



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES PROVENIENTES DE CÁNCER DE CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

HERNÁNDEZ ESTÉVEZ ERIKA HAYDÉ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ABRIL, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 15 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **HERNÁNDEZ ESTÉVEZ ERIKA HAYDÉ** con número de cuenta **96392780**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE CÁNCER DE CÉRVIX"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**:

Presidente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Vocal: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
Secretario: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
Suplente: DR. NESTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de marzo de 2016

M. del Coro Arizgandi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por el apoyo recibido durante mis estudios de Maestría
- Al CONACYT por la beca y el apoyo recibidos para la realización de esta tesis (Clave: 545277/294515).
- Al Programa para la Formación de Investigadores y al Fondo de Investigación en Salud, IMSS (Claves: 038 y 1411) por el apoyo recibido durante mi estancia en el instituto.
- A la Dra. Ma. De Lourdes Mora García y al Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá, miembros de mi Comité Tutorial, quienes con sus aportaciones enriquecieron este trabajo.

- Al Dr. Juan José Montesinos por permitirme ser parte de su grupo de investigación.
- Al Dr. Héctor Mayani por su liderazgo y la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en la UIMEO.
- A la Dra. Marta Elena Castro Manreza por todo su ayuda en la realización de los co-cultivos, las determinaciones de citocinas y en el citómetro de flujo y su análisis.
- A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano y al M. en C. Esteban Domínguez Cerezo por su apoyo en el citómetro de flujo.
- A la Dra. Karina Chávez y la Dra. Victoria Legorreta por su ayuda en las determinaciones de citocinas y PGE₂.
- A la laboratorista Martina Flores por su apoyo en el laboratorio.

Otra meta alcanzada..

Otro sueño cumplido

**Para mi complicada y excéntrica pero amorosa familia...
este logro también es suyo, gracias por caminar junto a mí.**

Los quiero.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Cáncer de Cérvix.....	3
1.1 Carcinoma Epidermoide.....	5
1.2 Adenocarcinoma.....	7
1.3 Respuesta inmune en pacientes con cáncer de cérvix.....	8
1.4 Evasión inmune de los tumores cervicales.....	9
2. Microambiente tumoral.....	11
3. Células Troncales Mesenquimales y Microambiente Tumoral.....	15
3.1 Células Troncales Mesenquimales.....	15
3.2 MSCs e Inmunosupresión.....	20
3.3 MSCs y Cáncer.....	25
4. MSCs en Cérvix.....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	32
METODOLOGIA.....	33
RESULTADOS.....	40
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	68
PERSPECTIVAS.....	69
LITERATURA CITADA.....	70

ABREVIATURAS

Aden.	Adenocarcinoma
ADN.	Ácido Desoxirribonucleico
Ang.	Angiopoyetina
APC.	Célula Presentadora de Antígeno
ARN.	Ácido Ribonucleico
BMP-4.	Proteína Morfogenética de hueso 4
CaCe.	Cáncer de Cérvix
CAF.	Fibroblasto asociado a cáncer
CeN.	Cérvix Normal
cFLIP.	Proteína Inhibidora FLICE
CFSE.	Carboxifluoresceína
CFU-F.	Unidad Formadora de Colonias
CMNs.	Células Mononucleares
CPH.	Células Progenitoras Hematopoyéticas
CTH.	Células Troncales Hematopoyéticas
CTL.	Linfocitos T Citotóxicos
DC.	Célula Dendrítica
EGF.	Factor de Crecimiento Epidermal
Epi.	Carcinoma Epidermoide
FGF.	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
HGF.	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HO-1.	Hemo-oxigenasa-1
IDO.	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFNγ.	Interferón gamma
IGF.	Factor de Crecimiento tipo Insulina
IL.	Interleucina
IMF.	Intensidad Media de Fluorescencia
KGF.	Factor de Crecimiento de Keratinocitos
LB.	Linfocito B
LCR.	Región de Control Grande
LIF.	Factor Inhibidor de Leucemia
LT.	Linfocito T
MEC.	Matriz Extracelular
MHC.	Molécula de Histocompatibilidad
MMP.	Metaloproteinasa de Matriz
MO.	Médula Ósea
MSC.	Células Troncales Mesenquimales
N/C.	Relación Núcleo:Citoplasma
NK.	Célula asesina natural
NO.	Óxido Nítrico
OSM.	Oncostatina M
PDGF-R.	Receptor Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PD-1.	Receptor de Muerte Programada 1

PD-L1.	Ligando 1 de Muerte Programada
PGE₂.	Prostaglandina E ₂
PHA.	Fitohepatoglutinina
SCF.	Factor de Células Troncales
SDF-1.	Factor Derivado del Estroma
SFB.	Suero Fetal Bovino
TAMs.	Macrófagos Asociados al Tumor
TGF-β.	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TLR.	Receptores tipo Toll
TNF-α.	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
Treg.	Linfocito T regulador
VEGF.	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VPH.	Virus de Papiloma Humano
Wnt.	Homólogo Mamífero de Drosophila Wingless
α-SMA.	Alfa Actina del Musculo Liso

RESUMEN

El Cáncer de Cérvix (CaCe) es un problema de salud pública, dado que es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos en mujeres, tanto a nivel mundial, como en México. El carcinoma epidermoide (Epi) y el adenocarcinoma (Aden) son los más comunes en la población de nuestro país con una frecuencia de aproximadamente el 80% y el 15% respectivamente. El principal agente inductor de este tipo de cáncer es la infección por virus del papiloma humano (VPH), sin embargo en los últimos años se ha demostrado la colaboración del microambiente tumoral en el crecimiento de las células malignas infectadas. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que las Células Troncales Mesenquimales (MSCs) son parte del microambiente tumoral en CaCe y que participan favoreciendo el crecimiento de las células malignas, mediante la disminución de la actividad citotóxica de los linfocitos T sobre estas células. Además, se ha demostrado que las MSCs provenientes de Médula Ósea (MO) afectan la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, principalmente mediante la producción de moléculas inmunosupresoras.

Con la finalidad de contribuir al estudio del microambiente tumoral en CaCe y como las MSCs afectan el comportamiento de los linfocitos T, en este trabajo se analizó la capacidad de las MSCs de Epi y Aden para disminuir la proliferación de linfocitos T, su efecto sobre marcadores de activación y la expresión de moléculas inmunosupresoras de membrana y secretadas.

De esta forma, este estudio muestra que las MSCs provenientes de Epi y Aden no tienen la capacidad de inmunosuprimir a los linfocitos T.

ABSTRACT

Cervical Cancer is a public health problem, since it is the second leading cause of death from cancer diseases in women, both globally and in Mexico . Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma are the most common in the population of our country at a rate of approximately 80% and 15% respectively. The main inducing agent this cancer is infection with human papilloma virus, however in recent years has been shown the tumor microenvironment collaboration in the growth of malignant cells infected. Our research group has demonstrated that mesenchymal stem cells (MSCs) are part of the cells comprising the tumor microenvironment involved in CaCe and encouraging the growth of malignant cells, by reducing the cytotoxic activity of T lymphocytes on these cells. Furthermore it has been shown that MSCs derived from bone marrow (MO) affect the proliferation and differentiation of T lymphocytes, primarily by producing immunosuppressive molecules.

In order to contribute to the study of the tumor microenvironment in CaCe and how MSCs affect the behavior of T cells, in this work we analyzed the ability of MSCs from Epi and Aden to reduce the proliferation of T lymphocytes, its effect on activation markers and the expression of immunosuppressive molecules both secreted and in the membrane.

Thus, this study shows that MSCs from Epi and Aden not have the ability to immunosuppress T lymphocytes

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE CÉRVIX

En la mayoría de los casos el cáncer de cérvix es causado por el Virus del Papiloma Humano (VPH) el cual es el segundo cáncer más común en mujeres (Walboomers et al, 1999; Bosch et al, 2002; Parkin et al, 2005). El VPH16 es el tipo de alto riesgo con mayor prevalencia en el mundo, siendo el VPH18 el segundo lugar. El VPH posee una estructura icosaédrica de 72 capsómeros, con 60 hexámeros y 12 pentámeros, con un diámetro de aproximadamente 55 nanómetros que contiene el genoma viral (Fig.1); (Hebner y Laiminis, 2006).



Figura 1. Virus del Papiloma Humano. Estructura icosaédrica de 72 capsómeros. (Tomado de http://www.cervicalcancerinfo.co.uk/images/hpv_virus.jpg)

El VPH es un virus con un ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena (7-8 kb), el cual infecta las capas basales de la epidermis y el epitelio mucoso. El genoma del VPH se divide en tres regiones: la región de control grande (large control región, LCR) que no contiene ningún marco de lectura; la región que corresponde a las proteínas tempranas (early región, E1 a E7) y la región correspondiente a las proteínas tardías (late región, L1 y L2) (Fig. 2) (McMurray et al, 2001). El ciclo viral está estrechamente ligado al ciclo de vida de la célula hospedera. En las capas basales se expresan los genes tempranos inductores de proliferación lo que resulta en la expansión lateral de células infectadas. Después de entrar en las capas suprabasales los genes virales responsables de la replicación viral, expresan las proteínas estructurales y de ensamblaje viral. Subsecuentemente, se liberan partículas infecciosas (Zur Hausen 1996; Zur Hausen, 2002).

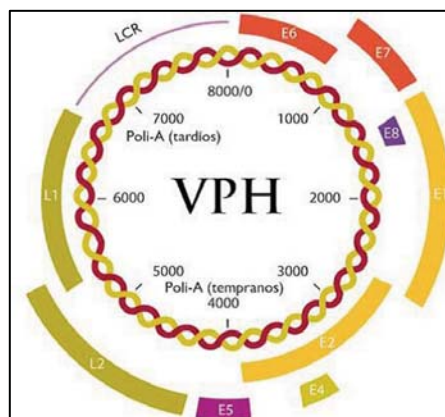


Figura 2. Genoma del VPH. Región de Control Grande (LCR), Región de Transcripción Temprana (ER) que contiene los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y la Región de Transcripción Tardía (LR) con los genes L1 y L2 que constituyen la cápside (Tomado de Muñoz et al, 2006).

Las proteínas virales E6 y E7 interactúan con múltiples proteínas del hospedero para promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis. E6 promueve la degradación de p53 y BAK, por lo que inhibe la apoptosis (Werness et al, 1990; Jackson et al, 2000). Y promueve la activación de la telomerasa (Veldman et al, 2001). E7 interactúa con las proteínas de la familia de retinoblastoma lo que potencia la proliferación celular (Dyson et al, 1989). Y estimula las ciclinas A y E promoviendo la progresión G0/G1 (Zerfass et al, 1995).

La progresión de la infección por VPH a cáncer de cérvix es un proceso que puede dividirse en 4 estadios (Fig. 3). El primero comprende la infección con VPH, en la mayoría de los individuos infectados el virus es eliminado en dos años. Sin embargo, el virus persiste en alrededor del 10% de las infecciones. El segundo estadio es la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, se caracteriza por displasia leve debida a la progresión de células con infección persistente a cáncer. Esta lesión puede progresar a una lesión escamosa intraepitelial de alto grado que se caracteriza por displasia moderada a carcinoma *in situ* (estadio tres). Esta lesión puede progresar al cuarto estadio, carcinoma invasivo (Shiffman et al, 2007).

Durante la transformación maligna, el DNA del VPH se integra al genoma del hospedero (Schwarz et al, 1985; Wentzensen et al, 2004). La integración del DNA viral se asocia con la transición en carcinoma invasivo (Hopman et al, 2004). Durante la inserción

en el DNA hospedero, el DNA integrado esta completo o sufre una pérdida parcial de genes virales. La pérdida de E1, E2, E4, E5 y L2 es frecuente, lo que incrementa el potencial de inmortalización de E6 y E7 (Zur Hausen et al, 1996; Chen et al, 1994) las cuales son esenciales en el mantenimiento del fenotipo maligno de las células tumorales y por lo tanto se expresan en todas estas (Goodwin y DiMaio, 2000).

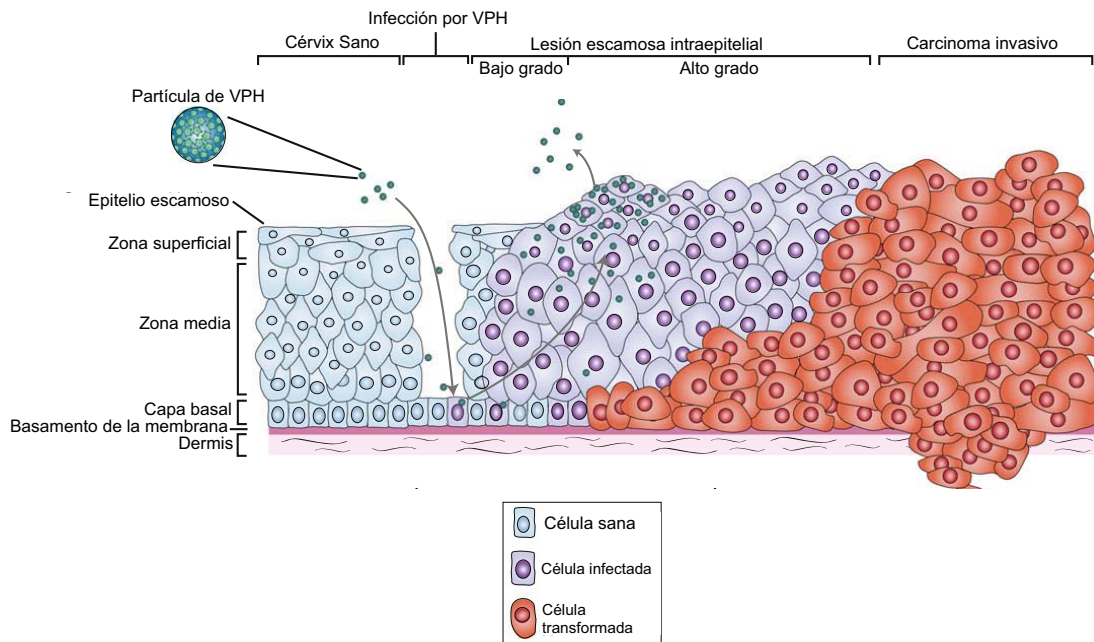


Figura 3. Progresión de la infección por VPH. 1. Infección por VPH. 2. Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. 3. Lesión escamosa intraepitelial de alto grado. 4. Carcinoma invasivo. (Modificado de Woodman et al, 2007).

1.1 Carcinoma Epidermoide

El carcinoma epidermoide infiltrante del cérvix uterino es la transformación neoplásica del epitelio escamoso en su estadio final (Fig. 4). Constituye el 70% de los tumores del cérvix y es el segundo más frecuente en la mujer. La edad media de las pacientes es de 50 años pero el rango es de 17-70 años de edad.

Hay dos variantes morfológicas en el carcinoma epidermoide o escamoso, queratinizante y no queratinizante. El sistema Bethesda no divide ambas variantes aunque tienen citologías distintas. El carcinoma escamoso no queratinizante se caracteriza por frotis con células aisladas y grupos que forman sincicios. Estas células son inmaduras con relación núcleo/citoplasma (N/C) alta. Una característica nuclear importante es la presencia

de nucléolo prominente, distribución irregular de la cromatina y una envoltura nuclear irregular. Hay mitosis, algunas anormales y un fondo diatésico tumoral necrótico. Las características citológicas del carcinoma escamoso queratinizante son la presencia de células aisladas y ocasionales grupos con marcada variación de la morfología, algunas de las cuales son alargadas y en forma de “renacuajo” y citoplasmas densos eosinófilos, núcleos opacos y alta relación N/C. Características que sugieren carcinoma invasivo son, la presencia de macronúcleolos en las células con núcleos con cromatina más dispersa y fondo diatésico tumoral (García et al, 2008).

Desde el punto de vista histológico existen tres tipos:

1. Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizante. Es el más frecuente. Aunque es el de mejor pronóstico este tipo tumoral debe valorarse en función de otros aspectos como el grado de invasión e infiltración en estructuras vecinas.
2. Carcinoma epidermoide de células grandes queratinizante. Constituye el 20% de los casos.
3. Carcinoma epidermoide de células pequeñas. Es el menos frecuente y el de peor pronóstico.

Citología. Las lesiones suelen ser evidentes clínicamente y no necesitan citología para el diagnóstico, sino biopsia. Sin embargo, en ocasiones la localización de las mismas no las hace fácilmente visible a la exploración. La existencia de necrosis, detritus celulares y sangre, dificulta la visualización de células neoplásicas.

1. Carcinoma queratinizante de células grandes. Células escamosas queratinizantes con morfología atípica. Núcleos generalmente grandes e irregulares. Es raro visualizar los nucléolos. Generalmente estas células se presentan aisladas.
2. Carcinoma no queratinizante de células grandes. Grandes grupos de células tumorales con citoplasma basófilo con aumento de la relación N/C. Los núcleos presentan anisotropía; la membrana nuclear es irregular con borde reforzado con marginación de la cromatina, que es granular con bandas gruesas y espacios claros paracromáticos. Pueden observarse macronúcleolos.
3. Carcinoma de células pequeñas. Células sueltas o en grupos, de pequeño tamaño, redondas con relación N/C aumentada, de forma que el citoplasma es muy escaso. Núcleos hipercromáticos sin nucléolo.

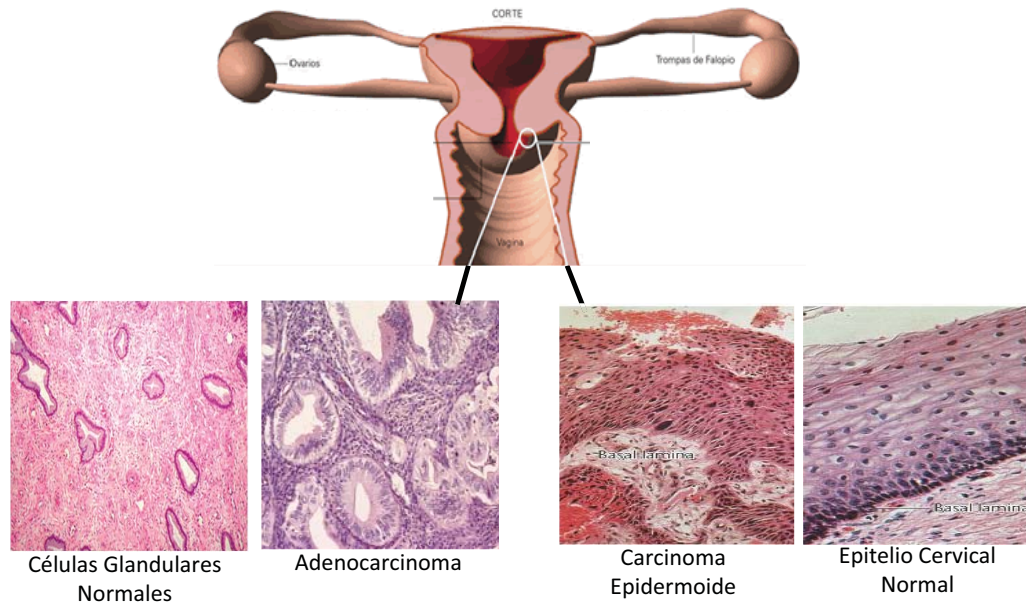


Figura 4. Adenocarcinoma y Carcinoma Epidermoide. El adenocarcinoma se origina en las células glandulares y el carcinoma epidermoide se localiza en las células epiteliales del cérvix (Bar et al, 2001; Walboomers et al,1999; Vizcaino et al, 1998; Lacey et al, 1999).

1.2 Adenocarcinoma

El adenocarcinoma es un tumor compuesto por glándulas de morfología variada que infiltra a través de la pared cervical y está rodeado de un estroma desmoplásico. Las glándulas neoplásicas pueden confluir adoptando un patrón cribiforme y están revestidas por células que contienen mucina en sus citoplasmas y que a menudo se disponen en una única capa, aunque también puede existir una moderada estratificación. Dependiendo del grado de diferenciación del tumor, los núcleos pueden ser de localización basal y estar ligeramente aumentados de tamaño, o pueden estar notablemente agrandados, hipercromáticos y tener nucléolo prominente (Hardisson, 2013) (Fig. 4).

En el adenocarcinoma *in situ* los frotis poseen un fondo inflamatorio (más frecuente) o un fondo limpio. Aparecen placas con abundante celularidad constituidas por células glandulares en cuyos bordes puede verse pseudoestratificación y amontonamiento nuclear (plumaje). Existen un gran número de variedades de adenocarcinoma del endocérvix, pero el más frecuente es el diferenciado con secreción de moco.

El adenocarcinoma infiltrante, puede presentar diversos grados de diferenciación. Cuando está bien diferenciado se asemeja al adenocarcinoma *in situ*; en los casos menos

diferenciados las células forman grupos tridimensionales y son grandes con citoplasma vacuolado y amplio. Los signos que indican infiltración son la diátesis tumoral y los macronucléolos, pero pueden estar ausentes cuando los adenocarcinomas están poco diferenciados.

1.3 Respuesta inmune en pacientes con cáncer de cérvix.

Se ha observado una fuerte respuesta proliferativa de linfocitos T (LT) de memoria específicos de VPH16 E2 y E6 en mujeres sanas negativas para VPH, lo que indica una infección previa. Esta respuesta se acompaña de la producción de interferón γ (IFN γ), interleucina 5 (IL-5) y niveles bajos de IL-10 (de Jong et al, 2002; Welters et al, 2003; de Jong et al, 2004). Se han realizado hallazgos similares para VPH18 (Welters et al, 2006). La presencia de LT específicos de VPH16 E2 se correlaciona con ausencia de progresión en pacientes con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, lo que indica un efecto protector de la inmunidad específico de E2 (Woo et al, 2010).

En contraste, en pacientes con cáncer de cérvix solo se observa una respuesta de LT específicos para VPH en la mitad de los casos con carcinoma invasivo y con lesión escamosa intraepitelial de alto grado. En estos pacientes se observó una débil respuesta proliferativa la cual no se asoció con la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-15 e IFN γ), pero se detectó IL-10 en pacientes con cáncer de cérvix (de Jong et al, 2004; De Vos van Steenwijk et al, 2008). Los reportes indican que una respuesta proliferativa específica de VPH16 es observada ocasionalmente mientras que la respuesta tipo Th1, definida por la producción de IL-2, es baja o esta ausente en pacientes con cáncer cervical (Luxton et al, 2003; de Grujil et al, 1996; de Grujil et al, 1998; Tsukui et al, 1996). Una respuesta específica para VPH16 E6 en pacientes con cáncer de cérvix se asocia con invasión profunda y supervivencia libre de enfermedad (Heusinkveld et al, 2010). Los LT citotóxicos (CTL) específicos para VPH rara vez se detectan en sangre periférica de pacientes con cáncer de cérvix y lesión escamosa de alto grado (Ressing et al, 1996; Bontkes et al, 1996; Nimako et al, 1997; Youde et al, 2000), mientras que esta respuesta es observada frecuentemente en donadoras sanas (Nakagawa et al, 1997; Nakagawa et al, 1999). La falla en la respuesta Th1 de pacientes con cáncer cérvico uterino puede explicar los bajos niveles de CTLs específicos de VPH (Piersma, 2011).

Se ha reportado la infiltración de LT específicos de VPH en neoplasias cervicales y nódulos linfoides (Piersma et al, 2007, Evans et al, 1997; Oerke et al, 2005; Hohn et al, 1999; Hohn et al, 1999). Estos LT infiltrados no son específicos para regiones preferenciales en las proteínas E6 y E7. Las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés: natural killer) parecen tener un papel limitado en la inmunovigilancia del cáncer cervical ya que hay números bajos de células $CD57^+CD3^-$, que abarcan una subpoblación de células NK, infiltrando el tejido tumoral (Jordanova et al, 2008; Piersma et al, 2007). Sin embargo, hay grandes números de este tipo celular en sangre periférica y el sistema linfoide. A pesar de la presencia de LT específicos de VPH en el tejido neoplásico, el sistema inmune es incapaz de eliminar el tumor.

