



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

## **CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL SECRETAN TGF-BETA QUE INDUCE A LOS LINFOCITOS TCD4+ A UNA MUERTE APOPTÓTICA**

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**HUGO LÓPEZ MUÑOZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"  
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS

**MÉXICO, D.F. MARZO, 2013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

## CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL SECRETAN TGF-BETA QUE INDUCE A LOS LINFOCITOS TCD4+ A UNA MUERTE APOPTÓTICA

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**HUGO LÓPEZ MUÑOZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS

MÉXICO, D.F. MARZO, 2013.



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **LÓPEZ MUÑOZ HUGO** con número de cuenta **09754411-9** con la tesis titulada "**Células de cáncer cervical secretan TGF-beta que induce a los linfocitos TCD4+ a una muerte apoptótica**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. BENNY WEISS STEIDER**:

Presidente: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
Vocal: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de febrero de 2013.

**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
**Coordinadora del Programa**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al posgrado en ciencias biológicas de la UNAM la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. de becario 78954 y a la UNAM proyecto PAPIIME 206812 por el financiamiento brindado para la realización de esta tesis.**

**A los miembros del comité tutorial:**

**Dra. Rebeca López Marure  
Dr. Diego Julio Arenas Aranda**

**Por sus aportaciones en la realización de este trabajo.**

**Agradezco a:**

**Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo  
Dra. María de Lourdes Mora García  
Dra. María Isabel Soto Cruz**

**Por su aportaciones que enriquecieron este trabajo**

**Un agradecimiento especial al M en C. Luis Sánchez Sánchez por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.**

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la UMIEZ, FES Zaragoza UNAM.**

Con todo mi amor para mi esposa, mis hijos, mis padres y mis hermanos.



## ÍNDICE

	Página
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN	
CÁNCER Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCu) .....	3
FACTORES DE CRECIMIENTO .....	5
EL TGF- $\beta$ .....	6
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL TGF- $\beta$ .....	8
SEÑALIZACIÓN DEL TGF- $\beta$ .....	9
EL TGF- $\beta$ Y EL CÁNCER .....	12
EFECTO CITOSTÁTICO DEL TGF- $\beta$ .....	12
EFECTO APOPTÓTICO DEL TGF- $\beta$ .....	13
TGF- $\beta$ COMO PROMOTOR TUMORAL .....	14
EL TGF- $\beta$ Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	17
TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS T .....	18
TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS Th1 Y Th2 .....	18
TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS T <sub>REG</sub> .....	19
TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS TCD8+ .....	19
TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS B .....	20
TGF- $\beta$ Y CÉLULAS NK .....	21
TGF- $\beta$ Y CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	21
TGF- $\beta$ Y MONOCITOS MACRÓFAGOS .....	22
TGF- $\beta$ Y GRANULOCITOS .....	22
TGF- $\beta$ COMO REGULADOR DE LA RESPUESTA INMUNE .....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVOS GENERALES .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
MÉTODO .....	28
RESULTADOS .....	33
DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53

**FIGURAS Y TABLAS**

<b>Figura 1.</b> Modelo que representa la estructura del TGF- $\beta_1$ unido a sus receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII en la membrana celular. ....	<b>Página 8</b>
<b>Figura 2.</b> Señalización del TGF- $\beta$ a través de las proteínas Smad y algunas moléculas que regulan negativamente este proceso. ....	<b>Página 11</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismo a través del cual el TGF- $\beta$ detiene a las células en la fase G1/S del ciclo celular. ....	<b>Página 13</b>
<b>Figura 4.</b> El TGF- $\beta$ puede inducir la muerte celular por apoptosis en diferentes líneas celulares a través de la activación de genes que promueven la liberación del Citocromo-C por la mitocondria activando la ruta de las caspasas. ....	<b>Página14</b>
<b>Figura 5.</b> Participación del TGF- $\beta$ en el proceso tumoral. ....	<b>Página 15</b>
<b>Figura 6.</b> Efecto del MC de células HeLa provenientes de CaCu sobre el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana. ....	<b>Página 33</b>
<b>Figura 7.</b> Efecto del MC de células tumorales provenientes de CaCu HPV-16 (SiHa y CaSki), HPV-18 (HeLa, InBl y CaLo) y HPV negativas(C-33A y ViBo) sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana.....	<b>Página 34</b>
<b>Figura 8.</b> Determinación de la bioactividad del TGF- $\beta$ soluble presente en el MC de células tumorales sobre la línea celular Mv1Lu. ....	<b>Página 38</b>
<b>Figura 9.</b> Bloqueo de la bioactividad del TGF- $\beta$ soluble contenido en el MC de células tumorales .....	<b>Página 39</b>
<b>Figura 10.</b> Efecto del MC de células tumorales sobre el ciclo celular de células linfocíticas humanas. ....	<b>Página 41</b>
<b>Figura 11.</b> Inducción de muerte por citotoxicidad en cultivos de linfocitos por el TGF- $\beta$ soluble contenido en el MC de células tumorales.....	<b>Página 42</b>
<b>Figura 12.</b> Detección de Fosfatidilserina-Anexina V en la cara externa de la membrana celular en cultivos de linfocitos tratados con TGF- $\beta$ recombinante o con 815 pg/ml de TGF- $\beta$ contenido en el MC de células tumorales.....	<b>Página 43</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto del MC de células tumorales sobre las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+.	
<b>Figura 14.</b> Efecto del MC de células de CaCu sobre la inducción de muerte por apoptosis en la subpoblacion de linfocitos TCD4+. ....	<b>Página 46</b>
<b>Tabla 1.</b> Miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ , moléculas que intervienen en su señalización y algunos de sus efectos biológicos.....	<b>Página 7</b>
<b>Tabla 2.</b> Proteínas que intervienen en la señalización del TGF- $\beta$ y cáncer asociado....	<b>Página 17</b>
<b>Tabla 3.</b> Concentración de TGF- $\beta$ en las diferentes líneas tumorales. ....	<b>Página 37</b>
<b>Cuadro 1.</b> Efecto del TGF- $\beta$ sobre diversos grupos celulares que intervienen en la respuesta inmunológica .....	<b>Página 24</b>

## Resumen

Se sabe que las células tumorales tienen la capacidad de modificar su microambiente para suprimir la respuesta inmunológica y favorecer su proliferación. Se ha mostrado que el TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la proliferación de diversos tipos celulares en el organismo, incluyendo a los linfocitos citotóxicos, células cooperadoras, monocitos, granulocitos y células NK, afectando al sistema inmunológico en general.

En el presente trabajo se evaluó si el TGF- $\beta$  secretado por células de cáncer cérvico uterino (CaCu) interfiere con la proliferación y sobrevivencia de linfocitos. Para ello se realizaron cocultivos de linfocitos con los medios condicionados (MC) de células de CaCu y fueron evaluados por incorporación de timidina tritiada y marcaje con carboxifluoresceína (CSFE). Se cuantificó la concentración de TGF- $\beta$  por la técnica de ELISA, se evaluó si el MC induce muerte celular por necrosis a través de la liberación de LDH y la muerte por apoptosis a través de la detección de fosfatidilserina-annexina-V y caspasa 3 activa. Finalmente se evaluó el efecto del MC en subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+ por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos muestran que el MC de células de CaCu inhibe la proliferación de linfocitos humanos además de inducir en ellos una muerte por apoptosis. Al utilizar anticuerpos contra TGF- $\beta$ , se observa un bloqueo en la actividad inhibidora, sugiriendo con ello que esta citosina es la responsable de la actividad observada. Finalmente se observó que el TGF- $\beta$  del MC de células de CaCu afecta principalmente a la subpoblación de linfocitos TCD4+.

**Abstract**

It is known that tumor cells have the capacity to modify their microenvironment in order to suppress the immunological response and to favor their own proliferation. TGF- $\beta$  is a potent inhibitor of the activity of cytotoxic lymphocytes, helper lymphocytes, monocytes, granulocytes and NK cells, thus interfering with the immunological system in general.

In this work it was evaluated if TGF- $\beta$  secreted in vitro by cervical cancer cells could interfere with the proliferation and survival of lymphocytes. For they were co-cultured lymphocytes with conditioned media (CM) from the cervical cancer cell lines and the inhibition of proliferation was evaluated by radioactivity incorporated and CFSE labeling assay. TGF- $\beta$  quantification on these CM was evaluated by ELISA. Necrotic cellular death was evaluated by measuring the liberation of lactate dehydrogenase (LDH). The apoptosis process was evaluated by means of Annexin-V and active caspase-3. The presence of CD4+ or CD8+ lymphocytes was evaluated by flow cytometry.

It was found that the conditioned media from these cells significantly inhibited the proliferation of lymphocytes and induced them to apoptosis. Antibodies against TGF- $\beta$  almost completely blocked this activity suggesting that this cytokine is responsible for the inhibitory activity. When the induced apoptosis on subpopulations of lymphocytes was evaluated it was detected that the CD4+ cells were specifically targeted.

## INTRODUCCIÓN

### CÁNCER Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCu)

El cáncer es una enfermedad producida por la transformación maligna de las células, que resulta de una serie de cambios genéticos que interfieren con el control de algunos de los procesos fundamentales que lleva a cabo la célula, como son: la proliferación, la diferenciación, la muerte celular y la estabilidad genética (Pinkas *et al.* 2006).

La pérdida de dichos controles, permite que las células tumorales se reproduzcan de forma descontrolada y generen metástasis, proceso en el que resulta fundamental la adquisición de ventajas selectivas sobre el resto de las células del organismo, que les permiten generar angiogénesis, pérdida de adhesión en el tejido de origen, producción de enzimas proteolíticas que degradan la membrana basal y les faciliten llegar hasta un vaso sanguíneo o linfático, inducir la expresión de moléculas de adhesión que le ayuden a abandonar el torrente sanguíneo, desarrollar estrategias para evadir la vigilancia inmunológica y generar un microambiente que les permita seguir proliferando en un tejido u órgano diferente al de origen (Jakowlew 2006, Kopfstein *et al.* 2006). Cada uno de estos pasos requiere de diferentes propiedades que la célula debe adquirir; por ejemplo, en una gran variedad de carcinomas la disminución de la adhesión a las células vecinas depende de la pérdida de la expresión de la cadherina E, una molécula de adhesión entre células epiteliales, mientras que la habilidad de atravesar tejidos parece depender de la producción de enzimas proteolíticas que permiten degradar la matriz extracelular (Jiménez *et al.*, 2003). Se ha demostrado también que para que los tumores crucen la membrana basal, deben tener receptores que permitan a las células adherirse a ella; esta capacidad que adquieren las células tumorales de generar metástasis es lo que hace al cáncer difícil de erradicar.

Dentro de los diferentes cánceres que se presentan, el CaCu ocupó el primer lugar como causa de muerte por cáncer en México, con 41,326 casos reportados por el Sistema Nacional de Salud durante el trienio de 1993 a 1995, lo que corresponde al 22.5% del total de casos registrados (Eifel *et al.*, 2001). En el 2005 se registraron 4,270 casos de CaCu, con una tasa de 10.2 por cada 100,000 mujeres, siendo el grupo más afectado el de 35 a 64 años de edad y representando la primera causa de mortalidad en mujeres por cáncer maligno con el 13.3% (Fuente: INEGI. Estadísticas vitales. Base de datos del 2007). Para 2009 el cáncer de mama se convirtió en la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, seguido por el CaCu que representó el 12.1% (INEGI 2009).

Este tipo de cáncer, aparece en la unión del canal cervical y del ectocérvix, que es el sitio donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o más

factores de riesgo, ya sean biológicos (mutaciones, virus, edad), socioculturales (escolaridad, hábitos de higiene), e incluso factores medioambientales a los que todos estamos expuestos. Las anomalías tempranas del cérvix, conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), se diagnostican comúnmente en mujeres de entre 30 y 40 años de edad. Para que el NIC evolucione a CaCu invasor necesita de 8 a 20 años y en la mayoría de los casos se requiere de 5 a 10 años para que las células transformadas penetren a la membrana basal del cérvix e invadan otros tejidos (Romery, 1980). Una vez ocurrido esto, las pacientes que no han recibido tratamiento, o que no han respondido a éste, mueren usualmente en un periodo de 3 a 5 años.

Uno de los factores de riesgo más importante asociado al CaCu, es la infección con virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés), y se ha asociado la presencia de este virus con algunos mecanismos que realiza la célula tumoral para favorecer su proliferación sobre otros grupos celulares, así como para evadir la vigilancia inmunológica (Ciaran B *et al* 2007). Los HPV son un grupo de más de 70 tipos de virus que pueden causar verrugas, o *papilomas* y se transmiten de una persona a otra durante el contacto sexual. La mayoría de las verrugas genitales son producidas por dos tipos de virus: el HPV 6 y el HPV 11 y sólo en raros casos se convierten en CaCu, por lo que se les llama virus de "bajo riesgo"; sin embargo, otros tipos de HPV han sido fuertemente asociados con el cáncer genital o anal y por ello se denominan tipos de "alto riesgo", e incluyen el HPV 16, HPV 18, HPV 33, HPV 35 y HPV 45 (Phelps *et al*, 1988).

El ciclo replicativo del HPV se ha adaptado de tal manera en las células infectadas, que previene la detección de los productos virales durante la replicación del virus en estados tempranos del desarrollo del cáncer, ya que la infección por el HPV se da en las células indiferenciadas basales del epitelio estratificado donde la replicación viral es limitada, en ese momento se da la expresión temprana de proteínas como E1 y E2 (Ciaran *et al*, 2007). El HPV no infecta a las células presentadoras de antígeno que se encuentran en ese tejido, ni lisan a las células de los estratos basales, por lo que no pueden englobar a los viriones ni presentar antígenos virales a otras células del sistema inmune, generando pocas oportunidades de que las células inmunológicas presentes en esos estratos celulares puedan detectar la presencia del virus. Adicionalmente, se ha encontrado que el virus ha evolucionado de tal manera, que limita la expresión de proteínas tardías como L1 y L2 en estratos basales, y su expresión se da mayormente en células de estratos superiores, que se encuentran en proceso de diferenciación, queratinización y próximas a descamarse, lo que limita al sistema inmune para reconocer proteínas de la cápside viral (Roden *et al*, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que los interferones (IFN- $\alpha$ , $\beta$  y  $\gamma$ ) son inducidos a expresarse como una respuesta celular ante las infecciones virales, sin embargo, en el caso del cáncer cervical, las proteínas E6 y E7 además de interferir con los controles del ciclo celular de las células infectadas, pueden prevenir la respuesta inmune mediada por los interferones. La proteína E6 del HPV-16, bloquea la actividad del IFN- $\alpha$  a través de la inhibición de los genes que inducen su síntesis, mientras que el E7 por su parte, tiene la capacidad de inhibir la activación del promotor para el IFN- $\beta$ . Se ha encontrado además, que la transcripción de los genomas virales es reprimida antes de la incorporación del ADN viral al genoma de la célula huésped y aún después de que el gen para la proteína E7 es expresado, los transcritos permanecen en el núcleo celular minimizando la producción de esta proteína y bloqueando su posible acceso a las células presentadoras de antígeno (Lee S. 2001).

