. Se lograron obtener biopsias de cérvix de 15 pacientes que participaron en el estudio, pero solo se analizaron por inmunohistoquímica las biopsias de seis pacientes que conservaban la lesión diagnosticada. Se hicieron cortes

histológicos de 4 μm con micrótopo de las biopsias embebidas en parafina. Se tiñeron los cortes histológicos utilizando un aparato con sistema automatizado para tinción histológica de Ventana Medical Systems Inc., Tucson.

Después de la incubación con los anticuerpos específicos, se agregó a las laminillas un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano y se reveló con 3, 3-diaminobencidina. Las laminillas fueron examinadas en un microscopio con objetivo de 400x para contar el número de células teñidas por campo en las áreas definidas y el área del tejido fue medida con un software Leica Qwin (Wetzlar, Germany). Las imágenes fueron salvadas con el programa Leica Meteor Live Image. El número de células positivas en regiones normales, con lesión escamosa o CaCU, del estroma y del epitelio cervical, fue expresado como número de células por μm^2 del área total del tejido.

7.15 Ensayo de estimulación y proliferación de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor

Se determinó la respuesta ante mitógenos específicos como PHA y anti-CD3, de los linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de las pacientes, mediante el método de incorporación de timidina marcada con tritio radiactivo (metil ^3H -timidina). Brevemente, 8×10^4 células obtenidas de pacientes o donadoras sanas fueron estimuladas con PHA o anti-CD3 (adherido previamente a la caja, a 4°C toda la noche) a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente en 200 μl de RPMI al 10%. Los cultivos se realizaron por triplicado en cajas estériles de 96 pozos con fondo en U (Corning Costar Corp., NY, USA). Se incubaron por 72 h a 37°C con 5% CO_2 . Se agregó 1 μCi por pozo de metil ^3H -timidina (6.7 Ci/ mmol, NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, USA) 12 h antes de terminar el período de incubación. Se cosecharon las células en papel filtro y la incorporación al DNA de timidina radiactiva fue cuantificada en un contador de centelleo líquido. Los resultados se obtuvieron en cuentas por minuto.

NOTA: Todo el procedimiento de proliferación antes de cosechar las células fue realizado en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar con protección adecuada. Se separaron correctamente desechos biológicos y radiactivos.

7.16 RT-PCR de citocinas y CD3 ζ

Se analizó la presencia o ausencia del RNAm de citocinas Th1, Th2 y Th3, y de CD3 ζ en 2×10^6 CMP y en $<1 \times 10^6$ LIT. Las células fueron estimuladas bajo las mismas

condiciones que se mencionaron anteriormente en presencia de PHA para el análisis del RNAm de citocinas y con anti-CD3 para la expresión de CD3 ζ . En este caso, las células fueron incubadas en cajas de seis pozos estériles durante 15 h.

El RNA total fue aislado de las células no adherentes usando el reactivo de TRIzol. Se realizó la síntesis de cDNA de acuerdo a las condiciones establecidas por Invitrogen. Se utilizaron 2.5 μ g de RNA para la síntesis de cDNA en presencia de 200 U de transcriptasa reversa M-MLV. Se determinó por PCR la expresión de citocinas y de CD3 ζ . Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 μ l conteniendo: 1 μ l de cDNA, 0.2 mM dNTPs, 15 pmol de cada uno de los oligonucleótidos, 2 mM MgCl₂, buffer de reacción 1X y 1 U de Taq DNA polimerasa recombinante. Se amplificó el gen constitutivo β 2 μ globulina para verificar la integridad del cDNA. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y los ciclos de amplificación por PCR (5 min de desnaturalización a 94°C, 30-40 ciclos de alineamiento, y un ciclo de extensión final de 5-10 min a 72°C) se detallan en la **tabla 7**. Los productos de PCR fueron separados en 6% PAGE, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por UV.

TABLA 7. OLIGONUCLEÓTIDOS Y CONDICIONES DE PCR

Gene	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR	Ciclos de alineamiento
Interleucinas			
IL-2 ^{187*}	S 5'CATTGCACTAAGTCTTGCACTTGCA3 AS 5'CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCCTG3'	305 pb	94°C- 1 min 68°C- 1.5 min 72°C- 2 min
IFN- γ ²⁸⁶	S 5'ATCAGCAGCGACTCCTTTCCGCTT3' AS 5'GAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACT3'	427 pb	95°C- 1 min 60°C- 1 min 72°C- 1 min
IL-4 ²⁸⁶	S 5'ACTCTGTGCACCGAGTTGACCG3' AS 5'GTCGAGCCGTTTCAGGAATCG3'	197 pb	94°C- 40s 60°C- 1 min 72°C- 1 min
IL-10 ²⁸⁷	S 5'ATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA3' AS 5'CTCTCAAGGGGCTGGGTGAGCTATCCCA3'	351pb	94°C- 1 min 65°C- 1 min 72°C- 1 min
TGF- β 1 ¹⁸⁷	S 5'GCCCTGGACACCAACTATTGCT3' AS 5'AGGCTCCAAATGTAGGGGAGG3'	161pb	94°C- 1min 60°C- 1 min 72°C- 1 min
Cadena del TCR			
CD3 ζ ²⁸⁶	S 5'CTCTGCTACCTGCTGGATGGAA3' AS 5'ATGTGAAGGGCGTCTAGGT3'	380 pb	94°C- 1 min 64°C- 45s 72°C- 1.5 min
Constitutivo			
β 2 μ -globulina ²⁸⁸	S 5'ACCCCACTGAAAAAGATGAGTAT3' AS 5'ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT3'	100 pb	94°C- 30s 60°C- 1 min 72°C- 1 min

*Citas. S= oligonucleótido sentido, AS= anti sentido.

7.17 Análisis estadístico

Los datos de proliferación de linfocitos periféricos e infiltrantes del tumor de cada paciente fueron expresados como la desviación estándar promedio (\pm DE). La prueba de análisis de varianza se utilizó para: estimar diferencias en edad de acuerdo al estado de salud (o estadio de la enfermedad), diferencias en la proliferación de linfocitos T periféricos estimulados respecto al estado de salud, diferencias entre 4 grupos estratificados de edad y proliferación de linfocitos T periféricos estimulados. La prueba de Scheffé nos permitió evaluar las diferencias significativas entre estos grupos. Se utilizó la prueba *t* de Student para estimar las diferencias de proliferación entre linfocitos T estimulados periféricos e infiltrantes de mujeres con CaCU. La asociación entre la proporción de muestras positivas para el RNAm de las citocinas o de CD3 ζ en linfocitos T periféricos y la edad estratificada, estado de salud o los grupos de proliferación en linfocitos T periféricos se calculó por la prueba de Chi cuadrada. La relación entre la presencia del RNAm de las citocinas y la de CD3 ζ en linfocitos T periféricos se estudió con la prueba exacta de Fisher. También se utilizó esta prueba para determinar la proporción de muestras positivas para la presencia del RNAm de las citocinas o de CD3 ζ en linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de 12 mujeres con CaCU. Las diferencias estadísticas en todas las pruebas fueron consideradas significativas cuando los valores *p* eran menores de 0.05.

8 RESULTADOS

8.1 Determinación del tipo viral a partir de DNA de los tejidos cervicales

Las oncoproteínas del VPH intervienen en diferentes procesos celulares incluyendo la respuesta inmune. De tal manera que el tipo viral puede determinar en parte el transcurso de la enfermedad en base a la capacidad oncogénica de sus proteínas. Por lo que en el presente trabajo se detectó por PCR, la presencia del VPH en biopsias y raspados cervicales de las pacientes en estudio. Para tener una referencia de los tipos virales en nuestra población de estudio, se determinó el tipo viral en base a patrones de restricción enzimática, de acuerdo a lo descrito por Yoshikawa 1991. **Tabla 6.**²⁸⁵

Se encontraron los tipos de VPH 6, 16, 18, 31, 33, 42, 52, 58; y dobles infecciones con VPH 16/18, 16/31 y 52/33, en 20 de las 37 muestras analizadas por histopatología o PCR. **Tabla 8.** El 24.2% del total de las muestras analizadas por PCR fueron positivas para VPH 16, el 21.2% para el VPH 18, el 12.2% para VPH 33, y 6.1% fueron positivas para VPH 31. Así, los tipos virales 16 y 18 son los principales agentes

causales de la enfermedad, seguidos de los tipos 31 y 33 como se ha reportado en otros trabajos.²⁸⁹ No se realizó el análisis estadístico para comparar si el estadio de la enfermedad o las otras variables analizadas se encontraban asociadas con algún tipo viral debido al escaso número de casos analizados para la variedad de tipos virales detectados.

TABLA 8. PRESENCIA DEL VPH EN BIOPSIAS O RASPADOS CERVICALES DE LAS PACIENTES.

Lesión	Total*	Tipo viral																					
		+	(%)	-	(%)	ND	6	16	18	33	42	58	DI										
LIE	24	14	(58.3)	6	(25)	3	(12.5)	2	(8.3)	1	(4.2)	1	(4.2)	1	(4.2)	1	(4.2)	1	(4.2)	4	(16.7)		
CaCU	13	13	(100)	0	(0)	4	(30.8)	0	(0)	2	(15.4)	3	(23.1)	2	(15.4)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(15.4)
Total	37	27	(72.9)	6	(16.2)	7	(18.9)	2	(5.4)	3	(8.1)	4	(10.8)	3	(8.1)	1	(2.7)	1	(2.7)	1	(2.7)	6	(16.2)

*Total de muestras analizadas por histopatología o PCR para la presencia del VPH. +, VPH positivos por PCR. -, VPH negativos por PCR. ND, tipo viral no determinado. DI, dobles infecciones. Nota : todos los VPH- son VPH+ por histopatología.

8.2 Proporción y localización de células T en biopsias cervicales de pacientes con CaCU

Para corroborar la presencia y proporción de linfocitos T infiltrantes del tumor en las biopsias de cérvix, analizamos por citometría de flujo la relación de células T CD4⁺ o CD8⁺ periféricas e infiltrantes del cérvix en dos mujeres con CaCU, y la comparamos con la relación existente en linfocitos periféricos de dos mujeres sanas y de dos mujeres con LIEBG. Las donadoras sanas y las mujeres con LIE presentaron una relación de células T CD4⁺/CD8⁺ periféricas de 1.4 y de 1.7, respectivamente. Mientras que en las mujeres con CaCU esta relación se invierte tanto en los linfocitos periféricos (0.71) como en los infiltrantes del tumor (0.97). Lo cual sugiere que las células T CD8⁺ son las que predominan en mujeres con CaCU.

Como se mencionó anteriormente, la localización, el tipo celular, el número de células así como la correcta activación de células T, pueden determinar el grado de avance de la enfermedad y tienen cierto valor pronóstico de la progresión de . Por lo cual se analizó por inmunohistoquímica, la distribución de células T en el epitelio y estroma de biopsias cervicales embebidas en parafina, de cinco mujeres con LIE (incluyendo un carcinoma *in situ* y una región normal) y una mujer con carcinoma

microinvasor del cérvix. En general se observaron más linfocitos infiltrantes en el estroma que en el epitelio independientemente del estadio de la enfermedad, prevaleciendo las células T CD8⁺. **Figura 14, Tabla 9.** Estos resultados concuerdan con los obtenidos por citometría de flujo en CaCU de este trabajo, y con los ya reportados por otros autores.^{191,194,201,205} Sin embargo, aún no existen reportes que esclarezcan la causa de esta distribución ni la inoperancia de las células T en los dos compartimentos del cérvix de pacientes con CaCU. Esto es debido a la escasa disponibilidad de muestra y de estas células en los compartimentos específicos.

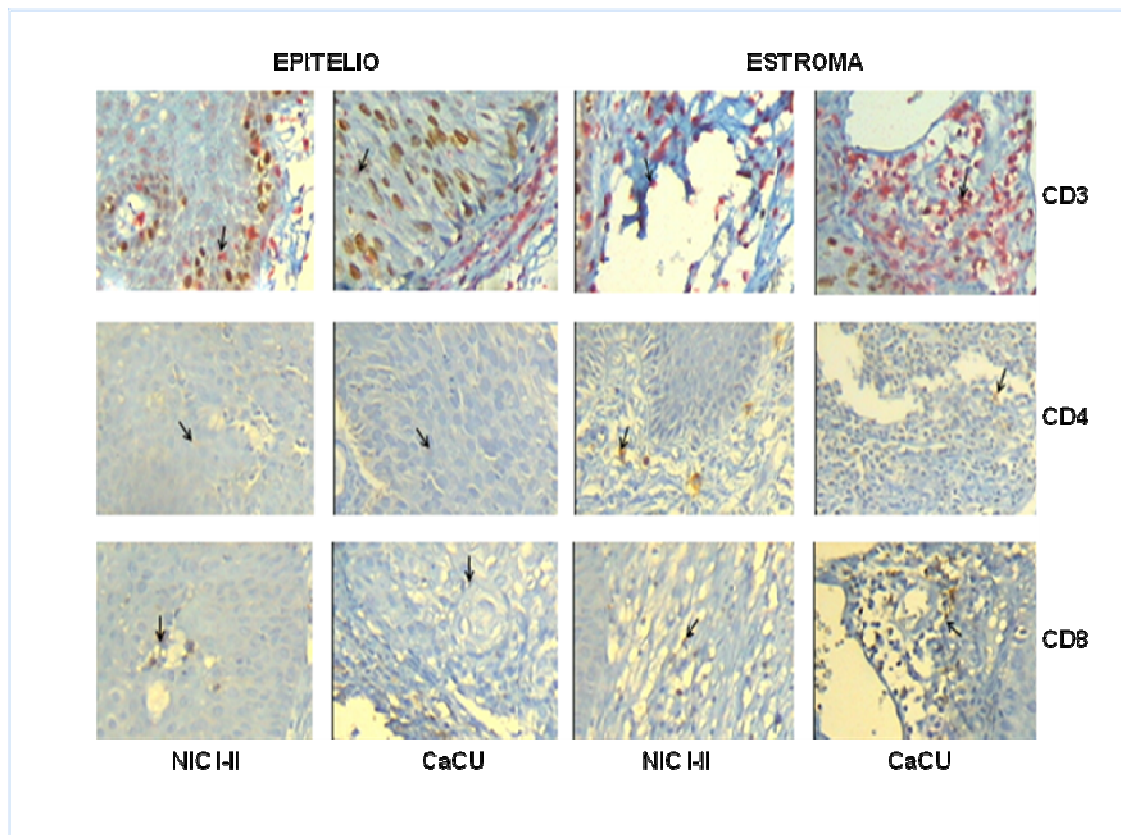


Figura 14. Mayor infiltración de linfocitos T en el estroma que en el epitelio cervical de mujeres con CaCU. Imágenes representativas de la presencia de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ o CD8⁺ teñidos por inmunohistoquímica.

TABLA 9 PREDOMINIO DE LINFOCITOS T INFILTRANTES CD8⁺ EN EPITELIO Y ESTROMA DE CÉRVIX EN MUJERES CON LIEAG O CaCU.

Regiones con neoplasia	^a Células CD3 ⁺ Ki67 ⁺ /	Células CD4 ⁺ /	Células CD8 ⁺ /
	^b Área (µm ²)		
Epitelio			
No LIE (n=2)	8(±3) / 216719(±30045) ^b	0(0)	0(0)
LIEBG (n=3)	7(±4) / 207530(±34829)	1(±1) / 178251(±30508)	4(±5) / 169847(±50235)
LIEAG (n=4)	11(±8) / 204200(±46519)	4(±4) / 203855(±45350)	8(±5) / 221495(±35194)
CaCU (n=1)	11(±4) / 208064(±34342)	8(±9) / 209708(±39649)	6(±4) / 218879(±43421)
Estroma			
No LIE (n=2)	13(±7) / 188102(±67657)	3(±2) / 219457(±38052)	0(0)
LIEBG (n=3)	32(±33) / 135750(±66310)	9(±7) / 163560(62100)	9(±10) / 167950(±61374)
LIEAG (n=4)	90(±77) / 198074(±44483)	24(±19) / 207810(±42300)	34(±28) / 215920(±37215)
CaCU (n=1)	133(±129) / 144753(±84078)	15(±17) / 114030(±86488)	30(±35) / 124839(±81657)

*Análisis por inmunohistoquímica de los datos obtenidos de cinco mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas (incluyendo un carcinoma *in situ* y tejido normal del cérvix) y de una mujer con CaCU microinvasor. Promedio del número de linfocitos^a y de las áreas obtenidas^b de 10 diferentes campos analizados (400x) de cada región neoplásica usando un microscopio compuesto y el programa LEICA. La DE se muestran en paréntesis. No LIE = cérvix normal en las biopsias de pacientes.

8.3 Respuesta proliferativa de linfocitos T en pacientes con CaCU

La evidente infiltración de células T citotóxicas CD8⁺ y la escasa presencia de células T CD4⁺ en el tumor sugiere que existe una desregulación en la respuesta de ambas, ya que las células T CD4⁺ son requeridas para la eficiente actividad citotóxicas de las primeras. Con el propósito de elucidar la funcionalidad de las células T durante el desarrollo del CaCU, nosotros comparamos la proliferación de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de mujeres con CaCU o LIE, con la proliferación de linfocitos T de donadoras sanas. Analizamos 22, 19 y 27 muestras de linfocitos T periféricos de las pacientes; y siete muestras de linfocitos infiltrantes del tumor. La proliferación de estas células se analizó mediante el método de incorporación al DNA de timidina marcada radiactivamente, para lo cual se estimularon estas células con fitohemaglutinina o anti-CD3 durante 3 días.

Se observó una diferencia significativa entre los diferentes grupos. Particularmente, existió una menor proliferación de linfocitos T periféricos en mujeres

con CaCU que en linfocitos T de donadoras sanas cuando las células fueron estimuladas con PHA ($p=0.01$) y anti-CD3 ($p\leq 0.05$). Sin embargo, la diferencia en la proliferación de células T de mujeres con LIE y de donadoras sanas no fue significativa. Esto indica que las células T de mujeres con LIE no presentan una alterada respuesta proliferativa lo cual es de suponerse ya que en estas pacientes puede haber regresión de las lesiones cervicales. **Figura 15.**

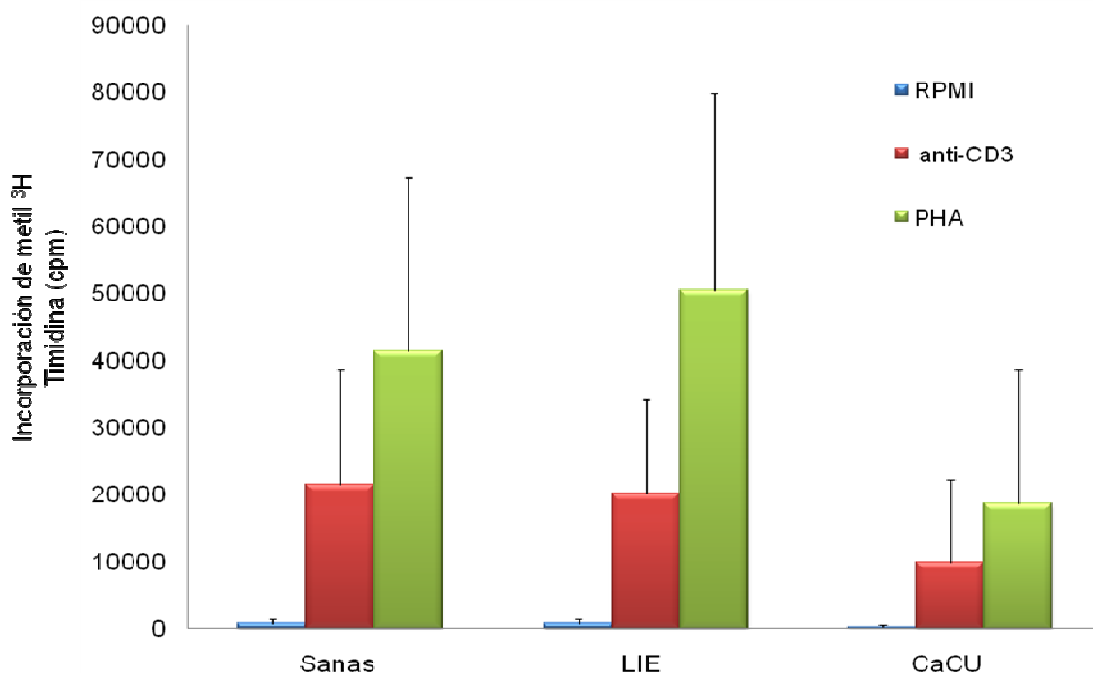


Figura 15. Baja respuesta proliferativa de células T periféricas en mujeres con CaCU respecto a mujeres sanas y con LIE. Estimulación por 72 h con mitógenos o sin mitógenos (RPMI al 10%). Resultados representativos del promedio de cpm (\pm DE) de los cultivos por triplicado para cada muestra. Se observa diferencia significativamente estadística en la proliferación de linfocitos T entre los grupos de estudio mediante la prueba de ANOVA. $p=0.036$, estimulados con anti-CD3 y $p< 0.001$ con PHA.

Sin embargo, en las pacientes con CaCU, no solo la activación de las células T a través del TCR se encuentra alterada sino también la de vías alternas, ya que su actividad proliferativa en presencia de ésteres de forbol (PMA, Phorbol-Myristate Acetate) y ionóforos de calcio (Ionomicina) es menor que la observada en pacientes con LIE o mujeres sanas. **Figura 16.**

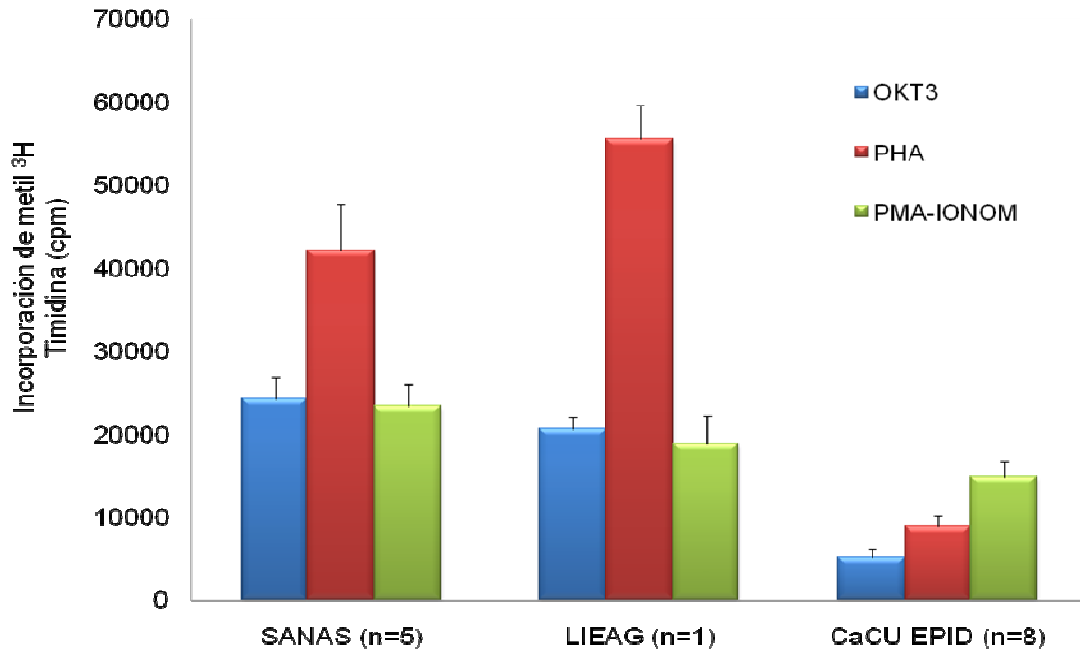


Figura 16. Baja respuesta proliferativa a diferentes mitógenos en células T de mujeres con CaCU. Estimulación por 72 h en presencia de 5 µg/ml anti-CD3, 5 µg/ml PHA o 10ng/ml PMA y 1 µg/ml Ionomicina. Resultados representativos del promedio de cpm (±DE) de los cultivos por triplicado para cada muestra.