1.4 Evasión inmune de los tumores cervicales.

En muchos tumores las células transformadas han adquirido diversos mecanismos para protegerse de la eliminación por el sistema inmune. Los cuales incluyen:

- A. Disminución en la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC I) y daño en el procesamiento de antígenos para prevenir su presentación.
- B. Resistencia a la apoptosis mediada por el sistema inmune.
- C. Expresión de factores inmunosupresores.
- D. Atracción de células inmunes capaces de inhibir a la respuesta inmune.

La pérdida de antígeno es una característica ausente en casi todos los pacientes, ya que el DNA de VPH puede detectarse en la mayoría de los tumores y el ácido ribonucleico (RNA) de E6 y E7 esta presente en todos los casos de transformación maligna (Walboomers et al, 1999; Stoler et al, 1992; van den Brule et al, 1991).

Las rutas más importantes usadas por los linfocitos para inducir apoptosis en células blanco son la ruta de exocitosis de gránulos y la ruta de FAS/FAS-L (Shresta et al, 1998). Los tumores escapan de estas mediante mecanismos como la sobre-expresión del gen antiapoptotico BCL-2 (Reed et al, 1988), la expresión de inhibidores de FAS-L, la proteína inhibidora FLICE (cFLIP) (Djerbi et al, 1999; Medema et al, 1999), la expresión del inhibidor de granzima B y el inhibidor PI-9 (Medema et al, 2001). cFLIP esta sobre-expresada en tumores cervicales en comparación con cérvix normal (Zhou et al, 2006). Muchos tumores disminuyen la expresión de MHC I para evadir el reconocimiento por el

sistema inmune. Se han observado alteraciones en la ruta de presentación de MHC I en pacientes con cáncer cervical (Koopman et al, 2000).

El ligando 1 de muerte programada (PD-L1) se expresa en una amplia variedad de tumores (Dong et al, 2002). Interactúa con el receptor de muerte programada 1 (PD-1) y CD80 en LT, induciendo apoptosis, anergia o agotamiento de LT efectores (Zou y Chen, 2008; Pentcheva-Hoang et al, 2009). La expresión de PD-L1 en pacientes con cáncer cervical se asocia con una mejora en la supervivencia (Karim et al, 2009). Esto puede explicarse por la incapacitación de LT reguladores PD1⁺ infiltrados a través de la interacción PD1:PD-L1.

Los factores inmunosupresores producidos por las células tumorales pueden contribuir al microambiente inmunosupresor. Estos factores incluyen indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que interfiere con la respuesta inmune inicial a antígenos tumorales, la capacidad citolítica de LT citotóxicos y potencia la capacidad supresiva de LT reguladores (Tregs) en diversos tipos de tumor (revisado en Munn y Mellor, 2007). Se ha demostrado la presencia de IDO en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer de cérvix (Nakamura et al, 2007). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) atrae células dendríticas (DC) inmaduras y macrófagos (Kim et al, 2007). El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) inhibe la respuesta inmune en múltiples niveles (Massague, 2008; Li et al, 2006), lo cual incluye la invasión celular y metástasis (Massague, 2008). En los tumores existe una relación inversa entre la expresión de TGF- β y los linfocitos infiltrados, lo que indica que TGF- β puede impedir la infiltración de linfocitos en cáncer cervical (Hazelbag et al, 2002). VPH induce la producción de factores inmunosupresores, además las proteínas E6 y E7 inhiben el factor regulador de IFN (IRF3 e IRF1, respectivamente; Ronco et al, 1998; Perea et al, 2000). Esto resulta en niveles más bajos de citocinas pro-inflamatorias, que puede ser un mecanismo por el cual el VPH crea un microambiente inmunosupresor (Nees et al, 2001).

Los macrófagos asociados al tumor (TAMs) tienen efectos directos en el crecimiento, vascularización y modulación del estroma tumoral. Además, producen citocinas y quimiocinas. Lo cual altera el fenotipo y modulación de la respuesta de los LT (Mantovani et al, 2002). Los macrófagos CD68⁺ infiltran tumores cervicales y nódulos linfoides metastásicos (Hilders et al, 1995; Zijlmans et al, 2006; Zijlmans et al, 2007). Los

TAMs alcanzan números similares a los LT infiltrados en tumores cervicales (Hilders et al, 1995).

Las células dendríticas (DC) inmaduras son capaces de infiltrar tumores humanos (Revisado en Gabrilovich, 2004), sin embargo, debido a su falta de moléculas coestimuladoras inducen deleción y anergia de LT (Melief, 2008). Tanto en cáncer cervical como en cérvix sano se encuentran números similares de DC inmaduras (Piersma et al 2007; Zijlmans et al, 2006), en contraste el numero de DC maduras se incrementa en el tejido tumoral, lo que indica que estas células se activan en el tumor, pero tienen una capacidad disminuida del migrar fuera del mismo. En nódulos linfoides que drenan este tejido en pacientes con cáncer de cérvix se han encontrado DC expresando IDO (Nakamura et al, 2007), lo que indica que juegan un papel durante el escape inmune.

2. MICROAMBIENTE TUMORAL

Las células tumorales dependen de la matriz extracelular (MEC) para tener un buen funcionamiento. La MEC es un componente del estroma tumoral y consiste de fibras de colágeno, fibronectina y elastina junto con proteoglicanos y polisacáridos (Sironen et al, 2011). La MEC es producida por células residentes, entre sus funciones están: proveer soporte estructural y permitir el tráfico celular, homeostasis, actuar como reservorio de citocinas y factores de crecimiento (Kim et al, 2011). Las células del microambiente tumoral (Fig. 5) tienen la habilidad de remodelar la MEC alterando la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) lo que cambia las interacciones intercelulares o con la propia matriz (Kodoma et al, 2007). Para que las células cancerosas sobrevivan, crezcan y hagan metástasis se debe establecer un microambiente en el cual las células mesenquimales, endoteliales, inflamatorias y la MEC estén funcionalmente organizadas (Nakagawa et al, 2004) (Fig. 5). Las MSCs promueven el crecimiento tumoral e invasión. El versican, un proteoglicano, tiene diversos papeles en la adhesión, proliferación y migración celular; se han encontrado altos niveles de versican en diversos tumores (Ricciardelli et al, 2009). Su expresión se correlaciona con un pronóstico en cáncer de cérvix (Kodama et al, 2007). El cáncer de cérvix está infiltrado con una gran cantidad de leucocitos que responden a la secreción de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas por parte de las células tumorales (Lorusso et al, 2008).

Células tumorales. Son la base de la enfermedad, inician los tumores y llevan a cabo la progresión tumoral, llevando las mutaciones oncogénicas y de supresores tumorales que definen al cáncer como una enfermedad genética. Muchos tumores humanos son histopatológicamente diversos, contienen regiones demarcadas por varios grados de diferenciación, proliferación, vascularidad, inflamación y/o invasividad (Hanahan y Weinberg, 2011).

Células endoteliales. Mucha de la heterogeneidad celular de los tumores se encuentra en sus compartimentos estromales. En donde se localizan las células formadoras de la vasculatura tumoral asociada. Una red de rutas de señalización interconectadas involucran ligandos en células endoteliales (Notch, Neuropilina, Robo y Eph-A/B) se ha adicionado a VEGF, angiopoyetina (Ang) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estas rutas han sido implicadas en la angiogénesis asociada al tumor (Pasquale, 2010; Ahmed y Bicknell, 2009; Dejana et al., 2009; Carmeliet y Jain, 2000). El crecimiento y metástasis tumoral son procesos dependientes de la inducción de angiogénesis. Se forman nuevos vasos sanguíneos para asegurar que las células tumorales reciban suficiente oxígeno y nutrientes (Delli et al, 2010). Los nuevos vasos sanguíneos son tortuosos y están dilatados además de sufrir fugas debido a la falta de la cubierta de pericitos (Raza et al, 2010).

Pericitos. En tejidos sanos proveen señales de soporte parácrino al endotelio que normalmente se encuentra inactivo. Una de estas es Ang-1 que envía señales antiproliferativas, recibidas por receptores Tie-2 en la superficie de las células endoteliales y VEGF que se encarga de mantener la homeostasis endotelial (Gaengel et al., 2009; Bergers and Song, 2005). Los pericitos también colaboran con el endotelio para sintetizar el basamento de la membrana vascular que ancla los pericitos y las células endoteliales y ayuda a los vasos sanguíneos a soportar la presión hidrostática del flujo sanguíneo. La inhibición farmacológica de la señalización del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) expresado por pericitos tumorales y progenitores de pericitos de Médula Ósea (MO) resulta en una cobertura pericitica reducida de los vasos tumorales lo que desestabiliza la integridad y función vascular (Pietras y Ostman, 2010; Raza et al., 2010; Gaengel et al., 2009). Los pericitos de vasos sanguíneos normales no son propensos a tal disrupción. Los tumores con cobertura pobre en su vasculatura son mas propensos a

permitir intravasación de células tumorales en el sistema circulatorio permitiendo la diseminación hematológica (Raza et al., 2010; Gerhardt and Semb, 2008).

Células del Sistema Inmune. Las células del sistema inmune presentes en el microambiente tumoral operan de modos opuestos: se pueden encontrar leucocitos, tanto antagónicos como promotores del tumor en diversas proporciones en la mayoría de las neoplasias (Hanahan y Weinberg, 2011). En el curso de la cicatrización normal y la lucha contra las infecciones, las células inflamatorias inmunes aparecen transitoriamente y desaparecen, en contraste a su persistencia en sitios de inflamación crónica, donde su presencia se asocia a fibrosis, angiogénesis aberrante y neoplasia (Grivennikov et al, 2010; Karin et al, 2006).

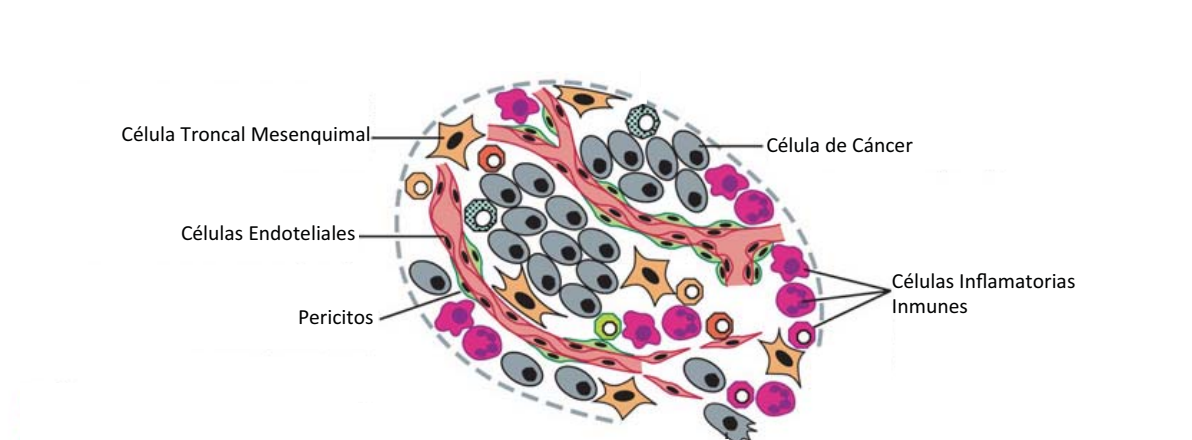


Figura 5. Microambiente tumoral. El microambiente tumoral se compone de diferentes tipos celulares los cuales cumplen una función específica para permitir el desarrollo, supervivencia y metástasis del tumor (Modificado de Hanahan y Weinberg, Cell, 2011).

Las células del sistema inmune promotoras del tumor incluyen macrófagos, células cebadas, neutrófilos, LT y linfocitos B (LB) (Coffelt et al., 2010; Egeblad et al., 2010; Qian y Pollard, 2010; Mantovani, 2010; Joyce y Pollard, 2009; Mantovani et al., 2008; Murdoch et al., 2008; DePalma et al., 2007). Estas secretan factor de crecimiento epidermal (EGF), VEGF, FGF2, entre otras quimiocinas y citocinas que amplifican el estado inflamatorio; además, estas células producen proangiogénicos y/o MMPs como MMP-9, cisteínas, catepsina, proteasas y heparanasas (Qian and Pollard, 2010; Murdoch et al., 2008). Por otro lado inducen y sostienen la angiogénesis tumoral, estimulan la proliferación de las células cancerosas, facilitan la invasión hacia el tejido y soportan la metástasis (Coffelt et al., 2010; Egeblad et al., 2010; Qian y Pollard, 2010; Mantovani, 2010; Joyce y Pollard, 2009;

Mantovani et al., 2008; Murdoch et al., 2008; DePalma et al., 2007). Las células mieloides infiltrantes del tumor (CD11b⁺/Gr1⁺) suprimen la actividad de LT citotóxicos y células NK (Qian y Pollard, 2010; Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009). El reclutamiento de ciertas células mieloides puede beneficiar doblemente al desarrollo tumoral, promoviendo directamente la angiogénesis y progresión tumoral mientras proporciona los medios para evadir la destrucción inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

El sistema inmune detecta y apunta específicamente a los agentes infecciosos mediante la respuesta inmune adaptativa la cual es apoyada por el sistema inmune innato. Además, el sistema inmune innato se involucra en la cicatrización y eliminación de células muertas y detritus celular. Esto es llevado a cabo por macrófagos, neutrófilos y una subclase de macrófagos “alternativamente activados”, neutrófilos y progenitores mieloides comprometidos en cicatrización y limpieza del tejido (Egeblad et al., 2010; Mantovani, 2010; Qian and Pollard, 2010; Johansson et al., 2008). Los progenitores mieloides son una fuente mayor de factores angiogénicos, epiteliales, factores de crecimiento estromal y enzimas remodeladoras de matriz requeridas para la cicatrización y estas células son reclutadas para soportar la progresión neoplásica. Subclases de LT y LB pueden facilitar el reclutamiento, activación y persistencia de los macrófagos y neutrófilos cicatrizadores y promotores de tumor (DeNardo et al., 2010; Egeblad et al., 2010; Biswas y Mantovani, 2010).

Fibroblastos asociados al cáncer. Hay dos subtipos

1. Células similares a los fibroblastos que crean la base estructural que soporta la mayoría de los tejidos epiteliales normales.
2. Miofibroblastos positivos para α -actina del musculo liso (α -SMA), los cuales difieren de los fibroblastos derivados de tejidos.

Los últimos son raros en la mayoría de los tejidos sanos, aunque el hígado y el páncreas contienen células positivas para α -SMA. El número de miofibroblastos aumenta transitoriamente en heridas y sitios de inflamación crónica. Estas células contribuyen a la fibrosis patológica durante la inflamación crónica observada en pulmón, riñón e hígado. Los miofibroblastos y variantes de fibroblastos derivados de tejidos normales potencian los fenotipos tumorales, la proliferación de células malignas, la angiogénesis y la invasión y

metástasis. Secretan componentes de la MEC y están implicados en la formación de estroma desmoplásico que caracteriza muchos carcinomas avanzados.

3. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES Y MICROAMBIENTE TUMORAL.

3.1 Células Troncales Mesenquimales (MSC).

Las Células Troncales Mesenquimales (MSC) son células clonogénicas, que además de originar células del mesodermo (osteoblastos, condrocitos, células endoteliales), se diferencian en células ectodermales (células neuronales; Kassem, 2004) y endodermales (células pulmonares y pancreáticas). Son adherentes, no fagocíticas, con morfología fibroblastoide y capaces de mantener la mielopoyésis.

La fuente principal para obtener MSCs es la médula ósea (MO). El material de inicio consiste en aspirados de MO obtenidos de donadores normales, los cuales son utilizados para el trasplante alogénico de MO. Después de obtener y sembrar células mononucleares (CMNs) de dichos aspirados en un medio basal suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Prockop, 1997; Conget et al 1999); la población en desarrollo de células adherentes es considerada la fuente primaria *ex vivo* de MSCs. No existe un procedimiento experimental único para la separación de estas células y la mayoría de los laboratorios se han basado en la adherencia, y capacidad de diferenciación multipotencial (hueso/adiposo/cartílago).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha postulado algunos criterios mínimos para definir a las MSCs humanas, como la expresión de los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90 y la ausencia de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 y HLA-DR, además de su capacidad para diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* (Dominici et al, 2006).

Estudios sobre las Unidades Formadoras de Colonias (CFU-Fs) obtenidas a partir de aspirados de MO humana han demostrado que se producen entre 1 y 20 de este tipo de colonias por cada 1×10^5 células mononucleares sembradas (Castro-Malaspina et al, 1980; Simmons y Torok- Storb, 1991). La proliferación de CFU-F *in vitro* está regulada por diferentes factores como el PDGF (Owen, et al, 1987), EGF (Gronthos y Simmons, 1995) y

el FGF-2 (Bianchi, 2003). De igual manera se han detectado algunos inhibidores de la formación de colonias de CFU-F, como el IFN- α e IL-4 que bajo condiciones *in vitro* inhibieron la formación de colonias estimuladas por la combinación de EGF y PDGF (Gronthos y Simmons, 1995; Wang et al, 1990).

Por otra parte, un aspecto importante es la localización anatómica de las células mesenquimales en la médula ósea. Algunos estudios sugieren que este tipo de células se localizan en las paredes de la red vascular sanguínea de la médula ósea, dado que se ha demostrado que las CFU-F obtenidas expresan α -SMA (Gronthos et al, 2003), y las células capaces de expresar esta proteína se limitan a los pericitos capilares, a las células que revisten la superficie del endosteo y a las células de músculo liso vascular de las arterias medulares. En contraparte esta proteína no se ha detectado en las células reticulares de los nichos hematopoyéticos, en adipocitos o células endoteliales vasculares (Bianco et al, 2001). De igual forma en células mesenquimales cultivadas se han detectado proteínas adicionales características de pericitos y células de músculo liso, tales como h-caldesmon, metavinculina, calponina y las cadenas pesadas de miosina de músculo liso (Galmiche et al, 1993).

Después del subcultivo, las MSCs muestran un gran potencial de expansión no obstante este presenta alta variabilidad. Algunas preparaciones pueden ser expandidas a través de 15 doblajes celulares (Bruder et al, 1998; Digirolamo et al, 1999; Phinney et al, 1999), otras cesan la replicación después de cuatro doblajes celulares aproximadamente. La naturaleza de este conflicto puede tener origen en varias determinantes, en el procedimiento usado para extraer la médula (Bruder et al, 1998; Digirolamo et al, 1999, Phinney et al, 1999; Blazek et al, 1999), la baja frecuencia de MSCs en los aspirados de médula (Pittenger et al, 1999) y la edad o condición del donador del cual se preparan las MSCs (Bruder et al, 1998; Galotto et al, 1999). A pesar del alto potencial de expansión *in vitro*, las MSCs no pierden (después de subcultivo moderado) su cariotipo normal y actividad de telomerasa (Pittenger et al, 1999). Sin embargo, los subcultivos extensos perjudican la función celular por el comienzo de evidentes señales de senescencia (Digirolamo et al, 1999) y/o apoptosis (Conget et al, 1999).

Asimismo, también se ha demostrado que las células mesenquimales por sí mismas son capaces de incrementar la proliferación y expansión de células troncales hematopoyéticas (CTH) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH) *in vitro* mediante la producción de citocinas que actúan de manera temprana para mantener a las células troncales hematopoyéticas en un estado de quiescencia o de autorenovación más que de diferenciación tales como factor de células troncales (SCF), Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), Factor Derivado del Estroma (SDF-1), Oncostatina M (OSM), Proteína Morfogenética Ósea (BMP-4), el Ligando del Receptor Flt-3 y TGF- β (Haynesworth et al, 1996; Majumdar et al, 1998 y Majumdar et al 2000b). Además éstas células son capaces de producir interleucinas como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15 (Azizi et al, 1998) y receptores para citocinas como IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, Interferón- γ R, receptor I y II para Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α RI y II) y el receptor para transferrina (Azizi et al, 1998; Pittenger et al, 1999) (Fig. 6).

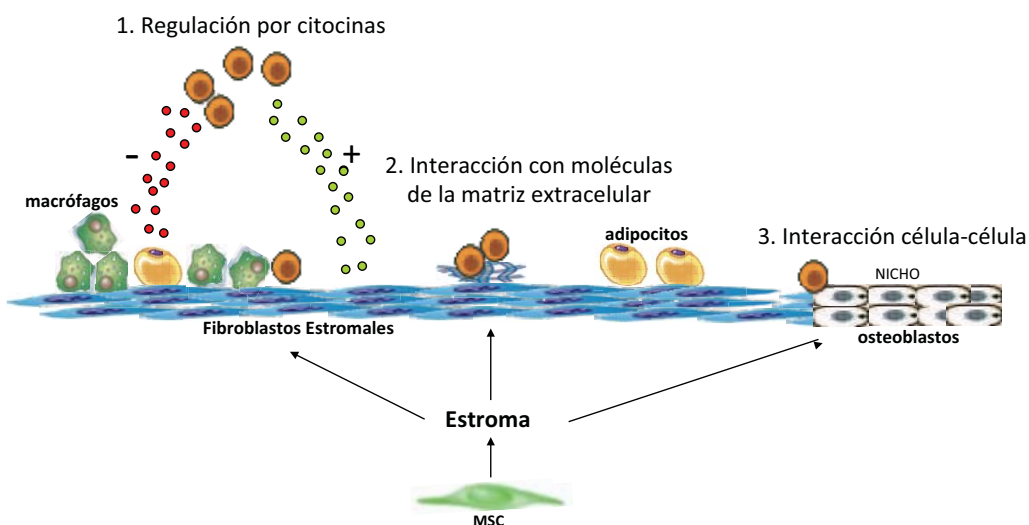


Figura 6. Microambiente hematopoyético. Las MSCs soportan la mielopoyesis en la MO mediante la secreción de citocinas, la producción de moléculas de matriz que permiten la adhesión o migración de las células hematopoyéticas y la interacción celular directa (Mayani et al, 2006).

Además de proveer el contacto crítico célula-célula y producir factores de crecimiento para la hematopoyesis, las MSCs atraen células troncales hematopoyéticas injertadas hacia la MO, induciendo los receptores de homing (Blair y Thomas, 1997). En animales sanos, las MSCs son capaces de migrar a otros tejidos además de la MO (Francois et al, 2006). Diversos experimentos *in vitro* han demostrado que la migración de MSCs esta

regulada por SDF-1/CXCR4 y el complejo formado por el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y c-Met e involucra a las MMPs (Son et al, 2006).

Como población, las MSCs derivadas de MO han demostrado tener un significativo pero altamente variable potencial de autorenovación durante su propagación serial *in vitro* (Bruder et al, 1997; Colter et al, 2000). Se ha demostrado que las CFU-Fs no ciclan *in vivo* (Friedenstein et al, 1974), y la entrada de estas a ciclo celular y subsecuente desarrollo en colonias depende de los factores de crecimiento (Castro-Malaspina et al, 1980). Los doblajes de población mas altos se han conseguido como consecuencia de la adición de factores de crecimiento específicos (FGF-2) al medio de cultivo basal (Bianchi et al, 2003). La densidad de siembra también juega un papel importante en la capacidad de expansión de las células mesenquimales. A menor densidad de siembra mayor expansión (Colter et al, 2000). Los trabajos realizados sugieren que las MSCs y sus clones son heterogéneos con respecto a su capacidad de autorenovación (Bianco et al, 2001).