Adicionalmente, algunos reportes indican que las proteínas virales afectan la secreción de citocinas en diversos tipos celulares. En ese sentido, se ha mostrado que las proteínas E6 y E7 secretadas por las células de CaCu inhiben la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK reduciendo de este modo su función; y la oncoproteína E6 producida por el HPV-16, puede regular negativamente la expresión de la IL-18 contribuyendo a la evasión inmunológica, ya que esta molécula es necesaria para la mediación de la respuesta dada por las células CD8+ (Lee S. 2001, Cho Y. 2001). Estos datos ponen de manifiesto el papel fundamental que juegan las citocinas y factores de crecimiento no sólo en el inicio del proceso tumoral, sino en su desarrollo y en la generación de metástasis.

## **FACTORES DE CRECIMIENTO**

Los factores de crecimiento se han descrito como reguladores de actividades homeostáticas fundamentales del organismo, destacando el grupo de las hormonas y el de las citocinas. No obstante, estas últimas, ejercen un mayor espectro de actividades biológicas debido a que controlan funciones tales como comunicación, diferenciación, activación, migración, motilidad, inhibición y/o proliferación de varios tipos celulares; participan de forma importante en el proceso inflamatorio; en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune y la hematopoyesis; en la comunicación neuroendócrina e inmunológica; en la segmentación, gastrulación y organogénesis durante el desarrollo embrionario; así como en la sustitución/reposición celular de tejido senescente o dañado (Espinosa *et al*, 2001; Lagman, 2001; Chen *et al*, 2002). Tales moduladores biológicos, ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina; intervienen en una fase determinada del ciclo celular (por lo general en la fase G1);

comúnmente presentan actividad pleiotrópica, redundante y sinérgica; circulan por los fluidos corporales, tienen un tiempo de vida media muy corta; y ejercen su actividad efectora sobre aquellas células blanco, las cuales expresan en su membrana receptores específicos de alta afinidad (Janeway, 2001). Es también reconocido el importante papel que juegan las citocinas durante el proceso tumoral, e incluso se ha demostrado que algunos tipos de cáncer aumentan la secreción de citocinas para favorecer su desarrollo (Crema B. *et al.* 2012).

De entre la extensa diversidad de factores de crecimiento conocidos y de los que se sabe aumentan su expresión durante el desarrollo del cáncer, hoy en día, el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés), es el miembro más estudiado de una familia de factores multifuncionales que llevan a cabo diversas actividades biológicas dentro del organismo. Una de sus funciones mejor estudiadas, es la inhibición de la proliferación de diversos tipos celulares a través de la modulación en la expresión de genes que regulan negativamente el ciclo celular e induce la muerte por apoptosis. (Drabsch Y *et al.* 2012) Su ruta de señalización incluye un grupo de proteínas denominadas Smad (Familia de factores de transcripción activados por los receptores de la familia del TGF- $\beta$ ). La nomenclatura proviene de la combinación de los nombres de las proteínas SMA (identificada en *C. elegans*) y MAD (identificada en *Drosophila*) que activan diversos factores de transcripción aumentando o disminuyendo la expresión de sus genes blanco. El TGF- $\beta$  ha sido también asociado al desarrollo del cáncer, donde se ha encontrado un aumento en su expresión en diversos tumores y la aparición de diversas mutaciones, tanto en los receptores como en las proteínas de su ruta de señalización. (Elliot R *et al.* 2005, Jakowlew B, 2006). Todo esto, aunado al potente efecto que tiene en la modulación de la respuesta inmunológica, donde inhibe la activación y diferenciación de los diferentes grupos celulares que intervienen en la respuesta inmune, lo convierte en un candidato de potencial uso terapéutico en el tratamiento contra el cáncer (Elliot *et al.*, 2005).

### **TGF- $\beta$**

El TGF- $\beta$  fue originalmente descubierto como un polipéptido secretado por fibroblastos transformados con el virus del sarcoma murino de Moloney, que tenía la aparente capacidad de transformar fibroblastos normales de ratón en cultivos “*In Vitro*” (De Larco, 1978). Inicialmente, fue llamado Factor de Crecimiento de Sarcoma (SGF); sin embargo, posteriormente se descubrió que estaba compuesto por dos factores diferentes: el TGF- $\alpha$  y  $\beta$ . El TGF- $\alpha$  ahora es reconocido como un miembro de la familia del factor de



crecimiento epidermal (EGF) y es utilizado para favorecer el crecimiento de diversas líneas celulares de origen epidérmico (Attisano L *et al*, 2002, Chin D. *et al*. 2004).

Actualmente se sabe que el TGF- $\beta$  pertenece a un grupo de citocinas evolutivamente conservadas llamadas colectivamente, “Superfamilia del TGF- $\beta$ ” cuya función dentro del organismo es regular el crecimiento, la diferenciación, organización y muerte de diferentes tipos celulares (Tabla 1).

De esta familia, el TGF- $\beta$  es la citocina más ampliamente estudiada y se ha encontrado que tiene diferentes funciones en diversos tipos celulares, controlando aspectos como la formación de matriz extracelular, morfogénesis, replicación celular, diferenciación y angiogénesis (Massague J. 2000, Yigong S. *et al* 2003).

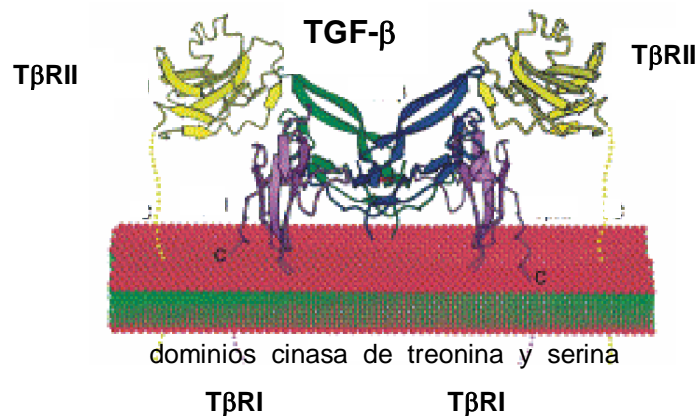
Superfamilia del TGF- $\beta$	Receptores	Smad asociadas al receptor	co-Smad	Funciones biológicas
TGF- $\beta$ isoformas 1, 2 y 3	T $\beta$ RI -T $\beta$ RII	Smad 2 y 3	Smad 4	Angiogénesis Formación de matriz extracelular Inmunosupresión Detención del ciclo celular Inducción de apoptosis
Proteínas morfogénicas de hueso (BMPs)	BMPRII-Alk2, Alk3 y Alk6	Smad 1, 5 y 8	Smad 4	Diferenciación de osteoblastos Neurogénesis Especificación del mesodermo ventral
Activinas	ActRIIA , ActRIIB-Alk4	Smad 2 y 3	Smad 4	Crecimiento gonadal Diferenciación embrionaria Formación de placenta
Inhibinas	ActRIIB-BMPRII	Smad 2 y 3	Smad4	Diferenciación gonadal y embrionaria

Tabla 1. Miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ , moléculas que intervienen en su señalización y algunos de sus efectos biológicos.

Se han descrito varias isoformas para el TGF- $\beta$  denominadas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4, y TGF- $\beta$ 5, las cuales poseen un 70-80% de homología estructural entre ellas (Peralta *et al*, 2001; Kimura *et al*, 1999). Las isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, provienen de células de mamíferos y en humanos se codifican en los cromosomas 19q13, 1q41, y 14q24, respectivamente. El TGF- $\beta$ 4 se ha encontrado en aves y el TGF-

$\beta 5$  en anfibios; adicionalmente se ha descrito el heterodímero TGF- $\beta 1.2$  en plaquetas de porcinos (Fortunel *et al*, 2000; Peralta *et al*, 2001). De todas éstas la que más se ha estudiado y a la que se le refiere simplemente como TGF- $\beta$  es la isoforma TGF- $\beta 1$ .

La proteína bioactiva del TGF- $\beta$  consta de un homodímero constituido por un par de cadenas de 112 residuos de aminoácidos unidas a través de un puente disulfuro; presentando así, una masa molecular neta de 25 kDa (Figura 1) (Fortunel, 2000). La masa molecular del monómero del TGF- $\beta$  es de 12.5 kDa (Peralta *et al*, 2001).



**Figura 1.** Modelo que representa la estructura del TGF- $\beta 1$  unido a sus receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII en la membrana celular. El TGF- $\beta$  se constituye por un homodímero de 25 kDa unido por enlaces disulfuro que al unirse a sus receptores proteínas cinasas de treonina y serina de tipo I y tipo II en la superficie celular, inicia su mecanismo de transducción de señal (Modificado de Yigong *et al*, 2003).

## ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es una citocina multifuncional pleiotrópica caracterizada principalmente por su actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora (Richards *et al*, 1998). Se encuentra en una amplia variedad de tejidos fetales y adultos, así como en el suero; las isoformas TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$ , TGF- $\beta 3$ , sólo se encuentran en tejidos de mamífero. Las fuentes celulares del TGF- $\beta$  son: los linfocitos, los osteoblastos, las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, las plaquetas, las células de Sertoli, los macrófagos, las células leucémicas; en tejidos se encuentra en el pulmón, el riñón, la placenta y en el cordón umbilical y se halla en altas concentraciones en el hueso y el bazo (Mire-Sluis *et al*. 1998, Drabsch Y *et al*. 2012).

El TGF- $\beta$  tiene acciones diversas y efectos opuestos dependiendo del tipo celular y condiciones microambientales; es capaz de inducir la diferenciación, la apoptosis, la

angiogénesis, la producción/degradación de la matriz extracelular e inhibir la formación de placas arterioescleróticas (Bollar *et al*, 2000; Fahey *et al*, 2001; Feldmann *et al*, 2002). El uso clínico del TGF- $\beta$ , ha provocado efectos adversos como fibrosis en la piel, hígado, riñón y pulmón (Fahey *et al*, 2001). Es un regulador negativo del ciclo celular por excelencia, en una extensa variedad de tipos celulares normales y tumorales, deteniendo el ciclo celular generalmente en la fase G1 (Drabsch Y *et al*. 2012). Es un potente inhibidor de la proliferación de células de origen mieloide, actúa sobre los monocitos-macrófagos promoviendo su quimiotaxis e inhibiendo o estimulando la secreción de citocinas, suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3 (Fortunel *et al*, 2000; Peralta *et al*, 2001). Paradójicamente, el TGF- $\beta$  fomenta el crecimiento tisular y la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Chen *et al*, 2002). Adicionalmente, se ha descrito la capacidad del TGF- $\beta$  de inducir la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos, células Mast y fibroblastos. Finalmente, se ha demostrado que las células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos infectados con el HIV (virus de inmunodeficiencia humana), son capaces de sobre-expresar el TGF- $\beta$  lo que resalta su poderoso papel inhibidor (Richards *et al*, 1998).

### SEÑALIZACIÓN DEL TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  transduce señales por la unión a sus receptores cinasa de treonina y serina, T $\beta$ RI y T $\beta$ RII, que son los responsables de los efectos biológicos del TGF- $\beta$  en las células blanco; sin embargo, existen también los receptores T $\beta$ RIII o betaglicanos, capaces de unirse al TGF- $\beta$ , pero que no participan en la transducción de señales (Massague J. 2000, Moustakas, *et al*. 2002). Se ha sugerido que este receptor controla la disponibilidad del TGF- $\beta$  en el microambiente extracelular local y regula su presentación activa a los receptores funcionales T $\beta$ RI y T $\beta$ RII. Estos dos receptores tienen una región extracelular rica en cisteínas, una región transmembranal y una región citoplasmática, la cual tiene el dominio de serina-treonina-cinasa. El TGF- $\beta$  se une directamente al receptor T $\beta$ RII y sólo hasta que se produce esta interacción, se da la unión del T $\beta$ RI para formar un complejo que induce la homodimerización del T $\beta$ RII por un lado y la del T $\beta$ RI por otro, para luego formar un complejo tetramérico a través del cual se da la transducción de la señal (Massague J. 2000, Moustakas, *et al*. 2002). En este complejo, la región citoplasmática del T $\beta$ RII está constitutivamente fosforilada y fosforila a su vez, al dominio GS (rico en glicina y serina) del T $\beta$ RI, lo que induce su actividad cinasa.

Se ha reportado que la transducción de la señal producida por el TGF- $\beta$ , es mediada por las proteínas Smad. Las proteínas Smad son una familia de factores de transcripción que tienen la habilidad de propagar las señales desde un receptor hasta el núcleo y que se clasifican de acuerdo con su función en R-Smad, Co-Smad e I-Smad (Inman G, *et al.* 2002). El reconocimiento de las R-Smad (Smad2 y 3) por el receptor, es facilitado por un grupo de proteínas adaptadoras denominadas SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), que las inmoviliza a la parte interna de la membrana celular a través de la interacción entre una secuencia peptídica de SARA y una región hidrofóbica de Smad2/Smad3. SARA contiene un dominio de unión a fosfolípidos que le permite reclutar a las Smad hacia la membrana para ser fosforiladas por el receptor. De este modo, Smad2/ Smad3, son directamente fosforiladas por el T $\beta$ RI sobre dos serinas conservadas en el extremo carboxilo terminal, lo que lleva a la liberación del complejo TGF $\beta$ -T $\beta$ RI-T $\beta$ RII-Smad, así como de SARA, y permite la formación de otro complejo: Smad2/Smad3 con Smad4; este complejo es traslocado al núcleo donde funciona como coactivador transcripcional que regula la transcripción de sus diferentes genes blanco (ejemplo *p15*, *p21*, *p27*) (Tzukazaki T. *et al.*, 1998, Bierie B. *et al.* 2006). Se ha identificado otro grupo de proteínas Smad denominado inhibidoras o I-Smad (Smad6 y Smad7), que son también inducidas por el TGF- $\beta$ , lo que sugiere que hay un mecanismo de autoregulación negativa intracelular que regula la señal inducida por el TGF- $\beta$ . Las Smad 6 y 7 interactúan con T $\beta$ RI de forma más estable que las Smad 2 y 3 compitiendo por la unión con el receptor, esto se debe a que las Smad 6 y 7 no tienen el sitio de fosforilación en su extremo carboxilo terminal. La sobreexpresión de Smad 6 y 7 inhibe la fosforilación de las Smad 2 y 3 lo que les confiere propiedades inhibidoras, ya que pueden bloquear la señalización en puntos tempranos en la vía de transducción de señal inducida por el TGF- $\beta$  (Drabsch Y *et al.* 2011).