El análisis de proliferación de los linfocitos T infiltrantes del tumor demostró que estas células tienen en general una respuesta nula a los mitógenos utilizados. De manera que al comparar la proliferación de estas células con las de sangre periférica de las mismas pacientes se observa una diferencia significativa. Esto indica claramente que la respuesta proliferativa de linfocitos T periféricos de mujeres con CaCU es deficiente mientras que los linfocitos infiltrantes no responden. **Figura 17.**

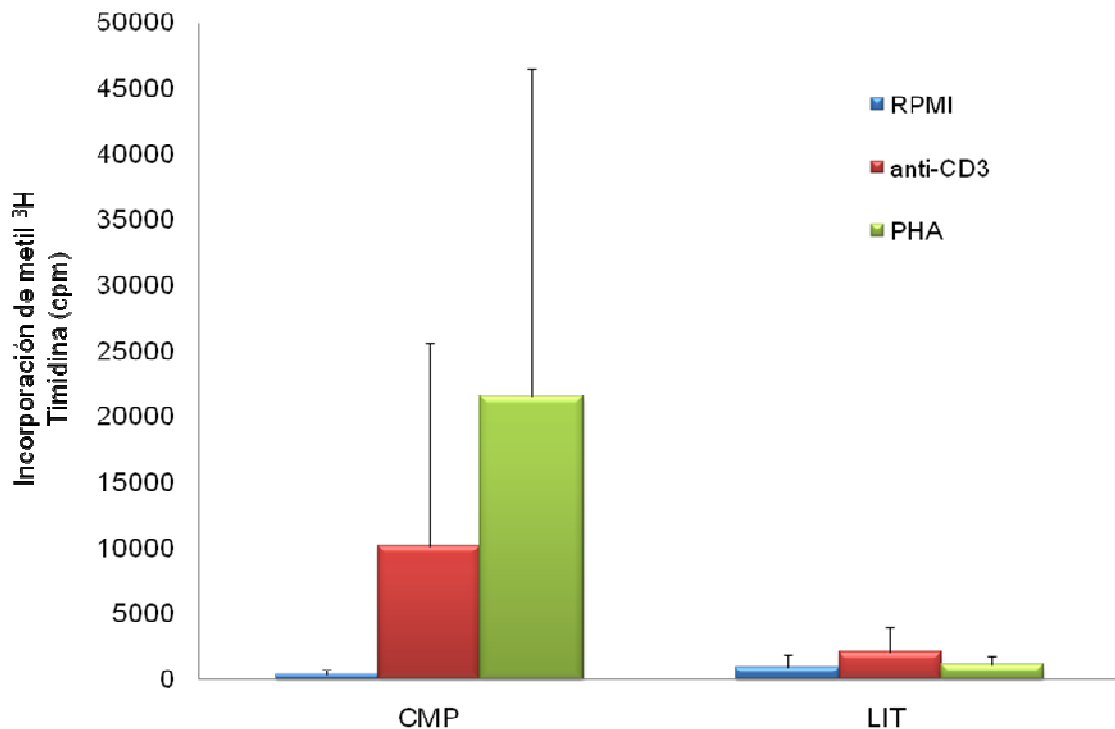


Figura 17. Nula respuesta proliferativa de linfocitos infiltrantes del tumor comparada con la respuesta de células T periféricas de mujeres con CaCU. Estimulación por 72 h en presencia de 0.5 µg/ml anti-CD3, 5 µg/ml PHA o sin mitógeno (RPMI al 10%). Resultados representativos del promedio de cpm (\pm DE) de los cultivos por triplicado para cada muestra. Solo se observa diferencia significativamente estadística entre las dos poblaciones celulares estimuladas con PHA mediante el análisis con la prueba *t* de Student ($p < 0.001$).

Se sabe que la respuesta inmune tiende a disminuir en personas sanas de 70 años de edad o mayores.²⁹⁰ Aunque ninguna de las pacientes analizadas en el presente trabajo tuvo 70 años o más; se analizó estadísticamente cual era el promedio de edad de las pacientes y si esta variable estaba asociada con la respuesta proliferativa. Se determinó con la prueba de Scheffé que las pacientes con CaCU analizadas en este trabajo tuvieron un promedio de edad de 46 años, que fue mayor que el de mujeres con LIE y donadoras sanas (promedio 34, ambas $p < 0.001$). Esto concuerda con el promedio de edad (45.1 -48.6 años) de mujeres con estadios iniciales del CaCU (estadios I-II) reportado en otros trabajos.²⁹¹ No se encontró relación entre la edad y la disminuida proliferación de células T en mujeres con CaCU al compararlas con las donadoras sanas (anti-CD3, $p = 0.834$; PHA, $p = 0.321$).

8.4 Patrón de citocinas en células T de pacientes con CaCU

Otra característica que determina el estado funcional de las células T es la producción de citocinas. Estas juegan un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad al regular la respuesta inmune. Por lo que se analizó la presencia del RNAm de las

principales citocinas Th1, Th2, Th3 en linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de mujeres con LIE o CaCU, y se compararon los resultados con los de linfocitos T periféricos de donadoras sanas. En la **Figura 18** se ejemplifica la expresión del RNAm de las citocinas y el gen constitutivo en algunas pacientes con LIEAG.

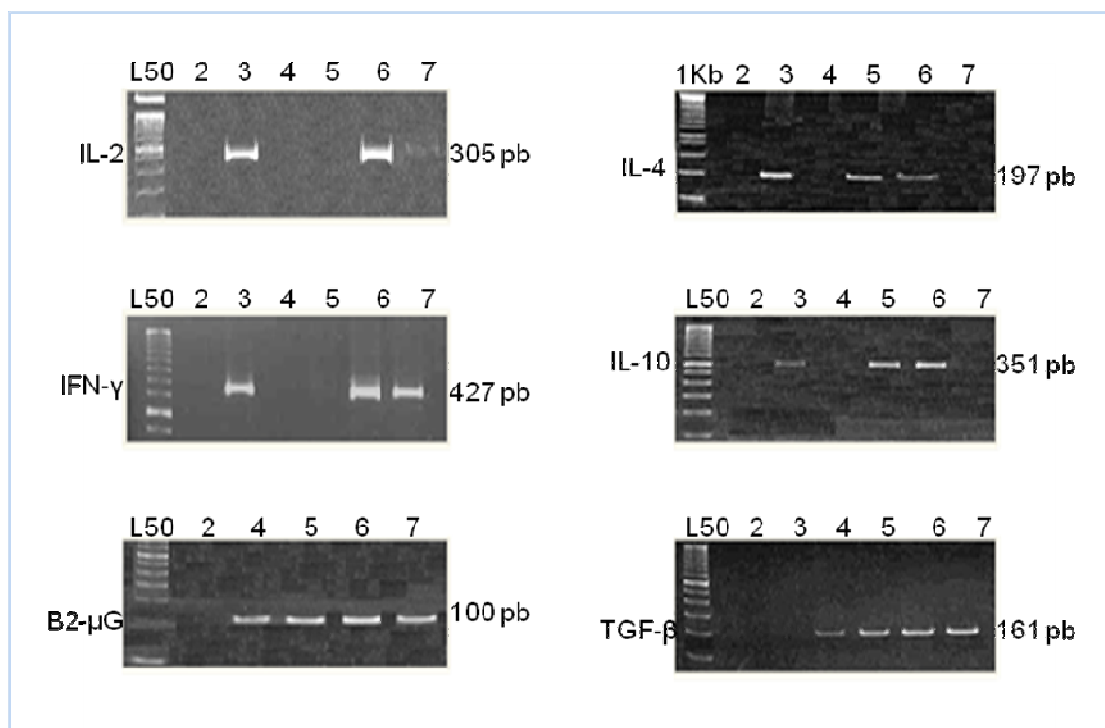


Figura 18. Geles representativos del análisis por RT-PCR de la expresión de citocinas Th1, Th2 y Th3 en linfocitos periféricos estimulados con PHA de mujeres con LIEAG. Geles de poliacrilamida al 6%. Carril: 1) Marcador de peso molecular; 2) Control sin cDNA, 3) Control +, cDNA de mujeres sanas, 4-7) cDNA pacientes. $\beta 2\text{-}\mu\text{G}$, gen constitutivo $\beta 2$ microglobulina.

Existe un número significativamente menor de muestras positivas para el RNAm de IL-2, IL-10 e IFN- γ en los estadios avanzados de la enfermedad. El número de muestras positivas para IL-4 y TGF- $\beta 1$ fue similar en los grupos de estudio; aunque mayor respecto a los mensajeros de las otras citocinas en mujeres con CaCU. **Tabla 10.** Estos resultados indican que los linfocitos T periféricos de pacientes con CaCU tienen una disminuida respuesta pro-inflamatoria que hace preponderar una respuesta Th2/Th3 no efectiva para eliminar el tumor. Además, se observa en estas pacientes que la presencia del RNAm de IL-10 en células T periféricas no es tan frecuente como se reporta en suero y biopsias de cérvix de pacientes con CaCU en otros estudios. Esto sugiere que esta citocina proviene de otras células, siendo la principal fuente las células tumorales.

TABLA 10. MENOR NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS PARA LOS RNA_M DE CITOCINAS TH1 E IL-10 EN LINFOCITOS T PERIFÉRICOS DE MUJERES CON CACU.

Citocinas	No. de mujeres (%)			valor <i>p</i> *
	Sanas <i>n</i> =26	LIE <i>n</i> =20	CaCU <i>n</i> =20	
IL-2	22(84.6%)	14(70%)	10(50%)	<i>p</i> = 0.040
IFN- γ	23(88.5%)	18(90%)	10(50%)	<i>p</i> = 0.002
IL-4	20(76.9%)	16(80%)	16(80%)	<i>p</i> = 0.956
IL-10	19(73.1%)	8(42.1%)	5(25%)	<i>p</i> = 0.004
TGF- β 1	20(76.9%)	12(63.2%)	14(70%)	<i>p</i> = 0.602

Análisis por RT-PCR de la presencia de citocinas en linfocitos periféricos estimulados con PHA. *Asociación entre las muestras positivas y el estado de salud con la prueba Chi-cuadrada.

Resulta importante conocer si el patrón de citocinas en linfocitos T periféricos es similar al que presentan los infiltrantes del tumor en mujeres con CaCU, ya que en la práctica clínica es más fácil obtener sangre periférica que nos indique el estado inmunológico de la paciente. Existe una tendencia a haber menor cantidad de muestras positivas para la mayoría de las citocinas en linfocitos infiltrantes del tumor comparados con los linfocitos periféricos. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico de los datos en estas poblaciones no se encontró una diferencia significativa para cualquiera de los mensajeros de citocinas, excepto para el RNA_M de IL-4; el cual se observó en más muestras de linfocitos T periféricos que en infiltrantes del tumor. Esto muy probablemente se deba al número de muestras analizadas. **Tabla 11.**

TABLA 11. PREDOMINIO DE MUESTRAS POSITIVAS PARA EL RNA_M DE TGF-B EN LINFOCITOS T INFILTRANTES DEL TUMOR.

Citocinas	No. de casos (%)		Valor p*
	CMP (n=12)	LIT (n=10)	
IL-2	8(66.7%)	3(30%)	p = 0.099
IFN-γ	8(66.7%)	4(40%)	p = 0.206
IL-4	10(83.3%)	4(40%)	p = 0.048
IL-10	3(25%)	1(10%)	p = 0.368
TGF-β1	8(66.7%)	6(60%)	p = 0.546

Análisis por RT-PCR de la presencia de citocinas en linfocitos periféricos e infiltrantes del tumor de mujeres con CaCU estimulados con PHA. *La relación en la proporción de muestras positivas entre ambas poblaciones celulares fue estudiada con la prueba de Fisher.

Interesantemente el RNA_M de TGF-β1 se encontró en más muestras de linfocitos infiltrantes en comparación con el resto de los RNA_M de las otras citocinas. Cuando se analizan los resultados individuales esta citocina es la única que se expresa en tres muestras de linfocitos infiltrantes del tumor; mientras que en linfocitos periféricos de las mismas pacientes se expresan todas las citocinas excepto IL-10, y dos de estas últimas muestras presentan una baja respuesta proliferativa a anti-CD3. Por el contrario, en tres mujeres con CaCU cuyos linfocitos T periféricos tienen una buena respuesta proliferativa, se observa expresión de la mayoría de las citocinas, especialmente IL-2 e IFN-γ en linfocitos periféricos e infiltrantes del tumor. Esto podría indicar que una correcta respuesta inmunológica asociada a citocinas Th1 de linfocitos T periféricos en pacientes con CaCU está acompañada de una mejor respuesta de los linfocitos infiltrantes del tumor, y probablemente de un mejor pronóstico para estas pacientes.

Los resultados hasta aquí mostrados indican que en el ambiente tumoral existen más factores que inhiben tanto la infiltración como la capacidad funcional de las células T *in situ*. Además, alteraciones en los linfocitos de sangre periférica pueden ser indicio de mayores cambios en el cérvix.

La interacción de IL-2 con su receptor es necesaria para regular la proliferación de células T inducida por los antígenos. Sin embargo, cuando prevalece la producción de IL-4 en una respuesta de células T, la proliferación puede estar restringida a células Th2.²⁹² Por lo que se analizó si existía una asociación entre los mensajeros de las citocinas y los datos obtenidos en tres grupos de proliferación de linfocitos T periféricos. No se encontró asociación estadística entre estas variables. Tampoco se

encontró relación alguna con los datos por edad estratificada. Lo cual sugiere que la menor frecuencia de muestras positivas para el RNAm de citocinas Th1 en mujeres con CaCU es debida a la enfermedad y no al proceso de envejecimiento de los linfocitos T humanos, caracterizado por una deficiencia general en la inducción de genes cuyos productos son requeridos para la fase S del ciclo celular.²⁹³

8.5 Presencia del RNA mensajero de CD3ζ en linfocitos periféricos e infiltrantes del tumor

Hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular exacto por el cual las células T son inhibidas en las pacientes con CaCU. Sin embargo, estudios previos demuestran que existe una expresión disminuida de la proteína CD3ζ en células NK y linfocitos T periféricos así como en los tumores primarios de mujeres con CaCU.^{269,271-272} Esto sugiere que la ineficiente función de las células T en estas pacientes puede estar asociada a la alterada expresión de CD3ζ.

Debido a que no existen reportes sobre la expresión del RNAm de CD3ζ en mujeres con CaCU; se examinó por RT-PCR la presencia de este en linfocitos T periféricos e infiltrantes de las pacientes con diferentes estadios de la enfermedad. Para lo cual se realizó el diseño de oligonucleótidos que comprendieran la región codificadora de CD3ζ y su isoforma de splicing CD3η utilizando el programa Vector NT1. A partir de la cadena complementaria de DNA, se amplificaron por PCR 380 pb de las 492 pb que corresponden al marco de lectura abierto de este gen. Se corroboró la amplificación de este producto al digerir con Pst1 el fragmento de DNA amplificado, que genera fragmentos de 252 pb y 134 pb, correspondientes a los tamaños esperados en base al mapa de restricción reportado para la cadena complementaria de CD3ζ. **Figuras 19 y 20.**

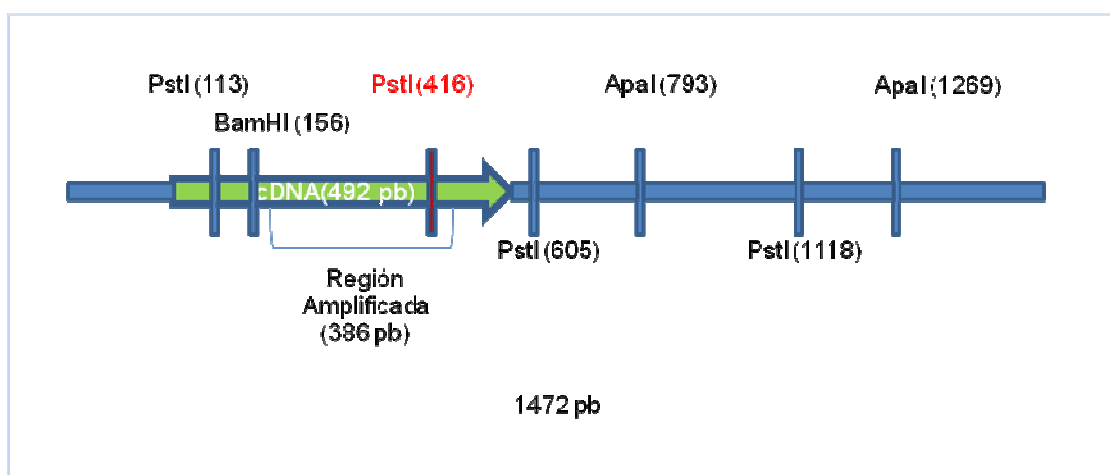


Figura 19. Mapa de restricción del cDNA de CD3ζ.

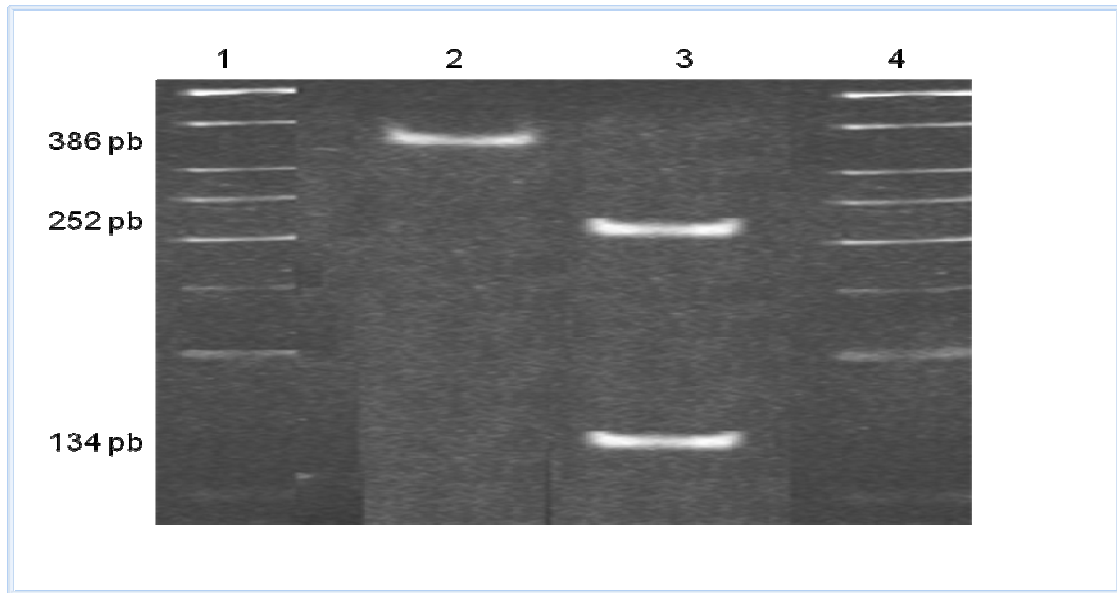


Figura 20. Digestión con Pst I del fragmento amplificado por RT-PCR de la cadena ζ de linfocitos T periféricos estimulados con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 por 16 h. Gel de poliacrilamida al 6%. Carriles: 1,4) Marcador de peso molecular L-50; 2) Producto de PCR; 3) Digestión con Pst I del producto amplificado.

Se analizó la presencia del RNAm de CD3 ζ en 32 muestras de linfocitos T periféricos estimulados con anti-CD3 de donadoras sanas, 20 de mujeres con LIE y 20 de mujeres con CaCU; y en 10 muestras de linfocitos infiltrantes del tumor. Se observó asociación entre la progresión del CaCU y un menor número de muestras positivas para la expresión del RNAm de CD3 ζ , lo cual fue más evidente en muestras de linfocitos infiltrantes. **Figuras 21 y 22.**

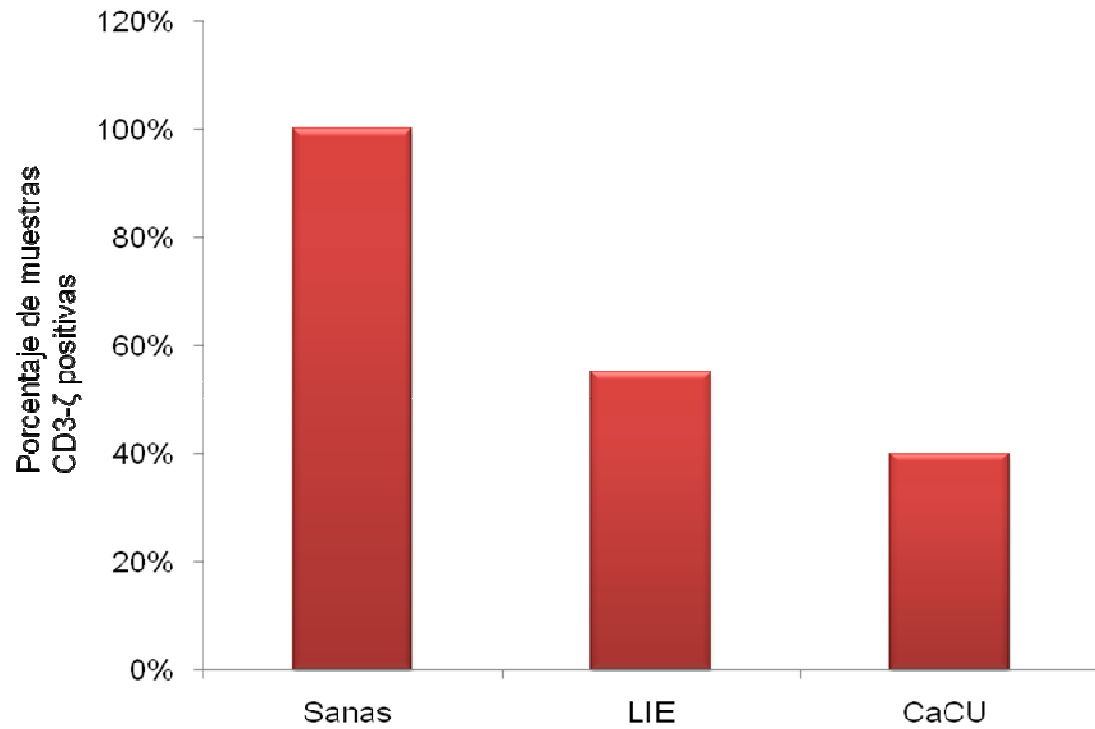


Figura 21. Disminución en sangre periférica del número de muestras positivas para el RNAm de CD3ζ durante el desarrollo del CaCU. Análisis por RT-PCR de linfocitos T periféricos estimulados con 0.5 µg/ml anti-CD3 durante 15 h. La asociación entre la proporción de muestras positivas para CD3ζ y el estado de salud fue calculada con la prueba de Chi-cuadrada ($p < 0.001$).