El LIF (Jiang et al, 2002; Metcalf et al, 2003), el FGF-2 (Tsutsumi et al, 2001; Zaragoza et al, 2006) y el homólogo mamífero de *Drosophila* Wingless (Wnts; Kleber, 2004; Boland et al, 2004) entre otros, han sido implicados en el mantenimiento de la troncalidad de las MSCs. Se ha demostrado su papel en la autorenovación y mantenimiento del tejido embrionario mesenquimal no diferenciado (Kolf et al, 2007). LIF es una citocina pleiotrópica que mantiene el estado troncal de las MSCs (Jiang et al, 2002) y también activa y reprime la diferenciación osteoblástica y osteoclastica (Heymann y Reuselle, 2000). El FGF2 mantiene el estado troncal de las MSCs (Tsutsumi et al, 2001) y en presencia de SFB al 10%, prolonga el período de vida de aquellas derivadas de MO a mas de 70 doblajes poblacionales y mantiene su potencial de diferenciación hasta 50 doblajes (Bianchi et al, 2003). Esto sugiere que el FGF-2 selecciona preferencialmente la supervivencia de una subpoblación de células con alto potencial de autorenovación. El tratamiento con Wnt3a incrementa la proliferación de las MSCs adultas e inhibe la diferenciación osteogénica (Boland et al, 2004). Se ha sugerido que la β -catenina esta involucrada en la regulación de la autorenovación por medio de Wnt. Las MSCs expresan los marcadores genéticos de células troncales embrionarias Oct-4 (involucrado tanto en el mantenimiento de la capacidad de regeneración como del estado de troncalidad de las células troncales; Matikainen y Laine, 2005, Barry et al, 2005), Sox-2 (implicado en el desarrollo

embrionario temprano y el mantenimiento del estado de no diferenciación de las células troncales; (Zhang et al, 2005; Erices et al, 2000; Thellin et al, 2000; Zhang et al, 2004; Niyibizi et al, 2004) y Rex-1 (comprometido en el funcionamiento de las células troncales) (Izadpanah et al, 2006).

Las colonias individuales derivadas de una sola MSC precursora han sido reportadas como heterogéneas en términos de potencial de linaje. Pittenger y cols. publicaron que un tercio de los clones de MSCs derivadas de MO son multipotentes (osteogénicas/condrogénicas/adipogénicas) (Pittenger et al, 1999). En otro estudio, Muraglia y cols. demostraron que el 30% de los clones celulares derivados de MSCs *in vitro* exhibieron un potencial de diferenciación tri-linaje (osteogénico/condrogénico/adipogénico), mientras que el resto mostró un potencial bi-linaje (osteogénico/condrogénico) o uni-linaje (osteogénico; Muraglia et al, 2000).

Asimismo, Kuznetsov y cols. publicaron que solo el 58% de los clones derivados de una sola colonia tienen la capacidad de formar hueso en cápsulas de cerámica con fosfato hidroxiapatita, después de ser transplantados en ratones inmunodeficientes (Kuznetsov et al, 1997). Todos estos resultados demuestran que las MSCs clonalmente derivadas son heterogéneas con respecto a su potencial de desarrollo. El enriquecimiento de una población inicial de MSCs mas homogénea, particularmente aquellas que tienen un potencial de diferenciación de multilinaje, puede también prolongar el período de vida de las células mesenquimales en la expansión *in vitro* (Baksh et al, 2004).

Baksh y cols. proponen un modelo para la regulación de la diferenciación de una célula troncal, que incorpora 2 compartimentos distintos pero continuos. En el primer compartimento las MSCs entran en modificación transcripcional, generando células sin aparentes cambios en fenotipo y capacidad de autorenovación. Similares a MSCs residentes en MO adulta, la mayoría de las células mesenquimales cultivadas *in vitro*, permanecen indiferenciadas hasta que son estimuladas. Bajo estimulación, las MSCs multipotentes entran en división asimétrica, dando origen a dos células hijas, una es la replica exacta de la célula madre y mantiene el potencial de multilinaje, y la otra se convierte en una célula precursora que continua dividiéndose simétricamente generando mas células precursoras. Estas células precursoras son morfológicamente similares a las MSCs multipotentes pero difieren en su transcripción de genes (repertorio). La progresión de MSCs a precursoras es

considerada el primer paso en el compromiso de las células troncales. La transición o salida del “compartimento de células troncales” al “compartimento del compromiso” ocurre cuando las células precursoras continúan dividiéndose simétricamente para generar células progenitoras unipotentes, simultáneamente con la adquisición de propiedades de linaje específico, convirtiéndose en células completamente maduras y comprometidas con fenotipo distinguible (Baksh et al, 2004).

El compromiso y diferenciación de las MSCs a tipos celulares maduros específicos es un proceso temporal altamente controlado que involucra la actividad de factores de transcripción, citocinas, factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular. Hay varios factores esenciales para el compromiso de una MSC. Entre ellos, moléculas secretadas y sus receptores (TGF- β), matriz extracelular (colágenos y proteoglicanos), actina de citoesqueleto y factores de transcripción intracelular (Cbfa1/Rnux2, PPAR γ , Sox9 y MEF2) juegan importantes papeles en el compromiso de las MSCs en linajes específicos y el mantenimiento de sus fenotipos diferenciados (Olsen et al, 2000; Waddington et al, 2003; McBeath et al, 2004; Harada y Rodan, 2003).

3.2 MSCs e Inmunosupresión.

Se han realizado estudios relacionados con la capacidad de inmunosupresión de las MSCs. Así, se ha demostrado que las MSCs suprimen muchas de las funciones de las células T, B, NK y DC (Fig. 7) y son pobremente reconocidas por los huéspedes HLA incompatibles. Además, los efectos de las MSCs en el sistema inmune pueden ser profundamente influenciados no sólo por las interacciones celulares, sino también por factores ambientales que dan forma a su fenotipo y funciones (Ucelli et al, 2006; Chan et al, 2006; Nauta et al, 2006; Eliopoulos et al, 2005). Varias moléculas involucradas en la sinapsis del nicho de células troncales hematopoyéticas (Wilson y Trump, 2006) como Gal-1, Ang-1, osteopontina y trombospondina-1 y 2 son altamente expresadas por las células mesenquimales que muestran capacidad inmunomodulatoria (Pedemonte et al, 2007). Los experimentos *in vivo* e *in vitro* sugieren que el comportamiento funcional de las MSCs es resultado del efecto combinado de factores solubles y mecanismos mediados por el contacto celular.

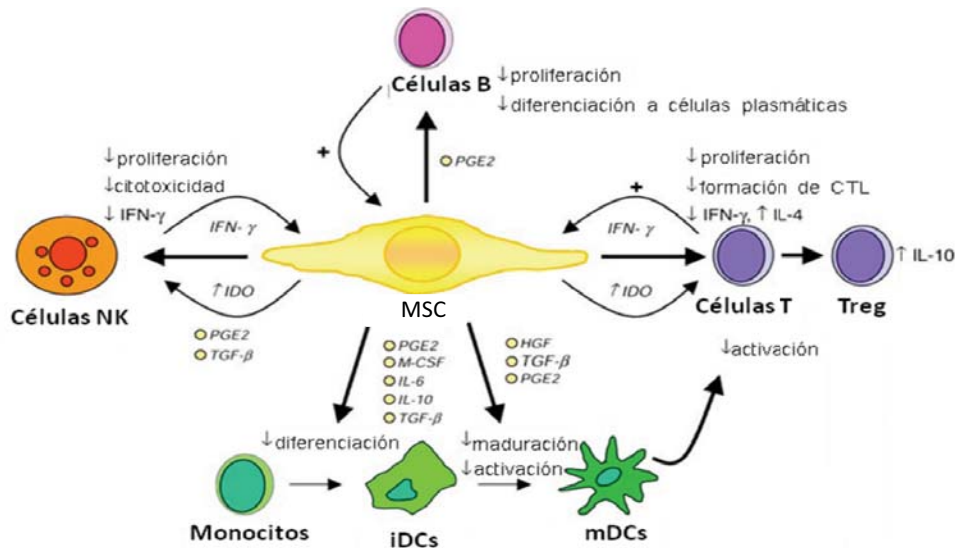


Figura 7. Efectos de las MSCs en las células del sistema inmune (modificado de Nauta y Fibbe, 2007).

Las MSCs son pobremente inmunogénicas, ya que muestran una baja expresión de MHC I y ausencia de la expresión de MHC II. Además, estas células no expresan moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 las cuales están involucradas en la activación de LT (LeBlanc et al, 2003; Majumdar et al, 2003).

Se ha sugerido que las MSCs afectan la proliferación de LT por medio de mecanismos tanto dependientes como independientes del contacto celular. Se ha vinculado a la expresión de las moléculas PD-L1 y HLA-G1 a los mecanismos dependientes de contacto celular (Selmani et al, 2008; Augello et al, 2005; Sheng et al, 2008; Giuliani et al, 2011), y se ha identificado a TGF- β , HGF, IL-10, IDO, óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂) y HLA-G5 como factores solubles (Meisel et al, 2004; Ryan et al, 2007; Selmani et al, 2008). Actualmente hay controversia en cuanto a la necesidad de contacto celular entre MSCs y LT para inhibir la proliferación celular (Krampera et al, 2006; Selmani et al, 2008; Rasmusson et al, 2005; Augello et al, 2005; Sheng et al, 2008; Giuliani et al, 2011; DiNicola et al, 2002; Groh et al, 2005). Además, algunos estudios han mostrado que las MSCs de MO previenen la expresión de los marcadores de activación tempranos CD25 y CD69 en células CD4⁺ y CD8⁺ activadas con fitohematoglutina (PHA; LeBlanc et al, 2004; Groh et al, 2005), sin embargo otros estudios indican que las MSCs no afectan la

expresión de los marcadores de activación en LT (Krampera et al, 2006; Ramasamy et al, 2008).

Se ha reportado que las MSCs humanas expresan receptores tipo Toll (TLRs) (Liotta et al, 2008; Lombardo et al, 2009; Optiz et al, 2009; Pevsner-Fischer et al, 2007). Los cuales se asocian con daño al tejido e infecciones. Además los niveles basales de expresión de TLRs en MSCs de MO y tejido adiposo son sensibles al estímulo de su microambiente. Esta expresión puede ser sobre-regulada por hipoxia (por medio de TLR1, TLR2, TLR5 y TLR9) o condiciones inflamatorias por IFN- γ , TNF, IFN- α e IL-1 β (por TLR2, TLR3 y TLR4) (Hwa et al, 2004; Raicevic et al, 2010).

Las interacciones entre las MSCs y LT han sido estudiadas ampliamente, particularmente *in vitro*. Se ha reportado que las MSCs tienen un impacto en varias de las propiedades de estos linfocitos, por ejemplo suprimen la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ activados (DiNicola et al, 2002; Tse et al, 2003) (Fig. 8). Las MSCs mantienen a los LT activados en fase G0/G1 del ciclo celular (Glennie et al, 2005), aunque no inducen apoptosis (DiNicola et al, 2002; Tse et al, 2003). Además, son capaces de prolongar la vida de LT no estimulados e inhibir las proteasas endógenas involucradas en la muerte celular (Benvenuto et al, 2007). También se ha demostrado que las MSCs reducen la expresión de IFN γ en CD4⁺ Th1 e incrementan la liberación de IL-12 por CD4⁺ Th2 (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ghannam et al, 2010). El potencial citotóxico de los LT también se ve disminuido (Maccario et al, 2005).

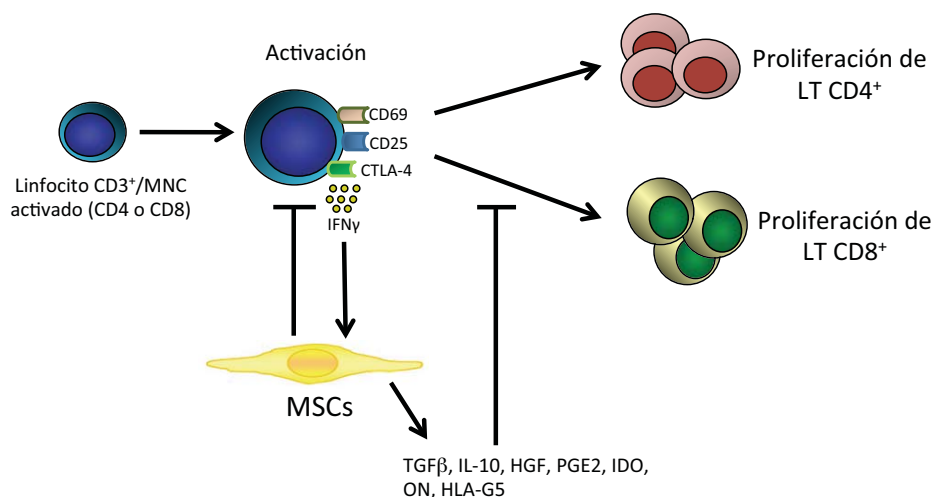


Figura 8. Efectos de las MSCs en la activación y proliferación de linfocitos T (Aggarwal et al, 2005; Yañez et al, 2006; Ramasamy et al, 2008; Maccario et al, 2005).

Los linfocitos Treg, con un fenotipo $CD4^+CD25^{high}$, tienen un papel importante en la inducción de tolerancia periférica y la inhibición de la respuesta inmune pro-inflamatoria (Riley et al, 2009). Diversos estudios ha demostrado que las MSCs inducen la expansión de linfocitos Treg funcionales $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ (Aggarwal y Pittenger, 2005; Ghannam et al, 2010; English et al, 2009; Prevosto et al, 2007). Aunque se han sugerido que existen mecanismos tanto dependientes como independientes del contacto celular entre las MSCs y los LT aun existe controversia al respecto.

En el sistema inmune humano los efectos de las MSCs en los LT son mediados de forma independiente del contacto celular, lo que evidencia la importancia de los factores de secreción como IL-1 β (Groh et al, 2005), TGF- β 1 (English et al, 2009), HGF (Di Nicola et al, 2002), PGE₂ (Aggarwal y Pittenger, 2005), hemo-oxigenasa-1 (HO-1; Chabannes et al, 2007), LIF (Nasef et al, 2008), IGF (Gieseke et al, 2007), sHLA-G5 (NAsef et al, 2008), galectina (Gieseke et al, 2010) y Jagged-1 (Liotta et al, 2008).

De igual forma, se ha reportado que el pretratamiento de MSCs con IFN- γ estimula la inmunomodulación (Chang et al, 2006; Krampera et al, 2003). Lo cual podría explicar la habilidad de las MSCs para actuar en condiciones inflamatorias como la enfermedad de injerto contra huésped aguda (EICHa), en donde la producción de citocinas como IFN γ por los LT y las células NK puede promover la inmunomodulación, y subsecuentemente suprimir la proliferación de los linfocitos $CD4^+$, $CD8^+$ y células NK (Gotherstrom et al, 2004).

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Castro-Manrreza et al, 2014) indican que las poblaciones celulares $CD4^+$ y $CD8^+$ se ven afectadas de la misma forma por MSCs provientes de MO. Esto probablemente en relación a la regulación en la expresión de marcadores de activación como CD25, CD69 y CTLA-4, sin embargo se observó que las MSCs de MO no afectaban la expresión de CD25 (marcador de activación en LT) en LT $CD3^+$ activados. Por otro lado, se observó el incremento en la expresión de CD69 (marcador temprano de activación de LT que promueve la síntesis de citocinas) en LT $CD3^+$ activados en presencia de MSCs.

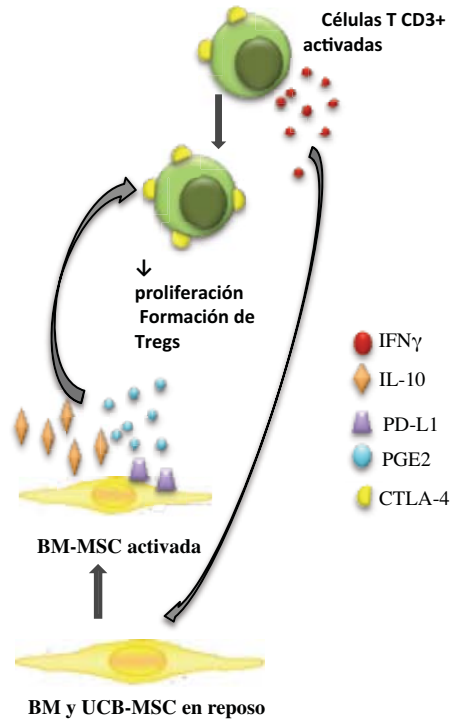


Figura 9. Efectos de las MSCs en linfocitos T CD3⁺. Las MSCs de MO (BM-MSC) activadas con IFN γ secretan moléculas que disminuyen la proliferación de linfocitos CD3⁺, estimulan la formación de linfocitos T reguladores (Tregs) y aumentan la expresión de CTLA-4 en la membrana de estos linfocitos (Castro-Manreza et al, 2014).

Además, se observó que las MSCs de MO no afectan la expresión de CTLA-4 (regulador negativo de LT) en poblaciones enriquecidas de LT CD4⁺ y CD8⁺ activados, la primera evaluación se realizó a las 24 horas de cocultivo de las MSCs con poblaciones enriquecidas de LT, sin embargo en el tercer día se observó un incremento en la expresión de CTLA-4 en LT CD4⁺ activados en aquellos cultivos con contacto celular. Ya que se observó una reducción en la proliferación solo en estos últimos, se evaluó la presencia de PD-L1 (una molécula involucrada en la inmunosupresión mediada por MSCs a través de un mecanismo dependiente del contacto celular y que además inhibe la proliferación de LT y la producción de citocinas) en la membrana celular de MSCs donde se observó un incremento en la expresión de la misma.

IFN- γ puede actuar como citocina inmunosupresora inhibiendo directamente la proliferación de LT e induciendo su apoptosis (Feng et al, 2008; Lu y Waller, 2009), además estimula la síntesis de moléculas inmunosupresoras como IDO, PGE₂ y PD-L1 en MSCs (Meisel et al, 2004; Aggarwal et al, 2005; Sheng et al, 2008) favoreciendo así la

inmunosupresión mediada por MSCs (Krampera et al, 2006; Ryan et al, 2007; Polchert et al, 2008; Deuse et al, 2011). En análisis llevados a cabo en nuestro laboratorio (Castro-Manrreza et al, 2014) se detectó un incremento significativo en las concentraciones de IFN γ de los sobrenadantes obtenidos de aquellos co-cultivos con contacto celular entre las MSCs y LT. De la misma forma, la disminución de la proliferación observada en los co-cultivos puede estar relacionada a la presencia de citocinas inmunosupresoras. Así, las MSCs incrementan la secreción de IFN γ mediante el contacto celular con LT activados lo que aparentemente se puede correlacionar con la reducción de la proliferación, en donde PD-L1 puede participar activamente por contacto celular (Sheng et al, 2008; Luan et al 2013). Se ha demostrado que la activación de LT en presencia de MSCs de MO reduce la secreción de citocinas Th1 pro-inflamatorias (TNF- α e IFN- γ) e induce la secreción de citocinas Th2 anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10; Aggarwal et al, 2005). Además, el IFN γ y TNF- α incrementan la inmunosupresión mediada por MSCs favoreciendo la secreción de moléculas inmunosupresoras como PGE $_2$ (Aggarwal et al, 2005; Krampera et al, 2006), razón por la cual se evaluó la presencia de IFN γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 y se observó que no había un incremento significativo en los niveles de IL-4 y TNF α lo cual sugiere que no se generó una respuesta Th1 o Th2 en presencia de MSC. Sin embargo, si se observó un incremento significativo en la secreción de IL-10 en los co-cultivos de MSCs de MO con LT. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que las MSCs de MO inhiben la proliferación de LT CD4 $^+$ y CD8 $^+$ activados cuando están en contacto celular. Esta reducción en la proliferación se relaciona con el aumento de la expresión de PD-L1 en las MSCs y CTLA-4 en LT, así como el incremento de la producción de IFN γ , IL-10 y PGE $_2$.

3.3 MSCs y Cáncer

Se ha observado que los tumores tienen múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune. Entre ellos, la habilidad de bloquear la maduración y función de células presentadoras de antígeno (APCs) y la de causar alteraciones en la transducción de señales y la función de LT (Campoli et al, 2005). Así la falta o supresión en la expresión de moléculas MHC I en células cancerosas es acompañada por una reducción en el reconocimiento y lisis de las células tumorales por parte de los LT citotóxicos CD8 $^+$, lo cual se asocia con la progresión de la enfermedad (Garrido et al, 2010).

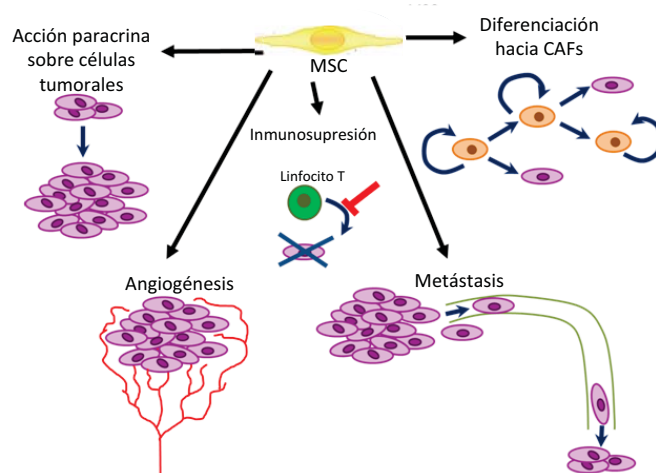


Figura 10. MSCs en el microambiente tumoral. Las MSCs favorecen el desarrollo tumoral promoviendo la proliferación y metástasis de células cancerosas, estimulando la angiogénesis, modulando la respuesta inmune y diferenciándose hacia fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) (modificado de Droujinine et al, 2013).

Se ha demostrado que las MSCs son elementos constitutivos del microambiente tumoral y debido a sus propiedades inmunosupresoras, se ha evidenciado que favorecen el desarrollo de tumores, al participar en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por las células neoplásicas (Djouad et al 2003; Spaeth et al, 2008). Las MSCs se han detectado en tumores, tales como: carcinoma ovárico (McLean et al, 2011), tumores de células gigantes de hueso (Wulling et al, 2003), neuroblastoma (Johann et al, 2010), osteosarcomas (Gibbs et al, 2005), lipomas (Lin et al, 2007) y cáncer gástrico (Cao et al, 2009).

Las MSCs ejercen un papel pro-maligno en distintos cánceres de tipo epitelial como cáncer de mama (Karnoub et al, 2007; Muehlberg et al, 2009), colón (Djouad et al, 2003; Shinagawa et al, 2010), pulmón (Yu et al, 2008; Suzuki et al, 2011), entre otros. Recientemente, se ha encontrado que las MSCs promueven la progresión de ciertos cánceres mesenquimales como osteosarcomas, los cuales se cree se originan de una transformación neoplásica de los linajes mesenquimales (Tsukamoto et al, 2012).

Los principales mecanismos (Fig.10) mediante los cuales las MSCs contribuyen al desarrollo del tumor son:

1. Acción directa en las células cancerosas a través de la secreción de moléculas cuya acción parácrina influencia el fenotipo de las células tumorales.
2. Las propiedades inmunosupresoras de las MSCs alteran la composición local de células inmunes y afectan las reacciones inmunes montadas contra las células malignas, propiciando un ambiente inmunoprivilegiado para las células neoplásicas.
3. Las MSCs influyen la vascularización del tumor, exacerbando la angiogénesis tumoral.
4. Las MSCs asociadas al tumor actúan como células progenitoras diferenciándose en el microambiente tumoral y además son una fuente local de otras células tumorales estromales, como los fibroblastos asociados al tumor (CAFs).

Las MSCs producen diversas quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que actúan de forma parácrina en sus respectivos receptores de superficie en las células cancerosas regulando el crecimiento y/o progresión del tumor. Quimiocinas derivadas de MSCs como CXCL1, CXCL2 o CXCL12/SDF-1 fomentan la proliferación de células cancerosas vía los receptores CXCR2 y CXCR4 en estas últimas (Rodhes et al, 2010; Halpern et al, 2011). Además, citocinas como IL-6 o IL-8 secretadas por las MSCs potencian la malignidad de cánceres como el mamario y el colorectal (Liu et al, 2011). Algunos factores de crecimiento derivados de MSCs como EGF actúan en sus receptores de superficie en las células tumorales potenciando la tumorogénesis (Yan et al, 2012).

Las MSCs pueden promover neoangiogénesis tumoral mediante la secreción/producción de factores angiogénicos como VEGF-A, angiopoyetinas, EGF, factor de crecimiento de keratinocitos (KGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF) y galectina (Chen et al, 2008; Burns et al, 2011) además de estar involucradas en el reclutamiento de células endoteliales y la promoción de la maduración de vasos sanguíneos recién formados (Suzuki et al, 2011; Oskowitz et al, 2011). También se ha demostrado que las MSCs son capaces de diferenciarse hacia células de tipo endotelial y comparten marcadores con pericitos, modulando de esta forma la vascularización del tumor (Oswald et al, 2004; Silva et al, 2005). En contraste, recientemente se ha reportado que las células

vasculares endoteliales se pueden convertir en células con características y propiedades mesenquimales (Medici et al, 2010), lo que sugiere que las transformaciones endotelial-mesenquimal son posibles en el contexto de la tumorigénesis.