Las R-smad y Co-Smad presentan dos dominios estructurales bien conservados, el MH1 (MAD-Homology 1) en el extremo amino terminal y el dominio MH2 en el extremo carboxilo terminal. El extremo MH1 de las Smad3 y Smad4, se unen a una secuencia específica en el ADN (CAGA), llamada elemento de unión a Smad (SBE), que se traslapa o está muy cercana de los factores de transcripción o elementos de respuesta al TGF- $\beta$  tales como AP-1. Ya en esos sitios, las Smad interactúan con proteínas que tienen actividad de acetil transferasa y desacetilasa para las histonas, alterando la estructura de la cromatina y dejando expuestas secuencias del ADN al aparato de transcripción. Esto incluye a las proteínas adaptadoras transcripcionales CBP y p300; las cuales no solo tienen actividad acetil transferasa en histonas, sino que actúan directamente en el reclutamiento

de la holoenzima ARN polimerasa II al promotor CBP y p300, pueden interactuar con Smad2, 3 y 4 y son requeridas para la activación transcripcional de una variedad factores de transcripción y coactivadores dependientes del TGF-β (Tzukazaki T. *et al*, 1998, Bierie B. *et al* 2006).

La señalización mediada por las proteínas Smad, termina con la ubiquitinación y degradación por el proteosoma de las R-Smad activas, así como de los receptores activados. Este proceso es mediado por las proteínas Smurf1 y 2. En este proceso juega un papel fundamental la Smad7, quien se encuentra en estado basal en el núcleo celular, y se mueve hacia la membrana plasmática después de que la célula es estimulada por el TGF-β, tanto la Smur1 como la Smurf2, forman un complejo estable con smad7 que se une al receptor activo para del TGF-β inhibiendo por un lado la fosforilación de las R-Smad y mediando la ubiquitinación de los receptores para ser degradados por el proteosoma (Figura 2) (Massague J. 2000).

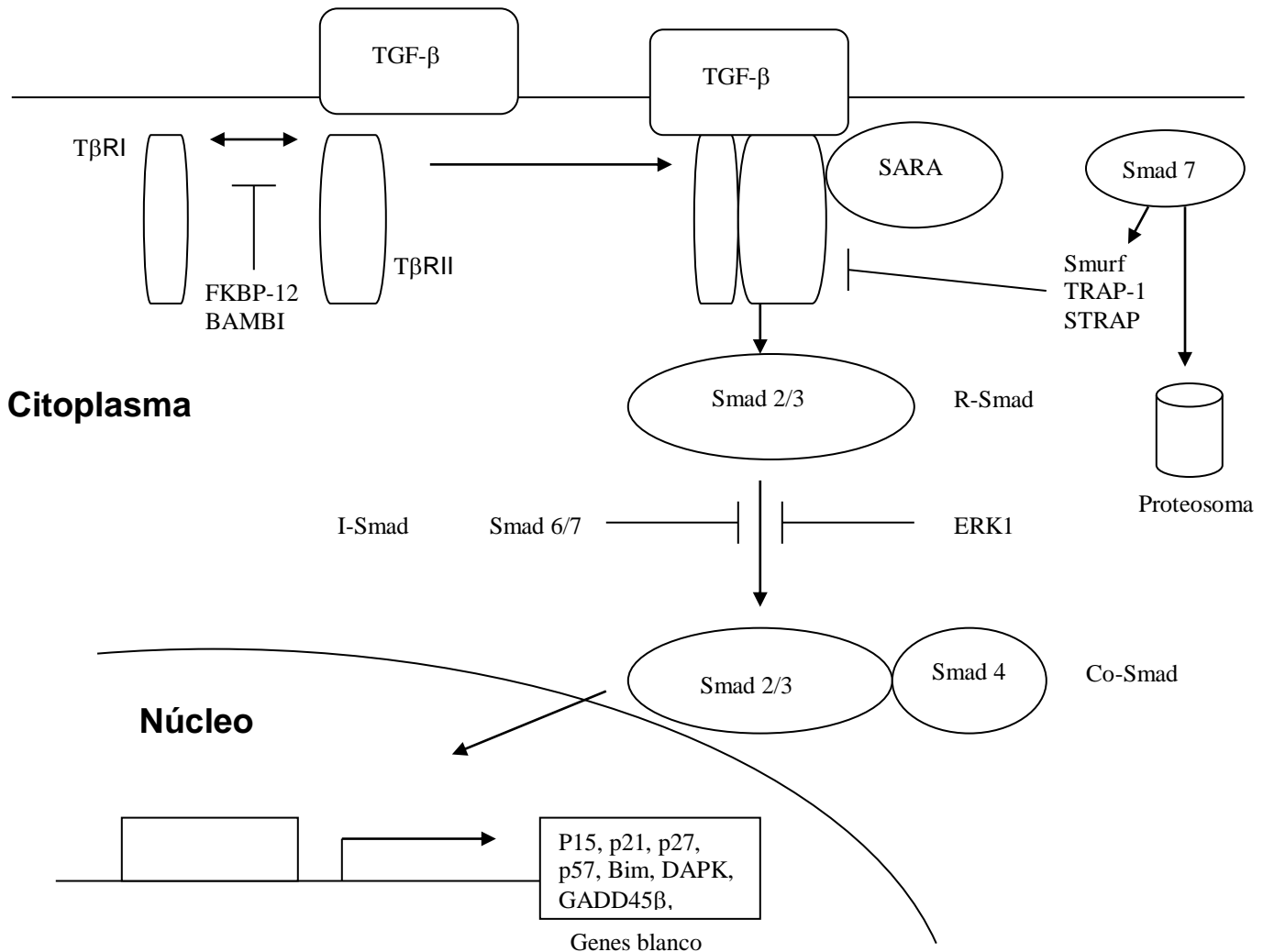


Figura 2. Señalización del TGF-β a través de las proteínas Smad y algunas moléculas que regulan negativamente este proceso. Activación →, inhibición |

## EL TGF- $\beta$ Y EL CÁNCER

En un tejido normal, el control entre la proliferación y la muerte de las células que lo constituyen es un proceso altamente ordenado que depende de un estricto balance entre las señales de estimulación y de inhibición de la proliferación, sobrevivencia y apoptosis que provienen de su medio. En ese sentido, el TGF- $\beta$  es una molécula presente en el microambiente celular capaz de inhibir la proliferación de diferentes tejidos, como el epitelial o células linfoides, contrarrestando el efecto de diversos agentes mitogénicos (Siegel P. *et al.* 2003). Esta capacidad del TGF- $\beta$  en principio brinda protección contra el crecimiento celular descontrolado característico de los tumores; como se ha demostrado en múltiples reportes, en donde se demuestra que en estados tempranos del desarrollo del cáncer, el TGF- $\beta$  inhibe el desarrollo tumoral y en algunos casos lo revierte. Esto se explica porque el TGF- $\beta$  además de inhibir la proliferación celular, tiene la capacidad de inducir la muerte por apoptosis en diferentes grupos celulares como epitelios y células hematopoyéticas (Figura 3). No obstante, se ha observado que durante el proceso tumoral se pierde la susceptibilidad a la inhibición producida por esta citocina, lo que se ha asociado a múltiples mutaciones, tanto en receptores como en moléculas que intervienen en su señalización y que, en condiciones normales, detienen a las células generalmente en la fase G1 del ciclo celular (Pinkas J. *et al.* 2006, Meulmeester *et al.* 2011).

## EFEECTO CITOSTÁTICO DEL TGF- $\beta$

Actualmente se sabe que el TGF- $\beta$  detiene a las células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas en la fase G1 del ciclo celular, a través de la regulación transcripcional de moléculas reguladoras del ciclo celular. Dos de sus principales blancos son la inhibición de la expresión de c-myc y manteniendo a pRB en su estado hipofosforilado. El TGF- $\beta$  lleva a cabo también un control post-transcripcional de importantes proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular, ya que induce la expresión de p21 y p15, quienes al aumentar su expresión, se unen a las CDK 4 y 6 desplazando a p27 y permitiendo su asociación a CDK2, inhibiendo su actividad y deteniendo el ciclo celular en la fase G1. En el caso de las células hematopoyéticas, se aumenta la expresión de p57 obteniendo un efecto similar al que se lleva a cabo con p21 y p27 (Siegel P. *et al.* 2003). El TGF- $\beta$  también tiene la capacidad de inhibir la expresión de cdc25 quien desfosforila y activa a las CDKs de G1 (Fig. 3). El control transcripcional de estos genes, al parecer es

regulado por las proteínas Smad 2, 3 y 4, que junto al factor de transcripción Sp1 se unen a las secuencias promotoras de esos genes (Bierie B. *et al.* 2006, Pinkas J. *et al.* 2006).

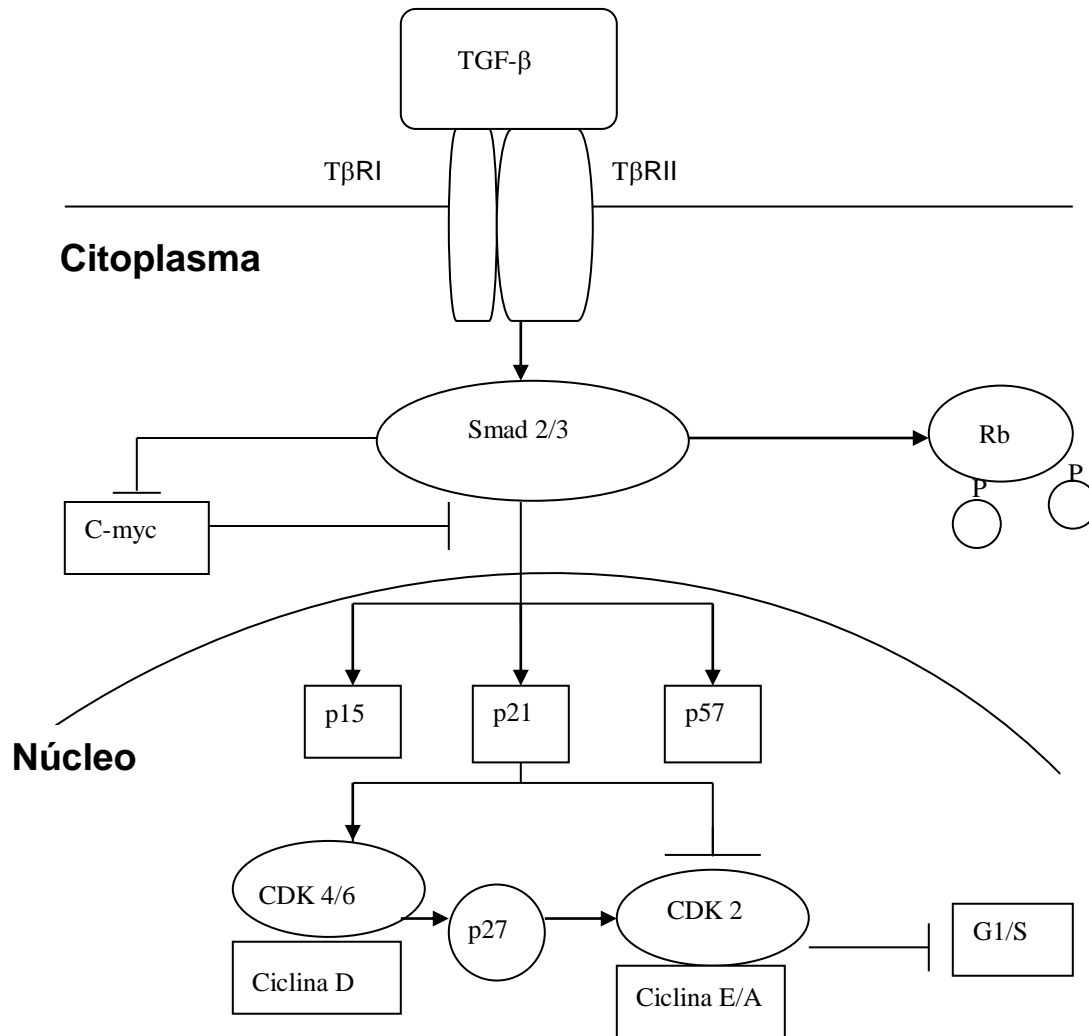


Figura 3. Mecanismo a través del cual el TGF- $\beta$  detiene a las células en la fase G1/S del ciclo celular.

### EFFECTO APOPTÓTICO DEL TGF- $\beta$

Además de inducir un paro en el ciclo celular el TGF- $\beta$  induce una muerte por apoptosis en algunas líneas celulares. Esta función es producida por la señalización de las proteínas Smad que regulan la expresión de genes relacionados con el control de la apoptosis como GADD45 $\beta$ , Bim y DAPK. GADD45 $\beta$  es una proteína señalizadora que interactúa con la proteína de cinasa MKK4 que activa a p38, quien a su vez activa a la caspasa 8 promoviendo el procesamiento y activación de Bid, induciendo en la mitocondria la liberación del citocromo C, lo que activa la ruta de las caspasas 9, 3 y 6 (Siegel P. *et al.* 2003). Otra ruta que promueve la activación de estas caspasas es a través de la

activación transcripcional del gen Bim, quien activa a su vez a Bax, e induce la liberación del citocromo C. Se ha observado que DAPK tiene también la capacidad de inducir la liberación del citocromo C de la mitocondria, aunque el mecanismo por el cual actúa aun no es claro (Figura.4). Por otro lado, se ha reportado que el TGF- $\beta$  es capaz de inducir la expresión del receptor de Fas (CD95L), cuya ruta de activación conduce a una muerte por apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 (Bierie B. *et al.* 2006, Pinkas J. *et al.* 2006).