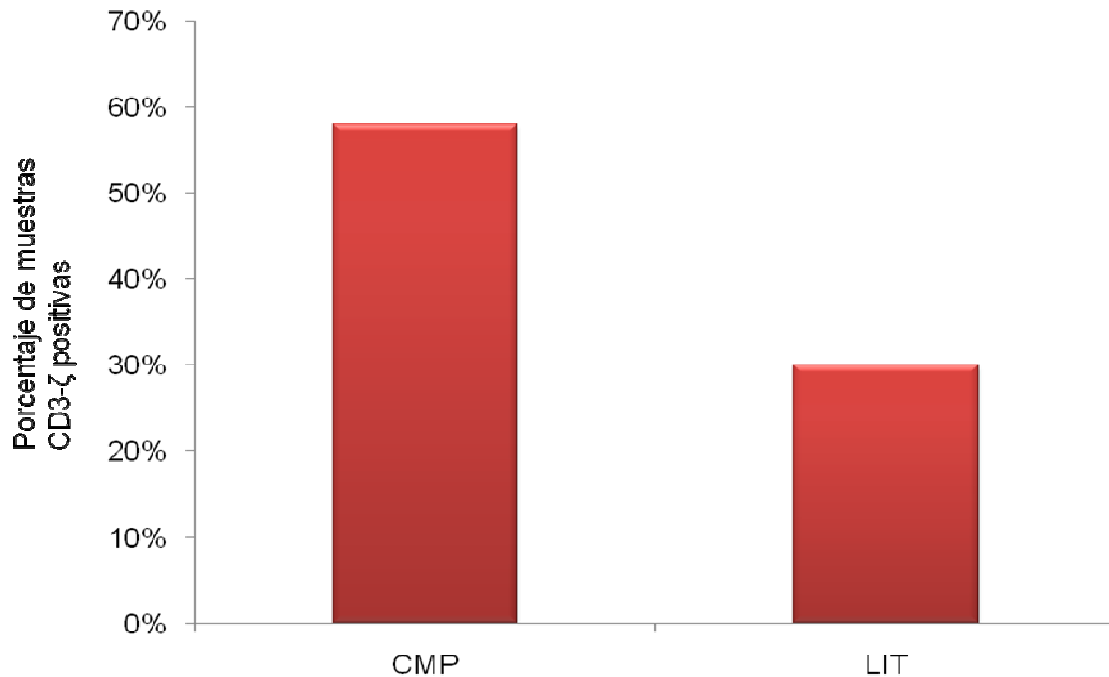


Figura 22. Menor número de muestras positivas para el RNAm de CD3ζ en linfocitos T infiltrantes del tumor que en linfocitos periféricos de mujeres con CaCU. Análisis por RT-PCR de linfocitos T estimulados con 0.5 μg/ml anti-CD3 durante 15 h. No hubo asociación significativa en la proporción de muestras positivas para CD3ζ entre las dos poblaciones celulares al usar la prueba exacta de Fisher.

Posteriormente determinamos si el número de muestras positivas para expresión del RNAm de CD3ζ correlaciona con la baja proliferación de células T en mujeres con CaCU. Interesantemente hubo una correlación significativa entre estas dos variables cuando se estimularon a las células con anti-CD3 ($p= 0.04$). Esto sugiere que la función disminuida de las células T correlaciona con alteraciones en la activación a través del TCR que conducen a la progresión del CaCU.

Las citocinas son proteínas multifuncionales que regulan diferentes procesos celulares entre ellos la activación, maduración y diferenciación de diversos tipos celulares.²⁹⁴ Por lo que se evaluó la relación existente entre la presencia del RNAm de citocinas y el RNAm de CD3ζ en linfocitos periféricos (LP) de los diferentes grupos de estudio; y entre los LP y los LIT de las mujeres con CaCU. Se encontró una asociación positiva significativa entre las muestras positivas para los RNAm de CD3ζ/IL-2 (LP, $p=0.011$, LP comparados con LIT, $p=0.015$) y CD3ζ/IFN-γ (LP, $p=0.012$, LP comparados con LIT $p=0.038$). Interesantemente, se observó una relación inversa entre el número de muestras positivas para el RNAm de IL-10 y CD3ζ en linfocitos periféricos ($p=0.029$). No se encontró una asociación entre las muestras que expresaron CD3ζ e IL-4 (o TGF-β1) en linfocitos periféricos. Sin embargo, la

presencia del RNAm de IL-4 se asoció positivamente con la de CD3 ζ cuando se compararon linfocitos periféricos e infiltrantes ($p=0.026$). Por lo anterior se deduce que la expresión óptima del mensajero de CD3 ζ está asociada con la expresión de los mensajeros de IL-2 y de IFN- γ , lo cual muy probablemente ocurra también en las respectivas proteínas.

Se evaluó si la edad estratificada estaba relacionada con la presencia del RNAm de CD3 ζ . Una menor proporción de muestras positivas para este mensajero fue encontrada en las pacientes pero no en mujeres sanas \geq de 50 años de edad ($p = 0.040$). Esto sugiere que otros factores relacionados con la enfermedad determinan esta asociación entre la edad y la presencia del RNAm de CD3 ζ en las pacientes.

9 DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este estudio demuestran que los linfocitos T de las pacientes tienen alteraciones funcionales que pueden estar asociadas a factores encontrados en los estadios avanzados de la enfermedad, independientes de la edad. Así, se observa que la respuesta de células T de mujeres con LIE es muy similar a la de donadoras sanas. Mientras que en las pacientes con CaCU disminuye la capacidad proliferativa, la presencia de mensajeros de citocinas Th1 y la de CD3 ζ en linfocitos T periféricos. Estas alteraciones fueron mucho más evidentes en los linfocitos infiltrantes del tumor, lo cual indica que el grado de inhibición de la funcionalidad en células T depende de su proximidad al sitio primario del tumor. Esto ha sido demostrado *in vitro* en células T provenientes de sitios cercanos al tumor que presentan baja respuesta a mitógenos e IL-2.^{134,295}

Similar a lo observado en el presente trabajo, las citocinas Th1, IL-2 e IFN- γ , disminuyen en sobrenadantes del cultivo de células mononucleares periféricas,¹⁹² en sangre²⁹⁶ y en plasma¹⁹³ de mujeres con LIEAG o CaCU. Por el contrario, Sheu¹⁸⁵ y Santin,¹⁹⁴ encuentran un patrón de citocinas Th1 en linfocitos T periféricos de mujeres con CaCU. Aunque no hubo significancia estadística entre los grupos de estudio, en el presente trabajo prevaleció la expresión del RNAm de IL-4 en los linfocitos T periféricos de mujeres con CaCU. Esto concuerda con la elevada producción de esta citocina en células mononucleares periféricas¹⁹² pero se opone a los bajos niveles encontrados en plasma¹⁹³ y en linfocitos T periféricos^{185,194} de mujeres con LIE o CaCU. Además, se encontró que la expresión del RNAm de IL-10 disminuye tanto en linfocitos periféricos como en los infiltrantes del tumor en estadios avanzados de la enfermedad; similar a lo reportado en sangre por Bais *et al.*²⁹⁶, y contrario a lo

observado en cérvix¹⁸⁶ y en sangre periférica¹⁹²⁻¹⁹³ de mujeres con LIE por otros autores. La menor presencia de los mensajeros de citocinas en los linfocitos infiltrantes del tumor no fue significativa al comparar linfocitos periféricos e infiltrantes de mujeres con CaCU. Excepto IL-4, que se observa en menor número de muestras de linfocitos infiltrantes contrario a lo reportado por Sheu *et al.*^{185,194} Interesantemente, encontramos que el 60% de estas células expresó TGF- β 1, de las cuales el 30% solo expreso esta citocina.

Las diferencias encontradas en el tipo de citocinas producidas por las células T en los diversos reportes pueden deberse a los métodos o mitógenos utilizados, a la presencia de otras células como fuente de estas citocinas, al estadio de la enfermedad, al número de muestras o incluso a la población analizada.

Por lo anterior, en el presente trabajo se confirma que existen menos muestras positivas para los RNAm de IL-2 e IFN- γ , predominando IL-4 en linfocitos T periféricos y prevaleciendo TGF- β 1 en linfocitos infiltrantes de mujeres con CaCU. Así, estas mujeres presentan un alterado patrón de citocinas que favorece el desarrollo del CaCU.

Además, estos resultados apoyan los ya reportados sobre la presencia de células T reguladoras (Treg) en nódulos linfáticos de mujeres con CaCU.²⁹⁵ Debido a que los linfocitos infiltrantes aquí estudiados presentan características semejantes a las de células regulatorias; que al ser estimuladas a través del TCR producen altas cantidades de TGF- β 1, baja expresión de IL-4 e IL-10 y carente expresión de IL-2 e IFN- γ .²⁹⁷ Las células Treg inhiben la activación y proliferación de otras células por contacto entre célula-célula o al producir IL-10 o TGF- β 1, evitando así una respuesta inmune inflamatoria.²⁹⁸⁻²⁹⁹ TGF- β 1 induce la transcripción del factor transcripcional específico de células Treg, FOXP3; el cual participa en la diferenciación a nivel periférico de células T vírgenes CD4⁺ CD25⁻ hacia una población de células Treg.³⁰⁰ Por lo que TGF- β 1 o IL-10 favorecen la diferenciación y expansión de células Th2/Tc2¹⁸⁵ o Treg³⁰¹ generando tolerancia inmunológica.

De esta manera, la persistencia del VPH y la expresión elevada de TGF- β 1 e IL-10 en el microambiente tumoral, entre otros factores, pueden inducir la acumulación de células T anérgicas con mayor frecuencia en el cérvix que en periferia.³⁰²

Interesantemente observamos una mejor respuesta proliferativa en linfocitos periféricos cuando estos y los infiltrantes del tumor en una misma paciente expresan casi todas las citocinas, especialmente IL-2 e IFN- γ . Esto sugiere que las citocinas Th1 son cruciales para eliminar la infección o lesiones del cérvix en el inicio de la enfermedad sin que se pierda el balance dinámico de citocinas Th1/Th2. Sin embargo, cuando no se logran revertir estas lesiones y continua el virus presente, predominan

las citocinas Th2 y posteriormente las Th3 para evitar los daños provocados por una inflamación prolongada, pero que finalmente pueden repercutir en el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, antes de que esto ocurra el sistema inmunológico tiene diferentes mecanismos que le permiten evitar estos daños en el organismo. Estudios recientes sugieren que la función alterada de células T y la baja expresión de CD3 ζ pudiera ser un mecanismo fisiológico para potencialmente prevenir las consecuencias de una prolongada respuesta inflamatoria.³⁰³ Así, se observa que las pacientes con CaCU presentan baja expresión de CD3 ζ en células T periféricas, en células asesinas naturales o NK y en linfocitos infiltrantes del tumor.²⁷¹⁻²⁷² En el presente trabajo se demostró por primera vez que no solo la proteína reportada por otros autores sino que también el RNAm de CD3 ζ disminuye conforme avanza la enfermedad. Además, la presencia de este mensajero está relacionada con la baja proliferación de linfocitos T periféricos estimulados con anti-CD3, sugiriendo que muy probablemente la vía de señalización a través del TCR se encuentre alterada, ya que también se observa que la expresión de este mensajero se asocia con la de citocinas proinflamatorias como IL-2 e IFN- γ . Por lo que probable en las muestras negativas para el RNAm de CD3 ζ existan bajos niveles de la proteína, regulando así funciones importantes de las células T como son la proliferación y producción de citocinas.

Por lo anterior, diferentes mecanismos pudieran participar en la disminuida expresión de CD3 ζ en células T de mujeres con CaCU, entre ellos son: la baja estabilidad de las isoforma del gen,³⁰⁴ la acción de las caspasas en las células T apoptóticas,³⁰⁵ el estrés oxidativo inducido por macrófagos,³⁰⁶ la acción de la proteína cinasa GCN2 (General Control Non- derepressing-2) que responde a los bajos niveles de triptófano,³⁰⁷ y los bajos niveles de L-arginina que reducen la vida media del RNAm de CD3 ζ .³⁰⁸ Interesantemente, diversas enzimas que participan en estos mecanismos se encuentran altamente expresadas en células presentadoras de antígeno de mujeres con LIE o en células tumorales de mujeres con CaCU.³⁰⁹⁻³¹¹ Y son: la enzima indolamina 2, 3 dioxigenasa (IDO), que cataboliza el triptófano y regula la proteína cinasa GCN2,³¹² y el receptor E-prostanoide-4 de prostaglandina E2 (PGE₂) y la ciclooxigenasa-2 (COX2) que inducen la arginasa I.³¹³ Particularmente, la transcripción de COX2 es inducida por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH16.³¹⁴ Es de suma relevancia notar que estas enzimas y los efectos tardíos del catabolismo del triptófano (vía TGF- β) favorecen la actividad de células Treg al inducir la expresión de Foxp3.^{307,315} Las células Treg producen TGF- β que suprime la actividad cito tóxica específica contra el tumor de células T CD8⁺³¹⁶ y pueden inducir la diferenciación de células dendríticas para que secreten altos niveles de IL-10, TGF- β bioactivo y bajos

niveles de IL-12p70.³¹⁷ A manera de retroalimentación, las células dendríticas son reclutadas a los nódulos linfáticos y estimulan la proliferación de células Treg a través del receptor de TGF- β II.³¹⁸ Más aún, en presencia de PGE₂, la respuesta de Th1 es suprimida y se induce una respuesta predominantemente Th2 con producción de IL-4 e IL-5.³¹⁹

Es importante destacar que la abundante expresión de TGF- β e IL-10 en biopsias y en los fluidos del cérvix y vagina de mujeres con LIEAG o CaCU^{185,187,320} deriva de varios de los mecanismos anteriormente mencionados. La expresión aberrante de estas citocinas también se ha encontrado en otro tipo de cánceres como el de páncreas, mama y melanoma.³²¹⁻³²⁴ Además, altos niveles de estas citocinas en suero de pacientes con cáncer pancreático correlacionan con la pérdida de CD3 ζ en linfocitos infiltrantes,³²² que pueden considerarse como marcadores pronóstico o de sobrevida no muy favorables.³²⁵ Resultados derivados en el laboratorio, del presente trabajo, confirman que la exposición prolongada *in vitro* de linfocitos T de donadoras sanas en presencia de las recombinantes humanas de TGF- β e IL-10 mantiene niveles bajos de expresión de CD3 ζ e inhibe la proliferación de estas células.

Hasta el momento se sabe que el VPH puede inducir la expresión de citocinas como TGF- β e IL-10, que además de inhibir la función de las células T, aumentan la expresión de proteínas del VPH, contribuyendo a la persistencia y progresión a CaCU de las lesiones cervicales asociadas al virus. Por lo tanto, nosotros hemos contribuido a elucidar el probable mecanismo de la baja respuesta de células T relacionado con la ausente expresión del mensajero de CD3 ζ en mujeres con CaCU. Aunado a esto se demostró que no solo los linfocitos infiltrantes sino que también los linfocitos periféricos de mujeres con CaCU presentan alteraciones funcionales a pesar de la lejanía con el tumor. Estas alteraciones funcionales como son la anergia, prevalencia de mensajeros de citocinas Th2 y probable presencia de Treg está caracterizada por la baja respuesta proliferativa, baja expresión del mensajero de CD3 ζ y alterada expresión de los RNAm de citocinas (y por lo tanto de las proteínas) generando una ineficiente respuesta inmune que favorece el desarrollo del CaCU. Por lo que la funcionalidad de los linfocitos periféricos puede servir como parámetro del tipo y calidad de la respuesta inmune en las lesiones cervicales. Considerándose a CD3 ζ como marcador candidato del pronóstico de la enfermedad. Así, la respuesta linfoproliferativa a péptidos específicos del VPH parece asociarse a la eliminación de la infección y a la regresión de las lesiones cervicales.²¹¹ Por lo que resulta indispensable que además de la intervención oportuna en las pacientes al realizar la prueba de Papanicolaou y tratamientos específicos; se analice la respuesta inmune en los diferentes estadios de la enfermedad de manera que se pueda generar suficiente

información para la implementación de inmunoterapias que no solo eliminen al virus sino que modifiquen las alteraciones en la respuesta inmune que se originaron por la presencia de este. De esta manera los esfuerzos por erradicar las lesiones o tumores en el cérvix tendrán mayor probabilidad de ser exitosos.

10 CONCLUSIONES

1. La presencia de DNA del VPH fue encontrada en 69% de las biopsias analizadas, siendo los tipos de VPH 16, 18 y 33 los más frecuentes. Es importante mencionar que el 78% de las muestras de LIE diagnosticadas con presencia de VPH por histopatología fueron confirmadas por PCR.
2. A nivel local y periférico, existe mayor proporción de células T CD8⁺ en estadios avanzados de la enfermedad. Lo cual demuestra una alterada relación de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ es un indicio de cambios funcionales en estas células.
3. La prevalencia de linfocitos (especialmente los CD8⁺) en el estroma respecto al epitelio cervical de mujeres con LIE y CaCU sugiere que durante la progresión de la enfermedad, diversos factores inhiben la funcionalidad y migración de las células T en el epitelio del cérvix.
4. La baja respuesta proliferativa de linfocitos T periféricos e infiltrantes del tumor de mujeres con CaCU demuestra que la función de estas células está alterada en estadios avanzados de la enfermedad.
5. El desequilibrio en el balance de expresión de los RNAm para citocinas con patrones Th2/Th3 no favorecen la eliminación de las lesiones cervicales, las cuales progresan a CaCU. Además, la preponderante expresión del RNAm de TGF-β1 en linfocitos infiltrantes de pacientes con CaCU indica la presencia de células T reguladoras cuya constante acción anti-inflamatoria puede contribuir al desarrollo de la enfermedad.
6. La progresión del CaCU está asociada a una menor expresión del RNAm de CD3ζ. Esto demuestra que además de las alteraciones postraduccionales reportadas para la proteína en las pacientes, existen cambios en la transcripción cuya causa se desconoce y que determinan un probable mecanismo de las alteraciones en el estado de activación y funcionalidad de los linfocitos T en las pacientes con LIE o CaCU.

7. La correlación significativa entre la menor presencia del RNAm de CD3 ζ , la baja proliferación de células T estimuladas a través del TCR, y la menor proporción de muestras positivas para citocinas Th1, indican la importancia de la expresión de CD3 ζ y de este tipo de citocinas en la correcta activación y funcionalidad de los linfocitos T durante el desarrollo del CaCU.
8. Por lo anterior se concluye que existen cambios a nivel molecular y funcional en células T periféricas de mujeres con lesiones avanzadas de alto grado y CaCU. Además, estas alteraciones encontradas en linfocitos periféricos son más evidentes en los infiltrantes del tumor.
9. Basados en los datos de nuestra investigación (Díaz-Benítez CE, J Clin Immunol 2009) y en trabajos reportados sobre la acción inhibitoria de TGF- β 1 e IL-10 se deduce que la baja proliferación, la disminuida expresión de CD3 ζ y la diferenciación a Th2-Th3 de linfocitos T de pacientes con CaCU es mediada por la presencia de estas citocinas inmunosupresoras.

11 PERSPECTIVAS

1. Evaluar en linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, Treg y células NK periféricos si los parámetros analizados en el presente trabajo se modifican cuando las pacientes con LIE o CaCU reciben el tratamiento terapéutico respectivo. Sería también interesante evaluar la respuesta inmune de células T en mujeres vacunadas con VPH
2. Analizar el mecanismo molecular por el cual IL-10 y TGF- β inhiben la expresión de CD3 ζ en linfocitos T.
3. Determinar mediante enfoques genómicos los transcritos prevalentes en linfocitos T periféricos de mujeres con LIE Y CaCU.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
2. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118(12): 3030-3044.
3. Secretaria de salubridad y asistencia. Compendio del registro histopatológico de neoplasias en México. *Epidemiología*. México 1998.
4. Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003; 45(Suppl 3): S306-314.
5. Alonso de Ruíz P, Córdova Ramírez S. Cap.1: Cuello uterino normal. *En*: Alonso de Ruíz P, Lazcano Ponce EC, Hernández Ávila M. *Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. 2a. ed. Médica Panamericana, México D.F, 2005: 1-12.
6. Bergeron C. The 2001 Bethesda System. *Salud Publica Mex* 2003; 45(Suppl 3): S340-S344.
7. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 2004; 364(9430): 249-256.
8. Alonso de Ruíz P, Córdova Ramírez S. Cap.8: Citopatología del cáncer invasor. *En*: Alonso de Ruíz P, Lazcano Ponce EC, Hernández Ávila M. *Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control*. 2a. ed. Médica Panamericana, México D.F, 2005: 81-89.
9. DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, principles and practice of oncology*. 6a. ed. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia PA, 2001; Vol. 2. www.LWWoncology.com
10. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Carlson J, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1): 295-304.
11. Perez CA, Brady LW. *Principles and practice of radiation oncology*. 2a. ed. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia PA, 1992: 919-1881.
12. Hoskins WJ, Perez C, Young RC. *Principles and practice of gynecologic oncology*. 2a. ed. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia PA, 1996: 802-846.
13. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12-9.
14. Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II. Interaction of HPV with other factors. *J Clin Pathol* 1995; 48(1): 1-6.
15. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 2003(31): 20-28.
16. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsagué X, Meijer CJLM, Van den Brule AJC, Franceschi S, Ashley R. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Institute* 2002; 94(21): 1604-1613.
17. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Närvänen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Serotypes of

Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. JAMA 2001; 285(1): 47-51.

18. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, Papp JR, Black CM, Unger ER. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. Am J Epidemiol 2005; 162(7): 668-675.

19. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, Hall C, Bacon M, Levine AM, Watts DH, Silverberg MJ, Xue X, Schlecht NF, Melnick S, Palefsky JM. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. J Natl Cancer Institute 2005; 97(8): 577-586.

20. Flores YN, Bishai DM, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Lőrincz A, Hernández M, Ferris D, Salmerón J. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. Salud Publica Mex 2008; 50(1): 49-58.

21. García-Closas R, Castellsagué X, Bosch X, González CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. Int J Cancer 2005; 117(4):629-637.

22. Mullokandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson AB, Klinger HP. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. Cancer Res 1996; 56(1): 197-205.

23. Medina-Martínez O, Vallejo V, Guido MC, García-Carrancá A. *Ha-ras* oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. Mol Carcinog 1997; 19(2): 83-90.

24. Schreiber K, Cannon RE, Karrison T, Beck-Engeser G, Huo D, Tennant RW, Jensen H, Kast WM, Krausz T, Meredith SC, Chen L, Schreiber H. Strong synergy between mutant *ras* and HPV16 E6/E7 in the development of primary tumors. Oncogene 2004; 23(22): 3972-3979.

25. Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, Nakamura H y Sakai H. Ras modifies proliferation and invasiveness of cells expressing human papillomavirus oncoproteins. J Virol 2008; 82(17): 8820-8827.

26. Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. J Exp Med 2000; 191(6): 961-976.

27. Arias-Pulido H, Narayan G, Vargas H, Mansukhani M, Murty VV. Mapping common deleted regions on 5p15 in cervical carcinoma and their occurrence in precancerous lesions. Mol Cancer 2002; 1: 3.

28. Vito P, Lacanà E, D'Adamio L. Interfering with apoptosis: Ca⁽²⁺⁾-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. Science 1996; 271(5248): 521-524.

29. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. Nature 2000; 406(6796): 641-645.

30. Yasugi T, Vidal M, Sakai H, Howley PM, Benson JD. Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins. J Virol 1997; 71(8): 5942-5951.

31. Wang Z, Castaño IB, De las Peñas A, Adams C, Christman MF. Pol kappa: a DNA polymerase required for sister chromatid cohesion. Science 2000; 289 (5480): 774-779.

32. Ku WH, Liu IL, Yen MS, Chang Chien CC, Yue CT, Ma YY, Chang SF, Ng HT, Wu CW, Shen CY. Genomic deletion and p53 inactivation in cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 72(2): 270-276.
33. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A, Laerum OD. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent *PIK3CA* amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer* 2006; 118(8): 1877-1883.
34. Zhang A, Månér S, Betz R, Angström T, Stendahl U, Bergman F, Zetterberg A, Wallin KL. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2002; 101(5): 427-433.
35. Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S, Inazawa J. Expression of *clAP1*, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res* 2002; 62(17): 4860-4866.
36. Minaguchi T, Yoshikawa H, Nakagawa S, Yasugi T, Yano T, Iwase H, Mizutani K, Shiromizu K, Ohmi K, Watanabe Y, Noda K, Nishiu M, Nakamura Y, Taketani Y. Association of *PTEN* mutation with HPV-negative adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer Lett* 2004; 210(1): 57-62.
37. Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, Snijders PJ. *TSLC1* gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 294-305.
38. Iwasaka T, Yokoyama M, Oh-uchida M, Matsuo N, Hara K, Fukuyama K, Hachisuga T, Fukuda K, Sugimori H. Detection of human papillomavirus genome and analysis of expression of *c-myc* and *Ha-ras* oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1992; 46(3): 298-303.
39. Riou G, Lê MG, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Orth G. Human papillomavirus-negative status and *c-myc* gene overexpression: independent prognostic indicators of distant metastasis for early-stage invasive cervical cancers. *J. Nat Cancer Inst* 1992; 84(19): 1525-1526.
40. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics* 2009; 12(5-6): 268-280.
41. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
42. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991; 60(6):1445-1456.
43. Howley PM. Cap.65: *Papillomavirinae*: the viruses and their replication. *En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. Fields Virology. 3a. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, NY, 1996; Vol.2: 2045-2076.*
44. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 6): 1456-1460.
45. Pei XF. The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. *Carcinogenesis* 1996; 17(7): 1395-1401.
46. López Saavedra A, Lizano Soberón M. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología* 2006; 1(1): 31-55.
47. Schiffman MH, Burk RD. Cap. 33: Human papillomaviruses. *En: Evans AS, Kaslow RA. Viral Infections of humans. Epidemiology and control. 4a. ed. Plenum Publishing Corporation, New York, N.Y, 1997: 983-1023.*

48. Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 10): 2653-60.
49. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79(3): 328-337.
50. Kónya J, Veress G, Hernádi Z, Soós G, Czeglédy J, Gergely L. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with prognostic factors in invasive cervical neoplasias. *J Med Virol* 1995; 46(1): 1-6.
51. Barnes W, Delgado G, Kurman RJ, Petrilli ES, Smith DM, Ahmed S, Lorincz AT, Temple GF, Jenson AB, Lancaster WD. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1988; 29(3): 267-273.
52. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(19): 1361-1368.
53. Tseng CJ, Tseng LH, Lai CH, Soong YK, Hsueh S, Pao CC. Identification of human papillomavirus types 16 and 18 deoxyribonucleic acid sequences in bulky cervical cancer after chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176(4):865-869.
54. Walker J, Bloss JD, Liao SY, Berman M, Bergen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989; 74(5): 781-785.
55. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 2001; 183(1): 8-15.
56. Barboza Quintana O, Garza Guajardo R. Cap. 6: Virus del papiloma humano (VPH). *En: Alonso de Ruíz, P, Lazcano Ponce EC, Hernández Ávila M. Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. 2a. ed. Médica Panamericana, México D.F, 2005: 57-66.*
57. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32(Suppl 1): S7-S15.
58. Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001; 75(3): 1565-1570.
59. Bousarghin L, Touzé A, Combata-Rojas AL, Coursaget P. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 1): 157-64.
60. Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 2009; 83(5): 2067-2074.
61. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM. 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* 1999; 274(9): 5810-5822.
62. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM: Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(5):1522-1527.
63. Evander M, Frazer IH, Payne E. Qi YM, Hengst K, McMillan NAJ. Identification of the α_6 integrine as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71(3): 2449-2459.

64. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW: alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283(3): 668-673.
65. Bousarghin, L, Touzé A., Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 2003; 77(6): 3846-3850.
66. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003; 307(1): 1-11.
67. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* 2010; 7: 11.
68. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(39): 14252-14257.
69. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. *J Virol* 2003; 77 (19): 10186-10201.
70. Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, Sakai H. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* 2000; 74(8): 3752-3760.
71. Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990; 250(4988): 1694-1699.
72. Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12398-12402.
73. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TSF. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *J Biol Chem* 1999; 274(5): 2696-2705.
74. Doorbar J. Molecular Biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2006; 110: 525-541.
75. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004; 117 (3): 349-360.
76. Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, Stöppler MC, Koval D, Schlegel R. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology* 1997; 237(2): 296-306.
77. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995; 9(19): 2335-2349.
78. Lambert PF. Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 1991; 65 (7): 3417-3420.
79. Peh WL, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, Brandsma J, Percival A, Lewis J, Liu WJ, Doorbar J. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* 2002; 76(20): 10401-10416.

80. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185(1): 251-257.
81. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993; 67(1): 315-322.
82. Fujii T, Masumoto N, Saito M, Hirao N, Niimi S, Mukai M, Ono A, Hayashi S, Kubushiro K, Sakai E, Tsukazaki K, Nozawa S. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 2005; 14(2): 103-108.
83. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3878-3884.
84. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 1999; 9(6): 379-386.
85. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 690-698.
86. Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol* 2005; 53(2):65-76.
87. Greslin I, Mouglin C, Seilles E. Biologie des infections à papillomavirus. II. Réponse immunitaire. *Ann Biol Clin* 1998; 56(3): 267-276.
88. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7): 423-428.
89. Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 1996; 289(1):1-8.
90. Bécherel PA, LeGoff L, Francès C, Chosidow O, Guillosson JJ, Debré P, Mossalayi MD, Arock M. Induction of IL-10 synthesis by human keratinocytes through CD23 ligation: a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism. *J Immunol* 1997; 159(12): 5761-5765.
91. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S, Brière F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188(2): 373-386.
92. Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 1999; 190(12): 1755-1768.
93. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286(5439): 525-528.
94. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 2005; 23(1): 19-28.
95. Mansson A, Adner M, Cardell LO. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir Res* 2006; 27(7): 36.

96. Claeys S, de Belder T, Holtappels G, Gevaert P, Verhasselt B, van Cauwenberge P, Bachert C. Human beta-defensins and toll-like receptors in the upper airway. *Allergy* 2003; 58(8): 748-53.
97. Kaisho T, Akira S. Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Curr Mol Med* 2003; 3(8): 759-771.
98. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* 2000; 114(3): 560-568.
99. Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25(5): 413-418.
100. Murphy K, Travers P, Walport M. Cap.1. Basic concepts in immunology. *En: Janeway's immunobiology*. 7a. ed. Garland Science, New York, 2008: 19.
101. Benoist C, Mathis D. Cap. 11. T-lymphocyte differentiation and biology. *En: Paul WE. Fundamental immunology*. 4a. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999: 370-371.
102. Solheim JC. Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunol Rev*. 1999; 172: 11-19.
103. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-379.
104. Neefjes JJ, Hämmerling GJ, Momburg F. Folding and assembly of major histocompatibility complex class I heterodimers in the endoplasmic reticulum of intact cells precedes the binding of peptide. *J Exp Med* 1993; 178(6): 1971-1980.
105. Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway CA Jr, Tonegawa S. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 1993; 74(3): 577-584.
106. Townsend AR, Gotch FM, Davey J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* 1985; 42(2): 457-467.
107. Rook G, Balkwill F. Cap.10. Cell-mediated immune reactions. *En: Roit I, Brostoff J, Male D. Immunology*. 5a. ed. Mosby, London, 1998: 121-138.
108. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003; 4(9): 835-842.
109. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24(6): 677-688.
110. Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med* 2006; 64(1): 4-9.
111. Robertson SJ, Hasenkrug KJ. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28(1):51-62.
112. Murphy K, Travers P, Walport M. Cap. 8. Priming of naive T cells by pathogen-activated dendritic cells. *En: Janeway's immunobiology*. 7a. ed. Garland Science, New York, 2008: 351.
113. Murphy K, Travers P, Walport M. Cap. 9. The humoral immune response. *En: Janeway's immunobiology*. 7a. ed. Garland Science, New York, 2008: 379-420.
114. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Maqnusson C, Smith CI, Hammarström L, Severinson E. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 1989; 19(7): 1311-1315.

115. Calvert JE, Johnstone R, Duggan-Keen MF, Bird P. Immunoglobulin G subclasses secreted by human B cells *in vitro* in response to interleukin-2 and polyclonal activators. *Immunology* 1990; 70(2): 162-167.
116. Kawano Y, Noma T, Kou K, Yoshizawa I, Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines: human IgG subclass production enhanced differentially by interleukin-6. *Immunol* 1995; 84(2): 278-284.
117. Kawana K, Yasugi T, Kanda T, Kawana Y, Hirai Y, Yoshikawa H, Taketani Y. Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(1): 102-105.
118. Mbulawa ZZ, Williamson AL, Stewart D, Passmore JA, Denny L, Allan B, Marais DJ. Association of serum and mucosal neutralizing antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) with HPV-16 infection and cervical disease. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 4): 910-914.
119. Sasagawa T, Yamazaki H, Dong YZ, Satake S, Tateno M, Inoue M. Immunoglobulin-A and -G responses against virus-like particles (VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intra-epithelial lesions. *Int J Cancer* 1998; 75(4): 529-535.
120. Wang ZH, Kjellberg L, Abdalla H, Wiklund F, Eklund C, Knekt P, Lehtinen M, Kallings I, Lenner P, Hallmans G, Mählck CG, Wadell G, Schiller J, Dillner J. Type specificity and significance of different isotypes of serum antibodies to human papillomavirus capsids. *J Infect Dis* 2000; 181(2): 456-462.
121. Sasagawa T, Rose RC, Azar KK, Sakai A, Inoue M. Mucosal Immunoglobulin-A and G-responses to oncogenic human papilloma virus capsids. *Int J Cancer* 2003; 104(3): 328-335.
122. Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(7):494-499.
123. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Schiller JT, Stukart MJ, Groot BS, Chabaud MM, Remmink AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ. Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(9): 630-638.
124. Passmore JA, Marais DJ, Sampson C, Allan B, Parker N, Milner M, Denny L, Williamson AL. Cervicovaginal, oral, and serum IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 2007; 79(9): 1375-1380.
125. Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis* 1996; 174(5): 927-936.
126. Wideroff L, Schiffman, MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kirnbauer R, Greer CE, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG, Scott DR, Sherman ME, Buckland J, Lowy D, Schiller J. Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women. *J Infect Dis* 1996; 174(5): 937-943.
127. Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K, Shapiro S, Shah KV. Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in relation to cervical HPV infection among college women. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(2): 122-126.
128. Ho GYF, Studentsov YY, Bierman R, Burk RD. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(1): 110-116.

129. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L, Pawlita M. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 475-480.
130. Melbye M, Palefsky J, Gonzales J, Ryder LP, Nielsen H, Bergmann O, Pindborg J, Biggar RJ. Immune status as a determinant of human papillomavirus detection and its association with anal epithelial abnormalities. *Int J Cancer* 1990; 46(2): 203-206.
131. Gentile G, Formelli G, Orsoni G, Rinaldi AM, Busacchi P. Immunosuppression and human genital papillomavirus infection. *Eur J Gynaecol Oncol* 1991; 12(1): 79-81.
132. Nasiell K, Nasiell M, Vačlavinková V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1983; 61(5): 609-614.
133. Bosch FX. Epidemiology of human papilloma virus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex* 2003; 45(Suppl 3): S326-S339.
134. Park TK, Kim SN. Cell-mediated immunity in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Yonsei Med J* 1989; 30(2): 164-172.
135. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(4): 432-436.
136. Woodworth CD. HPV innate immunity. *Front Biosci* 2002; 7: d2058-d2071.
137. Mendoza-Villanueva D, Diaz-Chavez J, Uribe-Figueroa L, Rangel-Escareño C, Hidalgo-Miranda A, March-Mifsut S, Jimenez-Sanchez G, Lambert PF, Gariglio P. Gene expression profile of cervical and skin tissues from human papillomavirus type 16 E6 transgenic mice. *BMC Cancer* 2008; 8: 347.
138. Arany I, Goel A, Tying SK. Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions. *Anticancer Res* 1995; 15(6B): 2865-2869.
139. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275(10): 6764-6769.
140. Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett* 2002; 179(2): 205-212.
141. Arany I, Grattendick KG, Tying SK. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res* 2002; 55(2): 331-339.
142. Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AH, Pellegrini S, Matlashewski GJ, Koromilas AE. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* 1999; 18(42): 5727-5737.
143. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998; 12(13): 2061-2072.
144. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales V, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González J, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor β 1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral Immunol* 2006; 19(3): 468-480.

145. Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Dreef EJ, Koopman LA, Violette SM, Weinreb PH, Fleuren GJ. Overexpression of the $\alpha v\beta 6$ integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol* 2007; 212(3): 316–324.
146. Sheppard D. Transforming Growth Factor β . A Central Modulator of Pulmonary and Airway. Inflammation and Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 413-417.
147. Cho YS, Kang JW, Cho M, Cho CW, Lee S, Choe YK, Kim Y, Choi I, Park SN, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett* 2001; 501(2-3):139-145.
148. Dinarello CA. IL-18: A Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(1 Pt 1): 11-24.
149. Gołab J. Interleukin 18-interferon γ inducing factor: a novel player in tumour immunotherapy? *Cytokine* 2000; 12(4): 332-338.
150. Tanaka-Kataoka M, Kunikata T, Takayama S, Iwaki K, Ohashi K, Ikeda M, Kurimoto M. *In vivo* antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection. *Cytokine* 1999; 11(8):593-599.
151. Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73(3): 2401-2409.
152. Huang SM, McCance DJ. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol* 2002; 76(17): 8710-8721.
153. Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol* 2001; 167(1): 497-504.
154. Kleine-Lowinski K, Rheinwald JG, Fichorova RN, Anderson DJ, Basile J, Münger K, Daly CM, Rösl F, Rollins BJ. Selective suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in human cervical epithelial and epidermal cells. *Int J Cancer* 2003; 107(3): 407-415.
155. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 2007; 178(5): 3186-3197.
156. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40: 97-112.
157. Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 1995; 69(5): 3185-3192.
158. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 2005; 113(2): 276-283.
159. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 2003; 310(1): 100-108.
160. Cromme FV, van Bommel PF, Walboomers JM, Gallee MP, Stern PL, Kenemans P, Helmerhorst TJ, Stukart MJ, Meijer CJ. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical

cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer* 1994; 69(6): 1176-1181.

161. Hilders CG, Munoz IM, Nooyen Y, Fleuren GJ. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecol Oncol* 1995; 57(3): 366-375.

162. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, Walboomers JM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* 1995; 72(2): 405-411.

163. Bontkes HJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Helmerhorst TJ, Stern PL. Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression. *Lancet* 1998; 351(9097): 187-188.

164. Mehta AM, Jordanova ES, Kenter GG, Ferrone S, Fleuren GJ. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(2): 197-206.

165. Heller DS, Hameed M, Cracchiolo B, Wiederkehr M, Scott D, Skurnick J, Ammar N, Lambert WC. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13(1): 67-70.

166. Kleine-Lowinski K, Gillitzer R, Kühne-Heid R, Rösl F. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 82(1): 6-11.

167. Riethdorf S, Riethdorf L, Richter N, Löning T. Expression of the *MCP-1* gene and the HPV 16 *E6/E7* oncogenes in squamous cell carcinomas of the cervix uteri and metastases. *Pathobiology* 1998; 66(6): 260-267.

168. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Ben-Baruch G, Agulansky L, Novikov I, Kopolovic J. Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma-clinicopathologic correlation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78(3): 240-244.

169. Frazer I, Tindle R. Cell-mediated immunity to papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 1992; 3: 53.

170. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Experim Immunol* 1999; 116(1): 33-40.

171. Jimenez-Flores R, Mendez-Cruz R, Ojeda-Ortiz J, Munoz-Molina R, Balderas-Carrillo O, de la Luz Diaz-Soberanes M, Lebecque S, Saeland S, Daneri-Navarro A, Garcia-Carranca A, Ullrich SE, Flores-Romo L. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology* 2006; 117(2): 220-228.

172. Guess JC, McCance DJ. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. *J Virol* 2005; 79(23): 14852-14862.

173. Bottley G, Watherston OG, Hiew YL, Norrild B, Cook GP, Blair GE. High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene* 2008; 27(12): 1794-1799.

174. Garzetti GG, Ciavattini A, Muzzioli M, Goteri G, Mannello B, Romanini C, Fabris N. Natural killer cell activity in patients with invasive cervical carcinoma: importance of a longitudinal evaluation in follow-up. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 40(2):133-138.

175. Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy A, Troyo-Sanroman R, Bravo-Cuellar A, Delgado-Rizo V, Garcia-Iglesias T, Hernandez-Flores G, Del Toro-Arreola S. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 2008; 8: 16.
176. Textor S, Dürst M, Jansen L, Accardi R, Tommasino M, Trunk MJ, Porgador A, Watzl C, Gissmann L, Cerwenka A. Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int J Cancer* 2008; 123(10): 2343-2353.
177. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419(6908): 734-738.
178. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009; 182(1): 240-249.
179. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111(3): 1327-1333.
180. Vitale C, Chiossone L, Cantoni C, Morreale G, Cottalasso F, Moretti S, Pistorio A, Haupt R, Lanino E, Dini G, Moretta L, Mingari MC. The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects down-regulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2004; 34(11): 3028-3038.
181. Hao S, Zhao J, Zhou J, Zhao S, Hu Y, Hou Y. Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(13): 1765-1775.
182. Romero AI, Thorén FB, Brune M, Hellstrand K. NKp46 and NKG2D receptor expression in NK cells with CD56dim and CD56bright phenotype: regulation by histamine and reactive oxygen species. *Br J Haematol* 2006; 132(1): 91-98.
183. Garcia-Iglesias T, Del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, Del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Dueñas MG, Balderas-Peña LMA, Bravo-Cuellar A, Ortiz-Lazareno PC, Daneri-Navarro A. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 2009, 9:186.
184. Hilders CG, Munoz IM, Nooyen Y, Fleuren GJ. Altered HLA expression by metastatic cervical carcinoma cells as a factor in impaired immune surveillance. *Gynecol Oncol* 1995; 57(3): 366-375.
185. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 2001; 167(5): 2972-2978.
186. Castle PE, Hildesheim A, Bowman FP, Strickler HD, Walker JL, Pustilnik T, Edwards RP, Crowley-Nowick PA. Cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin Immunol* 2002; 22(1): 23-27.
187. Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. *In vivo* expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol* 2006; 19(3): 481-491.
188. de Gruijl TD, Bontkes HJ, van den Muysenberg AJ, van Oostveen JW, Stukart MJ, Verheijen RH, van der Vange N, Snijders PJ, Meijer CJ, Wallboomers JM, Scheper RJ. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer* 1999; 35 (3): 490-497.

189. Inge TH, Hoover SK, Susskind BM, Barrett SK, Bear HD. Inhibition of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte responses by transforming growth factor β_1 . *Cancer Res* 1992; 52(6): 1386-1392.
190. Espevik T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM, Palladino MA Jr. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor β . *J Exp Med* 1987; 166(2): 571-576.
191. Edwards RP, Kuykendall K, Crowley-Nowick P, Partridge EE, Shingleton HM, Mestecky J. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion. *Cancer* 1995; 76(8): 1411-5.
192. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3): 245-250.
193. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Snijders PJ, Helmerhorst TJ. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* 2005; 58(10): 1096-1100.
194. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP, Hermonat PL. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR⁺ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001; 81(3): 424-432.
195. Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Căpîlna M, Félix S, Seillès E, Mougin C, Prétet JL. Immunohistochemical analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2006; 102(1): 22-31.
196. Woo YL, Sterling J, Damay I, Coleman N, Crawford R, van der Burg SH, Stanley M. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG* 2008; 115(13): 1616-1622.
197. Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60(1): 55-65.
198. Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blumberg ME, Bontkes HJ. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2007; 121(8): 1749-1755.
199. Cheng TY, Wu JT, Lin RH. Induction of tumor-specific T cell response by cognating tumor cells with foreign antigen-primed Th cells. *Int Immunol* 1998; 10(10): 1397-1406.
200. Gemignani M, Maiman M, Fruchter RG, Arrastia CD, Gibbon D, Ellison T. CD4 lymphocytes in women with invasive and preinvasive cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 1995; 59(3): 364-369.
201. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer* 1999; 86(8): 1537-1543.
202. Hachisuga T, Fukuda K, Kawarabayashi T. Local immune response in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52(1): 3-8.
203. Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyengaard JR, Nielsen K. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(8): 1135-1138.