La comunicación entre células tumorales y MSCs no sólo afecta a las primeras, sino que el microambiente tumoral es capaz de afectar también a las células mesenquimales, tanto en sus propiedades como en su capacidad de diferenciación. De hecho, se ha presentado evidencia de que las MSCs se transdiferencian en el tumor para dar origen a CAFs (Cho et al, 2012; Spaeth et al, 2009), los cuales han sido implicadas en diversos procesos pro-tumorales, como potenciación de la angiogénesis y el fomento de la remodelación de la matriz extracelular para facilitar la invasión tumoral (Cirri y Chiarugi, 2012). Sin embargo, todavía no se han dilucidado los mecanismos mediante los cuales las MSCs se diferencian en CAFs.

4. MSC en Cérvix.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de MSCs en Cérvix Normal (CeN) y cáncer de cérvix (CaCe) (Montesinos et al, 2013). Se observó que estas células presentan un patrón de marcadores de membrana similar a aquellas MSCs provenientes de MO ($CD73^+$, $CD90^+$ y $CD105^+$), sin embargo presentaban una capacidad de diferenciación distinta, ya que tanto las MSCs de CeN como aquellas de CaCe fueron capaces de diferenciarse hacia los linajes osteogénico y condrogénico, pero en el caso de la diferenciación adipogénica estas células, no presentaron una morfología adipocítica común, sino células fibroblastoides con gotas positivas para rojo oleoso en el citoplasma.

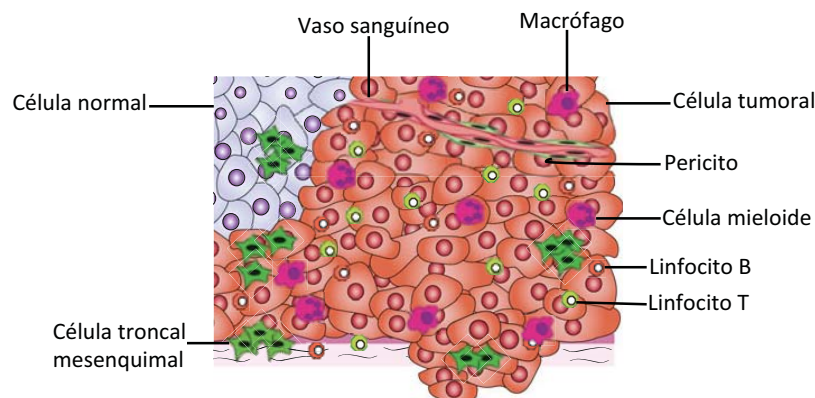


Figura 11. MSCs en cáncer de cérvix. Las MSCs forman parte del microambiente tumoral del cáncer de cérvix (Montesinos et al, 2013)

Previamente se ha evidenciado la presencia de mecanismos inmunológicos mediante los cuales las células tumorales evaden la actividad citotóxica de los LT, en la cual, está involucrada la expresión de MHC I (Mora-García et al, 2006), por lo que es posible que las MSCs detectadas en las muestras de CaCe participen en tal mecanismo. Por esta razón, se analizó el efecto de las MSCs en la expresión de moléculas MHC I en líneas celulares de CaCe y se observó, que en co-cultivos en los que no hay contacto celular entre las MSCs derivadas tanto de CaCe como de MO y las células de líneas tumorales de CaCe se induce una disminución en la expresión de moléculas MHC I en diferentes líneas celulares de CaCe. Este efecto es dependiente de la presencia de MSCs, ya que al removerlas del cultivo, las células tumorales recuperaron la expresión basal de MHC I en las primeras 24 horas, lo que sugiere que los factores solubles producidos en co-cultivos de MSCs y CaCe son los responsables de este efecto. Esta observación se confirmó cuando el medio condicionado obtenido de estos co-cultivos produjo una disminución significativa en la expresión de moléculas MHC I en células de la línea tumoral CaSki.

Se ha reportado que moléculas producidas por MSCs inducen una reducción en la expresión de moléculas MHC I en APCs, lo que las aleja del fenotipo pro-inflamatorio (TNF α , IL-12) a un fenotipo anti-inflamatorio (producción de IL-10; Jiang et al, 2005; Beyth et al, 2005; Nauta et al, 2006). Esto demuestra que tanto las células de cáncer, como las MSCs producen IL-10 (Todaro et al, 2006; Beyth et al, 2005) y que ésta disminuye la expresión de moléculas MHC I protegiendo a las células tumorales de LT citotóxicos (Matsuda et al, 1994). Con esto en consideración, se evaluó la presencia de IL-10 en el medio condicionado de co-cultivos de MSCs y CaSki, en los cuales se observó un aumento en la producción de IL-10 en el medio proveniente de los co-cultivos realizados con MSCs provenientes de CaCe con respecto a aquellos provenientes tanto de MO como de CeN. También se analizó la producción de citocinas tanto en MSCs como en células CaSki por separado y se observó que la producción en co-cultivo es mayor que la suma de la cantidad producida por ambos tipos celulares por separado. La adición de anticuerpos neutralizantes anti-IL10 o de rhIL-10 a los co-cultivos de MSC de CaCe y las células de la línea tumoral inhibió significativamente el efecto de IL-10 en la expresión de moléculas MHCI en células CaSki.



Figura 12. MSCs de cáncer de cérvix disminuyen la expresión de MHC I. La IL-10 producida por los co-cultivos in vitro de MSCs de cáncer de cérvix (CaCe) y una línea de cáncer de cérvix (CaSki) disminuye el reconocimiento de la célula tumoral por parte de los linfocitos T CD8 (Montesinos et al, 2013).

Además, se observó que las células CaSki previamente co-cultivadas con MSCs provenientes tanto de MO como de CaCe y en presencia de rhIL-10 fueron pobremente reconocidas por LT citotóxicos y la adición de anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 en estos cultivos provocó la recuperación del reconocimiento de células CaSki por parte de los LT citotóxicos. No se observaron cambios en aquellos co-cultivos con MSCs provenientes de CeN lo que sugiere distintas capacidades funcionales entre las MSCs provenientes de CeN y las de MO y CaCe, lo cual puede relacionarse con la concentración mas baja de IL-10 en las primeras (Montesinos et al, 2013).

Todo lo anterior indica que la IL-10 tiene un papel crucial en la regulación mediada por MSCs de la expresión de moléculas MHC I en células cancerosas y este mecanismo parece ser clave en la protección que las MSCs ejercen sobre las células tumorales. De hecho, la mayor expresión de IL-10 en tejido cervical se correlaciona con lesiones de mas alto grado (Clerici et al, 1997), así, la presencia de MSCs en el microambiente tumoral puede contribuir al incremento en la producción de IL-10 y de esta manera disminuir la expresión de moléculas MHC I en células tumorales. Sin embargo, no sabemos si las MSCs de CaCe, además de influir sobre la actividad citotóxica de LT, también son capaces de modificar la respuesta proliferativa y de activación de LT y que moléculas de membrana y citocinas participan en estos mecanismos biológicos. Además se observó que las MSCs provenientes de CaCe son negativas para VPH.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCe es un problema de salud pública, dado que es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos en mujeres, tanto a nivel mundial, como en México (Parkin et al, 1999; Boyle y Levi, 2008; INEGI, 2008). El carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma son los más frecuentes en la población de nuestro país con una frecuencia de aproximadamente el 80% y el 15%, respectivamente. El principal agente inductor de este tipo de cáncer es la infección por virus del papiloma humano, sin embargo en los últimos años se ha demostrado la colaboración del microambiente tumoral en el crecimiento de las células malignas infectadas. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que las MSCs son parte de las células que constituyen el microambiente tumoral en CaCe y que participan favoreciendo el crecimiento de las células malignas, mediante la disminución de la actividad citotóxica de LT sobre estas células (Montesinos et al, 2013). De igual manera estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que las MSCs provenientes de MO son capaces de inhibir la proliferación de LT CD3⁺ activados (Castro-Manreza et al., 2014).

Hoy en día, no sabemos si las MSCs pueden afectar de manera directa a los LT en su capacidad de proliferación y activación y cuáles son las moléculas inmunosupresoras de membrana y secretadas que participan en dichos mecanismos. El presente estudio tiene como objetivo analizar el efecto de las MSCs tumorales sobre la proliferación y activación de LT y evaluar la expresión y producción de moléculas inmunosupresoras en los cocultivos de LT y MSCs. Pretendemos determinar si las MSCs de CaCe presentan capacidad de inmunosupresión sobre los LT y con ello profundizar en el conocimiento de los mecanismos que pudieran participar en la evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales de CaCe epidermoide y adenocarcinoma.

HIPOTESIS

Las MSCs de CaCe tendrán la capacidad de disminuir la proliferación y activación de LT y favorecerán la producción de moléculas inmunosupresoras de membrana y secretadas en los co-cultivos con LT activados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad inmunosupresora de MSCs provenientes de CaCe sobre LT.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener y caracterizar MSCs de CeN, Epi y Aden.
- 2) Evaluar el efecto de las MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden sobre la proliferación de LT.
- 3) Evaluar el efecto de las MSCs de CeN y CaCe sobre la expresión de moléculas propias de la activación de LT.
- 4) Determinar la presencia de moléculas involucradas en la capacidad de inmunosupresión de las MSCs (INF γ , IL-10 y PGE $_2$) secretadas en los co-cultivos de MSCs y LT activados.
- 5) Determinar la expresión de moléculas inmunosupresoras membranales en MSCs (PD-L1) y en LT (CTLA-4) en los co-cultivos de MSCs y LT activados.

METODOLOGÍA

Obtención de MSCs de médula ósea. Se descongelaron MSCs obtenidas previamente de muestras de médula ósea (MO). Brevemente, se obtuvieron muestras de 5 ml de MO de donadores sanos, de las cuales se obtuvieron células mononucleares (CMN) mediante un gradiente de densidad y fueron resuspendidas y sembradas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco bajo en glucosa (DMEM-LG, por sus siglas en inglés; Gibco, California, USA), suplementado con 10% de SFB (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina y las células se sembraron en una botella de 25 cm² y posteriormente mediante adherencia a la caja de cultivo se obtuvieron MSCs. Para los diversos ensayos se usaron poblaciones obtenidas de la 3era resiembra.

Obtención de las MSCs de CeN, Epi y Aden. Las muestras de CeN se obtuvieron de donadoras sanas que fueron sometidas a histerectomía. Las muestras de pacientes de Epi y Aden fueron obtenidas de pacientes en estadios IIB, IIIA y IIIB. Se enviaron biopsias al Departamento de Patología para su diagnóstico. Las pacientes fueron incluidas en el estudio mediante los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años o más que acepten participar en el estudio previa firma de consentimiento informado (Protocolo 1411).
- Diagnóstico de cáncer de cérvix con su posterior confirmación diagnóstica (biopsia).
- Etapa clínica del cáncer de cérvix etapa IIB, IIIA y IIIB.
- Pacientes sin tratamiento previo que inicien tratamiento para CaCe dentro de las instalaciones del IMSS.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que se atiendan a nivel particular posterior a su diagnóstico.
- Pacientes con neoplasias previas.
- Pacientes con otras neoplasias simultáneas.
- Pacientes embarazadas o lactando.
- Infecciones concurrentes que afecten el estado de inmunidad de la paciente (HIV).

- Pacientes con enfermedades autoinmunes.

Para obtener las MSCs de CeN, Epi y Aden se tomó una muestra de aproximadamente 0.5 cm de diámetro del cuello uterino y se colocó en una caja petri donde se lavó con solución salina para quitar el exceso de sangre. Se pasó a otra caja en donde se cortó en trozos pequeños de aproximadamente 1 mm. Los trozos se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se agregó una solución de 0.5% tripsina-0.2% EDTA (Gibco, BRL) hasta cubrir el tejido. Se cubrió el matraz con una gasa estéril y se incubó a 37°C durante 20 minutos en agitación constante para realizar una disgregación enzimática y mecánica al mismo tiempo. Se hizo pasar el disgregado por una malla de nylon, se colectó la suspensión celular y se centrifugó durante 6 min. a 1200 rpm. Se resuspendió el botón celular en DMEM-LG, suplementado con 10% de SFB, (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina y se realizó un conteo celular con azul de tripano. Las células se sembraron en una botella de 25 cm². Se cultivaron a una densidad de siembra de 1x10⁶ cel/cm² en medio específico para MSCs antes mencionado. Se realizaron resiembras de los cultivos confluentes. Para los diversos ensayos se utilizaron las poblaciones de MSCs obtenidas en la 3era resiembra.

Resiembra y criopreservación de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los cultivos de MO, CeN, Epi y Aden se mantuvieron hasta alcanzar el 80-90% de confluencia. Una vez alcanzada esta confluencia, las células fueron colectadas usando una solución de 0.05% tripsina-0.02% EDTA (Gibco) durante 5 minutos a 37°C, se lavaron con solución salina al 10% SFB para inactivar la tripsina y fueron centrifugadas por 6 minutos a 1200 rpm. El botón celular fue resuspendido en medio específico para MSCs, una parte de la suspensión fue usada para realizar la resiembra y expansión celular y el resto se congeló en medio de congelación DMEM-LG 50% SFB adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (Sigma), a una concentración de 1-2x10⁶ cel/ml de medio de congelación y se almacenaron en nitrógeno líquido. Se realizaron resiembras de los cultivos confluentes y se congelaron células de las resiembras 1, 2 y 3. Las MSCs obtenidas de la 3era resiembra fueron empleadas para realizar la caracterización biológica de inmunofenotipo y capacidad de diferenciación además del análisis de capacidad de inmunosupresión.

Inmunofenotipo de las MSCs. Para determinar el inmunofenotipo de las MSCs obtenidas, se analizó la expresión de algunos antígenos de superficie mediante citometría de flujo en un equipo Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA). Se incubaron 2×10^5 células en 50 μ l de PBS al 2% de SFB durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Se incluyeron los controles incubando a las células con el correspondiente isotipo de acuerdo al anticuerpo primario IgG2a-PE (Caltag Laboratories), IgG1-FITC (Caltag Laboratories). Las células marcadas se analizaron contando un mínimo de 10,000 eventos en el citómetro. Se analizaron los antígenos CD105, CD73, CD90, HLA-ABC, CD29, CD14, CD31, CD34, CD45 y HLA-DR (Becton Dickinson, Biosciences; San Jose, CA, USA).

Capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. Para inducir la diferenciación osteogénica, se usaron células mesenquimales de la 3era resiembra las cuales se cultivaron en medio osteogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) y en cámaras con base desmontable para ser usadas como laminilla (Lab-Tek II Chamber Slide System, Nalguen Nunc Inter) durante 4 semanas y con cambios de medio 3 veces por semana. Para comprobar la diferenciación osteogénica se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina para lo cual se realizó un lavado con 1ml de agua desionizada y posteriormente se agregó 1ml de metanol previamente enfriado a -20°C. Se realizó otro lavado con agua desionizada y se agregaron 700 μ L de SIGMA FAST BCIP/NBT (Sigma, St Louis MO, USA) y se incubó durante 10 min en total oscuridad. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua desionizada. Para montar la laminilla se agregaron 3 gotas de solución acuosa para montar.

Para inducir la diferenciación condrogénica se usaron células de la 3era resiembra, las cuales se colocaron en un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifugaron a 1,000 rpm por 5 min para obtener un botón celular (del cual se formó la micromasa en presencia de TGF- β 1, que induce la síntesis de fibras de fibronectina y otros proteoglicanos presentes en la matriz extracelular). Se agregó medio condrogénico comercial (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Maryland USA) suplementado con 10 ng/ml de TGF- β (Cambrex) y se cultivó durante 4 semanas. Se realizaron cambios de medio 3 veces por semana. Para evaluar la diferenciación condrogénica se fijaron las micromasas en formaldehído al 4% y

posteriormente se deshidrataron en diluciones seriales de etanol y se incluyeron en bloques de parafina. Los bloques se cortaron en listón y se realizó una tinción inmunohistoquímica para detectar la presencia de colágena tipo II.

Para inducir la diferenciación adipogénica se usaron también células de la 3era resiembra, las cuales se cultivaron en medio adipogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) durante 3 semanas. Se realizaron cambios de medio 3 veces por semana. Para evaluar la diferenciación adipogénica, se incubó la caja durante 10 minutos con PBS y la capa celular se fijó con formalina buffer al 10% durante 1 hora. Se adicionó isopropanol al 60% durante 5 min, y posteriormente se agregó Rojo Oleoso durante 20 min. Se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina de Harris por 1 min. Las laminillas se montaron con propilenglicol, se dejaron secar y se observaron bajo el microscopio.

Obtención de CMNs. Se tomaron muestras de aproximadamente 30 ml de sangre periférica de donadores sanos y se obtuvieron las células mononucleares mediante un gradiente de densidad. Las CMNs se sembraron en medio RPMI suplementado (RPMI 1640, 10% SFB, 2 mM L-glu, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 100 µg/ml gentamicina) por 24 horas.

Obtención de Linfocitos T CD3⁺. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donadores sanos mediante un gradiente de densidad. Los LT CD3⁺ se obtuvieron por separación con microperlas y columnas MACS MS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) de CD3 humano. La pureza de las CD3⁺ obtenidas se analizó mediante citometría de flujo y solo se utilizaron las suspensiones con una pureza mayor al 97%. Las CD3⁺ se sembraron en medio RPMI suplementado (RPMI 1640, 10% SFB, 2 mM L-glu, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 100 µg/ml gentamicina) por 24 horas.

Estimulación de Linfocitos T CD3⁺. Los LT CD3⁺ cultivados se activaron en medio de co-cultivo (DMEM LG 10% SFB/RPMI 10% SFB) con perlas Dynabeads CD3/CD28 T cell expander (Invitrogene, California, USA) en proporción 1:1 (25 µl de dynabeads/1x10⁶ LT).

Las células fueron marcadas con éster succinimidil diacetato carboxifluoresceína (CFSE) al momento de ser sembradas, y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la proliferación.

Co-cultivo de MSCs/LT CD3⁺. Se realizaron co-cultivos de MSCs/LT CD3⁺ en contacto celular (en una proporción 1/1). Los co-cultivos se realizaron en placas de 24 pozos. Los LT CD3⁺ se sembraron y fueron activados como se describió anteriormente y en ausencia o presencia de 1.5×10^5 MSCs de MO, CeN y CaCe. Como control positivo se sembraron LT CD3⁺ activadas sin MSCs para medir la proliferación, secreción y expresión membranal de moléculas involucradas en inmunosupresión. También se sembraron MSCs en ausencia de CD3⁺ para el control basal de expresión de moléculas de superficie y secretadas. Los cultivos se mantuvieron durante 3-4 días para permitir las evaluaciones de proliferación y producción de moléculas mediante citometría de flujo.

Ensayos de proliferación. Los linfocitos CD3⁺ de todas las condiciones de cultivo antes mencionadas se marcaron con $1 \mu\text{l/ml}$ de 5,6 CFSE $2.5 \mu\text{M}$ al momento de ser sembrados. Se analizó la proliferación de linfocitos CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺. LT CD3⁺ activados en ausencia de MSCs se usaron como control positivo y se ajustaron como una proliferación del 100%. Los niveles de proliferación observados en los co-cultivos se normalizaron a este control.

Co-cultivo de MSCs/CMNs. Se realizaron co-cultivos de MSCs/CMNs en proporción 1:2 tanto en contacto celular como en ausencia de este. Los co-cultivos con contacto celular se realizaron en placas de 24 pozos. Las CMNs se activaron con $5 \mu\text{g/ml}$ de fitohematoglutinina (PHA por sus siglas en inglés) en ausencia o presencia de 1×10^5 MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los cultivos sin contacto celular se realizaron en cámaras transwell. Las MSCs de MO, CeN, Epi y Aden (1×10^5) se colocaron en la cámara inferior y las CMNs se colocaron en la cámara superior; las cámaras estaban separadas por una membrana semipermeable con un poro de 0.4 mm. Como control positivo se sembraron CMNs activadas sin MSCs para medir la proliferación y producción de moléculas relacionadas con inmunosupresión. También se sembraron MSCs en ausencia de CMNs

para el control basal de producción de moléculas. Los cultivos se mantuvieron durante 2-7 días y se evaluaron mediante citometría de flujo.

Ensayos de proliferación. Los CMNs de todas las condiciones de cultivo antes mencionadas se marcaron con 1µl/ml de CFSE 5 µM al momento de ser sembrados. Se analizó la proliferación de linfocitos CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺. CMNs activadas en ausencia de MSCs fueron usadas como control positivo y se ajustaron como una proliferación del 100%. Los niveles de proliferación observados en los co-cultivos se normalizaron a este control.

Análisis cuantitativo de moléculas secretadas. Se obtuvieron sobrenadantes de todas las condiciones de cultivo, incluyendo aquellos con CMNs no activadas, MSCs en ausencia de CMNs (controles negativos) y CMNs activadas en ausencia de MSCs (control positivo). Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta que se analizaron con cytometric bead array (CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se mezclaron 10 µl de perlas de captura que reconocen cada una de las citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-4), esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Mientras tanto, se preparó la curva de estandarización mediante la preparación de diluciones seriales de cada una de las moléculas secretadas (0-500 pg/ml). Posteriormente se mezclaron 50 µl de cada sobrenadante o de cada uno de los puntos de la curva estándar se mezclaron con 50 µl de las perlas de captura, se incubó esta mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Después se realizó un lavado con 1 ml de buffer de lavado y el botón fue resuspendido en 300 µl del mismo buffer. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo inmediatamente.

La concentración de PGE₂ se evaluó mediante ensayos ELISA con un kit ELISA Prostaglandina E₂ Humana (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El sobrenadante de MSCs cultivadas en ausencia de CMNs activadas se usó como control. Se preparó una curva estándar de PGE₂ mediante diluciones seriales de 0.03 a 4.0 ng/ml, posteriormente se agregaron 100 µl de las muestras problema o de cada uno de los puntos de la curva en los pozos de la microplaca, cada muestra se cuantificó por duplicado. En

cada uno de los pozos, previamente cubiertos con un anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra, se agregaron 50 µl de PGE2 marcada con fosfatasa alcalina y 50 µl anti-PGE2 monoclonal de ratón, excepto en los pozos correspondientes al blanco. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación, posteriormente los pozos se lavaron para eliminar aquello que no se adhirió. Después se adicionó el sustrato de fosfatasa alcalina (pNPP, del inglés para-nitrophenyl phosphate) y la placa se incubó durante 1 hora. Para finalizar se leyó la placa en un lector de ELISA (DYNATEC MR5000) a 412 nm.

Análisis por citometría de flujo: Se usaron anticuerpos conjugados con FITC, PE o APC contra CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CTLA-4, (BD Biosciences) CFSE y sus respectivos controles de isotipo para caracterizar Linfocitos T y también anti-PD-L1 (BD Biosciences) conjugado con PE para MSCs. Un total de $1-2 \times 10^5$ células, previamente bloqueadas con bloqueador del receptor Fc (Blocking Reagent Human; Miltenyi Biotec Blocking Reagent Human; Miltenyi Biotec) se resuspendieron en 100 µl de PBS-EDTA 1 mM al 3% de SFB y se incubaron con el anticuerpo apropiado durante 20-30 minutos, posteriormente se lavaron con 1 ml de PBS-EDTA 1mM al 3% de SFB y fijados con solución de fijación FACS (BD Biosciences). El Cytotfix/Cytoperm buffer (BD Pharmingen) se usó de acuerdo a las instrucciones del fabricante para detectar la presencia de CTLA-4 intracelular. Las células marcadas se analizaron en un FACS Canto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, Biosciences), donde se colectaron al menos 10,000 eventos por muestra. Los datos se analizaron con FlowJo 7.6 software.

Análisis de la intensidad media de fluorescencia. Se obtuvieron los valores de intensidad media de fluorescencia mediante el software de análisis de citometría de flujo y se normalizaron los valores tomando el control de cada experimento como 1.