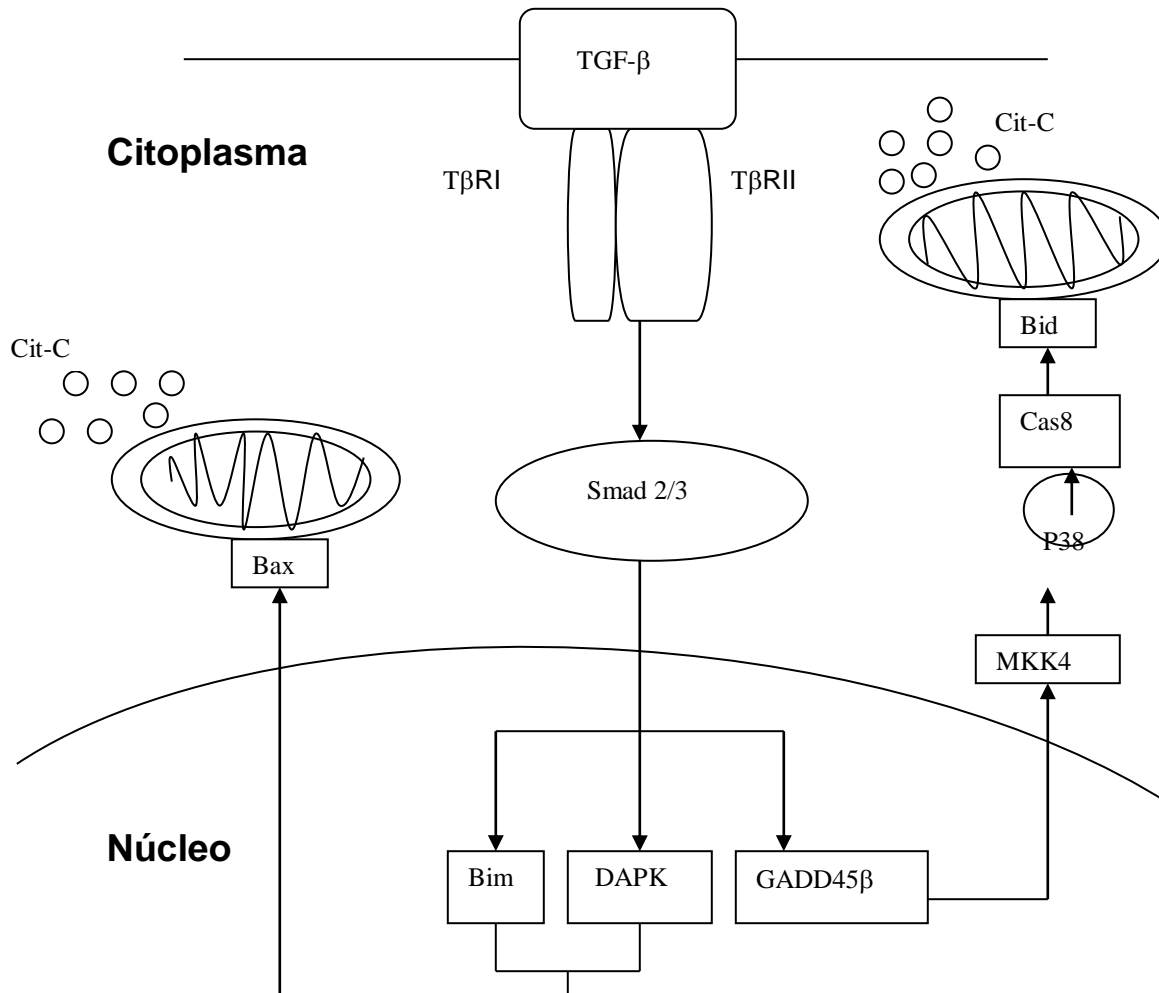


Figura 4. El TGF- $\beta$  puede inducir la muerte celular por apoptosis en diferentes líneas celulares a través de la activación de genes que promueven la liberación del Citocromo-C por la mitocondria activando la ruta de las caspasas.

### TGF- $\beta$ COMO PROMOTOR TUMORAL

El hecho de que las células que están sufriendo un proceso de transformación durante el desarrollo del cáncer pierdan la sensibilidad al efecto inhibitor mediado por el TGF- $\beta$ , lo



convierte en un potente mediador del desarrollo tumoral, y se reconoce que el TGF- $\beta$  juega un papel determinante en la progresión del cáncer, ya que tiene efectos importantes en la formación de la matriz extracelular, promoviendo la deposición de fibronectina y colágena, así como la expresión de integrinas. También promueve la vasculogénesis y tiene un efecto inhibitorio sobre la activación y proliferación de las células del sistema inmune, contribuyendo al desarrollo, crecimiento y metástasis tumoral. Estas actividades se adquieren gradualmente durante el desarrollo del tumor, ya que, como se mencionó, en los tejidos normales tiene un efecto inhibitorio; sin embargo, las células tumorales pierden la sensibilidad a su efecto y en algunos tipos de cáncer se empieza a secretar constitutivamente modificando de este modo su microambiente y favoreciendo el desarrollo tumoral (Lin H. *et al.* 1992, Arjaans *et al.* 2012). Este proceso, al parecer, está asociado a la adquisición de diversas mutaciones tanto en los receptores, como en las moléculas que intervienen en su señalización (Figura 5).

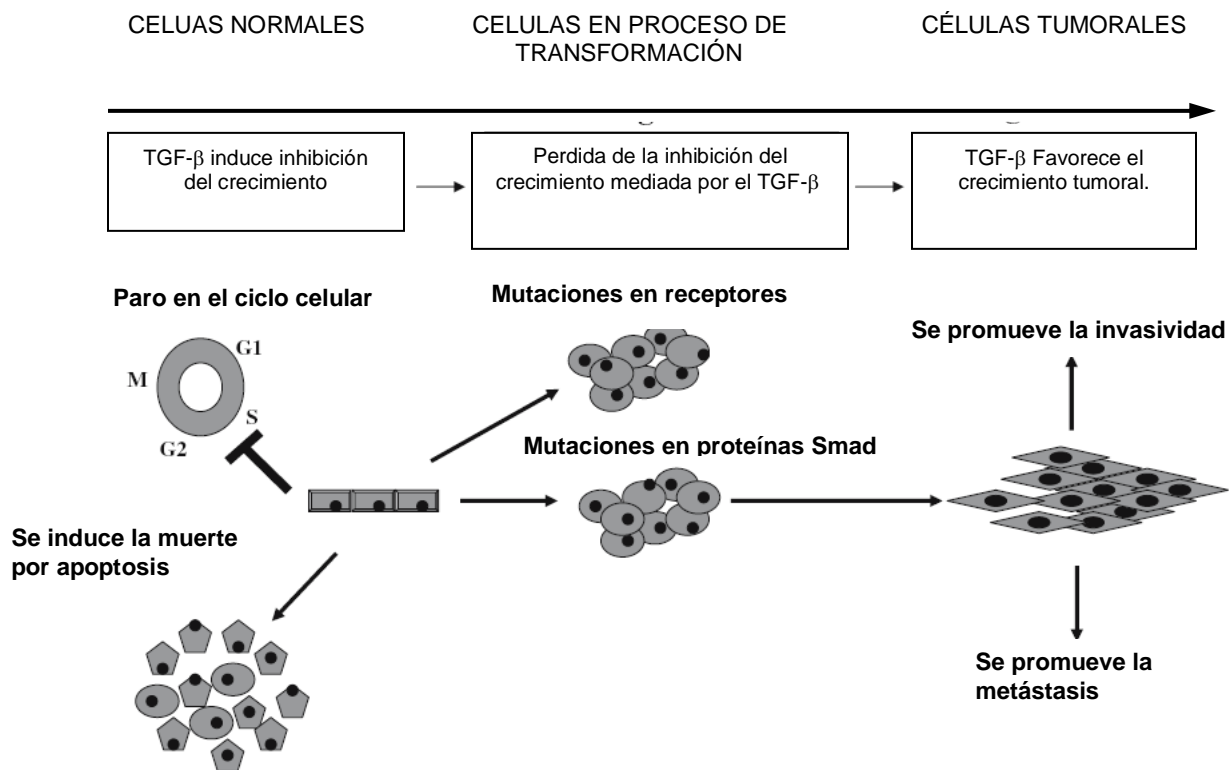


Figura 5. Participación del TGF- $\beta$  en el proceso tumoral (Modificado de Pinkas J. *et al.* 2006).

En ese sentido, numerosos estudios han mostrado que en diversas líneas de células tumorales se produce un aumento en la expresión de ARNm para el TGF- $\beta$ ; de igual manera, se ha reportado que los niveles en plasma de TGF- $\beta$  en pacientes con

cáncer se incrementa conforme avanza la enfermedad, además de observar elevados niveles de TGF- $\beta$  dentro del microambiente de diversos tumores como el de mama, próstata y carcinoma gástrico (Pinkas J. *et al.* 2006). Este hecho indica que a medida que el proceso tumoral avanza, se tiene un aumento en la producción de TGF- $\beta$ , lo que en la mayoría de los casos representa un mal pronóstico para los pacientes. El aumento en la expresión para esta citocina, puede producirse como una respuesta fisiológica para contrarrestar la proliferación excesiva de las células tumorales, sin embargo al perder la sensibilidad a su efecto inhibitor, aunado a la adquisición de mutaciones tanto en los receptores que señalizan para esta molécula, como en las proteínas Smad, lo convierte en un importante factor que les confiere a las células tumorales ventajas selectivas que promueven la progresión del tumor. Se ha encontrado en líneas celulares de carcinoma pancreático una pérdida en la expresión de ARNm para T $\beta$ RI, lo que le confiere resistencia contra el efecto inhibitor de esta citocina. Al transfectarle un cDNA para este receptor, se restituye su sensibilidad para TGF- $\beta$ . En el carcinoma de mama, se ha encontrado una mutación en la que se substituye una serina por una tirosina en el codón 387 (S387Y) del T $\beta$ RI lo que conduce también a la pérdida de la sensibilidad del TGF- $\beta$  (Lin H. 1992).

En comparación con el T $\beta$ RI, existe un mayor número de reportes que indican que diversas mutaciones en el receptor T $\beta$ RII están asociados al desarrollo de diversos tipos de cáncer. En el caso del carcinoma gástrico y de colon se ha observado una inestabilidad genómica asociada a la mutación de 10 pares de bases en el exón 3 del gen para el T $\beta$ RII (*BAT-RII*), lo que resulta en la formación de un receptor con la pérdida del dominio cinasa de treonina y serina, llevando a la pérdida de la sensibilidad en la detención del ciclo celular, sin afectar la inducción de la formación de matriz extracelular (Lin H. *et al.* 1992).

Por otro lado, en diversos tipos de cáncer como de pulmón, próstata, esófago y mama, se ha encontrado una disminución o completa pérdida en la expresión de RNAm para T $\beta$ RII, lo que hace que estos tumores sean resistentes al efecto del TGF- $\beta$ , contribuyendo de este modo a aumentar el fenotipo maligno (Siegel P. *et al.* 2003).

En el caso de las proteínas que señalizan para TGF- $\beta$ , la mutación más recurrente ocurre en la Smad4, generalmente en el codón 200 del extremo carboxilo terminal que interviene en la oligomerización de la Smad4 con las R-Smad y que lleva a producir una proteína truncada e inestable que tiende a ser degradada, llevando a la pérdida de la expresión de esta proteína en diversos tipos de cáncer (Tabla 2). Se han encontrado también algunas mutaciones en las proteínas Smad2 y Smad3 y aunque con menor

frecuencia que Smad4, estas mutaciones también llevan a la pérdida de sensibilidad contra TGF- $\beta$  favoreciendo el proceso tumoral (Bierie B. *et al.* 2006, Pinkas J. *et al.* 2006).

Molécula mutada	Cáncer asociado
T $\beta$ RI	Tracto biliar, mama, gástrico, esófago, ovárico, pancreático, próstata y colon
T $\beta$ RII	Tracto biliar, mama, esófago, gástrico, glioma, pulmón, ovárico, pancreático, próstata y colon.
Smad4	Tracto biliar, mama, cervical, colon, esófago, pulmón, ovario pancreático, intestino delgado.
Smad2	Cervical, colon, pulmón, cabeza y cuello.
Smad3	Gástrico.

Tabla 2. Proteínas mutadas que intervienen en la señalización del TGF- $\beta$  y cáncer asociado.

## EL TGF- $\beta$ Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Los primeros datos que indicaron que el TGF- $\beta$  participa en la regulación de la respuesta inmune, fueron obtenidos por Kehrl y su grupo de trabajo en la década de los 80's al mostrar que los linfocitos T humanos eran capaces de producirlo y que tenían un importante papel en su propia proliferación (Kehrl J. *et al.* 1986). Para la década de los 90's se utilizaron ratones a los que se indujeron mutaciones que los incapacitaron para producir TGF- $\beta$  (ratones knock out), que desarrollaban enfermedades autoinmunes y una respuesta inflamatoria excesiva llevándolos a una muerte prematura; sin embargo, al administrarles TGF- $\beta$  exógeno, se observó una disminución en la respuesta inflamatoria y un aumento de su tiempo de vida, concluyendo que el TGF- $\beta$  es un regulador negativo de la respuesta inmune. (Kulkarni A. *et al.* 1993). En los últimos años, se demostró la existencia de una subpoblación de linfocitos denominada T<sub>Reg</sub> que participa activamente en la regulación negativa de la respuesta inmunológica a través del TGF- $\beta$ , cuya función es fundamental para la homeostasis inmunológica del organismo (Julien C. *et al.* 2005).

## TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS T

El papel fundamental que tiene el TGF- $\beta$  en la biología de los linfocitos T fue por primera vez demostrado al aportar evidencia de que estas células son capaces de producirlo, induciendo un efecto antiproliferativo en cultivos *In Vitro* de ellos mismos (Kehrl J. *et al.* 1986).). Esta actividad se da por diversas estrategias que incluyen, el bloqueo de la transcripción de citocinas como la IL-2, necesaria tanto para su propia proliferación así como para la de otros grupos celulares como neutrófilos o macrófagos; en los que, además, aumenta la expresión de moléculas que regulan el ciclo celular, deteniéndolas en la fase G1, a través de proteínas específicas como p21, p15 y p27. Adicionalmente se ha encontrado que el TGF- $\beta$  es capaz de bloquear la expresión de moléculas como c-myc, la ciclina D2 y la ciclina E en los linfocitos T, así como la expresión de cdk4 en linfocitos primarios TCD4+, fundamental para la proliferación de estas células. Se ha observado además que el TGF- $\beta$  puede inhibir la diferenciación de los linfocitos T interfiriendo con el TCR así como con los receptores de moléculas coestimuladoras como CD28 (Wolfrain L. *et al.* 2004). El efecto que tiene el TGF- $\beta$  sobre la proliferación de los linfocitos también está relacionada con la reducción en la expresión de los receptores para esta citocina, ya que en células activadas disminuye la expresión del T $\beta$ RII, el efecto que tiene el TGF- $\beta$  es mínimo en comparación con la inhibición que se logra sobre linfocitos vírgenes, y se ha encontrado que al tratar a los linfocitos activados con IL-10, se restaura la expresión del T $\beta$ RII al igual que su sensibilidad al TGF- $\beta$  (Cottrez F. *et al.* 2001). En experimentos con ratones transgénicos que no expresan el receptor T $\beta$ RII, se observa que los linfocitos T no responden al efecto inhibitorio del TGF- $\beta$ . Finalmente se ha reportado que el TGF- $\beta$  inhibe la diferenciación de los linfocitos T hacia la subpoblación de linfocitos TCD8+ o TCD4+, además de suprimir la adquisición de las funciones efectoras de los linfocitos TCD8+ (Thomas D. *et al.* 2005).

## TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS Th1 Y Th2

El TGF- $\beta$  es capaz de bloquear la diferenciación de los linfocitos TCD4+ hacia el perfil Th2 favoreciendo el perfil Th1, generando un abatimiento de la respuesta inmunológica ejercida por las citocinas secretadas por las células Th2. La inhibición de esta subpoblación de linfocitos está dada por un mecanismo que bloquea la expresión del activador transcripcional GATA-3, fundamental para la diferenciación de los linfocitos T hacia este perfil, sin embargo, el efecto inhibitorio del TGF- $\beta$  desaparece completamente

en linfocitos diferenciados hacia Th2, lo cual indica que en este punto se adquiere resistencia a su efecto (Gorelik L. *et al.* 2000). Por su parte, los linfocitos Th1 son resistentes al TGF- $\beta$  debido a que el IFN- $\gamma$  producido constitutivamente por ellos mismos, bloquea el efecto del TGF- $\beta$ . El mecanismo por el que se produce este bloqueo no es claro, sin embargo se ha mostrado que el IFN $\gamma$  es capaz de inducir la expresión de Smad 7, la cual regula negativamente la señalización del TGF- $\beta$ . Adicionalmente se ha mostrado que el TGF- $\beta$  inhibe la expresión de T-bet, un factor transcripcional de linfocitos T necesario para iniciar su diferenciación hacia Th1. Estos reportes ponen de manifiesto que el TGF- $\beta$  es fundamental para mantener el equilibrio de los perfiles Th1 y Th2 de los linfocitos T y que alguna alteración en su producción puede llevar a una alteración en el equilibrio Th1/ Th2, afectando la respuesta inmunológica (Jakowlew B, 2006).

### **TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS T<sub>REG</sub>**

Los linfocitos T reguladores, representan una importante subpoblación celular que suprime activamente la respuesta inmune manteniendo la tolerancia inmunológica. El papel del TGF- $\beta$  en el desarrollo y mantenimiento de esta subpoblación de linfocitos ha sido recientemente estudiado y ha mostrado que es capaz de modificar el fenotipo de linfocitos de TCD4+CD25- a TCD4+CD25+ en ensayos *In Vitro* aumentando su población y con ello elevando la producción del TGF- $\beta$  en el organismo a través del aumento en la expresión del factor de transcripción foxp3 (Fantini M. *et al.* 2004). El mecanismo a través del cual se produce este efecto no ha sido esclarecido, no obstante, se proponen dos hipótesis; la primera indica que el efecto supresor está dado directamente por la secreción del TGF- $\beta$  y que esta citocina es la que lleva a cabo la función inhibidora, la segunda indica que las células TCD4+CD25+ tienen un receptor que les permite mantener unido a su superficie al TGF- $\beta$  y de ese modo mediar la inhibición por contacto de sus células blanco (Nakamura K. *et al.* 2001).

### **TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS TCD8+**

El TGF- $\beta$  ha mostrado ser un potente inhibidor de la diferenciación de los linfocitos TCD8+, ya que al ser activados en presencia del mismo, no adquieren sus funciones citotóxicas debido a que se ve afectado el programa de expresión de genes para estas moléculas. Se ha observado que el TGF- $\beta$  inhibe también la secreción de perforinas aun en linfocitos TCD8+ ya activados (Thomas D. *et al.* 2005). Adicionalmente se ha

encontrado que el TGF- $\beta$  es capaz de inhibir la expresión del ARNm para el receptor de Fas (Fas-L) en los linfocitos T CD8+ a través de la disminución de la expresión de c-myc, lo que podría prevenir la señalización de muerte que provocan en sus células blanco (Genestier L. *et al.* 1999). La inhibición en la expresión de IFN- $\gamma$ , fundamental para la función efectora de estas células, puede ser regulada por el factor de transcripción T-bet de forma similar a como se lleva a cabo en la subpoblación de linfocitos Th1, debido a que se ha observado una disminución en la expresión de esta molécula al tratar a las células TCD8+ con el TGF- $\beta$  (Ahmadzadeh M. *et al* 2005).

La regulación negativa que ejerce el TGF- $\beta$  en la diferenciación de los linfocitos TCD8+ ha sido fuertemente reforzada por estudios *In Vivo* con ratones knock out para TGF- $\beta$ , a los que se indujeron enfermedades inflamatorias y en los que se observaba una recuperación al eliminar a los linfocitos TCD8+; en este mismo modelo se observó que los ratones eran capaces de producir de manera inmediata citocinas efectoras al mantenerse activados los linfocitos T citotóxicos, lo que muestra el importante papel del TGF- $\beta$  en la regulación de los linfocitos TCD8+ *In Vivo*.

## TGF- $\beta$ Y LINFOCITOS B

El TGF- $\beta$  se reconoce como importante regulador de la proliferación y actividad de linfocitos B. En estudios *In Vitro* con linfocitos B maduros se ha observado que el TGF- $\beta$  tiene un potente efecto supresor de la proliferación asociado con un bloqueo en la progresión del ciclo celular, deteniendo a las células en la fase G1/S. Además se ha encontrado que el TGF- $\beta$  reprime la expresión de la ciclina A e inactiva a cdk2, posiblemente aumentando la expresión de p21 y p27 y suprimiendo a la vez la expresión de c-myc. La inhibición en la proliferación producida por el TGF- $\beta$  en los linfocitos B, es modulada por moléculas como CD40, quien aumenta la expresión de Smad7, bloqueando de este modo el efecto inhibitor de esta citocina sobre la proliferación de los linfocitos B (Patil S. *et al* 2000). Se ha mostrado también en estudios tanto *In Vitro* como *In Vivo*, que el TGF- $\beta$  inhibe la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B, además de cambiar su isotipo y favoreciendo a IgA. Por otro lado, se sabe que el TGF- $\beta$  es capaz de disminuir la fosforilación de Stat6, bloqueando de esta forma el efecto de la IL-4 en los linfocitos B, afectando su sobrevivencia y la síntesis de IgG e IgE (Roes J. *et al.* 2003).

Adicionalmente, se ha demostrado que el TGF- $\beta$  induce la muerte por apoptosis en células B inmaduras por una disminución en la expresión de c-myc, así como por la

inducción en la expresión de BH3, un factor pro-apoptótico miembro de la familia de Bcl-2 (Willey G. *et al.* 2003).

### **TGF- $\beta$ Y CÉLULAS NK**

Las células NK, son reconocidas por su participación en la respuesta inmunológica antitumoral y son capaces de reconocer células infectadas por ciertos virus y responder a productos microbianos, citocinas y moléculas que son expresadas por células tumorales (Hamerman J. *et al.* 2005). El TGF- $\beta$  es un inhibidor de las funciones de las células NK, ya que atenúa su actividad citolítica e inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , esencial para la proliferación de los linfocitos Th1. Esta inhibición se da aun en células estimuladas con IL-2 y aunque se desconoce el mecanismo a través del cual logra este efecto, se ha observado que inhibe a la cadena  $\alpha$  del receptor para la IL-2 (Hamerman J. *et al.* 2005). Se ha observado también que el TGF- $\beta$  induce una disminución en la expresión de receptores citotóxicos en sus células blanco, tales como NKp30 y NKG2D, fundamentales para esta función (Castriconi R. *et al.* 2003). Finalmente, se ha encontrado que las células NK pueden ser una fuente importante de TGF- $\beta$  en el organismo, ya que su estimulación con anti-CD69 o anti-CD2 las lleva a producir constitutivamente TGF- $\beta$  activo, provocando una importante regulación negativa del sistema inmunológico.

### **TGF- $\beta$ Y CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las células dendríticas desempeñan funciones importantes en la inducción de la respuesta inmunológica, así como en la tolerancia. El TGF- $\beta$  tiene la capacidad de regular negativamente la maduración de este grupo celular, afectando de este modo la respuesta inmunológica, sobre todo en aquellas funciones que son mediadas por los linfocitos T. Se ha observado que las células dendríticas expresan predominantemente moléculas del MHC clase II en presencia de TGF- $\beta$ , lo que podría favorecer la activación de los linfocitos CD4+. Sin embargo, al mismo tiempo se inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras, tales como CD80, CD83 y CD86, lo que podría llevar a los linfocitos activados a una muerte por apoptosis debido a una coestimulación deficiente. Por otro lado, se ha mostrado que el TGF- $\beta$  inhibe la producción de IL-12 inducida por moléculas pro inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 en células dendríticas, lo que lleva a la inhibición del perfil Th1 de los linfocitos TCD4+, alterando el equilibrio que existe entre estas dos subpoblaciones de linfocitos T. Se ha encontrado también, que la presentación de

antígenos por las células dendríticas a los linfocitos T, es bloqueada en presencia de TGF- $\beta$ , inhibiendo de esta manera su función. Finalmente se ha reportado que el TGF- $\beta$  es secretado por las mismas células dendríticas, lo que podría estar favoreciendo el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en los linfocitos T mediada por este grupo celular (Strobl H. *et al.* 1999).

## **TGF- $\beta$ Y MONOCITOS-MACRÓFAGOS**

Se ha encontrado que el TGF- $\beta$  inhibe la expresión de receptores que intervienen en el reconocimiento de antígenos provenientes tanto de microorganismos, como de células apoptóticas, en los macrófagos, bloqueando de este modo su función. También se ha observado que el TGF- $\beta$  regula negativamente la expresión de dos receptores de la IgG, Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII, y considerando que los macrófagos fagocitan más fácilmente moléculas o microbios opsonizados por las IgG, la fagocitosis de estas partículas resulta reducida. Se ha observado también que el TGF- $\beta$  puede afectar la eficiencia de los macrófagos en la presentación de antígenos, ya que inhibe la expresión de la molécula coestimuladora CD40, así como de la IL-12, representando un mecanismo importante en la regulación de la respuesta inmune al disminuir la estimulación secundaria en las células T en el sitio de infección (Wahl S. *et al.* 1993, Takeuchi M. *et al.* 1998). Ha sido reportado que la fagocitosis de células apoptóticas lleva a la secreción del TGF- $\beta$ , inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas en los macrófagos tales como la IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF y la IL-8, representando otro mecanismo de autorregulación de la respuesta inmunológica en la que el TGF- $\beta$  se encuentra involucrado (Heusinkveid M. *et al.* 2011).

## **TGF- $\beta$ Y GRANULOCITOS**



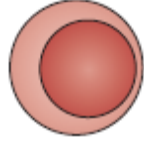
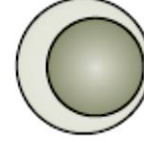

Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  inhibe la expresión de la IL-8 inducida por el TNF- $\alpha$  en células endoteliales, así como la expresión de selectina-E y V-CAM-1, lo que lleva al bloqueo de la trans migración de los neutrófilos a los sitios de infección, limitando de este modo la respuesta inflamatoria. Se ha encontrado también que el TGF- $\beta$  reduce la viabilidad y la liberación de peroxidasa en eosinófilos aislados de sangre periférica humana y regula la activación de los neutrófilos polimorfonucleares. Se ha reportado además que el TGF- $\beta$  puede disminuir las funciones efectoras como fagocitosis y la degranulación en este grupo celular, sin embargo estos resultados generan aun controversia por lo que se requiere mayor investigación (Park S. *et al.* 2000).






## TGF- $\beta$ COMO REGULADOR NEGATIVO DE LA RESPUESTA INMUNE

Como se ha mostrado, el TGF- $\beta$  es un potente regulador negativo de la respuesta inmunológica, capaz de afectar la proliferación y diferenciación de los diferentes grupos celulares que llevan a cabo la respuesta inmunológica del organismo (Cuadro 1). Una de sus principales funciones, es modular la respuesta inmunológica que se desencadena como consecuencia de la presencia de diversos antígenos extraños al organismo, así como de favorecer, una vez controlada la infección, que se pueda llevar a término la respuesta inmune. En ese sentido se muestra que el TGF- $\beta$  tiene la capacidad de inhibir tanto la activación como la diferenciación y con ello la adquisición de las funciones efectoras de los diversos grupos celulares que intervienen tanto en la respuesta inmunológica humoral como celular. Este bloqueo de la respuesta inmunológica se da a diferentes niveles, ya que afecta tanto a la células encargadas de iniciar la respuesta inmune mediada por linfocitos, al inhibir la secreción de citocinas necesarias para su activación y maduración de otros grupos celulares, al mismo tiempo que se inhibe la fagocitosis, el procesamiento y la presentación del antígenos a otras células efectoras como los linfocitos, bloqueando de este modo tanto su propia función, como la de otros grupos celulares (Ryungsa K. *et al.*2006, Ming O. *et al.*2006).

El hecho de que el TGF- $\beta$  tenga un potente efecto negativo en la regulación de la respuesta inmunológica, lo convierte en una citocina cuya estricta regulación resulta fundamental para el organismo y cualquier alteración que lleve a su sobre-expresión, puede desencadenar un bloqueo de la respuesta inmunológica, favoreciendo el inicio y/o desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer.