204. Bethwaite PB, Holloway LJ, Thornton A, Delahunt B. Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology* 1996; 28(4): 321-327.
205. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. High number of intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 2007; 67(1): 354-361.
206. Steele JC, Mann CH, Rookes S, Rollason T, Murphy D, Freeth MG, Gallimore PH, Roberts S. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *Br J Cancer* 2005; 93(2): 248-259.
207. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Bijl A, Verheijen RH, Meijer CJ, Scheper RJ, Stern PL, Burns JE, Maitland NJ, Walboomers JM. Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 1999; 80(Pt 9): 2453-2459.
208. de Jong A, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJM, Kenter G, Offringa R, van der Burg SH. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4⁺ T cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* 2004; 64(15): 5449-5455.
209. Gill DK, Bible JM, Biswas C, Kell B, Best JM, Punchard NA, Cason J. Proliferative T-cell responses to human papillomavirus type 16 E5 are decreased amongst women with high-grade neoplasia. *J Gen Virol* 1998; 79(Pt 8): 1971-1976.
210. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Luci III J, Contois D, Lawler P, Rush BB, Lorincz AT, Corrigan A, Burk RD, Qu W, Marshall MA, Mann D, Carrington M, Clerici M, Shearer GM, Carbone DP, Scott DR, Houghten RA, Berzofsky JA. Interleukin 2 production *in vitro* by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 1996; 56(17): 3967-3974.
211. Kadish AS, Ho GYF, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17): 1285-1293.
212. Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R, Abadi M. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(5): 483-488.
213. Altmann A, Jochmus-Kudielka I, Frank R, Gausepohl H, Moebius U, Gissmann L, Meuer SC. Definition of immunogenic determinants of the human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7. *Eur J Cancer* 1992; 28(2-3): 326-333.
214. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Stukart MJ, Walboomers JMM, Remmink AJ, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Scheper RJ. T-cell proliferative responses against human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein are most prominent in cervical intraepithelial neoplasia patients with a persistent viral infection. *J Gen Virol* 1996a; 77(Pt 9): 2183-2191.
215. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, Helmerhorst TJM, Verheijen RHM, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJLM, Scheper RJ. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res* 1998; 58(8): 1700-1706.
216. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JMM, Coursaget P, Stukart MJ, Dupuy C, Kueter E, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJ, Scheper RJ. Immune

responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome. *J Gen Virol* 1999; 80(Pt 2): 399-408.

217. Luxton JC, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Shepherd PS. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J Gen Virol* 1996; 77(Pt 7): 1585-1593.

218. Luxton JC, Rose RC, Coletart T, Wilson P, Shepherd PS. Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen Virol* 1997; 78(Pt 4): 917-923.

219. Höpfl R, Heim K, Christensen N, Zumbach K, Wieland U, Volgger B, Widschwendter A, Haimbuchner S, Müller-Holzner E, Pawlita M, Pfister H, Fritsch P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HP-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2000; 356(9246): 1985-1986.

220. van der Burg SH, Rensing ME, Kwappenberg KMC, de Jong A, Straathof K, de Jong J, Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Ottenhoff THM, Fleuren GJ, Kenter G, Melief CJ, Offringa R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer* 2001; 91(5): 612-618.

221. Shepherd PS, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Luxton JC. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J Gen Virol* 1996; 77(Pt 4): 593-602.

222. Delgado FG, Martínez E, Céspedes MA, Bravo MM, Navas MC, Cóbbita Rojas AL. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. *Immunology* 2009; 126(4):523-534.

223. Kadish AS, Romney SL, Ledwidge R, Tindle R, Fernando GJP, Zee SY, Van Ranst MA, Burk RD. Cell-mediated immune responses to E7 peptides of human papillomavirus (HPV) type 16 are dependent on the HPV type infecting the cervix, whereas serological reactivity is not type-specific. *J Gen Virol* 1994; 75(Pt 9):2277-2284.

224. de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol* 2004; 94(2): 488-494.

225. Luxton JC, Nath R, Derias N, Herbert A, Shepherd PS. Human papillomavirus type 16-specific T cell responses and their association with recurrence of cervical disease following treatment. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 5): 1063-1070.

226. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996; 271(5246): 173-178.

227. Delgado FG, Martínez E, Céspedes MA, Bravo MM, Navas MC, Cóbbita Rojas AL. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. *Immunology* 2009; 126(4): 523-534.

228. Peng S, Trimble C, Wu L, Pardoll D, Roden R, Hung CF, Wu TC. HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4⁺ T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Cancer Res* 2007; 13(8): 2479-2487.

229. de Vos van Steenwijk PJ, Piersma SJ, Welters MJ, van der Hulst JM, Fleuren G, Hellebrekers BW, Kenter GG, van der Burg SH. Surgery followed by persistence of high-grade squamous intraepithelial lesions is associated with the induction of a dysfunctional HPV16-specific T-cell response. *Clin Cancer Res* 2008; 14(22): 7188-7195.

230. Farhat S, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune responses to human papillomavirus 16 E6 and E7 antigens as measured by IFN gamma ELISpot in women with cleared or persistent HPV infection. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(4): 508-512.
231. Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RA, Kwappenberg KM, Stanley MA, van der Burg SH. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer* 2010; 126(1): 133-141.
232. Dillon S, Sasagawa T, Crawford A, Prestidge J, Inder MK, Jerram J, Mercer AA, Hibma M. Resolution of cervical dysplasia is associated with T-cell proliferative responses to human papillomavirus type 16 E2. *J Gen Virol* 2007; 88(Pt 3):803-813.
233. Trimble CL, Peng S, Thoburn C, Kos F, Wu TC. Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3. *Cancer Immunol Immunother* 2010 ; 59(5): 799-803.
234. Biron CA. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(4): 530-538.
235. Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993; 14(3): 107-111.
236. Cromme FV, Meijer CJ, Snijders PJ, Uyterlinde A, Kenemans P, Helmerhorst T, Stern PL, van den Brule AJ, Walboomers JM. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. *Br J Cancer* 1993; 67(6): 1372-1380.
237. Glew SS, Duggan-Keen M, Cabrera T, Stern PL. HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res* 1992; 52(14): 4009-4016.
238. Bal V, McIndoe A, Denton G, Hudson D, Lombardi G, Lamb J, Lechler R. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *Eur J Immunol* 1990; 20(9): 1893-1897.
239. Goodman RE, Nestle F, Naidu YM, Green JM, Thompson CB, Nickoloff BJ, Turka LA. Keratinocyte-derived T cell costimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN-gamma. *J Immunol* 1994; 152(11): 5189-5198.
240. Müller G, Saloga J, Germann T, Bellinghausen I, Mohamadzadeh M, Knop J, Enk AH. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J Clin Invest* 1994; 94(5): 1799-1805.
241. Nakagawa M, Stites DP, Farhat S, Sisler JR, Moss B, Kong MBF, Moscicki AB, Palefsky JM. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis* 1997; 175(4): 927-931.
242. Nakagawa M, Stites DP, Palefsky JM, Kneass Z, Moscicki AB. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(4): 494-498.
243. Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK, Palefsky JM, Moscicki AB. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis* 2000; 182(2): 595-598.
244. Nimako M, Fiander AN, Wilkinson GWG, Borysiewicz LK, Man S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res* 1997; 57(21): 4855-4861.

245. Alexander M, Salgaller ML, Celis E, Sette A, Barnes WA, Rosenberg SA, Steller MA. Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by *in vitro* stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(6): 1586-1593.
246. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GWG, Westmoreland D, Evans AS, Adams M, Stacey SM, Bournsnel ME, Rutherford E, Hickling JK, Inglis SC. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 1996; 347(9014): 1523-1527.
247. Evans CA, Bauer S, Grubert T, Brucker C, Baur S, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 42(3): 151-160.
248. Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1997; 57(14): 2943-2950.
249. Rensing ME, van Driel WJ, Celis E, Sette A, Brandt RMP, Hartman M, Anholts JDH, Schreuder GMT, ter Harmsel WB, Fleuren GJ, Trimpos BJ, Kast WM, Melief CJ. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* 1996; 56(3): 582-588.
250. Jochmus I, Osen W, Altmann A, Buck G, Hofmann B, Schneider A, Gissmann L, Rammensee HG. Specificity of human cytotoxic T lymphocytes induced by a human papillomavirus type 16 E7-derived peptide. *J Gen Virol* 1997; 78(Pt 7): 1689-1695.
251. Murakami M, Gurski KJ, Marincola FM, Ackland J, Steller MA. Induction of specific CD8⁺ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. *Cancer Res* 1999; 59(6): 1184-1187.
252. Schoell WM, Mirhashemi R, Liu B, Janicek MF, Podack ER, Penalver MA, Averette HE. Generation of tumour-specific cytotoxic T lymphocytes by stimulation with HPV type 16 E7 peptide-pulsed dendritic cells: an approach to immunotherapy of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74(3): 448-455.
253. Thornburg C, Boczkowski D, Gilboa E, Nair SK. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother* 2000; 23(4): 412-418.
254. Davidson EJ, Brown MD, Burt DJ, Parish JL, Gaston K, Kitchener HC, Stacey SN, Stern PL. Human T cell responses to HPV 16 E2 generated with monocyte-derived dendritic cells. *Int J Cancer* 2001; 94(6): 807-812.
255. Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi F, Salati E, Roman JJ, Lim S, Hermonat PL. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(12):948-957.
256. Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, Zhou W, Wang Z, Grizzi F, Roman JJ, Lim SH, Hermonat PL. Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002; 32(1): 30-38.
257. Valdespino V, Gorodezky C, Ortiz V, Kaufmann AM, Roman-Basaure E, Vazquez A, Berumen J. HPV16-specific cytotoxic T lymphocyte responses are detected in all HPV16-positive cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2005; 96(1): 92-102.

258. Kónya J, Eklund C, af Geijersstam V, Yuan F, Stuber G, Dillner J. Identification of a cytotoxic T lymphocyte epitope in the human papillomavirus type 16 E2 protein. *J Gen Virol* 1997; 78(Pt 10): 2615-2620.
259. Call ME, Wucherpfennig KW. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol* 2004; 40(18): 1295-1305.
260. Call ME, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 2004; 23(12): 2348-2357.
261. Baniyash M, García-Morales P, Bonifacino JS, Samelson LE, Klausner RD. Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T cell receptor. Possible identification of two structural classes of receptors. *J Biol Chem* 1988; 263(20): 9874-9878.
262. Orloff DG, Frank SJ, Robey FA, Weissman AM, Klausner RD. Biochemical characterization of the η chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to ζ . *J Biol Chem* 1989; 264(25):14812-14817.
263. Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(6): a002485.
264. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cap. 8: Activation of T lymphocytes. *En: Cellular and molecular immunology*. 4a. ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000: 161-181.
265. Kishimoto H, Kubo RT, Yorifuji H, Nakayama T, Asano Y, Tada T. Physical dissociation of the TCR-CD3 complex accompanies receptor ligation. *J Exp Med* 1995; 182(6): 1997-2006.
266. Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 1991; 64(5): 875-878.
267. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188(2): 373-386.
268. Bluestone JA, Khattri R, van Seventer GA. Cap.13: Accessory molecules. *En: Paul WE. Fundamental immunology*. 4a. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1999: 449-478.
269. Cheriyan VT, Krishna SM, Kumar A, Jayaprakash PG, Balaram P. Signaling defects and functional impairment in T-cells from cervical cancer patients. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24(6): 667-673.
270. Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased ζ chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(2):329-334.
271. Kono K, Rensing ME, Brandt RM, Melief CJ, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing ζ chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2(11): 1825-1828.
272. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Peccatori F, Gallee MP, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Aarbiou J, Mulder WM, Walboomers JM, Meijer CJ, van de Vange N, Scheper RJ. Expression of CD3- ζ on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer* 1999; 79(7-8): 1127-1132.
273. Matsuda M, Petersson M, Lenkei R, Taupin JL, Magnusson I, Mellstedt H, Anderson P, Kiessling R. Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal

tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int J Cancer* 1995; 61(6): 765-772.

274. Lai P, Rabinowich H, Crowley-Nowick PA, Bell MC, Mantovani G, Whiteside TL. Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996; 2(1): 161-173.

275. Rabinowich H, Banks M, Reichert TE, Logan TF, Kirkwood JM, Whiteside TL. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* 1996; 2(8): 1263-1274.

276. Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrout RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E, Bukowski RM, Ochoa AC. Loss of T-cell receptor ζ chain and p56^{lck} in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53(23): 5613-5616.

277. Kurt RA, Urba WJ, Smith JW, Schoof DD. Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signaling molecules. *Int J Cancer*. 1998;78(1):16-20.

278. Nakagomi H, Petersson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, Taupin JL, Vivier E, Anderson P, Kiessling R. Decreased expression of the signal-transducing ζ chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53(23): 5610-5612.

279. Mulder WM, Bloemena E, Stukart MJ, Kummer JA, Wagstaff J, Scheper RJ. T cell receptor-zeta and granzyme B expression in mononuclear cell infiltrates in normal colon mucosa and colon carcinoma. *Gut* 1997; 40(1): 113-119.

280. Zea AH, Curti BD, Longo DL, Alvord WG, Strobl SL, Mizoguchi H, Creekmore SP, O'Shea JJ, Powers GC, Urba WJ, Ochoa AC. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995; 1(11): 1327-1335.

281. Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992; 258(5089): 1795-1798.

282. Tartour E, Latour S, Mathiot C, Thiounn N, Mosseri V, Joyeux I, D'Enghien CD, Lee R, Debre B, Fridman WH. Variable expression of CD3- ζ chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer* 1995; 63(2): 205-212.

283. Whiteside TL, Miescher S, MacDonald HR, Von Flidner V. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. A comparison between velocity sedimentation and discontinuous density gradients. *J Immunol Methods* 1986; 90(2): 221-233.

284. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162 (1): 156-159.

285. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82(5): 524-531.

286. Díaz-Benítez CE, Navarro-Fuentes KR, Flores-Sosa JA, Juárez-Díaz J, Uribe-Salas FJ, Román-Basaure E, González-Mena LE, Alonso de Ruíz P, López-Estrada G, Lagunas-Martínez A, Bermúdez-Morales VH, Alcocer-González JM, Martínez-Barnette J, Hernández-Pando R, Rosenstein Y, Moreno J, Madrid-Marina V. CD3zeta expression and T cell proliferation are inhibited by TGF-beta1 and IL-10 in cervical cancer patients. *J Clin Immunol* 2009; 29(4): 532-544.

287. Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, Burguete A, Madrid-Marina V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest* 2008; 26(10): 1037-1043.
288. Bañuelos A, Reyes E, Ocadiz R, Alvarez E, Moreno M, Monroy A, Gariglio P. Neocarzinostatin induces an effective p53-dependent response in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(2): 671-680.
289. Mariani L, Monfulleda N, Alemany L, Vizza E, Marandino F, Vocaturo A, Benevolo M, Quirós B, Lloveras B, Klaustermeier JE, Quint W, de Sanjosé S, Bosch FX. Human papillomavirus prevalence and type-specific relative contribution in invasive cervical cancer specimens from Italy. *BMC Cancer* 2010; 10: 259.
290. Matour D, Melnicoff M, Kaye D, Murasko DM. The role of T cell phenotypes in decreased lymphoproliferation of the elderly. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 50(1 Pt 1): 82-99.
291. Verduzca Rodríguez LA, Palet Guzmán JA, Aguirre González H, González Puebla E. Cervico-uterine cancer and age. *Ginecol Obstet Mex* 1997; 65: 119-122.
292. Weiss A. Cap.12: T-lymphocyte activation. *En: Paul WE. Fundamental immunology*. 4a. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1999: 411-447.
293. Faassen AE, O'Leary JJ, Rodysill KJ, Bergh N, Hallgren HM. Diminished heat-shock protein synthesis following mitogen stimulation of lymphocytes from aged donors. *Exp Cell Res* 1989; 183(2): 326-334.
294. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 742-780.
295. Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G, Buzzonetti A, Legge F, Salutari V, Scambia G. Lymphocyte composition of tumor draining lymph nodes from cervical and endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1): 106-115.
296. Bais AG, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJ, Meijer CJ, Snijders PJ, Helmerhorst TJ. Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators Inflamm* 2007: 24147.
297. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389(6652): 737-742.
298. Robertson SJ, Hasenkrug KJ. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28(1): 51-62.
299. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 338-344.
300. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198(12): 1875-1886.
301. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 166(12): 7282-7289.
302. Gey A, Kumari P, Sambandam A, Lecuru F, Cassard L, Badoual C, Fridman C, Nagarajan B, Fridman WH, Tartour E. Identification and characterisation of a group of cervical carcinoma patients with profound downregulation of intratumoral Type 1 (IFN γ) and Type 2 (IL-4) cytokine mRNA expression. *Eur J Cancer* 2003; 39(5): 595-603.

303. Baniyash M. TCR ζ -chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(9): 675-687.
304. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraiishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Abe T, Takeuchi T. TCR ζ mRNA splice variant forms observed in the peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28(2): 185-193.
305. Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor ζ -chain. *Cancer Res* 1999; 59(7): 1422-1427.
306. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 ζ chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(23): 13119-13124.
307. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176(11): 6752-6761.
308. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3 ζ chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 2002; 277(24): 21123-21129.
309. Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 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 Sci* 2007; 98(6): 874-881.
310. Sales KJ, Katz AA, Davis M, Hinz S, Soeters RP, Hofmeyr MD, Millar RP, Jabbour HN. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5): 2243-2249.
311. Sedlmayr P, Semlitsch M, Gebru G, Karpf E, Reich O, Tang T, Wintersteiger R, Takikawa O, Dohr G: Expression of indoleamine 2,3- dioxygenase in carcinoma of human endometrium and uterine cervix. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527:91-95.
312. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 2005; 22(5): 633-642.
313. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 2005; 202(7): 931-939.
314. Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res* 2007; 67(8): 3976-3985.
315. Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E₂-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(12): 5211-2520.
316. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K, Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(2): 419-424.
317. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, de Creus A, Thomson AW, "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3⁺CD4⁺ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol* 2006; 177(9): 5868-5877.

318. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005; 202(7): 919-929.
319. Gold KN, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of helper T cell function by prostaglandins. *Arthritis Rheum* 1994; 37(6): 3925-3933.
320. Tjong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MPM, ten Kate FWJ, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 2001; 14(6): 357-360.
321. Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor- β and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* 1999; 155(2): 537-547.
322. von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Jöhnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3 Suppl): 925s-932s.
323. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor- β_1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 1995; 222(2): 155-162.
324. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5(1): 67-68.
325. Whiteside TL. Down-regulation of ζ -chain expression in T cell: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53(10): 865-878.

13.1 Publicaciones generadas como productos de la realización de la presente tesis cervicales

13.1.1 *Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V, et al. CD3- ζ expression and T cell proliferation are inhibited by TGF- β 1 and IL-10 in cervical cancer patients. Journal of Clinical Immunology 2009, 29:532-544.*

13.1.2 *Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V, et al. TGF- β and IL-10 inhibit T lymphocytes proliferation and CD3- ζ Expression in cervical cancer women. UICC World Cancer Congress. Free Papers. Washington, D.C. U.S.A. Medimond International Proceedings. 8-12 de Julio de 2006.*

CD3 ζ Expression and T Cell Proliferation are Inhibited by TGF- β 1 and IL-10 in Cervical Cancer Patients

Cintha E. Díaz-Benítez · Karla R. Navarro-Fuentes · Jacqueline A. Flores-Sosa · Janet Juárez-Díaz · Felipe J. Uribe-Salas · Edgar Román-Basaure · Ludwig E. González-Mena · Patricia Alonso de Ruiz · Guillermina López-Estrada · Alfredo Lagunas-Martínez · Víctor H. Bermúdez-Morales · Juan M. Alcocer-González · Jesús Martínez-Barnette · Rogelio Hernández-Pando · Yvonne Rosenstein · José Moreno · Vicente Madrid-Marina

Received: 8 December 2008 / Accepted: 2 February 2009 / Published online: 4 March 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract

Introduction Cervical cancer development from a squamous intraepithelial lesion is thought to be favored by an impaired T cell immunity. We evaluated parameters of T cell alterations such as proliferation, cytokine, and CD3 ζ expression in peripheral blood and tumor-infiltrating T lymphocytes from women with squamous intraepithelial lesions (SIL) or cervical cancer (CC).

Results and Discussion T cell proliferation and cytokine messenger RNA (mRNA) expression were similar in women with SIL and healthy donors, whereas low T cell proliferation and lower mRNA expression of IL-2, IL-10

and IFN- γ were observed in women with CC. Moreover, infiltrating cells showed marginal responses. We also found that CD3 ζ mRNA expression, whose protein is required for T cell activation, correlated with a decreased proliferation in advanced stages of the disease.

Conclusion Experiments with T cells from healthy donors in the presence TGF- β 1 or IL-10 suggest that these cytokines have a relevant role in T cell responses during CC progression.

Keywords Peripheral and infiltrating T cells · cervical cancer · CD3 ζ expression · IL-10 · TGF- β 1.

C. E. Díaz-Benítez · K. R. Navarro-Fuentes · J. A. Flores-Sosa · J. Juárez-Díaz · F. J. Uribe-Salas · A. Lagunas-Martínez · V. H. Bermúdez-Morales · J. Martínez-Barnette · V. Madrid-Marina (✉)
División de Infecciones Crónicas y Cáncer,
Instituto Nacional de Salud Pública de México,
Avenida Universidad #655, Sta. María Ahuacatlán,
62508 Cuernavaca, Morelos, Mexico
e-mail: vmarina@correo.insp.mx

E. Román-Basaure · L. E. González-Mena · P. Alonso de Ruiz
Departamento de Oncología y División de Patología,
Hospital General,
Mexico City, Mexico

G. López-Estrada
Departamento de Displasias, Hospital General Parres,
Cuernavaca, Mexico

J. M. Alcocer-González
Instituto de Immunología y Virología,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, Mexico

R. Hernández-Pando
Laboratorio de Patología Experimental,
Departamento de Patología,
Instituto Nacional de Medicina y Nutrición "Salvador Zubirán",
Mexico City, Mexico

Y. Rosenstein
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos,
Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Cuernavaca, Mexico

J. Moreno
Unidad de Investigación en Enfermedades autoinmunes,
División de Infecciones Crónicas y Cáncer,
Instituto Nacional de Salud Pública de México,
Mexico City, Mexico

Introduction

Cervical cancer (CC) affects about 500,000 women every year worldwide, with 40% having an expectancy of survival of 5 years [1]. Progression of a cervix lesion to CC depends on several factors; the best known is infection with high risk human papillomavirus (HPV), which is found in 99.7% of CC biopsies [2]. Although host local immune response can control HPV infection and abort the course of disease [3, 4], with cellular immunity being a critical factor in preventing squamous intraepithelial lesions (SIL) development to CC [5], CC patients frequently have a deficient local cell-mediated immunity [6].