Análisis estadístico. El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 20.0. La comparación entre los grupos fue realizada con la prueba de Kruskal-Wallis seguido por el Mann-Whitney U Test. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos

RESULTADOS

Las células provenientes de CeN, Epi y Aden presentaron morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación características de MSCs.

Para establecer que nuestras poblaciones celulares sean de MSCs, se tomó en consideración su morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de acuerdo a lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici et al, 2006). Así, se caracterizaron células provenientes de CeN (n=3), Epi (n=5) y Aden (n=4) y se compararon con aquellas de MO (n=5). Al igual que las células de MO, las células provenientes de todas las fuentes de cérvix crecieron de forma adherente y presentaron morfología fibroblastoide (Fig. 13A). Estas células también fueron positivas para los marcadores de superficie característicos de MSCs (CD73, CD90 y CD105; Tabla 1, Fig 13B). Además fueron negativas para la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD14), endoteliales (CD31) y HLA-DR (Tabla 1).

Marcador	MO n=5	CeN n=3	Epi n=5	Aden n=4
CD105	90 ± 13	89 ± 17	84 ± 9	93 ± 4
CD90	85 ± 15	99 ± 0.6	96 ± 3	93 ± 7
CD73	97 ± 3	88 ± 17	86 ± 3	94 ± 5
HLA-ABC	94 ± 9	51 ± 26	82 ± 1	65 ± 5
CD13	98 ± 1	98 ± 0.5	90 ± 0.06	97 ± 1
HLA-DR	3 ± 3	0.4 ± 0.09	0.3 ± 0.4	0.81 ± 0.79
CD45	1 ± 1	0.09 ± 0.07	0.25 ± 0.24	0.71 ± 0.62
CD14	2 ± 2	0.02 ± 0.05	0.48 ± 0.29	0.19 ± 0.3
CD34	0	0.2 ± 0.08	0.38 ± 0.57	0.05 ± 0.09
CD31	1 ± 1	0.26 ± 0.55	0.28 ± 0.31	0.5 ± 0.3

Tabla 1. Las MSCs de CeN, Epi y Aden presentan un inmunofenotipo similar al de las MSCs de MO. Los valores se muestran en porcentajes de células positivas ± desviación estándar para los distintos marcadores.

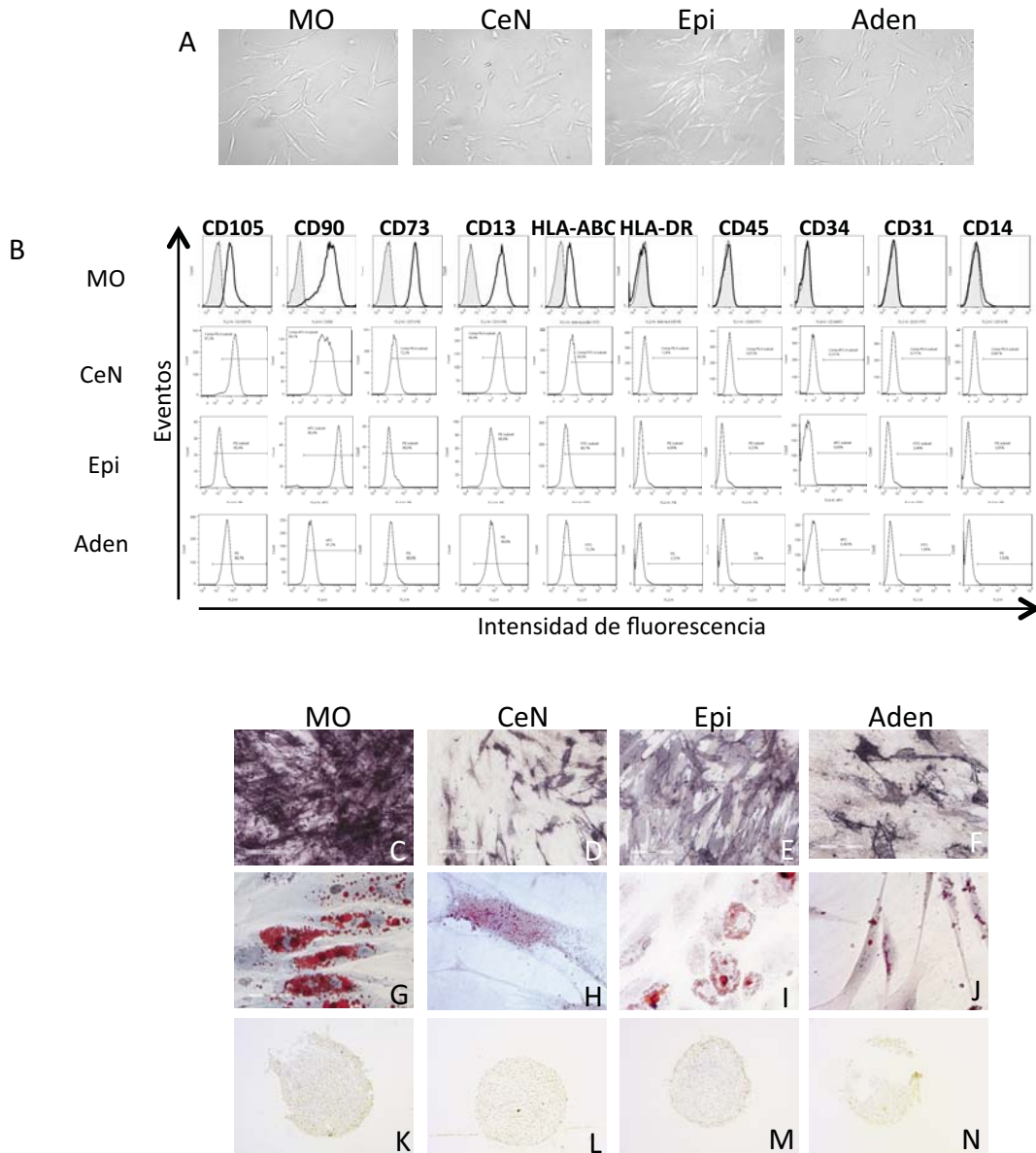


Figura 13. Caracterización de MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden. A) Morfología en cultivos de MSCs de las distintas fuentes. B) Inmunofenotipo de MSCs, histogramas representativos de los marcadores analizados en cada una de las fuentes. C-F) Diferenciación osteogénica evidenciada por la reacción de fosfatasa alcalina. G-J) Diferenciación adipogénica, indicada por la acumulación de vacuolas lipídicas teñidas con rojo oleoso. K-N) Diferenciación condrogénica, indicada por la expresión de colágena II.

De la misma forma, las células provenientes de CeN, Epi y Aden mostraron capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico (Fig. 13D-F), adipogénico (Fig. 13H-J) y condrogénico (Fig. 13L-N). Sin embargo, al observar los adipocitos formados por

las MSCs de CeN, Epi y Aden se advirtió que las células de CeN y Aden no perdieron la forma fibroblastoide (Fig. 13H y J, respectivamente) y que formaron vacuolas lipídicas pequeñas en comparación con aquellos adipocitos provenientes de MSCs de MO (Fig. 13G). En lo que se refiere a los adipocitos, formados por células de Epi, estos si presentaron una morfología característica de adipocitos sin embargo presentaron un menor número de vacuolas lipídicas (Fig. 13I) en comparación con aquellos provenientes de MO.

Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3⁺ purificados

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio indicaron que las MSCs de MO disminuyen la proliferación mediante contacto celular de una población purificada de LT CD3⁺ (Castro-Manreza et al, 2014). Tomando en cuenta esta capacidad de las MSCs de MO, quisimos determinar si aquellas provenientes de CeN, Epi y Aden tienen esta misma propiedad biológica sobre la población de linfocitos antes mencionada. Para ello, se obtuvo una población purificada de linfocitos T CD3⁺ con una pureza $\geq 97\%$, los cuales se activaron con anti-CD3/anti-CD28 en presencia y ausencia de MSCs de CeN, Epi y Aden (Fig. 14). La proliferación de LT CD3⁺ activados en ausencia de MSCs fue considerada como el 100% de proliferación (control positivo; Fig. 14A). En los co-cultivos con MSCs de MO se observó una disminución en la proliferación de los LT CD3⁺ (Fig. 14C) en comparación con el control positivo ($72.82 \pm 1.32\%$ y 100% , respectivamente). Las MSCs

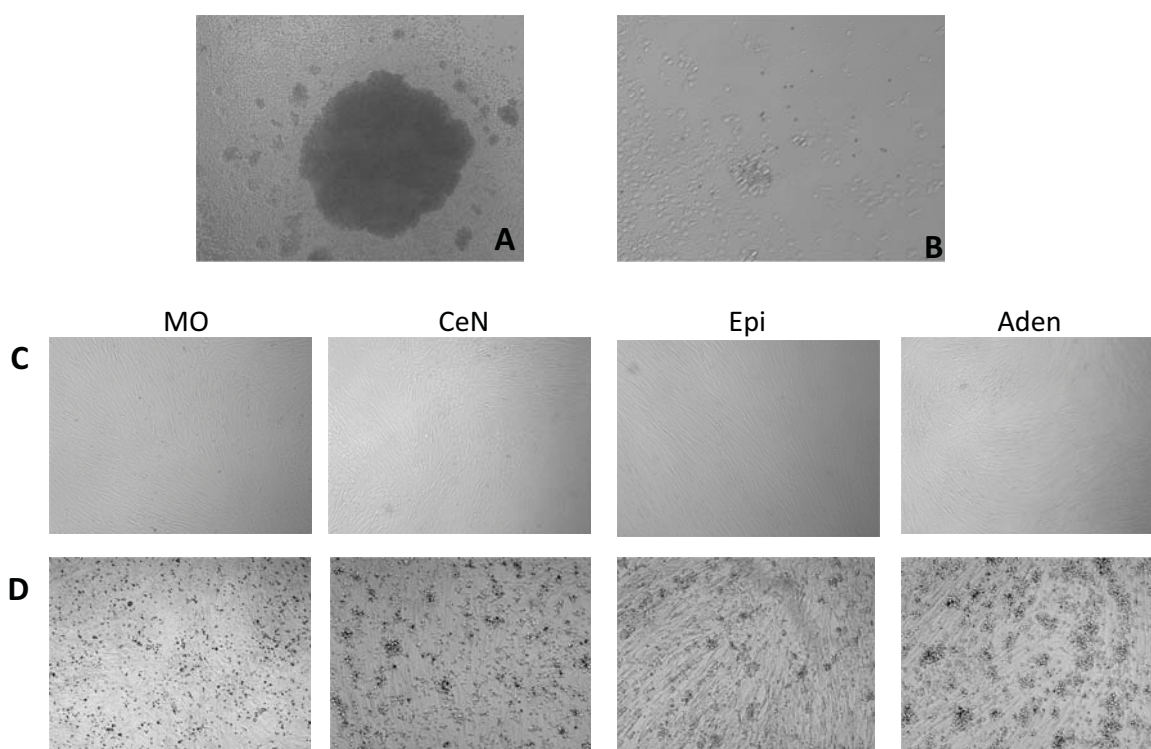


Figura 14. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3⁺ purificados. A) Proliferación de LT CD3⁺ activados en ausencia de MSCs. B) Macropartículas anti-CD3/anti-CD28. C) Monocapa de la fuente sembrada 72 horas antes del co-cultivo. D) Co-cultivos de 7 días permitiendo el contacto celular.

de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de los LT CD3⁺ (103±1.42%; 97±1.41% y 107.7±6%, respectivamente). Estos resultados sugieren que las MSCs provenientes de las fuentes mencionadas no tienen la capacidad de inmunosuprimir a los LT CD3⁺ purificados.

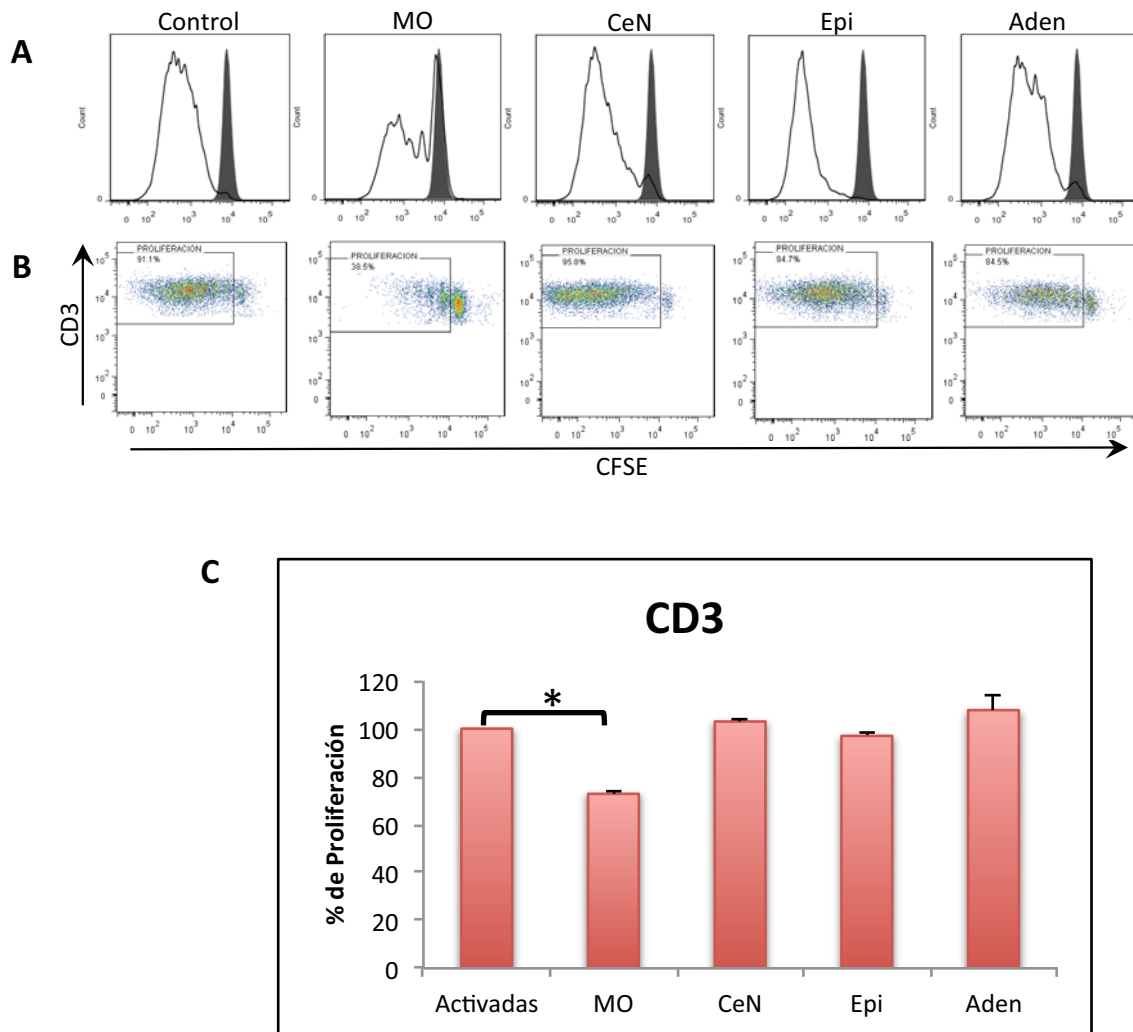


Figura 15. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3⁺. Linfocitos T CD3⁺ activados con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La proliferación en ausencia de MSCs se consideró como control positivo (Control; 100% n=2). El porcentaje de pérdida de CFSE se determinó sobre la región CD3⁺ al día 4 de cultivo. A) Histogramas representativos de CFSE de un experimento. B) Gráficos de puntos representativos de un experimento. C) Media ± SEM del porcentaje de proliferación (n=2 co-cultivos para cada una de las fuentes). *Diferencia estadística significativa con P<0.05.

Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de Linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en poblaciones de células mononucleares.

Estudios previos han descrito la evaluación de la capacidad inmunosupresora de las MSCs de MO utilizando poblaciones de CMNs activadas con PHA (LeBlanc et al, 2004; Rasmusson et al, 2005), en los cuales se observó una disminución en la proliferación de LT. Tomando en cuenta lo anterior y debido a que no se observó disminución de la proliferación de LT CD3⁺ enriquecidos en los experimentos anteriores y con la finalidad de evaluar la necesidad de la participación de otras células mononucleares las cuales se han visto involucradas en el efecto inmunosupresor de las MSCs, se decidió llevar a cabo los siguientes ensayos con una población de CMNs totales obtenidas de sangre periférica de donadores sanos y activadas con PHA en presencia o ausencia de MSCs de CeN, Epi y Aden (Fig. 16). Se realizaron co-cultivos sin contacto celular CMNs/MSCs (Fig. 16B) y con contacto célula-célula (Fig. 16D).

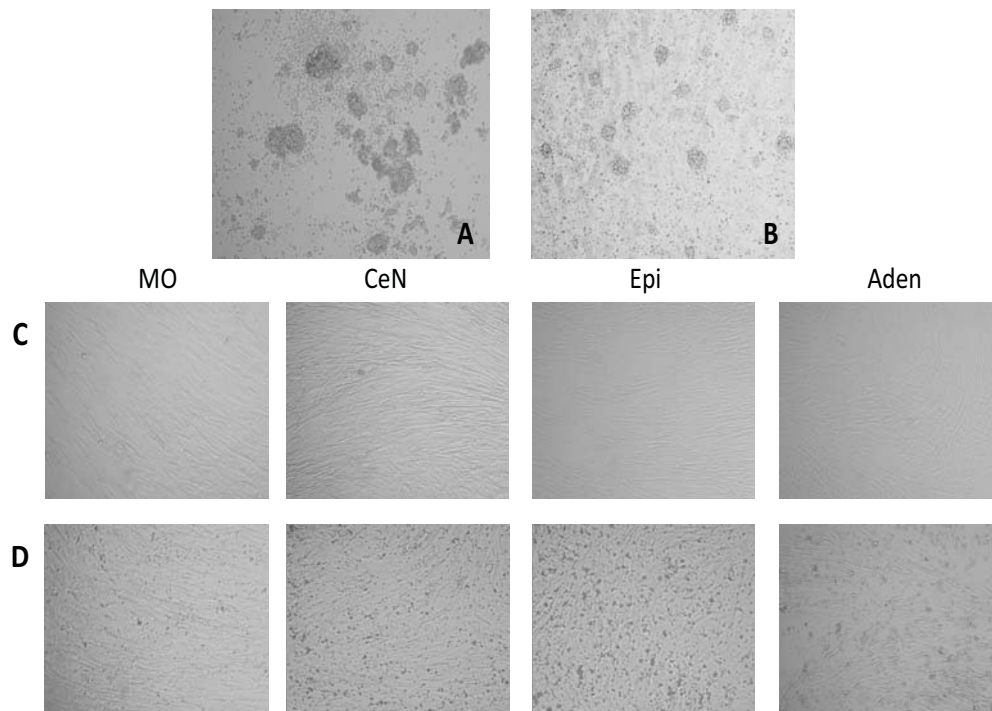


Figura 16. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺. A) CMNs activadas con PHA en ausencia de MSCs. B) CMNs activadas con PHA en co-cultivo con MSCs evitando el contacto celular. C) Monocapa de MSCs de la fuente indicada sembrada 72 horas antes del co-cultivo. D) Co-cultivo de 7 días permitiendo el contacto celular.

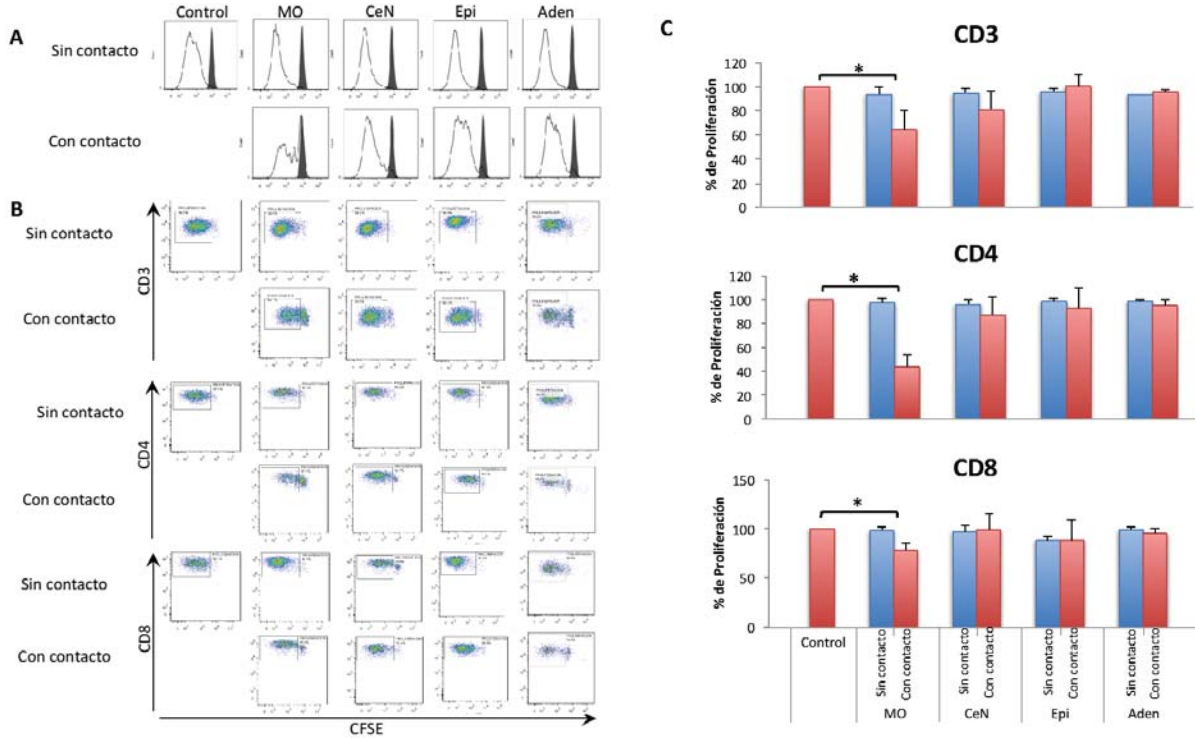


Figura 17. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de linfocitos T presentes en poblaciones de CMNs. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. (Con contacto, barras rojas) o evitando el contacto célula-célula (Sin contacto, barras azules). La proliferación en ausencia de MSCs se consideró como control positivo (Control; 100% n=9). El porcentaje de pérdida de CFSE se determinó sobre la región CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ al día 7 de cultivo. A) Histogramas representativos de CFSE de un experimento. B) Gráficos de puntos representativos de un experimento. C) Media \pm SEM del porcentaje de proliferación (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5; co-cultivos con contacto. MO n=6; CeN n=4; Epi n=6; Aden n=3; co-cultivos sin contacto). *Diferencia estadística significativa con P<0.05.

La proliferación de las CMNs activadas en ausencia de MSCs fue considerada como del 100% (control positivo; Fig. 17B y C). Con la finalidad de comprobar el correcto funcionamiento del sistema se realizó un co-cultivo con MSCs de MO y CMNs activadas con PHA, en el cual se observó disminución en la proliferación de los LT CD3⁺ en comparación con el control positivo (60 \pm 19.7%) (Fig. 17C) el mismo comportamiento se observó en las poblaciones CD4⁺ (49.86 \pm 24%) y CD8⁺ (72.96 \pm 18.1%) lo cual indica que el experimento funcionó de la forma correcta. Sin embargo, las MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden no disminuyeron la proliferación de LT CD3⁺ (94.35 \pm 6.43%; 95.65 \pm 4.6% y 93.2 \pm 2.4%, respectivamente; Fig. 17C), CD4⁺

($96\pm 3.8\%$; $98.5\pm 3.11\%$ y $98.9\pm 1.5\%$, respectivamente; Fig. 17C) y $CD8^+$ ($96.7\pm 6.3\%$; $88\pm 4.1\%$ y $99\pm 2.11\%$, respectivamente; Fig. 17C) en los co-cultivos sin contacto celular. De la misma forma, tampoco se observó disminución de la proliferación de $LT\ CD3^+$ ($80.83\pm 15.8\%$; $100\pm 9.9\%$ y $95.4\pm 2.1\%$, respectivamente; Fig. 17C), $CD4^+$ ($87\pm 15\%$; $92.8\pm 16.9\%$ y $95.2\pm 5.9\%$, respectivamente; Fig. 17C) y $CD8^+$ ($99\pm 16.3\%$; $88\pm 21.2\%$ y $95\pm 5\%$, respectivamente; Fig. 17C) en aquellos co-cultivos en los cuales se permitió el contacto celular. Estos resultados sugieren que las MSCs de CeN, Epi y Aden no son capaces de disminuir la proliferación de los LT, ya que se observó el mismo comportamiento tanto en cultivos con $LT\ CD3^+$ purificados activados con anti-CD3/anti-CD28 como con CMNs activadas con PHA.