ACTIVIDADES DEL TGF- $\beta$			
Grupo celular	Inhibe	Induce	Consecuencia
 Linfocitos TCD4+	Proliferación Diferenciación hacia Th1 y Th2 Funciones efectoras	Expresión de cd25 Expresión de FOXP3	Disminución de la secreción de citocinas necesarias para la maduración y activación de otros grupos de células efectoras como linfocitos TCD8+, LB, NK, etc.
 Linfocito TCD8+	Proliferación Diferenciación Función citotóxica		Supresión de la respuesta inmunológica mediada por citotoxicidad.
 Linfocitos T <sub>REG</sub>		Función supresora Mantenimiento en la periferia	Supresión y terminación de la respuesta inmunológica.
 Linfocitos B	Proliferación Activación y supervivencia Expresión de IgG e IgE	Expresión de IgA Apoptosis	Disminución de la respuesta inmune humoral.
 Células NK	Producción de citocinas Citotoxicidad		Disminución de la respuesta inmunológica antitumoral.

 <p>Monocitos-macrófagos</p>	<p>Diferenciación Fagocitosis Presentación de antígeno Expresión de receptores Producción de citocinas</p>		<p>Inhibición en la iniciación de la respuesta inmune celular y humoral. Inhibición de señales de activación y coestimulación para linfocitos.</p>
 <p>Granulocitos</p>	<p>Activación Fagocitosis Presentación de antígeno</p>		<p>Inhibición en la iniciación de la respuesta inmune celular y humoral. Inhibición de señales de activación y coestimulación para linfocitos.</p>
 <p>Células dendríticas</p>	<p>Producción de IL-2 Fagocitosis Maduración Presentación de antígeno</p>		<p>Inhibición en la iniciación de la respuesta inmune celular y humoral. Inhibición de señales de activación y coestimulación para linfocitos.</p>

Cuadro 1. Efecto del TGF- $\beta$  sobre diversos grupos celulares que intervienen en la respuesta inmunológica.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que algunos tumores son capaces de secretar citocinas que favorecen su estado tumorigénico, además de desarrollar mecanismos para evadir la respuesta inmunológica y permitir la invasividad. El TGF- $\beta$  está identificado como un potente regulador negativo de la respuesta inmunológica y es producido por diversos tumores. En el caso específico del CaCu, se ha encontrado un aumento en la expresión de TGF- $\beta$  en el suero de pacientes con diversos estadios de la enfermedad, lo mismo que en biopsias de tumores y en cultivos *In Vitro*, sin embargo, aún no se conoce con precisión el mecanismo a través del cual el TGF- $\beta$  producido por las células tumorales inhibe la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T, por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto del TGF- $\beta$  producido por líneas celulares de CaCu sobre la proliferación e inducción de una muerte por apoptosis en linfocitos T, como un mecanismo para evadir la vigilancia inmunológica.

## HIPÓTESIS

El TGF- $\beta$  es reconocido por su importante participación en la regulación negativa de la respuesta inmune, se ha reportado que en estados avanzados de CaCu se incrementa la producción de TGF- $\beta$ , por lo que es posible que este aumento de expresión de TGF- $\beta$  sea utilizado por las células tumorales para inhibir la proliferación de los linfocitos T e inducir su muerte por apoptosis.

## OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del TGF- $\beta$  presente en los medios condicionados (MCs) obtenidos a partir de cultivos de células de cáncer cérvico uterino (CaCu), sobre la proliferación, ciclo celular e inducción de muerte por necrosis o apoptosis en cultivos de linfocitos T humanos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar si los MCs de células tumorales HeLa, CaLo, InBI (HPV-18), SiHa, CaSki (HPV-16) y C33A y ViBo (HPV-), presentan una actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH).
- Determinar si el TGF- $\beta$  es responsable de la AIPCLH presente en los MCs de las diferentes líneas celulares.
- Evaluar si el TGF- $\beta$  presente en los MCs de las diferentes líneas celulares detiene a las células linfocíticas en alguna fase del ciclo celular.
- Determinar si los MCs de células tumorales inducen en cultivos de linfocitos una muerte por necrosis.
- Determinar si el TGF- $\beta$  presente en los MCs induce a los linfocitos a una muerte celular por apoptosis.
- Evaluar la actividad del TGF- $\beta$  presente en los MCs de las líneas celulares sobre las subpoblaciones de linfocitos TCD4+ y TCD8+.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de linfocitos de sangre periférica humana

Las muestras de sangre heparinizada fueron obtenidas de voluntarios aparentemente sanos. Las células mononucleadas fueron aisladas al ser centrifugadas a 1500 rpm a través de un gradiente de densidad en Hystopaque (Sigma-Aldrich USA), las células de la interfase fueron colectadas, lavadas 2 veces con solución buffer de fosfatos (PBS) e incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad durante 1 hora con RPMI-1640 (GIBCO, USA) suplementado con 20% de suero fetal de bobino (SFB) (GIBCO, USA). Al término de este tiempo se obtuvo una población enriquecida de linfocitos (PEL), al eliminar a las células adherentes. Las células de la PEL fueron cosechadas, lavadas 2 veces con PBS y colocadas en RPMI-1640 para ser utilizadas.

### Células y cultivos celulares

Se utilizaron siete diferentes líneas celulares provenientes de cáncer cervical. Las líneas celulares HeLa, SiHa, CaSki y C33A fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD), las líneas celulares CaLo, InBl y ViBo, fueron obtenidas por nuestro grupo de trabajo a partir de muestras de tumores de tres diferentes pacientes (Monrroy *et al.*, 1992). Las líneas de cáncer cérvico uterino (CaCu) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB.

Las células Mv1Lu se obtuvieron de la ATCC y fueron cultivadas en medio D-MEM (GIBCO, USA), suplementado con 10% de SFB.

Los fibroblastos humanos fueron obtenidos a partir de biopsias de cérvix de pacientes sometidas a histerectomía por un diagnóstico distinto a CaCu. El tejido fue cortado en fragmentos de 5mm e incubado con tripsina a una concentración del 0.05% a 37° C y agitación constante por 15 minutos. La suspensión celular obtenida fue filtrada a través de una malla y cultivada con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. Al tejido remanente se le adicionó nuevamente tripsina y se incubó por 15 minutos más en las mismas condiciones. La suspensión celular fue filtrada y cultivada en RPMI-1640 al 10% de SFB. A las 24 horas de cultivo, se retiró el sobrenadante con las células no adheridas y restos de tejido y las células adheridas fueron sub-cultivadas hasta obtener cultivos confluentes.

Los cultivos de linfocitos fueron estimulados a proliferar utilizando fitohemaglutinina (PHA) (Invitrogen CO. USA) a una concentración de  $10\mu\text{g}/\text{m}/1 \times 10^6$  células. Las PEL fueron sembradas en placas de 96 pozos (Corning Inc. USA) y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB por 72 horas.

Todos los cultivos fueron incubados a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  y una atmósfera saturada de humedad.

### **Obtención de los medios condicionados**

Las diferentes líneas de células tumorales de CaCu o fibroblastos de cérvix humano fueron sembrados a una densidad de 40 millones de células en frascos de cultivo de 80ml (Corning Inc. USA) por 24 horas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. Transcurrido el tiempo, las células que no se adhirieron fueron removidas y las células adheridas fueron lavadas 5 veces con PBS para eliminar todo el SFB del cultivo, y se cultivaron por 24 horas más con RPMI-1640 libre de SFB. El medio condicionado (MC) fue entonces removido y mantenido en congelación. Una vez que se obtuvo 1 litro de medio, éste fue alicuotado en tubos cónicos de 50ml y liofilizado en un liofilizador (Speed Vac SAVANT AES2000) hasta sequedad y dializado con una membrana de 1KDa (Spectra/Poor MWCO 1000), llevado a un volumen final de 10ml de PBS, se centrifugó a 14000RPM y se filtró con una membrana de  $0.22\mu\text{M}$  (Corning, USA) y finalmente congelado a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. La proteína total contenida en el MC fue determinada utilizando un kit de ácido bicínico (BCA) (Pierce, Rockford II, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **Evaluación de la proliferación celular**

Para evaluar la proliferación de PEL,  $1 \times 10^6$  células fueron lavadas con RPMI-1640 e incubadas con  $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$  de timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ) (NEN, Boston MA), por 24 horas, las células fueron entonces colectadas, lavadas 3 veces con PBS y cosechadas, se colocaron en viales con 2ml de líquido de centelleo (Beckman, USA) y evaluadas con un contador de centelleo (Beckman, USA. Modelo LS-6500).

Para evaluar la proliferación de PEL por incorporación de carboxifluoresceína (CSFE), las células fueron re-suspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml y se agregó CSFE (Sigma-aldrich, USA) a la suspensión celular a una concentración final de  $12\mu\text{M}$  y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El marcaje se completó al adicionar 1ml de SFB durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar la CSFE que no fue incorporada.

Las células marcadas fueron entonces lavadas 5 veces con PBS suplementado con 5% de SFB, contadas y re-suspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y cultivadas en placas de 96 pozos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo /200 $\mu$ l.

Las células Mv1Lu fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de SFB y tratadas con el MC de las células tumorales a las concentraciones indicadas para cada experimento por 48 horas. La proliferación de las células Mv1Lu fue evaluada por la técnica de incorporación de cristal violeta utilizando un lector de placas ELISA (E1 800 series, USA) a 570nm.

### **Evaluación de muerte por necrosis**

Para evaluar la muerte por necrosis producida por el MC de células tumorales sobre los cultivos de PEL se utilizó un kit para evaluar la liberación de LDH (Bio- Vision, California),  $2 \times 10^5$  células fueron sembradas en placa de 96 pozos con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y activadas con 15 $\mu$ l/ml de PHA. A las 72 horas se colectó el medio de cultivo, se centrifugó a 1500RPM y se transfirieron 100 $\mu$ l del medio a otra placa de 96 pozos, se adicionaron 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción a cada pozo y se incubó la placa por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 490nm usando un lector de placas ELISA (E1 800 series, USA)

### **Cuantificación del TGF- $\beta$ por ELISA**

Para la detección del TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de células tumorales se utilizó un kit para ELISA (Bio Source Internacional, Inc.). En tubos de polipropileno se agregaron 0.25 ml del MC de células tumorales y 0.05 ml de la solución de extracción, se incubaron a 4<sup>o</sup> C durante 30 minutos y se agregaron 0.25 ml de buffer de ázida de sodio por tubo, se tomaron 200  $\mu$ l de cada muestra y se colocaron en una placa de 96 pozos recubierta con el anti-TGF- $\beta$ 1. Se agregaron 50  $\mu$ l/pozo de anti-TGF- $\beta$  biotinado y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó la solución de los pozos y se lavó 4 veces con 400  $\mu$ l/pozo de solución de lavado y se dejó secar por 30 segundos, se agregaron 100  $\mu$ l/pozo de solución de trabajo de Streptavidina-peroxidasa (HRP) por 30 minutos, se lavó 4 veces con 400  $\mu$ l/pozo de solución de lavado y se agregaron 100  $\mu$ l/pozo de solución estabilizadora del cromógeno. Finalmente, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo de solución de paro y se leyó la placa a 450 nm en un lector de placas ELISA (E1 800 series, USA).



### **Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo**

Los linfocitos fueron cosechados y centrifugados a 1500 rpm durante 3 minutos, se lavaron una vez con PBS y se fijaron con etanol al 70% en PBS. Se lavaron con PBS y se re-suspendieron en 50  $\mu$ l/ml de RNAsa en PBS durante 1 h a 37° C. Posteriormente se tiñeron con 20  $\mu$ l/ml de yoduro de propidio (200 mg/l) (Sigma-Aldrich, USA) en PBS durante 2 min. Se re-suspendieron en 0.5ml PBS. La distribución de ADN en el ciclo celular fue determinada por citometría de flujo (FACS- Aria II) usando el software FACS Diva 6.1.2.

### **Análisis de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+**

Un millón de células de la PEL fueron lavadas 2 veces con PBS y re-suspendidas en 1 ml de PBA (PBS al 0.2% de ázida de sodio y 0.2% de albumina sérica bovina). Se centrifugó la suspensión y se retiró el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 5 $\mu$ l; se agregaron 5  $\mu$ l de anticuerpo conjugado  $\alpha$ CD4-FITC (Sta. Cruz, USA) diluido en PBA 1:5 y 5  $\mu$ l de anticuerpo conjugado  $\alpha$ CD8-PE (Sigma-Aldrich, USA) diluido en PBA 1:5, se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Se lavaron con 1 ml de PBA, se centrifugaron a 1500RPM, se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron en 0.5 ml de PBS. Los linfocitos CD4+ y CD8+ fueron determinados por citometría de flujo usando el software FACS Diva 6.1.2.

### **Evaluación de apoptosis por marcaje con anexina-V**

Para evaluar la inducción de muerte por apoptosis en cultivos de linfocitos, se utilizó un Kit de marcaje con Anexina-V-FITC para medir apoptosis a través de la translocación de la fosfatidilserina (PS) a la cara externa de la membrana celular, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que consisten en colocar en un tubo 500 $\mu$ l de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/ml y agregar 5 $\mu$ l de anexina-V conjugada a FITC y 10 $\mu$ l de solución de yoduro de propidio, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz y se determinó la fluorescencia por citometría de flujo. Los datos fueron analizados con el software FACS Diva 6.1.2.

### **Evaluación de apoptosis por la expresión de la caspasa-3**

Un millón de células fueron marcadas con los anticuerpos conjugados  $\alpha$ -caspasa-3-FITC (Sigma-Aldrich, USA) y con  $\alpha$ -CD4-PE (Sigma-Aldrich, USA), a una concentración de 10  $\mu$ g/ $1 \times 10^6$  células/100  $\mu$ l. Las células fueron lavadas dos veces con PBS (pH 7.2)

conteniendo 0.2% de NaN<sub>3</sub> y 0.2% de BSA y re-suspendidas en 0.5ml de PBS. Las células CD4+ y caspasa-3 positivas fueron detectadas por citometría de flujo usando el software FACS Diva 6.1.2.

### **Análisis estadístico**

Los datos experimentales fueron presentados como la media  $\pm$  S.D. de al menos tres experimentos independientes con seis repeticiones y fueron estadísticamente analizados usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de la prueba de Tukey con una significancia de  $p < 0.05$  comparado contra el control.