The main mediators of cell-mediated immunity against virus-infected cells and some tumors are cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTL). CTL eliminate virally infected cells by means of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity. Additionally, CD4⁺ T helper cells (Th) also participate in the control of these conditions. Upon a primary immune response, depending on the microenvironment and the signals received from certain cytokines, naive CD4⁺ T cells can differentiate into three to four major subsets of Th cells, with distinct pattern of cytokine secretion that drives different types of immune responses, usually toward the best possible combination to control of the specific invader. For instance, IFN- γ and IL-12 induce differentiation of Th1 cells to produce more IFN- γ , which enhances the clearance of intracellular pathogens; IL-4 induces differentiation of Th2 cells that produce IL-4, IL-5, and IL-13 and mediate immune responses against helminths [7]; finally, IL-6 plus TGF- β and IL-23 induce differentiation towards the Th17 lineage, necessary for the clearance of extracellular bacteria and fungi [8]; in certain conditions, TGF- β or IL-10 alone drives regulatory CD4⁺ T cell (Treg) differentiation which regulates immune responses by several distinct mechanisms [9, 10]. Thus, together with CTL, the only Th subset desirable in pre-malignant CC lesions are Th1 cells, as IFN- γ favors immune responses against viral infections.

Previous reports demonstrated that biopsies of CC patients have an increased expression of IL-10 and TGF- β 1 [11, 12]. These cytokines provide a microenvironment where Th1 cells do not develop and where CTL differentiation is also affected, thus providing a permissive environment for cancer growth. The source of these cytokines in cervical tissue appears to be epithelial cells, regardless that in other situations, they are produced by Th subsets distinct from Th1. Indeed, the expected Th1 cytokine profile is usually not detected in CC lesions, as observed in tumors that also express these cytokines such as pancreatic carcinoma [13].

In addition to antagonizing Th1 cytokines and their production, TGF- β 1 and IL-10 inhibit IL-2-dependent T cell proliferation as well as CTL activity of CD8⁺ T cells [14, 15]. This could explain why CD8⁺ T cells in the CC

microenvironment lack anti-tumor activity [16]. Interestingly, higher number of CD8⁺ T cells in tumor infiltrates is associated with a better prognosis of patients with CC [17], which could also depend on infiltrating CD4⁺ T cells.

Several conditions of chronic immune stimulation such as CC exhibit some alterations of T cell function that correlate with a decreased expression of the CD3 ζ chain [18–20]. This protein is a subunit of the T cell antigen receptor (TCR)-associated signal transduction complex, which is essential for T cell activation following antigen recognition by the TCR-CD3 complex [21]. The absence of this protein profoundly affects cell proliferation, CTL activity, and cytokine production by T cells.

To have a deeper insight of the functional role of T cells during CC progression, it is important to evaluate diverse immunological features at different stages of disease progression. Moreover, it is of particular interest to define parameters of T cells that could be indicative of disease persistence. Therefore, in the current studies, we examined T cell functions of peripheral blood lymphocytes (PBL) and tumor-infiltrating (TIL) T lymphocytes from women with SIL or CC, including proliferation, cytokine messenger RNA (mRNA) expression (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1), as well as CD3 ζ expression. We also bring evidence that *in vitro*, TGF- β 1 and IL-10 could have an important role in some of the T cell alterations we found.

Materials and Methods

Cell Lines

The human cervix carcinoma cell lines C33-A (HPV negative), SiHa (HPV 16⁺), and HeLa (HPV 18⁺) were a generous gift of Dr. Patricio Gariglio (CINVESTAV, Mexico) and were maintained in supplemented Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) medium at 37°C in 5% CO₂.

Cytokines, Antibodies, and Mitogens

Recombinant human IL-10 and TGF- β 1 (rhIL-10 and rhTGF- β 1), polyclonal neutralizing anti-human TGF- β 1 (chicken IgG), and anti-human IL-10 (goat IgG) antibodies were obtained from R&D Systems, Minneapolis, USA. The hybridoma-producing monoclonal antibody (mAb) anti-CD3 (OKT3) was obtained from the ATCC CRL-800-1 by JM. Phytohemagglutinin (PHA-M) was obtained from Sigma. Trypan blue dye was obtained from Invitrogen.

Patients and Tissue Samples

Fifty-seven patients from the Hospital General and Hospital General Parres of Mexico City and Cuernavaca (Morelos),

respectively, were enrolled in this study. Histological diagnostics from cervix biopsies were obtained from the Pathology Department of each hospital. The study groups were constituted as follows: a total of 29 women with CC, 26 with squamous carcinoma of the cervix and three with cervical adenocarcinoma (median age, 46; range 23–66), and a total of 28 women with SIL (median age, 34; range, 19–61) including cervical intraepithelial neoplasias grade I (low-grade SIL) and grades II–III (high-grade SIL). Controls were 32 healthy women (median age, 34; range, 21–61).

HPV was positive in 36 biopsies from SIL or CC patients by histological and/or polymerase chain reaction (PCR) analyses. Of these, 33% were HPV16⁺ (two cases were also HPV31⁺) and/or HPV18⁺. Peripheral blood (20 ml) was collected by venipuncture before any medical treatment in vacutainer tubes containing preservative-free heparin (Becton Dickinson, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Fresh biopsy specimens (5–10 mm³) of hysterectomy were obtained from 13 women with CC and were transported on ice in RPMI medium supplemented with 100 U/ml penicillin–streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Life Technologies Inc., San Diego, CA, USA). The study was approved by the institutional ethics committees and written informed consent was obtained from the patients and controls.

PBMC and TIL Isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll-hypaque density gradients (Hystopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). TILs were immediately isolated from minced cervix biopsies by Ficoll-hypaque 100–75% gradient separation as described previously [22]. Briefly, biopsies were mechanically minced on sterile Petri dishes. Then, pieces of biopsies were digested with 2% collagenase in RPMI for 1–2 h at 37°C in 5% CO₂. Dissociated tissues were washed with RPMI, pressed, and filtered through a nylon mesh. PBMC and TIL viability was consistently >99% and ≥90%, respectively, as determined by dye exclusion.

Flow Cytometry Analysis and Immunohistochemical Stains of T Cells from Patients

The proportion of CD3⁺ T cells expressing CD4⁺ or CD8⁺ surface markers in the periphery and in situ were determined by triple color flow cytometry. PBL ($\leq 5 \times 10^5$) and TIL ($\leq 2 \times 10^5$) were stained with Opticlone CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PECY5 (Coulter, Marseille, France) and the respective isotype controls from BD Biosciences, San José, CA and Coulter. After incubation at 4°C for 30 min with antibodies, cells were washed with washing buffer and fixed with 1% paraformaldehyde. Flow cytometry was

performed on a FACSCalibur (BD) and data were acquired with the CellQuest software by the use of forward and side scatter thresholds with 10,000 gates events. We used Leukogate to measure the proportions of T cells. WinMDI version 2.8 program was used to analyze the results.

The presence and localization of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells in situ were analyzed by immunohistochemistry (IHC) staining of paraffin-embedded cervix biopsies from patients. Sections of 4 μm of the biopsies were stained in a Benchmark automated histology staining system from Ventana Medical Systems Inc., Tucson. After incubation with the specific antibodies, a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase was added and slides were developed with 3,3-diaminobenzidine. Slides were examined with a light microscopy to count the numbers of stained cells in each high power (400×) field of the defined areas, and the tissue length areas were measured with the Leica Qwin software (Wetzlar, Germany). Images were saved with the Leica Meteor Live Image Program. The number of positive cells in the stroma and the epithelium from cervix of normal regions and areas with SIL or CC were expressed as number of cells per square micrometers of total tissue area.

T Cell Proliferation Assays

The specific response of PBMC and TIL to mitogens was determined by measuring methyl-³H thymidine uptake. Briefly, 8×10^4 cells from patients and healthy donors were either stimulated or not with 0.5 μg/ml plate-bound mAb anti-CD3 or with 5 μg/ml PHA in 200 μl complete RPMI. In selected experiments, PBL from healthy donors were stimulated with anti-CD3 in the presence of rhIL-10, rhTGF-β1, or supernatants from cervix cell lines. In parallel experiments, neutralizing antibodies to the respective cytokines were added 1 h before addition of cells. Triplicate cultures were incubated in 96-well round-bottom plates (Corning Costar Corp., NY, USA) for 72 h at 37°C in 5% CO₂. Of methyl-³H thymidine, 1 μCi/well (6.7 Ci/mmol, NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, USA) was added at the last 12 h of culture. Thymidine incorporation was measured in a liquid scintillation counter.

RT-PCR Assays for Cytokines and CD3ζ

PBMC (2×10^6) and TIL ($\leq 1 \times 10^6$) were incubated with 5 μg/ml PHA for cytokine mRNA expression or with 0.5 μg/ml plate-bound mAb anti-CD3 for CD3ζ assays in six-well plates for 15 h at 37°C in 5% CO₂. Total RNA was isolated from non-adherent cells using the TRIzol reagent from Invitrogen. First-strand complementary (cDNA) synthesis was carried out in the presence of 200 U of M-MLV reverse-transcriptase and 2.5 μg of total RNA using

standard conditions. PCR amplifications were carried out in 25 μ l reactions containing 1 μ l of cDNA, 0.2 mM final concentration of each dNTP, 15 pmol of each primer, 2.5 μ l of reaction buffer, and 1 U of recombinant Taq DNA polymerase. All reverse transcription PCR (RT-PCR) reagents were obtained from Invitrogen. The following primers were used for the PCR assay for: IL-10 (351 pb) forward 5'-ATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA-3' and reverse 5'-TCTCAAGGGCTGGGTACAGCTATC CCA-3', CD3 ζ (380 pb) forward 5'-CTCTGCTACCTGCTGGATGGAA-3' and reverse 5'-ATGTGAA GGGCGTCGTAGGT-3'. Primer sequences for IL-2, IFN- γ , TGF- β 1, and IL-4 have been published [12, 23]. Primers for the human housekeeping gene β 2 microglobulin (100 pb) were used to verify cDNA integrity [24]. PCR amplifications were performed in a Mastercycler PCR gradient (Eppendorf, Germany) under the following conditions: 5 min at 94°C; then 40 cycles (IL-4), 35 cycles (IL-10), or 30 cycles (CD3 ζ) at 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 10 min. PCR samples were electrophoresed in 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and visualized by UV after staining with ethidium bromide.

Detection of IL-10 and TGF- β 1 in Supernatants of Human Cervical Cancer Cell Lines

IL-10 and TGF- β 1 concentrations in supernatants from HeLa, SiHa, and C33-A cell lines were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cells (4×10^6) were incubated in DMEM without FBS in 25-cm² culture flasks for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Supernatants were centrifuged at 1,300 \times g at 4°C for 5 min to remove cellular debris. Supernatants were frozen at -70°C until quantitative analysis was performed by ELISA with kits (Quantikine™ Human IL-10 and TGF- β 1 immunoassays) from R&D Systems. Results were expressed as picograms per milliliter (pg/ml). Final cytokine concentration was calculated as means of duplicate readings.

In vitro Analysis of CD3 ζ Expression

Following depletion of monocytes by adherence to polystyrene plates, 1×10^6 PBL from healthy donors were stimulated with mitogens at 37°C in 5% CO₂ in 24-well plates for different times (0, 8, 16, 24 h). In some experiments, 65 pg/ml of rhTGF- β 1 or rhIL-10 were added 1 h before the beginning of the experiment. Varying concentrations of the respective neutralizing antibodies were used to inhibit the effect of cytokines. After incubation, cells were washed with phosphate-buffered saline and incubated for 30 min at 4°C with lysis buffer containing protease inhibitors. The lysate was centrifuged at 11,000 \times g for 15 min. Total proteins from supernatants

were determined by the bicinchoninic acid kit from Pierce, Rockford, IL, USA. Thirty micrograms of proteins was electrophoresed on 12% sodium dodecyl sulfate-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with the mouse mAb human anti-CD3 ζ (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 12 h 4°C. After that, peroxidase coupled secondary goat Ab mouse anti-IgG from DAKO, A/S Denmark was added and proteins were detected by enhanced chemiluminescence using the Renaissance West-ern blot kit, Pierce.

Statistical Analysis

Data of PBL and TIL proliferation from each sample were expressed as the mean standard deviation (\pm SD). Analysis of variance test was used to estimate age differences according to health status, proliferation differences of stimulated PBL vs. health status, and differences among four groups of stratified age vs. PBL proliferation. Scheffé test allowed us to assess significant differences among these groups. Student's *t* test was used to estimate proliferation differences of stimulated PBL vs. stimulated TIL from women with CC. The association between the proportion of positive samples for cytokines or CD3 ζ mRNA presence in PBL vs. stratified age, health status, or groups of PBL proliferation was calculated by chi-square test. The relationship between cytokines and CD3 ζ mRNA presence in PBL was studied by Fisher exact test. This test was also used to determine the proportion of positive samples for cytokines or CD3 ζ mRNA presence in PBL and TIL from 12 women with CC. Statistical differences in all tests were considered significant when *p* values were less than 0.05.

Results

Prevailing Proportions of CD8⁺ T Cells in the Periphery and the Cervix Infiltrates of CC Patients

We compared by flow cytometry the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in PBL and TIL samples from CC patients (*n*=2) and PBL from low-grade SIL patients (*n*=2) and normal donors (*n*=2). Results revealed a PBL ratio of 1.4 in healthy donors, 1.7 in SIL patients, and a higher proportions of CD8⁺ in PBL (0.71) and TIL (0.97) from CC patients. The distribution of T cells in the epithelium and stroma of biopsies from five women with SIL (including a carcinoma in situ and a normal region) and one woman with microinvasive carcinoma of cervix was determined by IHC. There were more TIL in the stroma than in epithelium in advanced stages of the disease, prevailing CD8⁺ T cells (Table I and Fig. 1). In general, consistent with other reports [16, 25], we found that CD8⁺ T cells are

Table 1 Infiltrating T Cells in Cervical Biopsies of Women with SIL or CC

Neoplasia regions	CD3 ⁺ Ki67 ⁺ count ^a /	CD4 ⁺ count/	CD8 ⁺ count/
	Area ^b (μm ²)		
Epithelium			
No SIL (<i>n</i> =2)	8 (±3) ^a /216,719 ^b (±30,045)	0 (0)	0 (0)
LGSIL (<i>n</i> =3)	7(±4)/207,530 (±34,829)	1 (±1)/178,251 (±30,508)	4 (±5)/169,847 (±50,235)
HGSIL (<i>n</i> =4)	11 (±8)/204,200 (±46,519)	4 (±4)/203,855 (±45,350)	8 (±5)/221,495 (±35,194)
CC (<i>n</i> =1)	11 (±4)/208,064 (±34,342)	8 (±9)/209,708 (±39,649)	6 (±4)/218,879 (±43,421)
Stroma			
No SIL (<i>n</i> =2)	13 (±7)/188,102 (±67,657)	3 (±2)/219,457 (±38,052)	0 (0)
LGSIL (<i>n</i> =3)	32 (±33)/135,750 (±66,310)	9 (±7)/163,560 (62,100)	9 (±10)/167,950 (±61,374)
HGSIL (<i>n</i> =4)	90 (±77)/198,074 (±44,483)	24 (±19)/207,810 (±42,300)	34 (±28)/215,920 (±37,215)
CC (<i>n</i> =1)	133 (±129)/144,753 (±84,078)	15 (±17)/114,030 (±86,488)	30 (±35)/124,839 (±81,657)

Immunohistologic analysis from data of five women with squamous intraepithelial lesions (including one carcinoma in situ and normal cervical tissue) and one woman with microinvasive CC

No SIL normal cervix in patients' biopsies, LGSIL low grade squamous intraepithelial lesions, HGSIL high grade squamous intraepithelial lesions, CC cervical cancer

^a Mean number of lymphocytes

^b Mean length areas obtained from about ten high power fields (400×) for each neoplasia region were analyzed using a light microscope and the LEICA Program. Standard deviations are shown in parentheses

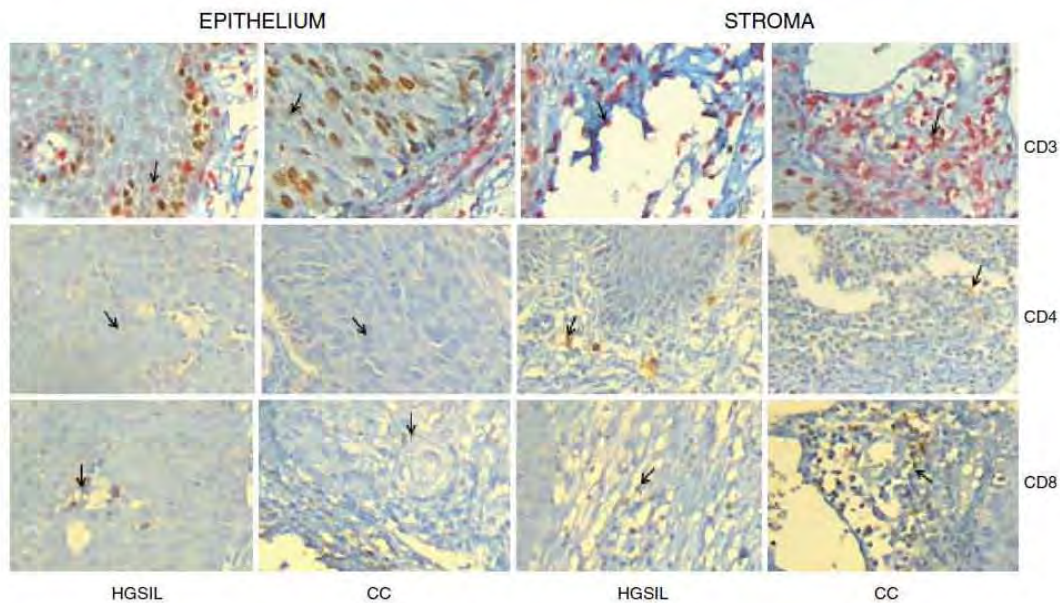


Fig. 1 Presence of infiltrating T cells in epithelium and stroma of cervix biopsies from women SIL or CC. Representative examples of the presence of CD3⁺, CD4⁺, or CD8⁺ T cells stained by Immunohistochemistry. HGSIL high-grade squamous intraepithelial lesions, CC cervical cancer

predominant compared to CD4⁺ T cells in women with CC. However, what are the mechanisms behind this distribution as well as behind the inability of these cells to eliminate the tumor in CC remain unclear.

Cells from CC Patients Have a Decreased Proliferative Capacity

To better understand T cell behavior during the course of CC disease, we first examined proliferation of PBL and TIL from patients with SIL or CC and compared them to that of healthy donors. Thus, PBL from SIL (*n*=19) or CC (*n*=22) patients and healthy women (*n*=27), as well as TIL from women with CC (*n*=7), were stimulated with PHA or immobilized anti-CD3 for 3 days. As shown in Fig. 2a, proliferative responses among groups were significantly different. For PHA, PBL from CC patients proliferated less

than those from SIL patients (*p*<0.001) and healthy women (*p*=0.01), although the differences between SIL patients and healthy women were not significantly different.

Moreover, a significant difference (*p*≤0.05) was found in anti-CD3-stimulated PBL between CC patients and healthy donors. On the other hand, there was a marginal response of TIL from CC patients to mitogens. Finally, when the proliferation of PBL vs. TIL was compared in seven of the women with CC, only PBL proliferation to PHA was statistically higher than that of PHA-stimulated TIL (Fig. 2b). Thus, women with CC have a deficient PBL proliferative response, with no response observed for TIL.

The mean age of women with initial phases of CC (stages I–II) ranged from 45.1 to 48.6 years old [26]. Our CC patients had a median age of 46, which was higher than that of women with SIL and healthy women (median age of 34) by Scheffé test (both with *p*<0.001). Although immune responses tend to decrease in older persons [27], the differences seen in our studies are not likely due to age differences. First, because decreased immune responses in healthy persons tend to appear at 70 years of age and none of our patients was 70 or older; second, because we did not find age-related decrease of T cell proliferation both in healthy women and CC patients (anti-CD3, *p*=0.834; PHA, *p*=0.321).

Anti-inflammatory Cytokine Profile of T Cells from CC Patients

As mentioned above, cytokines display an anti-inflammatory profile in CC lesions, with predominance of IL-10, TGF-β, and IL-4. It is not known whether these cytokines are produced by TIL or by other cells besides CC cells. Moreover, it was of interest to examine whether PBL cytokine profiles resembled those of TIL. Therefore, we first examined the cytokine mRNA profiles of peripheral T cells from patients. Table II shows that at advanced stages of CC, there were significantly less number of positive samples expressing IL-2, IL-10, and IFN-γ mRNA by PBL, whereas a number of positive samples for IL-4 and TGF-β1 mRNA expression were similar at all stages, which also were similar to healthy women. These results indicate that peripheral T cells from CC patients have a decreased pro-inflammatory potential. In addition, the results suggest that these cells somehow reflect the status of cytokines in CC lesions. However, PBL had a decreased IL-10 mRNA expression, which is at variance with the increased IL-10 in CC lesions. This raises the possibility that as previously suggested, the increased IL-10 in CC lesions is from cell sources other than T cells.