Las MSCs de CeN, Epi y Aden no afectan la expresión de moléculas de activación temprana en Linfocitos T.

La activación de LT con antígenos o mitógenos induce la expresión de marcadores de activación tales como CD25, CD69 y CTLA-4 (Wang et al, 2008). En estudios previos se observó que la presencia de MSCs de MO reducía la expresión de los marcadores de activación temprana CD25 y CD69 (LeBlanc et al, 2004), sin embargo resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que las MSCs de MO no afectan la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 (Castro-Manrreza et al, 2014). Para determinar si las MSCs de cérvix modifican la expresión de dichas moléculas, se decidió analizar su expresión en LT en los co-cultivos con contacto de MSCs de las fuentes estudiadas. Su expresión en LT activados en ausencia de MSCs fueron consideradas como control positivo (Control; Fig. 18B).

Se observó que la expresión de CD25 en LT CD3⁺ no se ve afectada por la presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden (20.4±29.4%; 11.39±3.42%; 9.43±4.3% y 21.18±10.89%, respectivamente; Fig. 18B) ya que al compararla con el control (9.25±6%) no se observaron diferencias significativas (P<0.05) entre los grupos (Fig. 18B). Se observó un comportamiento similar al analizar la expresión de CD69 en los LT cultivados con MSCs (MO 43.88±16.57%; CeN 23.44±11.49%; Epi 25.52±11.22% y Aden 38.31±6.19%, Fig. 18B) dado que al ser comparadas con el control (22.98±14.6%) no se encontraron diferencias significativas (p<0.05). En lo que se refiere a la expresión de CTLA-4 (Fig. 18B) tampoco se encontraron diferencias significativas entre el control (9.72±2.63%; P>0.05) y aquellos LT con MSCs provenientes de MO, CeN, Epi y Aden (14.14±4.48%, 15.6±3.13%; 11.27±2% y 16.05±6.85%, respectivamente; Fig. 18B).

En el caso de la población de LT CD4⁺, la expresión de CD25 no se modificó cuando los LT son sembrados con MSCs de MO, CeN, Epi y Aden (30.96±26.55%; 24.55±9.12%; 20.84±7.35% y 33.4±14.8%, respectivamente; Fig. 19B) ya que cuando estos fueron comparados con el control (19.9±9%), no se observaron diferencias significativas (P>0.05). Asimismo, al analizar la expresión de CD69 se encontró que aquellos LT cultivados con MSCs de las fuentes mencionadas (MO 47.86±15.72%; CeN 30.7±12.26%; Epi 33.14±9.8% y Aden 43.7±12.2%, Fig. 19B) no presentaron diferencias significativas con el control (28.82±12.8%; P>0.05).

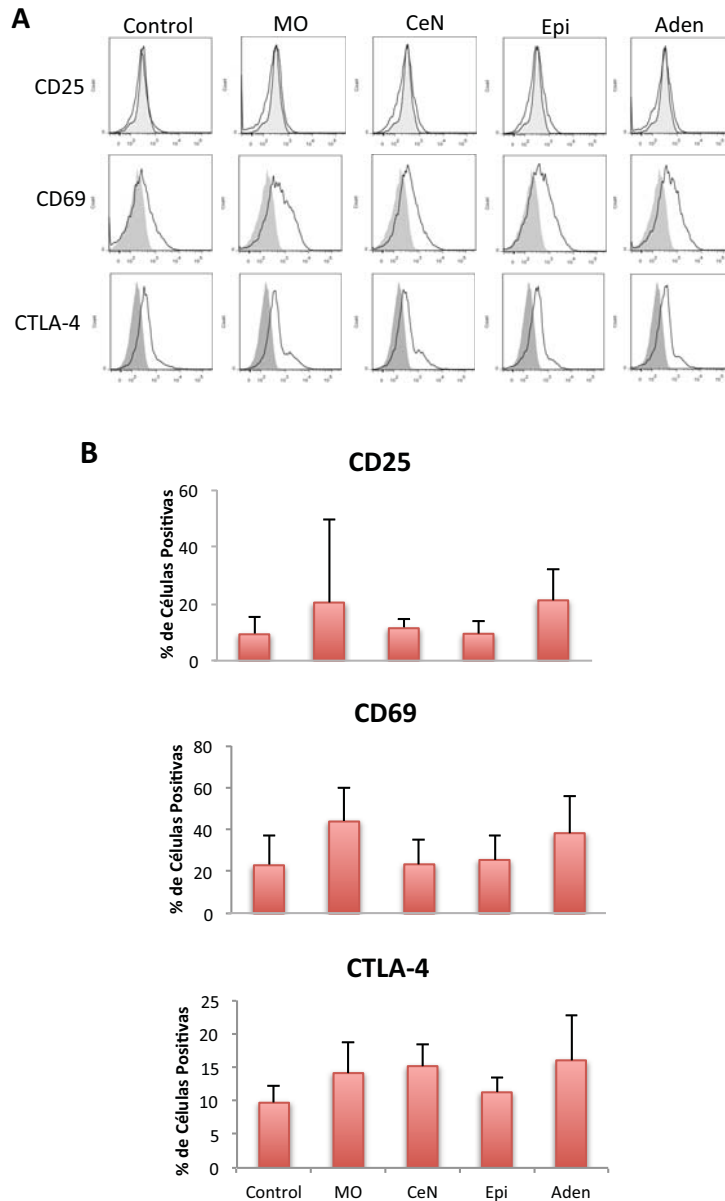


Figura 18. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no afectan la expresión de moléculas de activación en linfocitos T de poblaciones de células mononucleares. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión de las moléculas en linfocitos T activados en ausencia de MSCs se consideró como control positivo (Control). El porcentaje de expresión de los marcadores se determinó sobre la población de linfocitos T a las 48 h de cultivo. A) Histogramas representativos de la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 de un experimento. B) Media \pm SEM del porcentaje de expresión (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5).

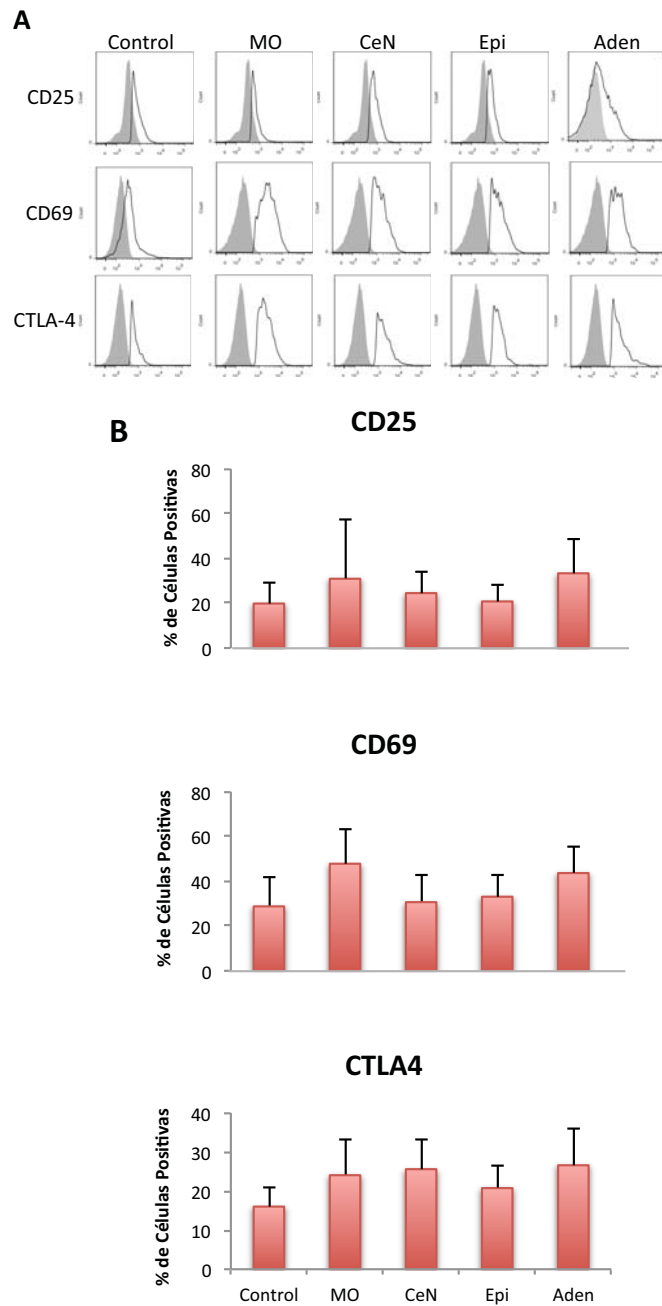


Figura 19. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no afectan la expresión de moléculas de activación en linfocitos T CD4⁺. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión de las moléculas en linfocitos T CD4⁺ activados en ausencia de MSCs se consideró como control positivo (Control). El porcentaje de expresión de los marcadores se determinó sobre la población de linfocitos T a las 48 h de cultivo. A) Histogramas representativos de la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 de un experimento. B) Media \pm SEM del porcentaje de expresión (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5).

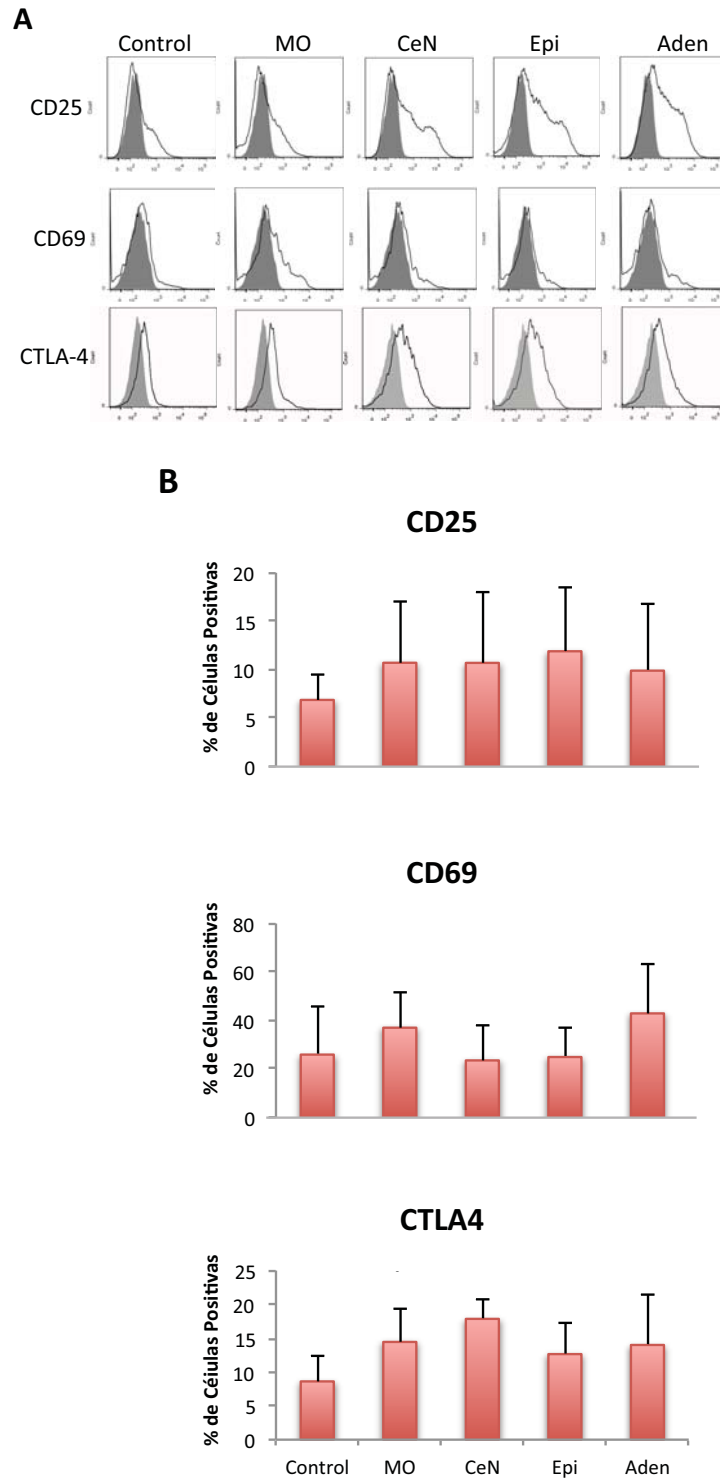


Figura 20. Las MSCs de CeN, Epi y Aden no afectan la expresión de moléculas de activación en linfocitos T CD8⁺. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los cocultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión de las moléculas en linfocitos T CD8⁺ activados en ausencia de MSCs se consideró como control positivo (Control). El porcentaje de expresión de los marcadores se determinó sobre la población de linfocitos T a las 48 h de cultivo. A) Histogramas representativos de la expresión de CD25, CD69 y CTLA-4 de un experimento. B) Media \pm SEM del porcentaje de expresión (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5).

En cuanto a la expresión de CTLA-4 (Fig. 19B) se observó un comportamiento similar, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en los cultivos con MSCs de las fuentes estudiadas (MO $24.05\pm 9.17\%$; CeN $25.6\pm 7.57\%$; Epi $20.75\pm 5.79\%$ y Aden $26.6\pm 9.2\%$; Fig. 19B) en comparación con el control ($16\pm 5\%$).

Para los linfocitos $CD8^+$ (Fig. 20), no se observó cambio en la expresión de CD25, ya que al comparar los LT de los cultivos con MSCs de las cuatro fuentes estudiadas (MO $10.71\pm 6.2\%$; CeN $10.7\pm 7.4\%$; Epi $11.9\pm 6.6\%$ y Aden $9.9\pm 7\%$; Fig. 20B) no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) cuando fueron comparadas con el control ($6.88\pm 2.7\%$). En lo que se refiere a la expresión de CD69 los linfocitos cultivados en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden ($37\pm 15\%$; $23.5\pm 14.2\%$; $24.9\pm 12.3\%$ y $42.9\pm 20\%$, respectivamente; Fig. 20B) no presentaron diferencias significativas cuando fueron comparados con el control ($25.9\pm 19.8\%$; $P>0.05$). De la misma forma tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de CTLA-4 al comparar los cultivos con MSCs de las cuatro fuentes antes mencionadas (MO $14.44\pm 5\%$; CeN $17.85\pm 3\%$; Epi $12.64\pm 4.73\%$ y Aden $14\pm 7.49\%$; Fig. 20B) con el control ($8.6\pm 3.62\%$; $P>0.05$).

Estos resultados sugieren que las MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden no modifican la expresión de moléculas de activación temprana CD25, CD69 y CTLA-4 en LT $CD3^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$.

Moléculas inmunoregulatoras secretadas en los co-cultivos de células mononucleares y MSCs de CeN, Epi y Aden.

Previamente se ha demostrado la importancia del IFN γ en la inducción de las propiedades inmunosupresoras de las MSCs, tanto en ausencia como en presencia de otras citocinas pro-inflamatorias (Mourez et al, 2007; Sheng et al, 2008). De igual forma resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que los sobrenadantes provenientes de los co-cultivos de LT CD3⁺ activados y MSCs de MO en contacto celular tienen una mayor concentración de IFN γ , en comparación con los cultivos en ausencia de MSCs (Castro-Manrreza et al, 2014).

Debido a que las MSCs de las fuentes analizadas no mostraron capacidad para disminuir la proliferación de LT en un sistema de co-cultivo *in vitro*, esto podría relacionarse con una baja concentración de citocinas presentes en el cultivo. De esta forma se evaluó la presencia de citocinas que participan en la respuesta inmunoregulatora de las MSCs. Se determinó la concentración de IFN γ , TNF α , IL-10 e IL-4 en los co-cultivos en los cuales se permitió el contacto celular (Fig. 21). La concentración de citocinas presentes en el medio condicionado de las CMNs activadas en ausencia de MSCs fue considerada como control positivo (Control). Se detectó una menor expresión de IFN γ en co-cultivos con MSCs de las cuatro fuentes en comparación con el control, sin embargo esta diferencia resultó no ser significativa (Control 3475.37 \pm 2682.52 pg/ml; MO 886.13 \pm 1133.42 pg/ml; CeN 1285.21 \pm 1944.7 pg/ml; Epi 1651.41 \pm 2061.94; Aden 2128.18 \pm 1744.65 pg/ml; Fig. 21), un comportamiento similar se observó en el caso de IL-10 (Control 63.68 \pm 26.9 pg/ml; MO 68.75 \pm 21.71 pg/ml; CeN 51.5 \pm 16.27 pg/ml; Epi 68.58 \pm 18.25 pg/ml; Aden 55.27 \pm 16.29 pg/ml; Fig. 21). En el caso de la expresión de TNF α solo se observó una disminución significativa en la secreción de esta citocina en los sobrenadantes de los co-cultivos en presencia de MSCs de MO y CeN con respecto al control (83.79 \pm 12.94 pg/ml; 69.29 \pm 12.63 pg/ml y 109.17 \pm 29.2 pg/ml, respectivamente; Fig. 21). Respecto a la concentración de IL-4 se encontró una disminución en la concentración de esta citocina en los co-cultivos con MSCs de MO, CeN, y Epi con respecto al control (46.41 \pm 7.71 pg/ml; 35.53 \pm 6.46 pg/ml; 56.06 \pm 17.51 pg/ml y 186.16 \pm 126.01 pg/ml, respectivamente; Fig. 21). Los resultados obtenidos indican que probablemente las cantidades de IFN γ y TNF α presentes en el sobrenadante no es suficiente para inducir las propiedades

inmunosupresoras de las MSCs de CeN, Epi y Aden; además al parecer IL-10 e IL-4 no son suficientes para disminuir la proliferación de LT presentes en el co-cultivo con MSCs.

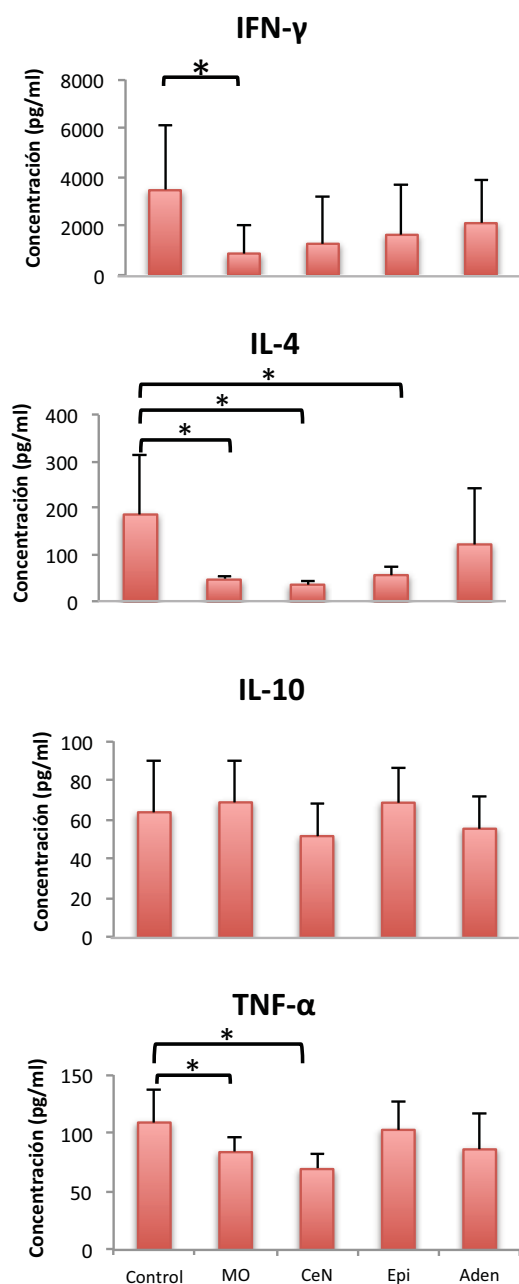


Figura 21. Citocinas presentes en los co-cultivos de LT activados y MSCs. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La concentración de citocinas se determinó a los 6 días de co-cultivo en los sobrenadantes mediante la técnica de CBA. La concentración de citocinas detectada en el medio condicionado de las CMNs activadas en ausencia de MSCs fueron consideradas como expresión basal (Control). Se muestra Media \pm SEM de la concentración de citocinas (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5). *Diferencia estadística significativa con $P < 0.05$.

La PGE₂ secretada por las MSCs esta involucrada en la disminución de la proliferación de los LT, además estimula la producción de IL-4 e IL-10 y promueve la diferenciación de LTreg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺; Kalinski, 2012). Debido a que las MSCs de MO son capaces de secretar PGE₂ al ser estimuladas con IFN γ (Aggarwald y Pittenger, 2005), se decidió evaluar la cantidad de PGE₂ presente en el medio condicionado de los co-cultivos con contacto celular entre MSCs y LT activados. La concentración de PGE₂ del medio condicionado de MSCs cultivadas en ausencia de LT activados, fue considerada como expresión basal de la molécula (Control; Fig. 22). Los medios condicionados provenientes de los co-cultivos con MSCs de MO mostraron un incremento significativo en la secreción de PGE₂ en comparación con el control (Control: 6.11 \pm 3.1 ng/ml, Contacto: 13.13 \pm 0.78 ng/ml).

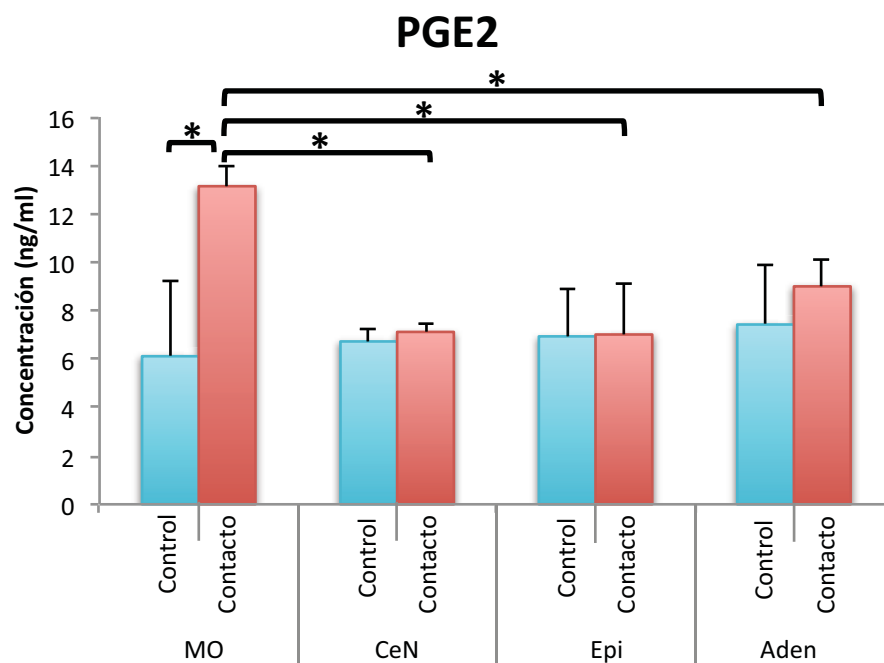


Figura 22. Producción de PGE₂ en cultivos con MSCs provenientes de MO, CeN, Epi y Aden. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión en MSCs en ausencia de CMNs activadas se consideró como control. La concentración de la molécula en los sobrenadantes de los co-cultivos se determinó a los 6 días de cultivo mediante un ensayo de ELISA. Se muestra Media \pm SEM de la concentración de citocinas (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5). *Diferencia estadística significativa con P<0.05.