## RESULTADOS

Se ha reportado que las células tumorales adquieren ventajas selectivas que les permiten modificar su microambiente a través de la secreción de diversas citocinas que favorecen su proliferación, además de intervenir en la evasión del sistema inmunológico para garantizar su sobrevivencia y favorecer la metástasis. En el caso particular del CaCu, se ha encontrado un aumento en la expresión de citocinas como la IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$ , esta última ha sido asociada con la regulación negativa de las diferentes células que intervienen en la respuesta inmunológica como son los linfocitos T; sin embargo, no se ha demostrado concluyentemente si las células tumorales de cáncer cervical sobreexpresan TGF- $\beta$  que actúe sobre la proliferación o activación de este grupo celular. Por ello, con el fin de determinar si las células tumorales provenientes de CaCu son capaces de secretar factores solubles biológicamente activos, entre ellos el TGF- $\beta$ , que permitan lograr esta acción, se determinó la concentración total de proteína contenida en el MC de células HeLa por la técnica de BCA y se evaluó su efecto sobre el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana (Figura 6).

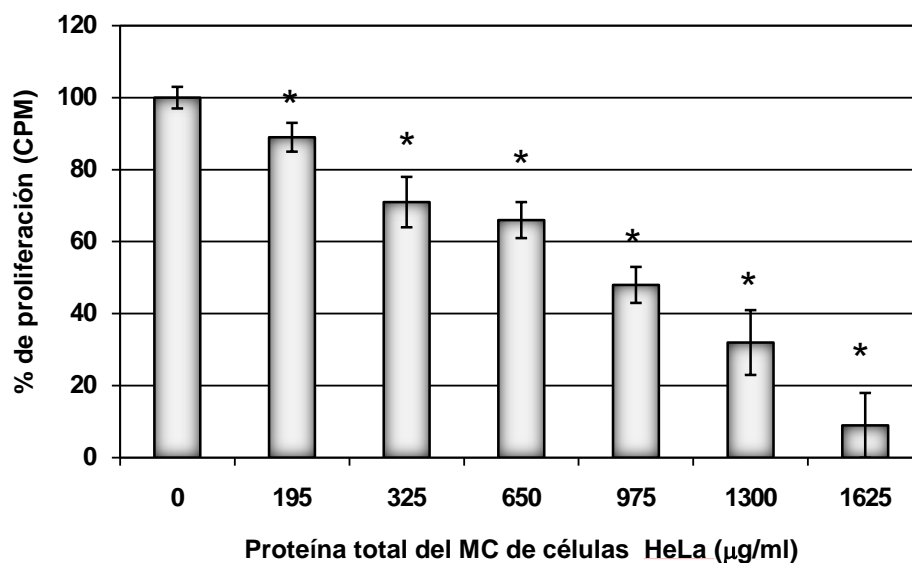


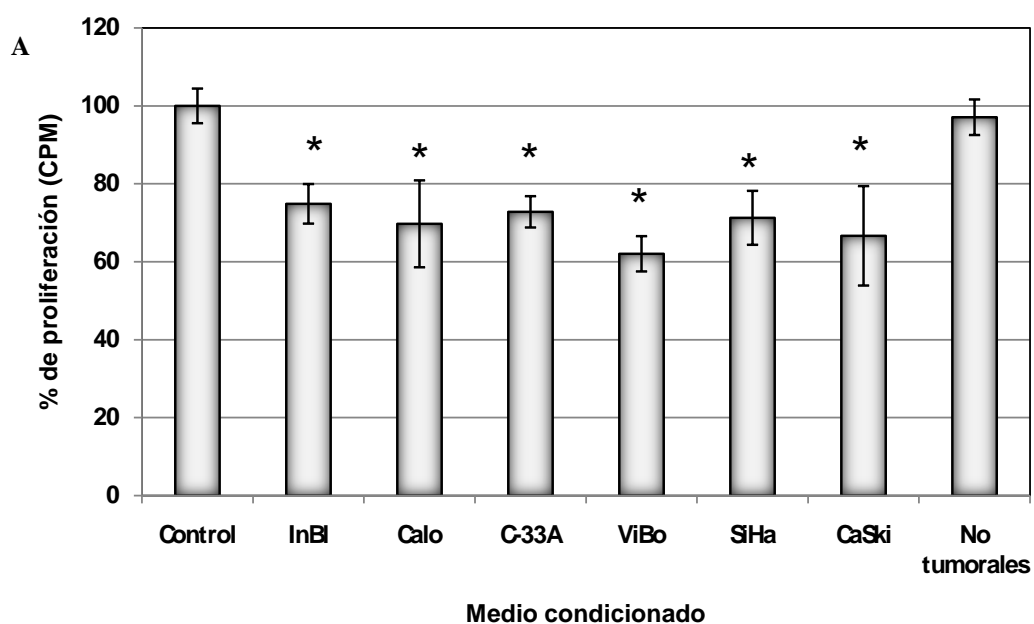
Figura 6. Efecto del MC de células HeLa provenientes de CaCu sobre el potencial proliferativo de linfocitos de sangre periférica humana. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de PHA, tratadas con diferentes concentraciones de proteína total contenida en MC de células HeLa y evaluadas a las 72h por incorporación de timidina tritiada.

\*  $p < 0.05$  vs. 0  $\mu\text{g/ml}$  (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos (Figura 6), muestran el efecto que producen diferentes concentraciones de proteína total contenida en MC de células tumorales sobre la proliferación de los cultivos de linfocitos humanos, poniendo de manifiesto que hay una

menor incorporación de timidina tritiada en todos los cultivos de linfocitos que fueron tratados con las diferentes concentraciones de proteína total contenida en el MC de células HeLa en comparación con el cultivo sin tratamiento, indicando con ello una inhibición en la síntesis de ADN y por tanto que se ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación de ésta células. Podemos observar además que conforme se incrementa la concentración de proteína contenida en el MC, se presenta una disminución de la proliferación de los linfocitos, indicando que se produce un efecto dependiente de la dosis y mostrando que a una concentración de 975  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total se inhibe al 50% el número celular (IC50).

Una vez determinado que el MC de células Hela tiene la capacidad de disminuir la proliferación de cultivos de linfocitos y obteniendo que la IC50 fué de 975  $\mu\text{g/ml}$ , se procedió a determinar la concentración total de proteína en el MC de las líneas celulares de CaCu InBl, CaLo (HPV-18), SiHa, CaSki (HPV-16), ViBo y C-33A (HPV negativas) y se evaluó si presenta la misma actividad inhibitora de la proliferación de linfocitos humanos (figura 7).



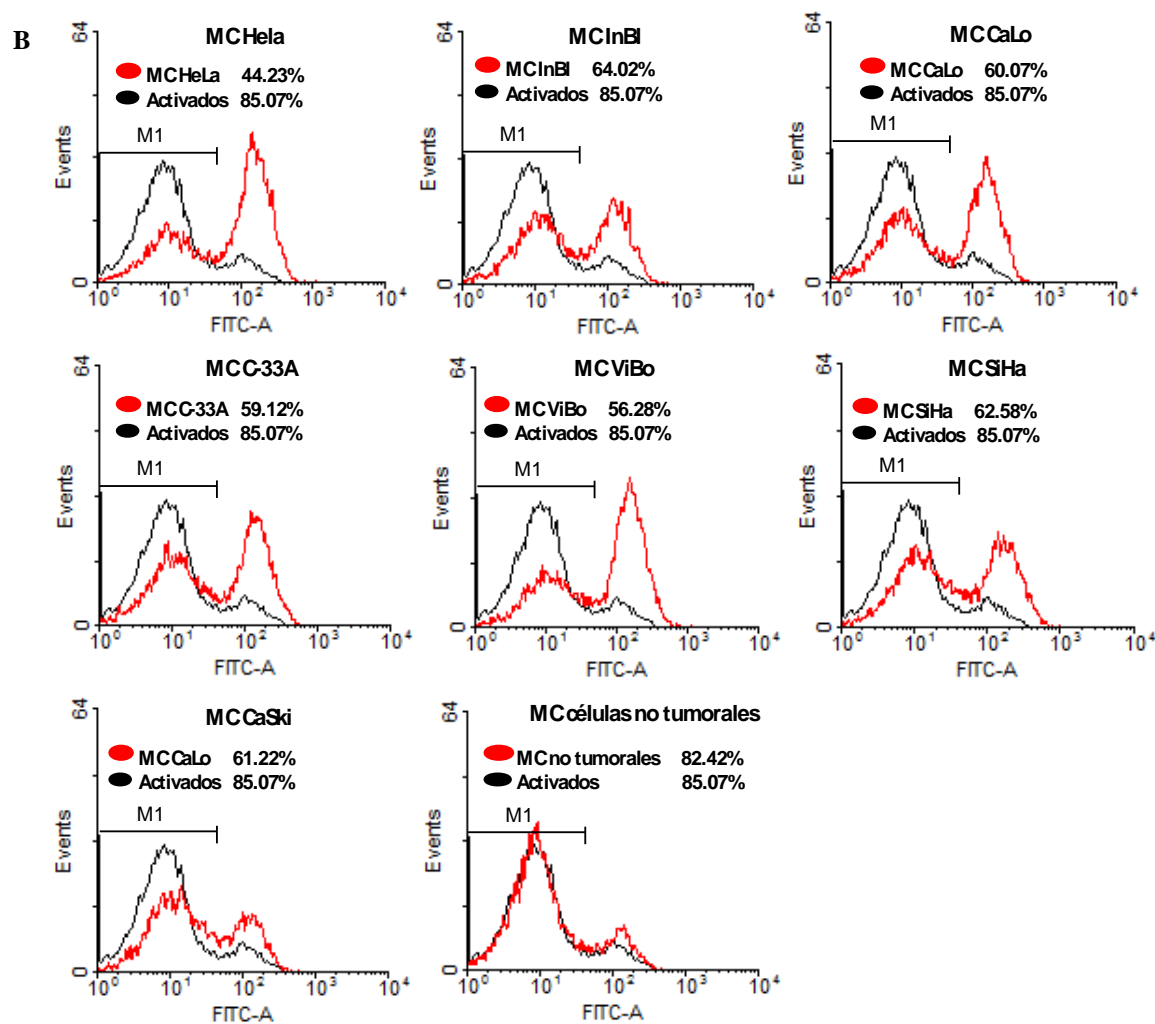


Figura 7. Efecto del MC de células tumorales provenientes de CaCu HPV-16 (SiHa y CaSki), HPV-18 (HeLa, InBI y CaLo) y HPV negativas (C-33A y ViBo) sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana. A. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con  $10 \mu\text{g/ml}$  de PHA, tratadas con  $975 \mu\text{g/ml}$  de proteína total contenida en el MC de las diferentes líneas tumorales y evaluadas a las 72h por incorporación de timidina tritiada. B. Cultivos de linfocitos activados con  $10 \mu\text{g/ml}$  de PHA, tratados con  $975 \mu\text{g/ml}$  de proteína total contenida en el MC de células tumorales y evaluadas a las 72h por incorporación de carboxifluoresceína. M1= Células en proliferación.

\*  $p < 0.05$  vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos muestran que al tratar los cultivos de linfocitos con el MC de las diferentes líneas celulares de CaCu, se induce una disminución de la síntesis de ADN entre 30 y 40% (Figura 7A) con respecto al cultivo sin tratamiento, indicando que todas las líneas tumorales de CaCu utilizadas en este experimento tienen la capacidad de secretar al medio de cultivo una actividad inhibitoria de la proliferación de linfocitos. Adicionalmente, podemos observar que el MC de células no tumorales de cérvix humano no afecta la incorporación de timidina tritiada en el ADN del cultivo de linfocitos.

El hecho de observar una disminución en la tasa de incorporación de timidina tritiada en los cultivos de linfocitos tratados con el MC de las diferentes líneas tumorales, nos indica que se afecta la proliferación de estos cultivos. Sin embargo, con la intención de corroborar este dato se procedió a evaluar directamente la división celular marcando a los linfocitos en cultivo con carboxifluoresceína y evaluando la tasa de división celular por citometría de flujo (Figura 7B). Los resultados muestran que en los cultivos tratados con fitohemaglutinina la marca de carboxifluoresceína se diluye (se utiliza el mismo espectro que para FITC), indicando una tasa de proliferación en el cultivo del 85%, sin embargo al tratar al cultivo con el MC de células HeLa se observa una tasa de proliferación del 44%, indicando que se afecta aproximadamente al 48% de los linfocitos activados. En el caso del resto de los MC de células de CaCu se observan tasas de proliferación entre 56 y 64% indicando que se afecta la proliferación entre un 25 y 34% con respecto a los cultivos activados. Estos datos son consistentes con los obtenidos por la técnica de incorporación de timidina tritiada y ponen de manifiesto que se está afectando el potencial proliferativo de los cultivos tratados. Cabe resaltar que los MC de células no tumorales de cérvix humano no inducen la dilución de la marca de carboxifluoresceína, manteniendo un comportamiento similar al de los linfocitos activados.

Los resultados obtenidos demuestran que los MC de las líneas de CaCu utilizadas presentan una actividad inhibidora de la proliferación de células linfocíticas humanas (AIPCLH), independientemente de que dichas células estén infectadas con el HPV-18, HPV-16 o estén libres de HPV, lo que sugiere que el efecto observado no está relacionado con la presencia del virus y por ello se decidió continuar el trabajo utilizando solo una línea tumoral positiva para HPV-18 (HeLa), una para HPV-16 (CaSki) y una libre del HPV (ViBo).

Una vez determinado que los MC de células de CaCu inhiben la proliferación de linfocitos y considerando los diversos reportes que muestran el importante papel inmunoregulatorio que juegan las citocinas en el microambiente tumoral, entre las que encontramos al TGF- $\beta$  quien ha sido reconocido por su importante papel como regulador negativo de la respuesta inmunológica, se procedió a evaluar si este factor de crecimiento está presente en el MC de células de CaCu y si es responsable del efecto antiproliferativo observado en cultivos de linfocitos.

Para esclarecer este punto, se procedió a cuantificar la cantidad de TGF- $\beta$  presente en el MC de las líneas tumorales por la técnica de ELISA (Tabla 3).