To further evaluate whether cytokine mRNA expression in PBL reflected that found in TIL from the cervix of CC patients, we designed parallel experiments with these two

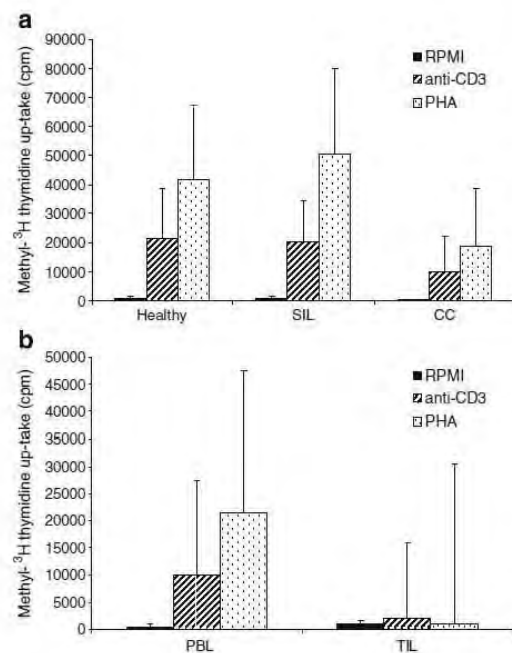


Fig. 2 Decreased T cell proliferation in SIL and CC. Proliferation was examined by means of ³H TdR incorporation assays in cells from women with SIL, CC, or from healthy donors. 8 × 10⁵ cells were incubated at 37°C during 72 h in the presence of 0.5 μg/ml anti-CD3, 5 μg/ml Phytohemmagglutinin (PHA) or alone (RPMI). Results represent the mean cpm ± SD of triplicate cultures for each sample. a Significant differences were observed among the groups of study by ANOVA test in PBL stimulated with anti-CD3 (*p*=0.036) or PHA (*p*<0.001). b Proliferation differences between PBL and TIL from women with CC were only found in T cells stimulated with PHA (*p*<0.001, Student's *t* test)

Table II Cytokines mRNA Expression by PHA-Stimulated Lymphocytes from Women with SIL or CC

Cytokines	No. of patients (%)			P value ^a
	Healthy women (n=26)	Women with SIL (n=20)	Women with CC (n=20)	
IL-2	22 (84.6%)	14 (70%)	10 (50%)	0.040
IFN- γ	23 (88.5%)	18 (90%)	10 (50%)	0.002
IL-4	20 (76.9%)	16 (80%)	16 (80%)	0.956
IL-10	19 (73.1%)	8 (42.1%)	5 (25%)	0.004
TGF- β 1	20 (76.9%)	12 (63.2%)	14 (70%)	0.602

PBL (2×10^6) from healthy donors or patients were stimulated with 5 μ g/ml PHA during 15 h at 37°C. Cytokine expression was analyzed by RT-PCR

^a Chi-square test was used to analyze the association between positive samples for cytokines and health status in PBL samples

populations of T cells. Table III shows that although there was a tendency to a smaller number of positive samples for most cytokines in TIL, no statistically significant difference was found for any of these cytokines between TIL and PBL, except for IL-4.

Decreased CD3 ζ mRNA expression by PBL and TIL reflects disease progression in CC. Previous studies have suggested that a reduced T cell function can be associated to alterations in CD3 ζ protein expression [18–20]. Thus, in the next series of experiments, we examined expression of CD3 ζ mRNA by T cells as an indicator of possibly decreased T cell function in CC patients. Hence, PBL from healthy donors (n=32), SIL patients (n=20), and CC patients (n=20), as well as TIL (n=10) at different stages of CC, were stimulated with anti-CD3, and CD3 ζ mRNA

Table III Differences in Proportion of Positive Samples for Cytokines mRNA Expression Between Peripheral Blood and Tumor Infiltrating T Cells from Women with CC

Cytokines	No. of patients (%)		P value ^a
	PBL (n=12)	TIL (n=10)	
IL-2	8 (66.7%)	3 (30%)	0.099
IFN- γ	8 (66.7%)	4 (40%)	0.206
IL-4	10 (83.3%)	4 (40%)	0.048
IL-10	3 (25%)	1 (10%)	0.368
TGF- β 1	8 (66.7%)	6 (60%)	0.546

PBL (2×10^6) and TIL (1×10^6) from patients with CC were stimulated with 5 μ g/ml PHA during 15 h at 37°C. Cytokine expression was analyzed by RT-PCR

^a Fisher exact test was used to study the proportion of positive samples for cytokines in PBL vs. TIL

expression was examined by RT-PCR. As seen in Fig. 3a, CC progression was associated with lower CD3 ζ mRNA, which was even lower in TIL (Fig. 3b). We next determined whether decreased CD3 ζ mRNA expression correlated with low T cell proliferation in CC. As expected, there was a significant correlation between low T cells proliferation and decreased CD3 ζ mRNA expression by anti-CD3 stimulated T cells ($p=0.044$). Thus, decreased T cell function appears to correlate with CC progression, which is in agreement with a decreased T cell proliferation in CC patients.

Cytokines induce generation, stimulation, and differentiation of multiple cell types by means of their regulatory effects on many genes and their products [28]. To establish the possible association of cytokines with the levels of CD3 ζ expression, we evaluated the relation between a number of cytokines and CD3 ζ expression by PBL and PBL vs. TIL. As expected, there were significant positive associations between CD3 ζ /IL-2 (PBL, $p=0.011$, PBL vs.

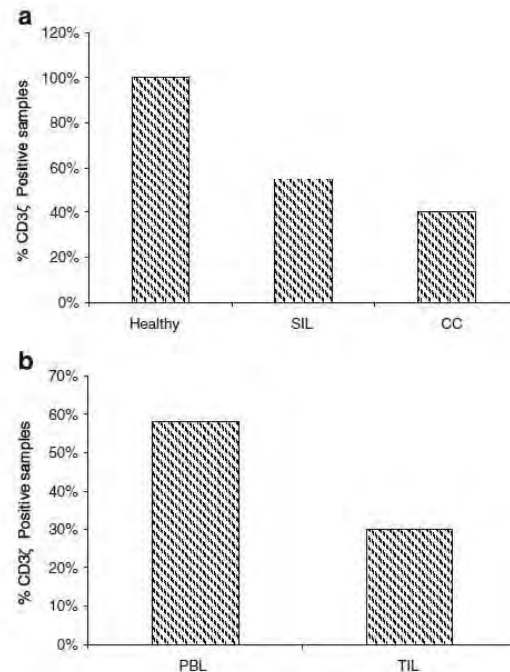


Fig. 3 Decreased CD3 ζ mRNA expression during cervical cancer progression. PBL (2×10^6) and TIL (1×10^6) from healthy donors or patients were incubated with 0.5 μ g/ml of anti-CD3 during 15 h at 37°C. CD3 ζ expression was analyzed by RT-PCR. a Chi-square test was used to calculate the association between the proportion of positive samples for CD3 ζ and health status in PBL ($p<0.001$). b Fisher exact test was used to study the proportion of positive samples for CD3 ζ between PBL and TIL in women with CC (not significant)

TIL, $p=0.015$) and CD3 ζ /IFN- γ (PBL, $p=0.012$, PBL vs. TIL, $p=0.038$) mRNA expression. Moreover, there was an inverse association for IL-10/CD3 ζ mRNA expression in PBL ($p=0.029$). Finally, IL-4 and TGF- β 1 mRNA expressions were not associated with CD3 ζ expression in PBL. However, IL-4 was positively associated to CD3 ζ when PBL vs. TIL were compared ($p=0.026$). These results show that an optimal expression of CD3 ζ is associated with expression of IL-2 and IFN- γ .

Inhibitory Effect of TGF- β 1 and IL-10 on T Cell Proliferation

Overexpression of TGF- β 1 and IL-10 in the cervix of patients with advanced stages of CC [11, 12] could favor CC development by inhibiting T cell responses against CC cells. According to the data shown thus far, the major source of IL-10 in CC are not T cells, and in agreement with other reports, the majority of these cytokines originate from infected or transformed epithelial cells from cervix, which also appear to be the major source of TGF- β 1. Preliminary experiments indicated the presence of IL-10 and TGF- β 1 in supernatants from the human cervical carcinoma cell lines HeLa, SiHa, and C33. Therefore, we evaluated by ELISA the presence of these cytokines in supernatants from the human cervical carcinoma cell lines HeLa, SiHa, and C33 after 24 h of incubation without FBS. Production of TGF- β 1 was higher in HeLa (275 pg/ml) and SiHa (240 pg/ml) than in C33A (33 pg/ml). IL-10 was detected in supernatants of HeLa (18.7 pg/ml) and SiHa (1.1 pg/ml), but not in C33-A cells. These results showed that HPV⁺ cervix cell lines produce higher quantities of both cytokines (especially of TGF- β 1) than the HPV⁻ C33A cell line (data not shown).

Hence, to evaluate the effect of TGF- β 1 and IL-10-rich supernatants on PBL proliferation, PBMC from healthy donors were stimulated with anti-CD3 in the presence of supernatants from CC cell lines, SiHa (final TGF- β 1 concentration, 65 pg/ml), HeLa (final concentrations of TGF- β 1 65 pg/ml and IL-10 ~4.4 pg/ml), and C33-A (33 pg/ml TGF- β 1). Figure 4 shows that HeLa and SiHa supernatants had a 99% inhibitory effect on T cell proliferation compared with the control (medium alone), whereas C33-A supernatants only produce 55% inhibition. Although this does not formally indicate that the inhibition seen is the result of the aforementioned cytokines, the fact that HPV⁺ cell line supernatants with the same concentrations of TGF- β 1 have a similar inhibitory effect on T cell proliferation and that supernatants from C33-A with half the amount of TGF- β 1 had a proportional decrease in the inhibitory effect on T cell proliferation is compatible with the notion that the main responsible for the inhibition is TGF- β 1, although we cannot rule out that in this

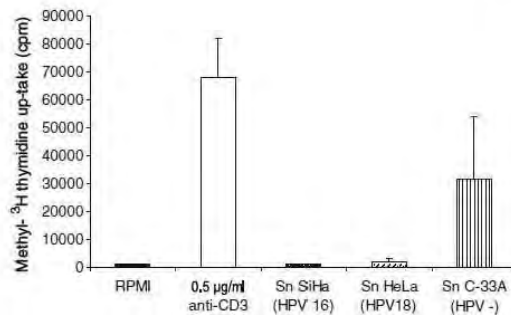


Fig. 4 Inhibition of T cell proliferation by supernatants of CC cell lines containing TGF- β 1 and IL-10. PBL (8×10^4) from healthy donors were stimulated during 72 h at 37°C with 0.5 µg/ml anti-CD3 in the presence of supernatants (sn) from cell lines containing 65 pg/ml TGF- β 1 (HeLa, SiHa), 33 pg/ml TGF- β 1 (C33-A), and ~4.4 pg/ml IL-10 (HeLa). T cell proliferation was analyzed by ³H TdR incorporation assays. Results represent the mean cpm±SD of triplicate cultures from three different experiments

experimental setup, proliferating T cells were producing endogenous IL-10 as a result of TGF- β 1 activity.

Therefore, to further define the contributing roles of TGF- β 1 or IL-10 to the inhibition of T cell proliferation, PBMC were stimulated with anti-CD3 in absence of exogenous cytokines or in the presence of rhTGF- β 1 or rhIL-10, with or without their respective neutralizing polyclonal antibodies. We found that the inhibitory effect of rhTGF- β 1 was totally counteracted with 41.6 ng/ml neutralizing anti-rhTGF- β 1 (Fig. 5a), whereas the inhibitory effect of rhIL10 was blocked with 23 ng/ml neutralizing α -rhIL-10 (Fig. 5b). These data indicate that both cytokines independently produce a profound inhibitory effect on T cell proliferation. However, both cytokines together did not inhibit T cell proliferation at a higher level than either one alone (data not shown).

Presence of TGF- β 1 and IL-10 Reduces CD3 ζ Expression in PBL

Results obtained herein showed that supernatants from the CC cell lines as well as the rhTGF- β 1 and rhIL-10 inhibited proliferation of T cells from healthy donors. However, the mechanism by which these cytokines accomplish their effect is unknown. One possibility is that these cytokines were affecting expression of CD3 ζ , a phenomenon which is frequently associated with a loss of T cell function. T cell stimulation does not interfere with CD3 ζ protein expression (Fig. 6a). Hence, we examined CD3 ζ protein expression by unstimulated PBL from healthy donors at varying time lengths after the addition of rhTGF- β 1 and rhIL-10 at concentrations known to be produced by CC cell lines. Control cells cultured in RPMI medium up-regulated CD3 ζ

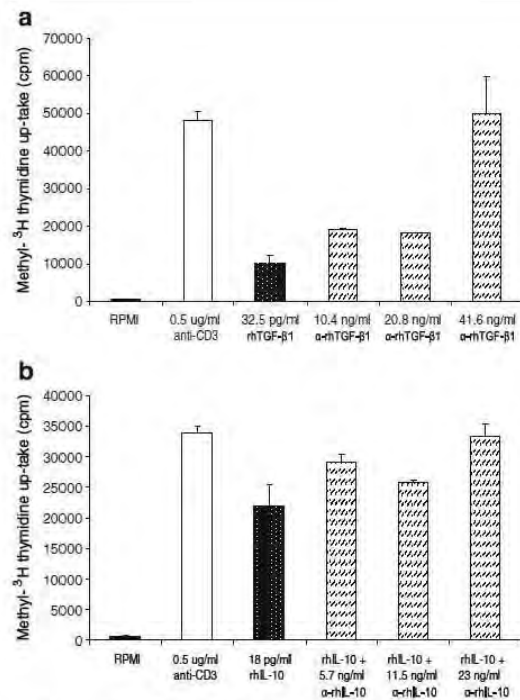


Fig. 5 Specificity of the inhibitory effects on T cell proliferation by neutralizing antibodies. PBL (8×10^4) from healthy donors were stimulated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 in the presence of rhTGF- β 1 (a) or with rhIL-10 (b) during 72 h at 37°C. Respective neutralizing antibodies were added at the indicated concentrations. T cell proliferation was analyzed by ^3H TdR incorporation assays. Results represent the mean $\text{cpm} \pm \text{SD}$ of triplicate cultures from three different experiments

protein expression after 8 h of culture, which persisted up to 24 h (Fig. 6b, top). However, the addition of rhTGF- β 1 delayed CD3 ζ protein expression, as it increased only slightly at 8 h of incubation with a further increase to the same levels as the control at 16 and 24 h (Fig. 6b, top and middle). To examine the possibility that escape from TGF- β 1-dependent CD3 ζ inhibition was due to consumption of the cytokine, rhTGF- β 1 was added to the cultures every 8 h, which resulted in sustained decrease in CD3 ζ protein expression at all the time points (Fig. 6b, bottom).

Finally, we examined the specific effects of rhTGF- β 1 or rhIL-10 on CD3 ζ protein expression by adding a fixed amount (650 ng/ml) of neutralizing α -rhTGF- β 1 or with varying concentrations of neutralizing α -rhIL-10. To ensure an optimal blocking effect, in both cases, blocking antibodies and their respective cytokines were combined 1.5 h before they were added to the cell cultures. This was the case as shown in Fig. 6c, d where addition of neutralizing antibodies

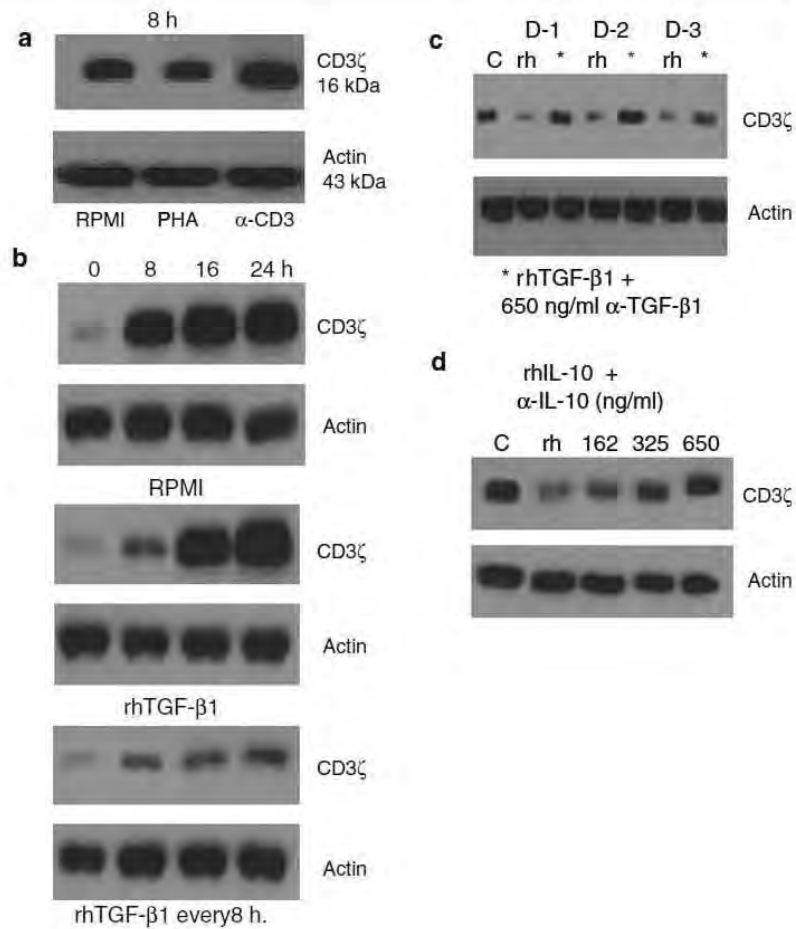
counteracted the inhibitory effect of rhTGF- β 1 or rhIL-10 on CD3 ζ expression, but not on that of the constitutive protein β -actin used as a control for protein expression in all the conditions tested. Therefore, rhTGF- β 1 and rhIL-10 can independently inhibit CD3 ζ expression.

Discussion

In this study, we demonstrated that PBL from women with CC proliferate less than those from women with SIL and healthy donors. Diminished T cell proliferation was related to more advanced stages of the disease, independently of the age. There was also no response of TIL. This is in agreement with the results reported by other authors who observed a decreased response to PHA and anti-CD3 in PBL and in T cells from tumor-draining lymph nodes (even after addition of exogenous IL-2) of women with CC [6, 29]. These results indicate that low proliferation of T cells is independent of the stimulus used and that the degree of this response depends on the proximity to the primary tumor site.

The analysis of the cytokine profile of PBL and TIL in the study groups showed that in women with CC, IL-2 and IFN- γ mRNA levels in PBL are decreased as shown for their respective proteins in supernatants of cultured PBMC [30] and for IFN- γ in plasma [31]. In contrast to data described in other works where considerable quantities of IL-10 in the cervix [32] and in the blood of women with SIL [30, 31] were detected, we found that IL-10 mRNA decreases in PBL and TIL during CC development. This suggests that high production of this cytokine is mediated by cells other than T cells in these patients. Compared to the elevated production of IL-4 in PBMC [30] and to the low levels in plasma [31], we found a high frequency of the IL-4 mRNA in PBL without a significant difference among the groups of study. Similar results with TGF- β 1 mRNA were also found. Comparing these results with those obtained by Sheu et al. [11] and Santin et al. [25], we did not find a prevalent Th1 pattern in PBL. Differences in the types of cytokines produced by T cells may be due to the methods and mitogens used, the presence of other cells as a source of cytokines, the disease stage, the number of samples, or even the population analyzed. Moreover, there were few positive samples for most cytokines in TIL; however, no statistically significant difference existed for any of the cytokines in TIL vs. PBL, except for IL-4. Down-regulation of IL-2 and IFN- γ leaves IL-4 and TGF- β 1 as the predominant cytokines in PBL and TIL from women with CC. Noteworthy, it was observed that from 60% of TIL expressing TGF- β 1 mRNA, 30% were only TGF- β 1-positive. Therefore, it seems that there is a switch from a Th1 in SIL patients to a Th2/Th3 pattern in patients with CC.

Fig. 6 CD3 ζ protein expression in T cells incubated with rhTGF- β 1 and rhIL-10. Total proteins were obtained from 1×10^6 PBL from healthy donors cultured in 24-well microtiter plates at 37°C. CD3 ζ expression and actin as a control was analyzed by Western blot. **a** PBL stimulated with 5 μ g/ml PHA or 0.5 μ g/ml anti-CD3 for 8 h. **b** PBL incubated with RPMI alone (*top*) or with 65 pg/ml rhTGF- β 1 added at the beginning of culture (*middle*) or every 8 h (*bottom*). PBL culture during 8 h with **c** 65 pg/ml rhTGF- β 1 and neutralizing anti-rhTGF- β 1 or **d** or 65 pg/ml rhIL-10 and neutralizing anti-IL-10. Results are representative of three different experiments. *C* cells with RPMI alone, *D* excuse healthy donors



These results and other reports, where Treg cells have been identified in tumor-draining lymph nodes from CC patients [29], suggest that persistence of the HPV and presence of TGF- β 1 and IL-10, among other factors, can induce the accumulation of anergic T cells unable to express mRNA cytokines such as IFN- γ , IL-4, and IL-17 in women with CC [33]. Some of these anergic T cells could produce high amounts of TGF- β , low amounts of IL-4 and IL-10, and no IL-2 and IFN- γ upon TCR ligation [34]. These cells, known as Treg, efficiently inhibit activation and proliferation of other T cells by cell to cell contact or by producing IL-10 or TGF- β in order to avoid exacerbated immune responses originated by a pathogen or self-antigen [35, 36]. Interestingly, TGF- β induces transcription of Treg-cell-specific transcription factor (FOXP3) that mediates peripheral CD4 $^+$ CD25 $^-$ naive T cell differentiation

toward Treg cells [37]. Thus, the presence of TGF- β 1 and/or IL-10 could induce differentiation or expansion of Th2/Tc2 [11] or Treg cells [38] that regulate other T cell function by inducing tolerance. Therefore, higher expression of TGF- β 1 and IL-10 in the tumor microenvironment than in the periphery partially explains why TIL show a more altered function than PBL in CC patients.

Recent work suggests that altered T cell functions and CD3 ζ down-regulation could be a physiological mechanism to prevent potentially harmful prolonged inflammatory reactions [39]. In CC, a decreased expression of CD3 ζ protein has been found in peripheral T cells, in natural killer cells, and in TIL, but not in T cells from pelvic lymph nodes in women with or without metastasis [19, 20]. We also showed in the present work a down-regulation of CD3 ζ mRNA expression according to the disease progres-

sion. Notably, low proliferation of PBL stimulated with anti-CD3 was related to a decreased in CD3 ζ mRNA presence, indicating an altered T cell signaling through TCR/CD3. Besides, significant associations were found between CD3 ζ and IFN- γ or IL-2. Thus, it is probable that low mRNA expression of CD3 ζ correlates with lesser quantities of the protein, regulating in this way TCR signals and therefore T cell functions such as proliferation and cytokine production.

Several mechanisms causing dysfunctional alterations of T cells in women with CC could be involved in the down-regulation of protein expression and the half-life mRNA of the CD3 ζ , including gene isoforms [40], the action of caspases [41], oxidative stress [42], and the low levels of tryptophan [43] or L-arginine [44]. Indoleamine-2,3 dioxygenase (IDO), cyclooxygenase-2 (COX2), and the prostaglandin E2 receptor E-prostanoid-4 (PGE2) that participate in these mechanisms are highly expressed in CC tumors [45, 46] and could favor Treg cells activity (via TGF- β) by inducing the expression of Foxp3 [45, 47]. Interestingly, COX2 transcription is induced by HPV oncoproteins [48].