En cambio, no se observó incremento significativo ($P>0.05$) en la secreción de PGE_2 en ninguno de los co-cultivos con MSCs de CeN, Epi y Aden (Control: 6.72 ± 0.55 ng/ml, Contacto: 7.12 ± 0.35 ng/ml; Control: 6.93 ± 1.95 ng/ml, Contacto: 7.01 ± 2.15 ng/ml y Control: 7.42 ± 2.43 , ng/ml Contacto: 9 ± 1 ng/ml, respectivamente; Fig. 22). Sin embargo, si se observan diferencias significativas entre los cultivos con contacto de MO y aquellos de CeN, Epi y Aden (13.13 ± 0.78 ng/ml; 7.12 ± 0.35 ng/ml; 7.01 ± 2.15 ng/ml y 9 ± 1 ng/ml; respectivamente). De esta forma, no se observó disminución en la proliferación de los LT en co-cultivo con las MSCs provenientes de estas fuentes.

El Incremento en la expresión de PD-L1 en MSCs de CeN y Epi no induce la inmunosupresión de los Linfocitos T.

Anteriormente se demostró la importancia del contacto celular para la inhibición de la proliferación a través de la expresión de PD-L1, la cual esta involucrada en la inhibición de la proliferación de LT mediante el contacto célula-célula (Sheng et al, 2008). De esta

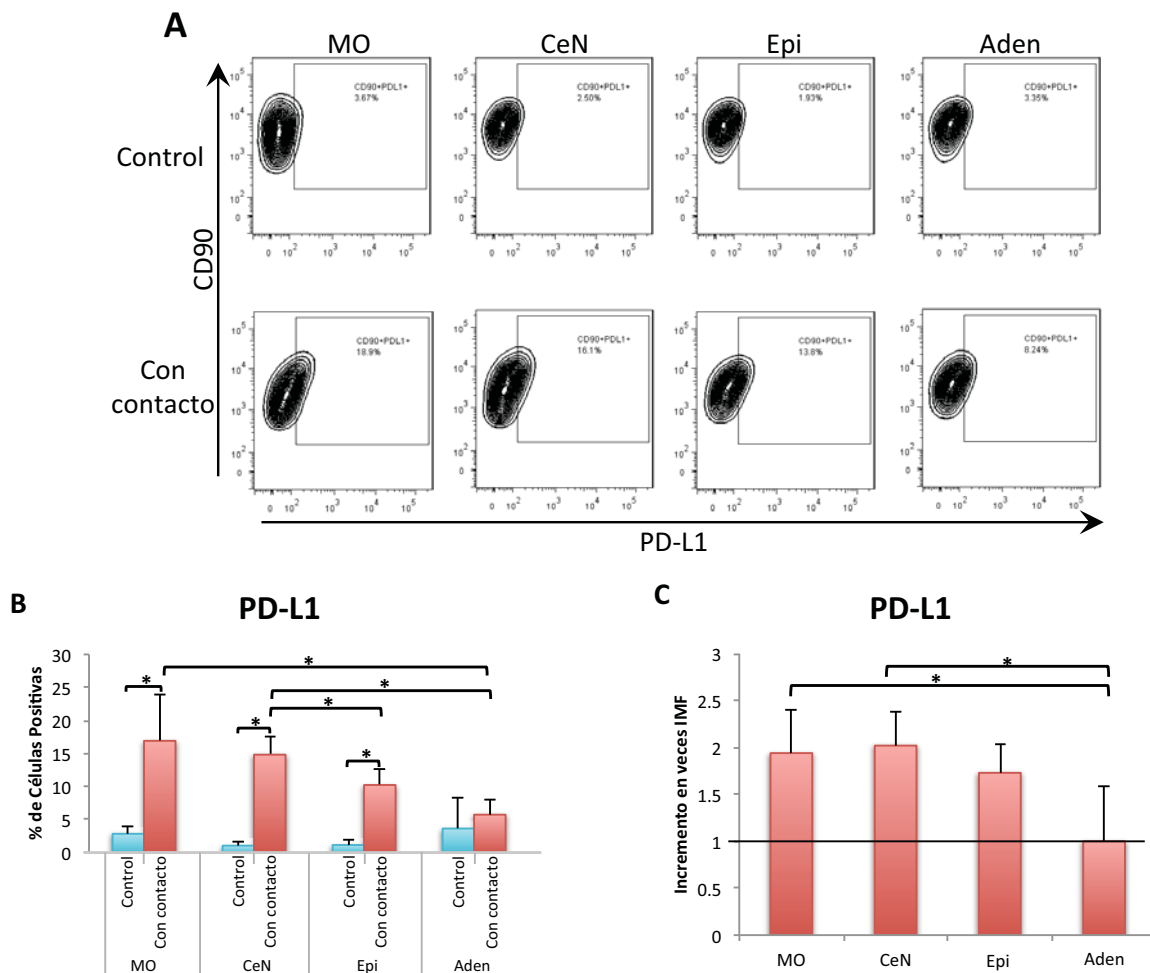


Figura 23. MSCs de Epi y Aden aumentan su expresión de PD-L1 en presencia de linfocitos T activados. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión de PD-L1 en MSCs en ausencia de CMNs activadas se consideró como control. El porcentaje de la población PD-L1⁺ y el incremento en veces de la IMF de PD-L1 se determinó sobre la región CD3⁺CD90⁺ después de 7 días de cultivo. A) Gráficos de contorno representativos de un experimento. B) Media ± SEM del porcentaje de MSCs CD3⁺CD90⁺PD-L1⁺. C) Incremento en veces de IMF en la población CD3⁺CD90⁺PD-L1⁺. (MO n=6; CeN n=4; Epi n=4; Aden n=4). *Diferencia estadística significativa con P<0.05.

forma, se analizó la expresión de PD-L1 en las MSCs de todas las fuentes presentes en los co-cultivos con contacto celular. El porcentaje y la intensidad media de fluorescencia (IMF) en MSCs cultivadas en ausencia de CMNs activadas fueron considerados como la expresión basal de la molécula (Control; Fig. 23). Los resultados obtenidos indican que la presencia de CMNs activadas aumenta la expresión de PD-L1 en MSCs (Fig. 23B) cuando son co-cultivadas en contacto celular en aquellas células provenientes de MO (Control: $2.8 \pm 1\%$, Contacto: $16.9 \pm 7\%$); CeN (Control: $1 \pm 10.5\%$, Contacto: $14.8 \pm 2.7\%$) y Epi (Control: $1.1 \pm 0.8\%$, Contacto: $10.2 \pm 2.3\%$); dicho incremento no se observó en el caso de Aden (Control: $3.6 \pm 4.8\%$, Contacto: $5.7 \pm 2.3\%$). Además, se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión de las células provenientes de CeN y Epi en comparación con las de Aden, las cuales mostraron menor expresión de la molécula analizada. Resultados similares fueron obtenidos al analizar la IMF de PD-L1 (Fig. 23C), donde se observó un incremento significativo en las MSCs de CeN (2.02 ± 0.37) y en aquellas provenientes de Epi (1.73 ± 0.31) el cual no fue observado en Aden (1 ± 0.59). También se observó una diferencia significativa en el aumento en la IMF de CeN en comparación con el de Aden. Estos resultados indican que a pesar de que se observa un incremento en la expresión de PD-L1 en MSCs cuando estas son cultivadas con LT activados, este no es suficiente para inducir inmunosupresión.

El incremento en la expresión de CTLA-4 no induce la inmunosupresión de linfocitos T en co-cultivo con MSCs de CeN, Epi y Aden.

CTLA-4 es un regulador negativo de la respuesta inmune, su máxima expresión se alcanza entre las 24h y 48h después de la activación (Wing et al, 2011), por lo cual se decidió analizar si los cambios en la expresión de esta molécula se mantenían por un tiempo más prolongado. Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio mostraron que las MSCs de MO incrementan la expresión de CTLA-4 en LT CD4⁺ cuando estos son co-cultivados en contacto celular durante 3 días de cultivo. Por esta razón se analizó la expresión de esta molécula 6 días después de la activación, ya que en experimentos anteriores realizados a las 48h de activación no se observó cambio en la expresión de esta molécula en aquellos LT CD4⁺ cultivados con MSCs de las tres fuentes estudiadas en comparación con el control. Para ello se realizaron co-cultivos con contacto celular de CMNs activadas con MSCs de CeN, Epi y Aden y se analizó tanto el porcentaje de células

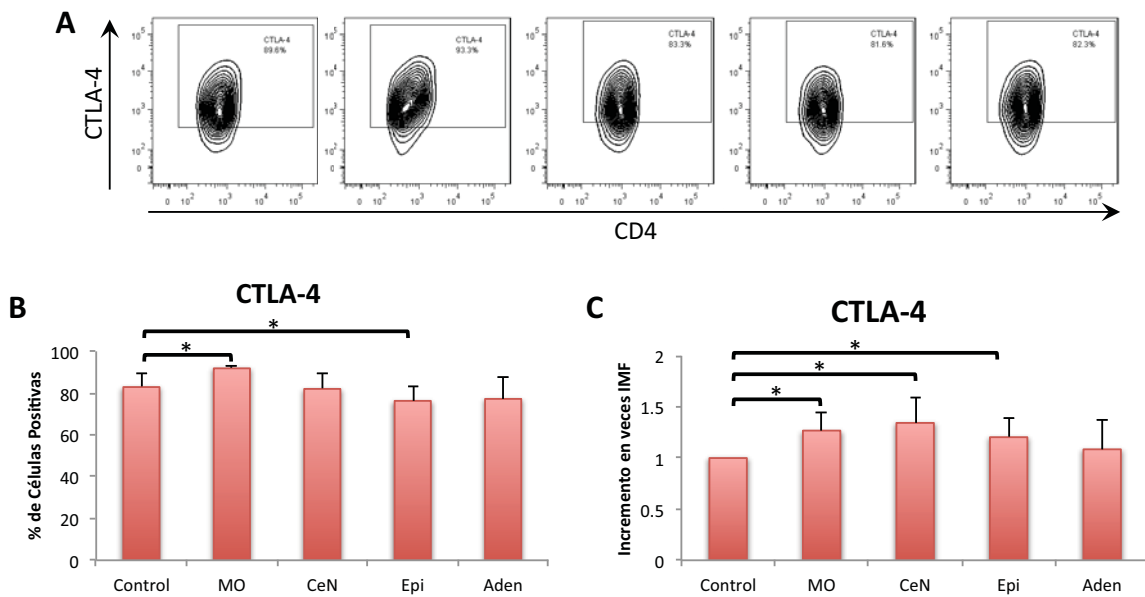


Figura 24. MSCs de CeN y Epi aumentan la IMF de expresión de CTLA-4 en linfocitos T activados. CMNs activadas con PHA en presencia de MSCs de MO, CeN, Epi y Aden. Los co-cultivos se realizaron permitiendo el contacto celular. La expresión de CTLA-4 en LT CD4⁺ en ausencia de MSCs se consideró como control. La expresión de la molécula se determinó a los 6 días de cultivo mediante citometría de flujo. Se muestra Media ± SEM de la expresión de la molécula (MO n=9; CeN n=7; Epi n=9; Aden n=5). *Diferencia estadística significativa con P<0.05.

positivas como la IMF en la población de LT CD4⁺. La expresión de CTLA-4 en LT activados en ausencia de MSCs fue considerada como control positivo (Control; Fig. 24). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre el control y MO y Epi; sin embargo se observaron comportamientos distintos en los dos tipos celulares. En el caso de las MSCs de MO se observó un aumento significativo en comparación con el control (91.86±1.5% y 82.91±6.81%, respectivamente) y para Epi lo observado fue una disminución significativa con respecto al control (76.3±6.76% y 82.91±6.81%, respectivamente). Estas diferencias no se observaron entre el control (82.91±6.81%) y CeN y Aden (82±7.38% y 77.24±10.87% respectivamente; Fig. 24B). En lo que se refiere a la IMF de CTLA-4 se encontró un aumento significativo (P<0.05) en MO, CeN y Epi (1.26±0.18; 1.34±0.24 y 1.08±0.28, respectivamente; Fig. 24C) en comparación con el control (1). De esta forma, aunque la expresión de la molécula aumenta de forma significativa en los LT CD4⁺ individuales, este aumento no se ve reflejado en la disminución de la proliferación de los LT activados cultivados con MSCs de las tres fuentes estudiadas.

DISCUSIÓN

Las MSCs han mostrado tener propiedades inmunosupresoras y promover el desarrollo, supervivencia y metástasis tumoral al proporcionar un ambiente propicio para la evasión de la respuesta inmune (Djouad et al, 2003; Spaeth et al, 2008). Se ha reportado la presencia de MSCs en diversos tipos de cáncer (McLean et al, 2011; Wulling et al, 2003; Johann et al, 2010; Cao et al, 2009) y previamente nuestro grupo de trabajo reportó la presencia de MSCs tanto en cérvix normal como en cáncer de cérvix (Montesinos et al, 2013) y evidenció su participación en la evasión de la respuesta inmune en contra de las células tumorales, dado que las MSCs de CaCe tuvieron la capacidad de disminuir la expresión de MHC I en células tumorales de CaCe. Un aspecto interesante de conocer es si las MSCs de CaCe tienen la capacidad de inmunosuprimir a los LT, lo cual no ha sido explorado a la fecha.

En este estudio se procesaron muestras de dos tipos de cáncer cervical: carcinoma epidermal o de células escamosas de cérvix y adenocarcinoma y en ambos casos se obtuvieron células con morfología fibroblastoide, positivas para los marcadores característicos de MSCs (CD73, CD90 y CD105) y con capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica, y condrogénica. No obstante, aunque cumplen con las condiciones necesarias para ser consideradas como MSCs (Dominici et al, 2006), se observaron diferencias en la capacidad de diferenciación adipogénica al compararlas con aquellas provenientes de MO, ya que aunque presentaron la formación de vacuolas lipídicas evidenciadas por la positividad para rojo oleoso, éstas no cambiaron su morfología y permanecieron fibroblastoides tanto en el caso de las MSCs de CeN como las provenientes de Epi y Aden. Esta diferencia en el potencial de diferenciación adipogénica puede deberse a la ubicación de las MSCs de las fuentes estudiadas ya que en el cérvix no hay tejido graso. Lo anterior coincide con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Montesinos et al, 2013), además se encontró un menor porcentaje de expresión de MHC I en estas células en comparación con las de MO, lo cual coincide con los reportes que indican que los pacientes con cáncer de cérvix presentan anomalías en la maquinaria de presentación de antígeno de MHC I en células tumorales (Jordanova et al, 2008; Bontkes et al, 1998; Cromme et al, 1994; Keating et al, 1995; Connor y Stern, 1990; Cromme et al, 1993; Koopman et al, 2000; Hilders et al, 1995; van Driel et al, 1996; Mehta et al, 2008).

Los anteriores resultados indican que aunque las células obtenidas de las tres fuentes estudiadas son MSCs, estas no tienen capacidad de diferenciación similar a las de MO. Además, a pesar de que son positivas para los marcadores considerados para las MSCs, hay diferencia en la expresión de ciertos marcadores, lo que puede estar relacionado con características propias que definen a las MSCs en relación a su localización anatómica y para determinar ello sería importante analizar el inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de un mayor número de muestras.

Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que las MSCs de MO son capaces de inhibir la proliferación de una población purificada de LT CD3⁺ activados con anti-CD3/anti-CD28 cuando estas son co-cultivadas *in vitro* en presencia de contacto celular (Castro-Manreza et al, 2014), razón por la cual en este trabajo se utilizó el mismo sistema de co-cultivos con MSCs de las fuentes estudiadas, sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados, ya que no se observó inmunosupresión de los LT CD3⁺ en ninguno de los casos.

Tomando en cuenta que las MSCs interactúan con diversos componentes del sistema inmune que influyen en su comportamiento regulador (Keating, 2012; LeBlanc y Mougiakakos, 2012) y que la producción de citocinas pro-inflamatorias por macrófagos M1 pueden activar a las MSCs y disparar la secreción de mediadores que dañan la diferenciación de monocitos hacia un perfil anti-inflamatorio y a macrófagos M2 (Le-Blanc y Mougiakakos, 2012), se realizaron co-cultivos de MSCs de todas las fuentes estudiadas con CMNs activadas con PHA tanto en contacto celular como en ausencia de este. En todos los casos se utilizaron dos controles, el primero consistió de CMNs activadas con PHA en ausencia de MSCs y como segundo control un co-cultivo en contacto con MSCs de MO, esto con el fin de asegurar el correcto funcionamiento del sistema. Con el uso de CMNs se obtuvieron resultados similares a los observados con linfocitos CD3⁺ purificados, dado que no hubo disminución de la proliferación de LT CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ cuando estos se activaron en presencia de MSCs de CeN, Epi y Aden. Esto puede deberse a que la polarización de los macrófagos provee un mecanismo suplementario para mantener el balance entre los efectos pro- y anti-inflamatorios (Ren et al, 2008).

De esta forma, la retroalimentación reguladora entre MSCs y macrófagos genera una profunda sensibilidad al microambiente que se manifiesta a través de la habilidad de

cambiar entre actividades pro- y anti-inflamatorias. En ambos casos, los mecanismos de recambio recaen en la producción de mediadores solubles como IDO. Las concentraciones de estos factores pueden ser críticos al activar el cambio entre MSCs anti- y pro-inflamatorias y también entre macrófagos M1 y M2 (Ren et al, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que al parecer las MSCs de Epi y Aden no poseen capacidad de inmunosupresión cuando son extraídas de su microambiente. Además, en este caso, la presencia de otro componente como las células tumorales puede influir en el comportamiento inmunoregulator de las MSCs, por lo que deben hacerse más estudios que involucren a este tipo celular. Otro factor que puede estar influyendo en este caso, es que los ensayos se llevaron a cabo utilizando CMNs provenientes de donadores sanos, de esta forma, deben realizarse experimentos donde se utilicen CMNs provenientes de pacientes diagnosticadas con Epi y Aden para evaluar el comportamiento tanto de los LT como de las MSCs provenientes de ambas fuentes.

Diversos estudios han descrito el efecto de las MSCs provenientes de MO sobre la expresión de las moléculas de activación temprana de LT CD25, CD69 y CTLA-4 (LeBlanc et al, 2004; Groh et al, 2005; Krampera et al, 2006; Ramasamy et al, 2008); sin embargo se reportan resultados contradictorios ya que algunos mencionan que en una población de CMNs activadas con PHA, las MSCs de MO disminuyen la expresión de CD25 y CD69 en LT (LeBlanc et al, 2004); en otros estudios se reporta que la expresión de estas mismas moléculas no se ve afectada cuando una población enriquecida de LT CD3⁺ son activados con aloantígenos en presencia de MSCs de MO (Ramasamy et al, 2008). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con aquellos reportados previamente por Ramasamy y cols. ya que no se observó ninguna diferencia en la expresión de CD25 y CD69 en los LT activados cultivados con MSCs de CeN, Epi y Aden a las 48h de cultivo en comparación con el control. En lo que se refiere a la expresión de CTLA-4 tampoco se encontraron diferencias en la expresión de la molécula en los co-cultivos con MSCs de las tres fuentes estudiadas en comparación con el control, lo cual coincide con reportes previos que indican que en poblaciones enriquecidas de LT CD4⁺ y CD8⁺ activados con aloantígenos y cultivadas con MSCs de MO, no se observaron cambios en la expresión de este marcador (Krampera et al, 2006). La diferencia en los resultados

obtenidos en los diversos estudios, puede deberse a las poblaciones utilizadas en cada uno de ellos o bien al método de activación empleado.

El IFN γ inhibe la proliferación e induce la apoptosis de LT (Feng et al, 2008; Lu y Waller, 2009) y estimula la síntesis de moléculas inmunosupresoras como IDO, PGE $_2$ y PD-L1 en MSCs (Meisel et al, 2004; Aggarwal et al, 2005; Sheng et al, 2008), además de favorecer su capacidad inmunosupresora (Krampera et al, 2006; Ryan et al, 2007; Polchert et al, 2008). Así, dado que nuestros resultados indican que las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de LT activados, se evaluó la presencia de esta citocina para saber si había una disminución en la concentración de la misma en los co-cultivos y esta era la razón por la cual la actividad inmunosupresora de las MSCs de cérvix no se inducía y con ello no se veía favorecida la disminución de la proliferación de LT activados en presencia de las MSCs. Al respecto, no se detectaron cambios en la concentración de esta citocina en los sobrenadantes de los co-cultivos con MSCs de cérvix, no obstante al realizar la comparación con el sobrenadante de aquellos de MO, se observó que no incrementaban la concentración de IFN γ en comparación con el control y aunque no se observó una diferencia significativa, podemos ver una tendencia al incremento en la concentración cuando se compara el sobrenadante de este co-cultivo con aquellos de CeN, Epi y Aden, siendo este último aquel con mayor concentración de la citocina, aunque las MSCs de esta fuente no inhibieron la proliferación de LT activados. Dado que el IFN γ estimula la producción de la molécula inmunosupresora IDO en MSCs (Meisel et al, 2004; Sheng et al, 2008), probablemente está vía esta disminuida en la inmunoregulación de las MSCs de cérvix, sin embargo, deben hacerse más estudios los cuales deben incluir la presencia de células tumorales en los co-cultivos para determinar ello. Los resultados obtenidos en los co-cultivos con MO coinciden con las observaciones hechas por otros grupos acerca de que estas células disminuyen la secreción de IFN γ por los LT activados (Sheng et al, 2008; Ramasamy et al, 2008; Chiesa et al, 2012). No obstante, al parecer una baja concentración de IFN γ es capaz de activar a las MSCs de MO, mientras que en el caso de los co-cultivos en presencia de MSCs provenientes de cérvix en los cuales se detectaron mayores concentraciones de IFN γ , esta podría no favorecer la inmunosupresión de las MSCs o bien la concentración de esta citocina contrarrestar el efecto inmunosupresor de las MSCs o

favorecer la diferenciación de estas células hacia un fenotipo no inmunosupresor, como lo sugieren algunos estudios (Ren et al, 2008; Li et al, 2012; Shi et al, 2012).

De la misma forma, las MSCs de MO disminuyen la secreción de citocinas pro-inflamatorias tipo Th1 (TNF α e IFN γ) por parte de los LT activados e induce la producción de citocinas anti-inflamatorias tipo Th2 (IL-10 e IL-4; Aggarwal y Pittenger et al, 2005). Sin embargo, las MSCs pueden potenciar la respuesta inmune a través de la producción de quimiocinas que reclutan a los linfocitos a sitios de inflamación, dado que producen CXCL9, CXCL10 y CXCL11 bajo el control de citocinas pro-inflamatorias. Esto ocurre cuando las MSCs no han sido expuestas a niveles suficientes de citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IFN γ , de esta forma no se produceIDO suficiente para suprimir la proliferación de LT (Ren et al, 2008). De esta forma, IDO es un apagador molecular de la inmunoregulación de las MSCs (Ren et al, 2008). Por esta razón y ya que se observó la presencia de IFN γ se analizó la secreción de TNF α . En este estudio se encontró una disminución en la secreción de esta citocina en el caso de los sobrenadantes de los co-cultivos de CeN en comparación con el control, sin embargo no se encontraron diferencias con el resto de los co-cultivos, los cuales se comportan de forma similar al control en los cuales al parecer no hay una disminución en la respuesta Th1.

IL-10 es un mediador importante en la inmunosupresión mediada por MSCs de MO, sin embargo, se ha reportado que esta citocina no es uno de los principales responsables de la inmunosupresión mediada por MSCs ya que al añadir un anticuerpo neutralizante de esta citocina en un co-cultivo mixto de linfocitos con MSCs, no se observó una disminución en la inmunosupresión ejercida por las MSCs (Ryan et al, 2007), lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio, ya que no se observó una diferencia significativa entre los co-cultivos con MO en los que se observó disminución en la proliferación de LT y aquellos con MSCs de CeN, Epi y Aden en donde no hubo disminución. Lo anterior indica la posible ausencia de otras moléculas involucradas en la capacidad de inmunosupresión mediada por MSCs, que al parecer no están presentes en los co-cultivos con células provenientes de cérvix.

En el caso de IL-4 se observó una disminución en la concentración de esta citocina en los sobrenadantes de los co-cultivos con MSCs de todas las fuentes estudiadas en comparación con el control, sin embargo en un estudio previo llevado a cabo en nuestro

laboratorio, se estableció que IL-4 no participa en la regulación de la inmunosupresión de las MSCs de MO (Castro-Manreza et al, 2014).

Por otro lado, la PGE₂ es un factor lipídico que disminuye la proliferación de LT, estimula la secreción de IL-4 e IL-10 y promueve la generación de LTreg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Kalinski, 2012). Además se ha demostrado que el IFN γ estimula la secreción de PGE₂ en las MSCs (Rasmusson et al, 2005; Avanzani et al, 2000; Ryan et al, 2007). Debido a lo anterior y ya que encontramos secreción de IFN γ en los co-cultivos con MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden, se analizó la presencia de PGE₂ en los sobrenadantes. En este estudio se detectó un aumento en la concentración de PGE₂ en aquellos co-cultivos con MSCs de MO cuando estas son cultivadas con LT activados, en cambio no se observó ningún incremento en la concentración de esta molécula en los co-cultivos con MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden. La disminución en la concentración de PGE₂, puede estar relacionada con la falta de capacidad para inhibir la proliferación de LT por parte de las MSCs de cérvix. Es importante mencionar que en los co-cultivos con MSCs de cérvix se observó una tendencia a una mayor producción de IFN γ , lo que parecería contradictorio dado que debería favorecer la producción de PGE₂, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de la participación de otras moléculas en dicha inducción y que probablemente estén ausentes en los co-cultivos de MSCs de cérvix. Estudios llevados a cabo por Spaggiari y cols (2008), muestran que la PGE₂ actúa de forma sinérgica con IDO, ya que se requiere la inhibición de ambas moléculas para restaurar la proliferación de células NK que han sido cultivadas en presencia de MSCs de MO. Con ello sería importante evaluar la concentración de IDO en nuestro sistema de cultivo, dado que podría estar disminuida al igual que PGE₂.

Estudios previos han demostrado la participación de PD-L1 presente en la membrana de las MSCs en la inmunosupresión de LT por medio del contacto celular (Sheng et al, 2008; Castro-Manreza et al, 2014). Además la ruta PD1/PD-L1 se activa en presencia de tumores ya que previene la autoinmunidad y contribuye a la formación del microambiente inmunosupresor mediante la regulación de los LT (Francisco et al, 2010). En este estudio observamos que las MSCs de CeN y Epi aumentan el porcentaje de expresión de PD-L1 y su IMF cuando son cultivadas durante 7 días en presencia de LT activados con PHA, lo cual no se observó en aquellas células de Aden. No obstante, aunque

se observó un aumento en la expresión de PD-L1 en las MSCs de CeN y Epi a los 7 días, debido probablemente a la presencia de $IFN\gamma$, dicha expresión no es suficiente para que se observe disminución en la proliferación de LT activados en presencia de MSCs de las fuentes estudiadas.

CTLA-4 regula de forma negativa la respuesta inmune y se expresa en LTreg, sin embargo, cuando se bloquea la molécula con anticuerpos monoclonales en un cultivo en el cual hay presencia de MSCs, este no tiene ningún efecto en la actividad inmunosupresora de estas células, lo que indica que se requiere la presencia de distintas moléculas para que las MSCs sean capaces de ejercer inmunosupresión sobre los LT. En este trabajo encontramos que la expresión de esta molécula no se modifica después de 48h de cultivo con MSCs de las fuentes estudiadas, sin embargo también se analizó la presencia de este marcador al día 6 de cultivo para contrastar los resultados y de esta forma tener un mejor conocimiento del patrón de expresión de CTLA-4 en los linfocitos activados en presencia de MSCs de CeN, Epi y Aden. En estos co-cultivos se observó que no aumenta el número de células positivas para este marcador, sin embargo se observó un aumento significativo de la IMF en CeN y Epi, lo que indica que la presencia de CTLA-4 no es suficiente para que las MSCs de cérvix inmunosupriman. Con respecto a las MSCs de Aden, no se observó aumento significativo en el porcentaje de expresión o en la IMF, lo que puede explicar en parte por que las células provenientes de este tipo de cáncer no son capaces de inmunosuprimir.

Así, aunque las células obtenidas de CeN, Epi y Aden son MSCs, estas poseen una capacidad de diferenciación e inmunofenotipo diferentes a aquellas de provenientes de MO, razón por la cual probablemente tienen diferencias funcionales, en este caso la inmunoregulación.

Por otro lado, la localización de las MSCs analizadas en este estudio puede ser la razón por la cual las estas no poseen la capacidad de inhibir la proliferación de LT, ya que este tejido se encuentra continuamente expuesto a patógenos e inflamación y por lo tanto resultaría contraproducente que las MSCs de este tejido inmunosupriman dado que se favorecería en mayor medida un patrón constante de infecciones. Este comportamiento de las MSCs de cérvix probablemente se modifique en presencia de las células tumorales, lo cual tendría que ser estudiado con mayor profundidad.

CONCLUSIONES

- Las células obtenidas de CeN, Epi y Aden poseen las características que definen a las MSCs, por lo que pueden ser consideradas como tales, sin embargo presentan un menor potencial en cuanto a la capacidad de diferenciación adipogénica y a la expresión de MHCI en comparación con aquellas provenientes de MO.
- Las MSCs de CeN, Epi y Aden no disminuyen la proliferación de LT CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺.
- Las MSCs de cérvix no modifican la expresión de las moléculas de activación temprana CD25, CD69 y CTLA-4 en los LT activados en presencia de estas células.
- Se observa una tendencia a una mayor producción de IFN γ en los co-cultivos con MSCs de cérvix, el aumento en la concentración de esta citocina podría ser una de las causas por las que no se observa disminución en la proliferación de los LT activados.
- Las concentraciones de citocinas como IL10 encontradas en los medios condicionados de los co-cultivos no son suficientes para inhibir la proliferación de LT.
- La baja concentración de PGE₂ en los sobrenadantes de los co-cultivos con MSCs de CeN, Epi y Aden probablemente indica la importancia de esta molécula para disminuir la proliferación de los LT activados.
- Aunque se encontró un aumento en la expresión de PD-L1 en MSCs de CeN y Aden, esta molécula posiblemente requiere la presencia de otros factores para llevar a cabo una función inmunosupresora. Otra posibilidad es que estos niveles de expresión no sean suficientes para disminuir la proliferación de los LT activados.
- Las MSCs de cérvix no inducen un incremento en la expresión de CTLA4 en LT activados.
- Las MSCs provenientes de CeN, Epi y Aden no poseen la capacidad de inmunosuprimir a los LT.

PERSPECTIVAS

Dado que en el presente estudio no se observó inhibición de la proliferación de linfocitos activados en presencia de MSCs de CeN, Epi y Aden, se debe incluir en el sistema de cultivo a las células tumorales para estudiar la interacción de las MSCs con este tipo celular.

La participación de los macrófagos es importante en la inmunoregulación por parte de las MSCs, y la interacción de ambos tipos celulares da lugar a una respuesta pro-o anti-inflamatoria. Con ello conocer el tipo de macrófagos que se generan en este co-cultivo es importante para explicar uno de los mecanismos por medio de los cuales actúan las MSCs.

Otro posible mecanismo por medio del cual las MSCs pueden ejercer inmunosupresión in vivo es la formación de LTreg, por lo que se debe analizar si en este sistema de cultivo hay generación de LTreg.

Por otra parte se deben analizar otras moléculas y citocinas inmunosupresoras como TGF β , IDO y HLA-G5 las cuales han mostrado participar en la actividad inmunoreguladora de las MSCs de MO.

De esta forma empezaremos a dilucidar si las MSCs de las fuentes estudiadas poseen un fenotipo pro-inflamatorio o carecen de propiedades inmunosupresoras.

LITERATURA CITADA

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005. 105: 1815-1822.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005. 35:1482-1490.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow cell implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002. 30: 42-48.

Blair A, Thomas DB. Preferential adhesion of fetal liver derived primitive haemopoietic progenitor cells to bone marrow stroma. *Br J Haematol* 1997; 99: 726-731

Bell MC, Edwards RP, Partridge EE, Kuykendall K, Conner W, Gore H, et al. CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. *J Clin Immunol*. 1995. 15:130-36.

Beyth S, Z Borovsky, D Mevorach, M Liebergall, Z Gazit, H Aslan, E Galun and J Rachmilewitz. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005. 105:2214– 2219.

Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 2003; 287: 98-105.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192.

Biswas SK, and Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol* 2010. 11, 889–896.

Blazsek I, Delmas MB, Legras S, Marion S, Machover D, Misset JL. Large-scale recovery and characterization of stromal cell-associated primitive haematopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 647-657

Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJ, Verheijen RH, Stukart MJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stacey SN, Duggan-Keen MF, Stern PL, Man S, Borysiewicz LK, Walboomers JM. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2000. 88(1):92–98

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002. 55(4):244–265

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-294.

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 985-996.

Burns JS, Kristiansen M, Kristensen LP, Larsen KH, Nielsen MO, Christiansen H, et al. Decellularized matrix from tumorigenic human mesenchymal stem cells promotes neovascularization with galectin-1 dependent endothelial interaction. *PLoS One* 2011. 6:e21888

Campoli M, S Ferrone, AH Zea, PC Rodriguez and AC Ochoa. Mechanisms of tumor evasion. *Cancer Treat*. 2005. Res 61–88.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301.

Castro-Manreza ME, Mayani H, Monroy-García A, Flores-Figueroa E, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet V, Santiago-Osorio E, Montesinos JJ. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem Cells and Dev*. 2014. 23(11):1217-32

Cao H, XuW, QianH, ZhuW, YanY, Zhou H, Zhang X, Xu X, Li J, Chen Z, Xu X. Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett*. 2009. 274:61-71.

Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. Antigen presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferongamma. *Blood* 2006. 107: 4817-4824.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008. 3:e1886

Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012. 40:130-8

Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012. 31:195- 208

Clerici M, M Merola, E Ferrario, D Trabattoni, ML Villa, B Stefanon, DJ Venzon, GM Shearer, G De Palo and E Clerici. Cytokine production patterns in cervical intra-epithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997. 89:245–250

Coffelt SB, Lewis CE, Naldini L, Brown JM, Ferrara N, and De Palma M. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *Am. J. Pathol.* 2010. 176, 1564–1576.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3213-3218.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999. 181: 67-73.

de Gruijl TD, Bontkes HJ, Stukart MJ, Walboomers JM, Remmink AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, 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* 1996. 77(Pt 9):2183–2191

de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJ, 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

de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, van Meijgaarden KE, Drijfhout JW, Kenter G, Vermeij P, Melief CJ, Offringa R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 2002. 62(2):472–479

de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, 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

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002. 99: 3838-3843.

DeNardo DG, Andreu P, and Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010. 29, 309–316.

De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, and Lewis CE. Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol.* 2007. 28, 519–524.

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

Delli CJ, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis* 2010. 13(1): 43-58

DeNardo DG, Andreu P, and Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010. 29, 309–316.

Deuse T, M Stubbendorff, K Tang-Quan, N Phillips, MA Kay, T Eiermann, TT Phan, HD Volk, H Reichenspurner, RC Robbins, S Schrepfer. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011. 20:655-667.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture. A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-281.

Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 1999. 190(7):1025–1032

Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003.102:3837-3844.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006. 8: 315-317.

Egeblad M, Nakasone ES, and Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 2010. 18, 884–901.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005. 106: 4057-4065.

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.

Feng G, Gao W, Strom TB, Oukka M, Francis RS, Wood KJ and Bushell A. Exogenous IFN-gamma ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2008 38:2512–2527.

Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24: 1020-1029.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403

Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 2004. 4 (12):941–952

Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993; 82: 66-76.

Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Cuarto R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 1999; 27: 1460-1466

García E, Bosch JM, Covisa A, Atero D, Guinot JL, Poveda A, Ortiz B, Illueca C, Traves V, Romero R, Ortega F, Labrador T, Morales J. Guía Clínica de la Patología Cervical. Fundación Instituto Valenciano de Oncología. 2008

Garrido F, I Algarra and AM Garcia-Lora. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions. *Cancer Immunol Immunother* 2010. 59:1601–1606.

Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 2005. 7:967-976.

Giuliani M, M Fleury, A Vernochet, F Ketrroussi, D Clay, B Azzarone, JJ Lataillade, A Durrbach. Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One* 2011. 6:e19988

Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillo- mavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97(23):12513–12518

Grivennikov SI, Greten FR, and Karin M. Immunity, inflammation, and cáncer 2010. *Cell* 140, 883–899.

Groh ME, B Maitra, E Szekely and ON Koc. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005. 33:928–934

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factors requirements of STRO-1+ human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions. *Blood* 1995; 85: 929-940.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesisidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116: 1827-1835.

Halpern JL, Kilbarger A, Lynch CC. Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor. *Cancer Lett* 2011. 308:91-9

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011. 144:646-674

Hardisson D. Carcinoma de Cérvix. Tipos histológicos y factores pronósticos. X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2009.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996; 166: 585-592.

Hazelbag S, Gorter A, Kenter GG, van den Broek L, Fleuren G. Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Hum Pathol* 2002. 33 (12):1193–1199

Heusinkveld M, Welters MJ, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Melief CJ, Fleuren GJ, Kenter GG, van der Burg SH (2010) The detection of circulating Human Papillomavirus (HPV)- specific T cells is associated with improved survival of patients with deeply infiltrating tumors. *Int J Cancer*. 2010. 15;128(2):379-89.

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

Hohn H, Pilch H, Gunzel S, Neukirch C, Freitag K, Necker A, Maeurer MJ. Human papillomavirus type 33 E7 peptides presented by HLA-DR*0402 to tumor-infiltrating T cells in cervical cancer. *J Virol* 2000. 74(14):6632–6636.

Hohn H, Pilch H, Gunzel S, Neukirch C, Hilmes C, Kaufmann A, Seliger B, Maeurer MJ. CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol* 1999. 163 (10):5715–5722.

Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, Vooijs GP, Speel EJ, Ramaekers FC. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004. 202 (1):23–33

Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 2000. 14(23):3065–3073

Jiang XX, Y Zhang, B Liu, SX Zhang, Y Wu, XD Yu and N Mao. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005.105:4120–4126.

Johann PD, Vaegler M, Gieseke F, Mang P, Armeanu-Ebinger S, Kluba T, Handgretinger R, Müller I. Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer* 2010. 10:501.

Johansson M, Denardo DG, and Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol. Rev.* 2008. 222, 145–154.

Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant LG, Kenter GG, van der Burg SH, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8 +/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res* 2008. 14(7):2028–2035

Joyce JA, and Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2009. 9, 239–252.

Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, Kenter GG, Chen L, Boer JM, Melief CJ, van der Burg SH. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009. 15(20):6341– 6347.

Karin M, Lawrence T, and Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006. 124, 823–835.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007. 449:557-63

Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004. 95: 209-14.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2007. 66(11):5527–5536

Kim SH, Turnbull J, Gulmond S. Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 2011. 209(2):139-151

Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. and Dazzi, F., Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003. 101: 3722-3729.

Krampera M, L Cosmi, R Angeli, A Pasini, F Liotta, A Andreini, V Santarlasci, B Mazinghi, G Pizzolo, F Vinante, P Romagnani, E Maggi, S Romagnani and F Annunziato. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006. 24:386–398.

Kodoma J, Hasengaowa, Kusumoto T, et al. Versican expression in human cervical cancer. *Eur J Cancer* 2007. 43(9):1460-1466

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

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003. 57: 11-20

Le Blanc K, I Rasmusson, C Gotherstrom, C Seidel, B Sundberg, M Sundin, K Rosendahl, C Tammik and O Ringden. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin- activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004. 60:307–315.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006. 24:99–146

Lin X, Zhang Y, Dong J, Zhu X, Ye M, Shi J, Lu J, Di Q, Shi J, Liu W. GM-CSF enhances neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2007. 16: 18(11): 1113-7.

Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res* 2011. 71:614-24

Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008. 130(6):1091-1103

Lu Y and Waller EK. Dichotomous role of inter- feron-gamma in allogeneic bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009 15:1347–1353.

Luan X, Li G, Wang G, Wang F and Lin Y. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34⁺ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2013. 45: 32–38.

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.

Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005. 90: 516-525.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002. 23(11):549–555

Mantovani A, Allavena P, Sica A, and Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008. 454, 436–444.

Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med.* 2010. 10, 369–373.

Maluf PJ, Michelin MA, Etchebehere RM, Adad SJ, Murta EF. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Arch Gynecol Obstet.* 2008. 278:525-30.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000b; 9: 841-848.

Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008. 134(2):215–230

Matsuda M, F Salazar, M Petersson, G Masucci, J Hansson, P Pisa, QJ Zhang, MG Masucci and R Kiessling. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 1994. 180:2371–2376.

McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, Cabrera L, Keller E, McCauley L, Cho KR, Buckanovich RJ. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells

regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest*. 2011. 121:3206-3219.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. 2001. 82(1):15-33.

Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Offringa R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 1999. 190(7):1033–1038

Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, Franken KL, Hahne M, Albar JP, Meisel R, A Zibert, M Laryea, U Gobel, W Daubener and D Dilloo. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3- dioxygenasemediated tryptophan degradation. *Blood* 2004. 103:4619–4621.

Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 2010. 16:1400-6

Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W and Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygen- asemediated tryptophan degradation. *Blood* 2004.103:4619– 4621.

Melief CJ, Offringa R. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001. 98(20):11515–11520

Montesinos JJ, Mora-García ML, Mayani H, Flores-Figueroa E, García-Rocha R, Fajardo-Orduña GR, Castro-Manreza ME, Weiss-Steider B, and Monroy-García A. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cáncer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *StemCells and Dev*. 2013. 22 (18): 2508-2519

Mora-García M de L, Duenas-González A, Hernández-Montes J, De la Cruz-Hernández E, Pérez-Cárdenas E, Weiss-Steider B, Santiago-Osorio E, Ortíz-Navarrete VF, Rosales VH, et al. Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *J Transl Med* 2006. 4:55.

Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, et al. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 2009. 30:589-97

Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007. 117(5):1147–1154

Murdoch, C., Muthana M, Coffelt SB, and Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2008 8, 618–631.

Nauta AJ, AB Kruisselbrink, E Lurvink, R Willemze and WE Fibbe. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34 + -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006. 177:2080–2087.

Nakagawa H, Liyanarachi S, Davaluruni RV et al. Role of cancer-associated stromal fibroblast in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004. 23(44):7366-7377.

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

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

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001. 75(9):4283–4296.

Nimako M, Fiander AN, Wilkinson GW, 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.

Oerke S, Hohn H, Zehbe I, Pilch H, Schicketanz KH, Hitzler WE, Neukirch C, Freitag K, Maeurer MJ. Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer* 2005.114 (5):766–778.

Oskowitz AZ, Penfornis P, Tucker A, Prockop DJ, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004. 22:377-84

Ostrand-Rosenberg S, and Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* 2009 182, 4499–4506.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.

Owen ME, Cave J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CRU-F. *J Cell Sci* 1987; 87: 731-738.

Parkin DM, Pisan P, Ferlay J. Global cancer statistics, 1999. *Cancer J Clin.* 49: 33-64.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005. 55(2):74–108

Pedemonte E, Benvenuto F, Casazza S, et al. The molecular signature of therapeutic mesenchymal stem cells exposes the architecture of the hematopoietic stem cell niche synapse. *BMC Genomics* 2007. 8: 65.

Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev* 2009. 229(1):67–87.

Perea SE, Massimi P, Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. *Int J Mol Med* 2000. 5(6):661–666

Piersma SJ, Welters MJ, van der Hulst JM, Kloth JN, Kwappenberg KM, Trimbos BJ, Melief CJ, Hellebrekers BW, Fleuren GJ, Kenter GG, Offringa R, van der Burg SH. Human papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and -DP as a restriction element. *Int J Cancer* 2007.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143.

Phinney DG, Kopen G, Rigther W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1999; 75: 424-436.

Polchert D, J Sobinsky, G Douglas, M Kidd, A Moadsiri, E Reina, K Genrich, S Mehrotra, S Setty, B Smith, A Bartholomew. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 2008. 38:1745-55.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997. 276: 71-74.

Qian BZ, and Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010. 141, 39–51.

Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007. 83(1): 71-6.

Rasmuson I, O Ringden, B Sundberg and K Le Blanc. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005. 305:33–41.

Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol* 2010. 85(8):593-598

Reed JC, Cuddy M, Slabiak T, Croce CM, Nowell PC. Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature* 1998. 336(6196):259–261

Rhodes LV, Antoon JW, Muir SE, Elliott S, Beckman BS, Burow ME. Effects of human mesenchymal stem cells on ER-positive human breast carcinoma cells mediated through ER-SDF-1/CXCR4 crosstalk. *Mol Cancer* 2010. 9:295

Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP, Russell DL, Horsfall DJ. The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009. 28 (1-2):233-245

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

Ryan JM, F Barry, JM Murphy and BP Mahon. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2007. 149:353–363.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007. 370 (9590):890–907

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985. 314(6006):111–114

Selmani Z, A Naji, I Zidi, B Favier, E Gaiffe, L Obert, C Borg, P Saas, P Tiberghien, N Rouas-Freiss, ED Carosella and F Deschaseaux. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4 + CD25^{high}FOXP3 + regulatory T cells. *Stem Cells* 2008. 26:212–222.

Sheng H, Y Wang, Y Jin, Q Zhang, Y Zhang, L Wang, B Shen, S Yin, W Liu, L Cui, N Li. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* 2008. 18:846-857.

Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2010. 127:2323-33

Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998. 10(5):581–587

Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005. 111(2):150-6

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78: 55-62.

Sironen RK, Tammi R, Auvinen PK, Anttla M, Kosma VM. Hyaluronan in human malignances. *Exp Cell Res* 2011. 317 (4): 383-391

Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 2009. 4:e4992

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 1992. 23(2):117–128

Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, et al. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med* 2011. 17:579-87

Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Bini M, Perez Alea A, Maria Florena L, Miceli G, Condorelli S, Bonventre S, et al. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. *Cancer Res* 2006. 66:1491–1499.

Tsukamoto S, Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Kido A, Mori T, et al. Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. *Int J Oncol* 2012. 40(1):163-9.

Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J 3rd, 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.

Ucelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006. 36: 2566-2573.

van den Brule AJ, Cromme FV, Snijders PJ, Smit L, Oudejans CB, Baak JP, Meijer CJ, Walboomers JM. Nonradioactive RNA in situ hybridization detection of human papillomavirus 16-E7 transcripts in squamous cell carcinomas of the uterine cervix using confocal laser scan microscopy. *Am J Pathol* 1991. 139 (5):1037–1045.

Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001. 75 (9):4467–4472

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive

cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999. 189(1):12–19

Wang QR, Yang ZJ, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the growth of murine bone marrow CFU-F. *Exp Hematol* 1990; 18: 341-347.

Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, Franken KL, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Kenter G, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6- specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 2003. 63(3):636–641

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel DM. 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

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990. 248(4951):76–79.

Wilson A, and Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 93-106.

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.

Wulling M, Delling G, Kaiser E. The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *HumPathol*. 2003. 34:983-993.

Yan XL, Fu CJ, Chen L, Qin JH, Zeng Q, Yuan HF, et al. Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. *Breast Cancer Res Treat* 2012. 132:153-64.

Youde SJ, Dunbar PR, Evans EM, Fiander AN, Borysiewicz LK, Cerundolo V, Man S. Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* 2000. 60(2):365–371

Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev* 2008; 17:463-73

Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1995. 69(10):6389–6399

Zhou JH, Chen HZ, Ye F, Lu WG, Xie X. Fas-mediated pathway and apoptosis in normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cancer. *Oncol Rep* 2006. 16(2):307–311

Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Baelde HJ, Eilers PH, Kenter GG, Gorter A. The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *J Pathol* 2006. 208(4):507–517

Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Baelde HJ, Eilers PH, Kenter GG, Gorter A. Role of tumor-derived proinflammatory cytokines GM-CSF, TNF-alpha, and IL-12 in the migration and differentiation of antigen-presenting cells in cervical carcinoma. *Cancer* 2007. 109(3):556–565

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008. 8(6):467–477

zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996. 1288(2):F55–78

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002. 2 (5):342–350