All of these findings suggest that many of these mechanisms are likely to occur in the women with advanced stages of CC. Moreover, TGF- β 1 and IL-10, found in biopsies and in the fluids from cervix and vagina of women with CC or SIL [11, 12, 49], seem to play a special role in many of these mechanisms. Aberrant TGF- β 1 or IL-10 expression is not an exclusive event in CC; their presence has also been reported in malignancies such as pancreatic carcinoma, breast carcinoma, and malignant melanoma [13, 50–52]. Their increased levels found in sera from pancreatic cancer patients also correlated with a loss of CD3 ζ in TIL [50], which is predictive of a poor prognosis and survival in patients with cancer [53]. These contributions led us to analyze TGF- β 1 and IL-10 effects on proliferation and CD3 ζ protein expression of T cells from healthy donors. These cytokines contained in supernatants from HPV⁺ CC cell lines inhibited T cell proliferation. Also, rhTGF- β or rhIL-10 inhibited both T cell proliferation and CD3 ζ expression. Moreover, a prolonged exposure of PBL to these cytokines caused a continued low expression of CD3 ζ protein. Therefore, IL-10 and TGF- β 1 seem to be highly involved in the low PBL proliferation and CD3 ζ expression in women with CC. Thus, antigen-specific immune responses through TCR are highly affected due to the lack of CD3 ζ expression. Further research will determine the particular role of these cytokines in T cell function of cancer pathologies.

So far, it is known that HPV can enhance the expression of cytokines such as TGF- β 1 or IL-10, which inhibit T cell functions and augment viral proteins, contributing to the persistence and progression of HPV-related cervix lesions to CC. For example, HPV-16 E7 transcription is up-

regulated by IL-10 [54] and regulatory elements in the promoter of the human TGF- β 1 gene are recognized indirectly by the HPV-16 E6 oncoprotein [55]. Therefore, we have contributed to the elucidation of a probable mechanism for the low T cell response related to the absent expression of CD3 ζ in women with CC. Moreover, it was shown that not only TIL but PBL from these patients also have evident functional alterations regardless of the fact that PBL are far away from tumor. Hence, one might hypothesize that the competence of PBL is a reliable measure of the type and quality of immune responses that are present at the cervical lesions. Thus, lymphoproliferative responses to specific HPV peptides appear to be associated with the clearance of the infection and the regression of SIL [56]. In contrast, low proliferation, low CD3 ζ expression, and altered cytokine expression generate a more severe immune impairment characterized by dysfunctional alterations of T cells such as anergy, prevalence of Th2, or Treg cells that greatly favor tumor development. Therefore, future efforts to eradicate SIL or tumors from cervix need to be combined with immunotherapies that not only eliminate the virus but also the altered immune response that its presence causes. Besides, some immune parameters of PBL such as CD3 ζ expression can be used as a prognostic marker of the T cell immune status in women with high-grade SIL or CC.

Acknowledgments We are grateful to the volunteers participating in this study as well as the staff of the Departments of Pathology and Surgery from the general hospitals. We also appreciate the kindness of Dr. Celso Ramos (INSP) and Dr. Raúl Barrera (INER) for sharing some instruments for the proliferation technique; the willingness to share some technical tips for TIL isolation of Dr. Llorente (INNSSZ); and the technical advice of Milena Saki and Hector Maldonado (INNSSZ), Patricia Rojo and Gibrán Pérez (Dr. Morenos's lab), and Carla Olivia (INSP). This work was supported by the Instituto Nacional de Salud Pública in Mexico and grants from CONACYT-SEP 49574-24483-M, Mexico. C.E. Díaz Benítez was a recipient of a fellowship from CONACYT. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD. degree of Díaz Benítez C. E. from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.

References

- Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3:619–26.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12–9. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- Melbye M, Palefsky J, Gonzales J, Ryder LP, Nielsen H, Bergmann O, Pindborg J, Biggar RJ. Immune status as a

- determinant of human papillomavirus detection and its association with anal epithelial abnormalities. *Int J Cancer*. 1990;46:203–6. doi:10.1002/ijc.2910460210.
4. Gentile G, Formelli G, Orsoni G, Rinaldi AM, Busacchi P. Immunosuppression and human genital papillomavirus infection. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1991;12:79–81.
 5. Nasiell K, Nasiell M, Vačlavinková V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol*. 1983;61:609–14.
 6. Park TK, Kim SN. Cell-mediated immunity in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Yonsei Med J*. 1989;30:164–72.
 7. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003;4:835–42. doi:10.1038/ni969.
 8. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006;24:677–88. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002.
 9. Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med*. 2006;64:4–9.
 10. Robertson SJ, Hasenkrug KJ. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28:51–62. doi:10.1007/s00281-006-0019-2.
 11. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001;167:2972–8.
 12. Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol*. 2006;19:481–91. doi:10.1089/vim.2006.19.481.
 13. Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor- β and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol*. 1999;155:537–47.
 14. Inge TH, McCoy KM, Susskind BM, Barrett SK, Zhao G, Bear HD. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β on T lymphocytes. Induction of CD8 expression in the CTLL-2 cell line and in normal thymocytes. *J Immunol*. 1992;148:3847–56.
 15. Espevik T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM, Palladino MA. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor- β . *J Exp Med*. 1987;166:571–6. doi:10.1084/jem.166.2.571.
 16. Edwards RP, Kuykendall K, Crowley-Nowick P, Partridge EE, Shingleton HM, Mestecky J. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion. *Cancer*. 1995;76:1411–5. doi:10.1002/1097-0142(19951015)76:8<1411::AID-CNCR2820760817>3.0.CO;2-V.
 17. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drjfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. High number of intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res*. 2007;67:354–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3388.
 18. Kuss I, Saito T, Johnson JT, Whiteside TL. Clinical significance of decreased ζ chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5:329–34.
 19. Kono K, Rensing ME, Brandt RM, Melief CJ, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing ζ chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1825–8.
 20. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Peccatori F, Gallee MP, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Aarbiou J, Mulder WM, Walboomers JM, Meijer CJ, van de Vange N, Scheper RJ. Expression of CD3- ζ on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer*. 1999;79:1127–32. doi:10.1038/sj.bjc.6690179.
 21. Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell*. 1991;64:875–8. doi:10.1016/0092-8674(91)90310-U.
 22. Whiteside TL, Miescher S, MacDonald HR, Von Fliedner V. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. A comparison between velocity sedimentation and discontinuous density gradients. *J Immunol Methods*. 1986;90:221–33. doi:10.1016/0022-1759(86)90079-7.
 23. de Gruijl TD, Bontkes HJ, van den Muysenberg AJ, van Oostveen JW, Stukart MJ, Verheijen RH, van der Vange N, Sniijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, Scheper RJ. Differences in cytokine mRNA profiles between pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer*. 1999;35:490–7. doi:10.1016/S0959-8049(98)00371-2.
 24. Bañuelos A, Reyes E, Ocadiz R, Alvarez E, Moreno M, Monroy A, Gariglio P. Neocarzinostatin induces an effective p53-dependent response in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:671–80. doi:10.1124/jpet.103.051557.
 25. Santín AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP, Hermonat PL. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR⁺ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2001;81:424–32. doi:10.1006/gyno.2001.6200.
 26. Verduzca-Rodríguez LA, Palet-Guzmán JA, Aguirre-González H, González-Puebla E. Cervico-uterine cancer and age. *Ginecol Obstet Mex*. 1997;65:119–22.
 27. Matour D, Melnicoff M, Kaye D, Murasko DM. The role of T cell phenotypes in decreased lymphoproliferation of the elderly. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;50:82–99. doi:10.1016/0090-1229(89)90224-9.
 28. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:742–80.
 29. Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G, Buzzonetti A, Legge F, Salutari V, Scambia G. Lymphocyte composition of tumor draining lymph nodes from cervical and endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol*. 2004;92:106–15. doi:10.1016/j.ygyno.2003.09.020.
 30. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattini D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:245–50. doi:10.1093/jnci/89.3.245.
 31. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Sniijders PJ, Helmerhorst TJ. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol*. 2005;58:1096–100. doi:10.1136/jcp.2004.025072.
 32. Castle PE, Hildesheim A, Bowman FP, Strickler HD, Walker JL, Pustilnik T, Edwards RP, Crowley-Nowick PA. Cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin Immunol*. 2002;22:23–7. doi:10.1023/A:1014252402630.
 33. Gey A, Kumari P, Sambandam A, Lecuru F, Cassard L, Badoual C, Fridman C, Nagarajan B, Fridman WH, Tartour E. Identification and characterisation of a group of cervical carcinoma patients with profound downregulation of intra-

- tumoral type 1 (IFN γ) and Type 2 (IL-4) cytokine mRNA expression. *Eur J Cancer* 2003;39:595–603. doi:10.1016/S0959-8049(02)00839-0.
34. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MGA. CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737–42. doi:10.1038/39614.
 35. Robertson SJ, Hasenkrug KJ. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28:51–62. doi:10.1007/s00281-006-0019-2.
 36. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:338–44. doi:10.1038/nri1180.
 37. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198:1875–86. doi:10.1084/jem.20030152.
 38. Yamagishi S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;166:7282–9.
 39. Baniyash M. TCR ζ -chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:675–87. doi:10.1038/nri1434.
 40. Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, Shiraishi K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Abe T, Takeuchi T. TCR ζ mRNA splice variant forms observed in the peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28:185–93. doi:10.1007/s00281-006-0035-2.
 41. Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor ζ -chain. *Cancer Res*. 1999;59:1422–7.
 42. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 ζ chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13119–24. doi:10.1073/pnas.93.23.13119.
 43. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*. 2006;176:6752–61.
 44. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3 ζ chain expression by L-arginine. *J Biol Chem*. 2002;277:21123–9. doi:10.1074/jbc.M110675200.
 45. Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 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 Sci*. 2007;98:874–81. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00470.x.
 46. Sales KJ, Katz AA, Davis M, Hinz S, Soeters RP, Hofmeyr MD, Millar RP, Jabbar HN. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:2243–9. doi:10.1210/jc.86.5.2243.
 47. Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E₂-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res*. 2005;65:5211–20. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0141.
 48. Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res*. 2007;67:3976–85. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4273.
 49. Tjong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MPM, ten Kate FWJ, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine*. 2001;14:357–60. doi:10.1006/cyto.2001.0909.
 50. von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Jöhnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7:925s–32s.
 51. Kong FM, Ancher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor- β ₁ levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg*. 1995;222:155–62. doi:10.1097/0000658-199508000-00007.
 52. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Bröcker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res*. 1995;5:67–8. doi:10.1097/00008390-199502000-00008.
 53. Whiteside TL. Down-regulation of ζ -chain expression in T cell: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53:865–78.
 54. Arany I, Grattendick KG, Tying SK. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res*. 2002;55:331–9. doi:10.1016/S0166-3542(02)00070-0.
 55. Peralta-Zaragoza O, Bermudez-Morales V, Gutierrez-Xicotencatl L, Alcocer-Gonzalez J, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor β 1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. *Viral Immunol*. 2006;19:468–80. doi:10.1089/vim.2006.19.468.
 56. Kadish AS, Ho GY, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1285–93. doi:10.1093/jnci/89.17.1285.

Reprinted from:

UICC World Cancer Congress

Free Papers

Washington, D.C. (USA), July 8-12, 2006

MEDIMOND

INTERNATIONAL PROCEEDINGS

TGF- β 1 and IL-10 Inhibit T Lymphocytes Proliferation and CD3- ζ Expression in Cervical Cancer Women

CE. Díaz-Benítez¹, JA. Flores-Sosa¹, KR. Navarro-Fuentes¹, J. Juárez-Díaz¹, AD. Vázquez-Cruz¹, G. Fernández-Tilapia¹, G. López-Estrada², P. Alonso de Ruíz³, E. Román-Basaure³, LE. González-Mena³, FJ. Uribe-Salas¹, J. Martínez-Bartnetche¹, A. Lagunas-Martínez¹, VH. Bermúdez-Morales¹, J. Moreno-Rodríguez⁴, R. Hernández Pando⁵, Y. Rosenstein-Asoulay⁶, JM. Alcocer-G.¹ and V. Madrid-Marina¹

¹National Institute of Public Health, Chronic Infections and Cancer Division, CISEI, Universidad Avenue #655, Sta. Ma. Ahuacatitlán, Cuernavaca, Morelos, México 62508; ²General Hospital, Cuernavaca, ³General Hospital, México City; ⁴Siglo XXI Medical Center, México City; ⁵INNNSS, México City; ⁶IBT-UNAM, Cuernavaca

Summary

Cervical cancer (CC) is partly due to the failure of immune response to eliminate tumoral cells. Altered T lymphocytes response has been found in these women. The mechanism for T lymphocytes impairment remains unknown. Overexpression of TGF- β and IL-10 in CC biopsies may implicate an action of these cytokines on T lymphocytes response. We also found TGF- β 1 and IL-10 mRNA expression in CC biopsies. Low peripheral T lymphocytes proliferation and CD3- ζ (a protein for T lymphocytes activation) mRNA expression occur in Mexican women with CC. Furthermore, incubation of peripheral T lymphocytes from healthy donors with rhTGF- β 1 and rhIL-10 affect cells proliferation and CD3- ζ protein expression. These results suggest that TGF- β 1 and IL-10 may affect T lymphocytes proliferation and CD3- ζ expression in women with CC.

Introduction

Cervical cancer continues affecting primary women from undeveloped

countries. Several epidemiological studies have established a strong relation between the human papillomavirus (HPV) and development of CC¹⁻². It seems that immune response plays a crucial role in the control of HPV infections and CC progression. The switch from a Th1 to Th2 cytokine profile in peripheral blood and a decreased peripheral T lymphocytes response to HPV proteins, are associated with a recurrence of cervical intraepithelial neoplasia and CC³⁻⁴. Low expression of CD3- α is also found in women with CC⁵. Several reports including the present work show that TGF- β and IL-10 are highly expressed in cervical tumors⁶⁻⁷ suggesting an action of these cytokines on T lymphocytes response. Thus, TGF- β and IL-10 could affect CD3- ζ expression and T lymphocytes proliferation. In order to validate this hypothesis, the proliferative response and CD3- ζ expression of peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy donors was analyzed after incubating cells with human recombinant TGF- β 1 and IL-10 proteins as well as in PBL from women with CC. Results obtained indicate that TGF- β 1 and IL-10 may play a role in T lymphocytes proliferation and activation in women with CC.

Materials and Methods

Patients and samples. 71 women with CC (the General Hospitals in Mexico-City and Cuernavaca-Morelos, and the Institute of Cancer in Acapulco-Guerrero) participated in this study. Blood and cervix biopsies were collected before treatment. A cervix sample was obtained with cytobrush of 20 healthy women from 42 women as the control group.

Samples processing. Mononuclear cells were purified from peripheral blood by using Ficoll-Hypaque gradient. Cells were grown in supplemented RPMI medium (100 U/ml penicillin-streptomycin and 10% fetal bovine serum). Biopsies were digested with proteinase K at 37°C ON for RNA isolation.

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay of IL-10, TGF- β 1 and CD3- ζ . Trizol reagent was added to digested biopsies and PBL (stimulated for 15 h with anti-CD3). Primers sequences for CD3- α were: 5'CTCTGCTACCTGCTGGATGGAA3' and 5'ATGTGAAGGGCGTCGTAGGT3'. Primers sequence and conditions for IL-10, TGF- β 1 and the human housekeeping gene β -2 microglobulin were previously reported⁷. Similar conditions were used for CD3- ζ . The amplification products were resolved by 6% PAGE and visualized by UV.

Proliferation assays. 8×10^4 PBL/well were stimulated with 0.5 μ g/ml anti-CD3 in 200 μ l of 10% RPMI, in 96-well round-bottom microtiter plates, for 72 h at 37°C in 5% CO₂. rhTGF- β 1 or rhIL-10 was added to cells from healthy donors at the beginning of culture. 12 h before harvest, 1 μ Ci/well of ³H-Thymidine was added. ³H-Thymidine incorporation was measured in a liquid scintillation counter.

Western Blot (WB) analysis. 1×10^6 PBL from healthy donors were lysed.

TABLE 1. Presence of IL-10 and TGF- β 1 mRNA in women with cervical cancer.

Cytokines	Biopsies from Cervix		Peripheral T lymphocytes	
	Healthy Women (n=20)*	Women with Cervical Cancer (n=50)*	Healthy Women (n=22)*	Women with Cervical Cancer (n=21)*
IL-10**	0%	84%	68%	19%
TGF- β 1**	8 %	92%	73%	57%

* Number of women analyzed.

** RT-PCR analysis of Cytokines.

30 μ g total protein were resolved by 12% SDS-PAGE and WB. Membranes were incubated with the mouse mAb human anti-CD3- ζ (Santa Cruz) and a peroxidase coupled secondary goat Ab mouse anti-IgG (DAKO). Protein was detected by Chemiluminescence.

Results and conclusions

Presence of TGF- β 1 and IL-10 mRNA in biopsies of women with CC. To confirm that TGF- β 1 and IL-10 are expressed in Mexican women with CC, we analyzed mRNA expression by RT-PCR in cervix biopsies and stimulated PBL. The results showed a higher frequency of TGF- β 1 and IL-10 mRNA on biopsies from women with CC than on samples from controls. Different results were found in PBL (Table 1).

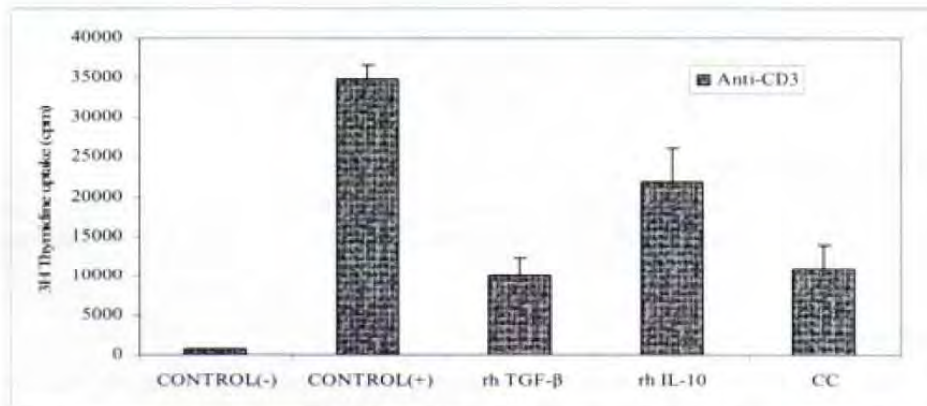


Fig. 1. TGF- β 1 or IL-10 effect on peripheral T lymphocytes. 8×10^6 healthy donors' PBL (n=6) were cultured in RPMI 10% and stimulated with (control +) or without (control -) 0.5 μ g/ml anti-CD3 and the presence of 32.5 pg/ml rhTGF- β 1 or 18 pg/ml rhIL-10. PBL from women with cervical cancer (CC) were also stimulated with anti-CD3. Cells were incubated during 72 h at 37°C in 5% CO₂. [³H] Thymidine incorporation by cells was assayed at the last 12 h. Results represent the mean cpm of triplicate wells \pm SD (error bar).

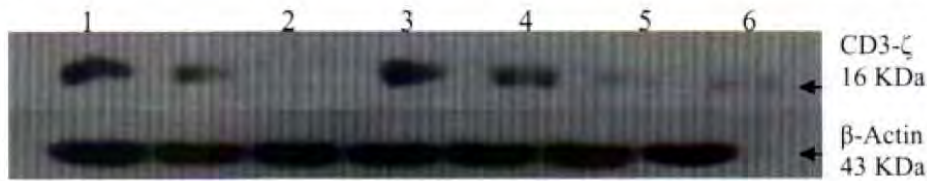


Fig. 2. CD3- ζ protein downregulation by rhTGF- β 1 and rhIL-10 in T lymphocytes from healthy donors. Cells were incubated for 16 h as described above. Total protein was obtained and CD3- ζ expression was analyzed by Western Blot. 1) Unstimulated cells; 2-3) Unstimulated cells with rhTGF- β 1 (65 ng/ml) and rhIL-10 (65 ng/ml), respectively; 4) Stimulated cells with anti-CD3 (0.5 μ g/ml); 5-6) Stimulated cells with rhTGF- β 1 and rhIL-10, respectively. β -actin was analyzed as control

Role of TGF- β 1 and IL-10 on T lymphocytes proliferation. To evaluate the action of TGF- β 1 and IL-10 on T lymphocytes proliferation, PBL from healthy donors were stimulated with anti-CD3 in the presence of rhTGF- β 1 or rhIL-10. Results showed that rhTGF- β 1 is more effective in inhibiting T lymphocytes proliferation than rhIL-10 (Fig. 1). When we analyzed the proliferative state of PBL from patients, we found similar results as those observed in T lymphocytes from healthy donors incubated with rhTGF- β 1 (Fig. 1).

Effect of TGF- β 1 and IL-10 on CD3- ζ protein expression. To analyze the effect of rhTGF- β 1 or rhIL-10 on CD3- ζ protein expression, PBL from healthy donors were incubated in the presence of rhTGF- β 1 or rhIL-10. Both cytokines inhibited CD3- ζ protein expression when cells were stimulated with anti-CD3 (Fig. 2). We also found a low CD3- ζ mRNA expression in PBL from patients (Data not shown). In conclusion, these results strongly suggest that TGF- β 1 and IL-10 could be implicated in the low T lymphocytes response of patients with CC, by affecting CD3- ζ expression.

Acknowledgments

This work was supported by a grant No. 1018-M911 from CONACYT in Mexico and a fellowship No. 153082 from CONACYT (UNAM) to Cinthya E. Díaz Benítez.

References

1. Walboomers JM. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189: 12-9; 1999.
2. Bosch FX. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 5: 244-265; 2002.
3. Sarkar AK. *et al.* Inverse correlation of cellular immune responses specific to synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 with recurrence

- of cervical intraepithelial neoplasia in a cross-sectional study. *Gynecol. Oncol.* 99: S251-61; 2005.
4. Bais AG. *et al.* A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J. Clin. Pathol.* 58: 1096-1100; 2006.
 5. K. Kono. *et al.* Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 2: 1825-1828; 1996.
 6. Sheu BC. *et al.* Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J. Immunol.* 167: 2972-2978. 2001.
 7. Alcocer-González JM. *et al.* *In vivo* expression of immuno-suppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cancer cells. *Viral Immunology.* 19: 481-491, 2006.