LINEA CELULAR	Concentración de TGF- $\beta$ en los MCs (pg/ $\mu$ g de protein total)
HeLa	0.8358
SiHa	0.3846
C-33A	0.3564
Células no tumorales	0.0

Tabla 3. Concentración de TGF- $\beta$  en las diferentes líneas tumorales

Al efectuar la cuantificación de TGF- $\beta$  por la técnica de ELISA, encontramos que en los cultivos de células no tumorales de cérvix humano no se detecta la presencia de esta citocina. En contraste, si hay expresión de TGF- $\beta$  en el MC de células de CaCu con una mayor expresión en el MC de células HeLa, hecho que demuestra que las células tumorales incrementan de manera importante la producción de esta citosina comparado contra las células o tumorales del mismo tejido. Sin embargo, dado que el TGF- $\beta$  es secretado como una proteína inactiva y debe ser procesado para adquirir su actividad biológica, surge la duda si las células de CaCu tienen la capacidad de secretarlo biológicamente activo. Para esclarecer este punto se utilizó la línea celular Mv1Lu. En esta línea celular se ha demostrado que la resencia de TGF- $\beta$  inhibe su proliferación. Para ello las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con el MC de las líneas celulares HeLa, SiHa y C-33A.

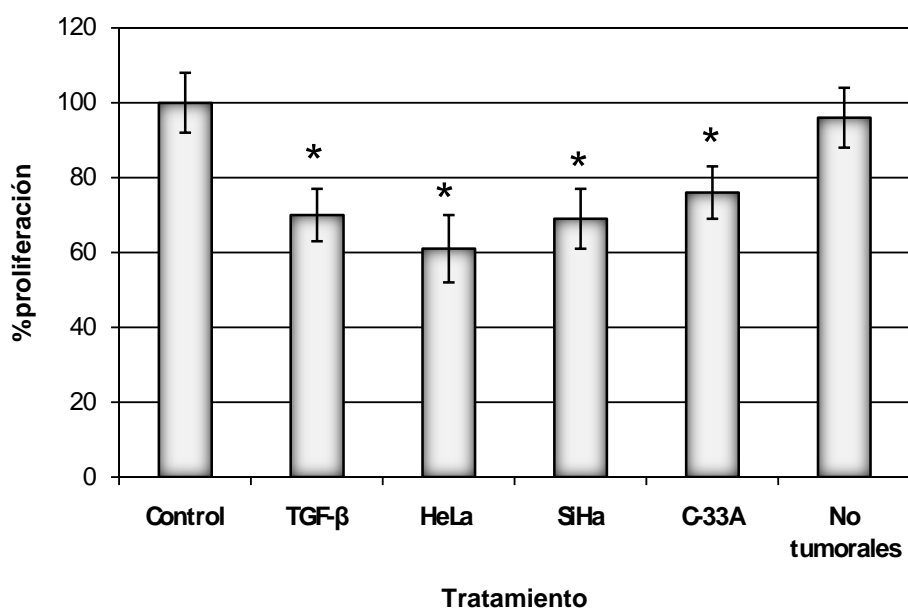


Figura 8. Determinación de la bioactividad del TGF- $\beta$  soluble presente en el MC de células tumorales sobre la línea celular Mv1Lu. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con el equivalente a 815pg/ml de TGF- $\beta$  contenido en el MC de las diferentes líneas celulares de CaCu o 975 $\mu$ g/ml de proteína total del MC de células no tumorales o 5ng/ml de TGF- $\beta$  recombinante. La evaluación se realizó a las 48 h por la técnica de cristal violeta.

\*  $p < 0.05$  vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

Los resultados (Figura 8) muestran una diferencia significativa en la proliferación de los cultivos de células Mv1Lu tratados con el MC de las diferentes líneas de CaCu comparado con el cultivo sin tratamiento, indicando que la proliferación de estas células se ve inhibida por el MC de células tumorales. No obstante, los cultivos tratados con el MC de células no tumorales, no muestran diferencia significativa con respecto al control sugiriendo que la actividad inhibidora solo se encuentra presente el MC de células tumorales. Estos datos evidencian además, que el TGF- $\beta$  presente en el MC de las líneas de CaCu se encuentra biológicamente activo y dada su importante función inmunomoduladora, es probable que sea el responsable de la actividad inhibidora observada.

Con la intención de aclarar este punto, se procedió a bloquear la actividad del TGF- $\beta$  presente en el MC, utilizando un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$ , tanto en células Mv1Lu, como en linfocitos humanos, para determinar si el efecto inducido por el TGF- $\beta$  se ve afectado.



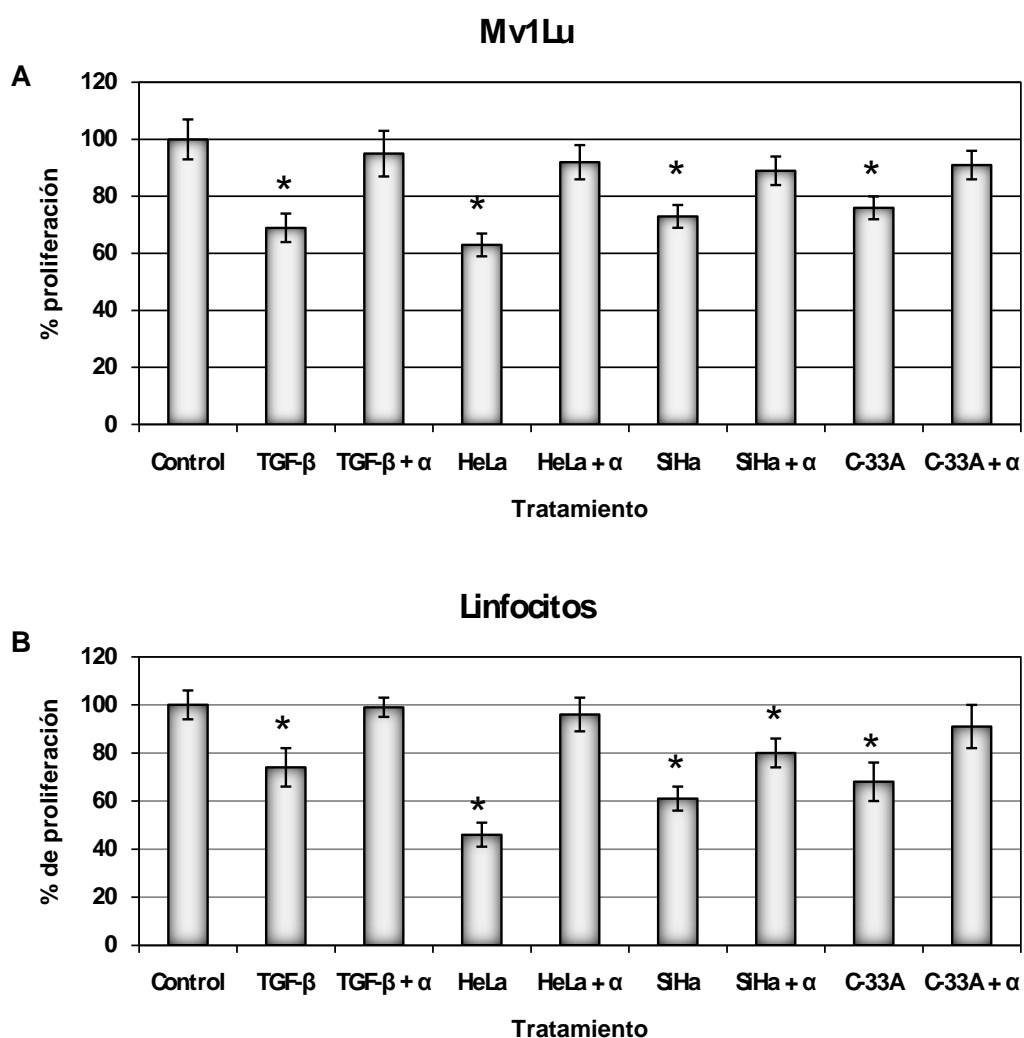


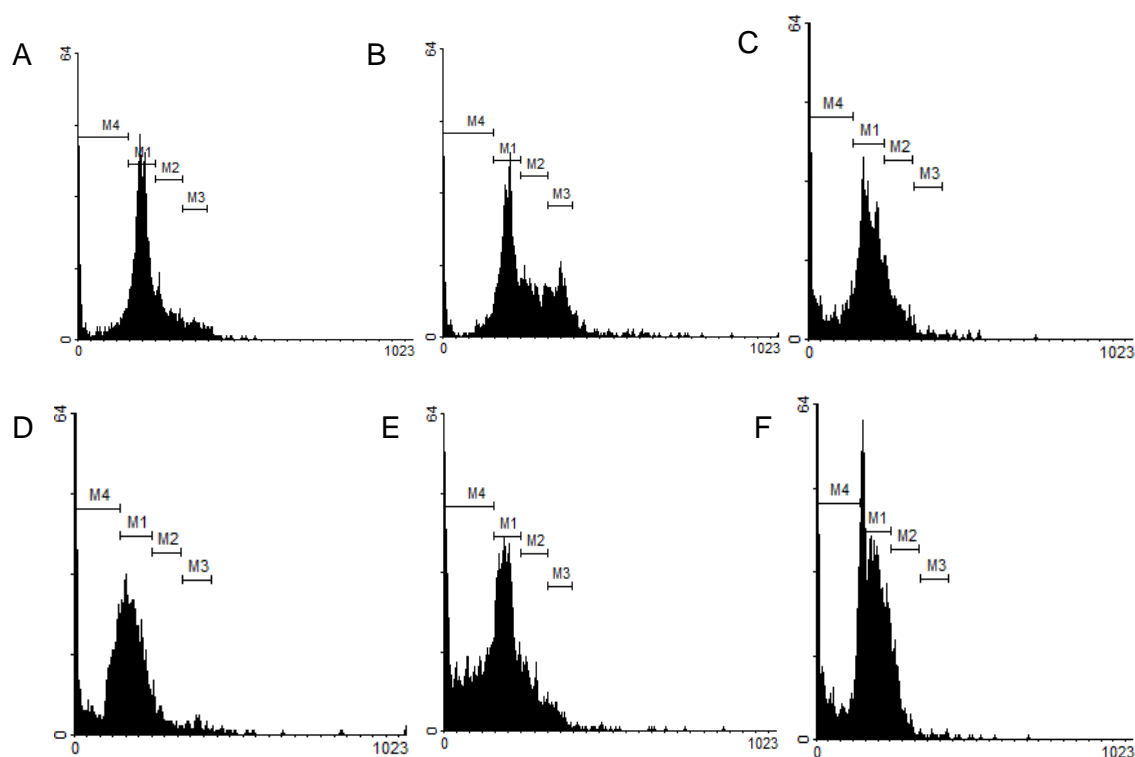
Figura 9. Bloqueo de la bioactividad del TGF- $\beta$  soluble contenido en el MC de células tumorales. A. Las células Mv1Lu fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con 815 pg/ml del TGF- $\beta$  presente en el MC de las diferentes líneas celulares de CaCu o MC bloqueados con un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$ . La evaluación se realizó a las 48 h por cristal violeta. B. Los linfocitos fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 10  $\mu$ g/ml de PHA, tratadas con 815 pg/ml TGF- $\beta$  presente en el MC de las diferentes líneas celulares de CaCu o MC bloqueados con un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$ . La evaluación fue realizada a las 72h por incorporación de timidina tritiada

\*  $p < 0.05$  vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

En las gráficas (Figura 9), se observa que cuando el MC de células tumorales es bloqueado con un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$ , el efecto sobre la proliferación producido por el MC de células de CaCu se ve inhibido, tanto en células Mv1Lu (Figura 9A) como en cultivos de linfocitos humanos (Figura 9B), hecho que pone de manifiesto que el TGF- $\beta$  es el responsable de dicha actividad. Es interesante observar además que en el caso de las células Mv1Lu se logra una recuperación completa del potencial

proliferativo, debido a que no existe diferencia significativa entre los cultivos tratados con el MC bloqueado con anti-TGF- $\beta$  y el control; sin embargo, en los cultivos de linfocitos no se observa una recuperación total con el MC de SiHa, sugiriendo que podrían estar participando otras citocinas en el efecto observado. No obstante este resultado, resulta claro que el principal responsable de la actividad inhibidora presente en el MC de células de CaCu es el TGF- $\beta$ , sin embargo, hasta este punto no sabemos si la disminución de la proliferación de linfocitos observada está acompañada de una inducción a muerte celular o solo se mantiene detenido al cultivo de linfocitos en alguna fase del ciclo celular.

Con la intención de despejar esta duda, se procedió a evaluar el efecto del TGF- $\beta$  presente en el MC de células tumorales sobre el ciclo celular de linfocitos por citometría de flujo, determinando la distribución del ADN de las células en las diferentes fases del ciclo celular. (Figura 10).



CONDICION	M1/G0-G1	M2/S	M3/G2-M	<b>M4/Sub-G1</b>
A. Linfocitos sin activar	73.32	8.62	7.18	<b>6.82</b>
B. Linfocitos activados	48.68	18.40	23.06	<b>5.92</b>
C. TGF- $\beta$ recombinante	58.24	7.46	6.12	<b>25.76</b>
D. MC HeLa	54.18	6.06	5.56	<b>22.74</b>
E. MC C-33A	38.34	4.36	5.88	<b>44.60</b>
F. MC SiHa	51.36	9.28	4.76	<b>32.96</b>

Figura 10. Efecto del MC de células tumorales sobre el ciclo celular de células linfocíticas humanas. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, activados con 10 $\mu$ g/ml de PHA y tratados con el equivalente a 815pg/ml de TGF- $\beta$  presente de MC de células HeLa, C33A, SiHa o TGF- $\beta$  recombinante y evaluados a las 72h de cultivo por citometría de flujo. A) Linfocitos sin activar B) Linfocitos activados C) Linfocitos activados tratados con el MC de células HeLa . D) Linfocitos activados tratados con el MC de células C-33A E) Linfocitos activados tratados con el MC de células SiHa. Las regiones M1, M2 y M3 corresponden a las fases G0/G1, S y G2-M del ciclo celular respectivamente. M4 = sub-G1.

Al analizar la distribución de ADN en el ciclo celular de los cultivos de linfocitos podemos observar que en los cultivos no tratados con PHA la mayoría de las células (73% de la población) se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular indicando que no han recibido un estímulo mitótico. En el cultivo de linfocitos que fueron tratados con PHA

se produce una disminución de las células en fase G0/G1 (48%) y un incremento del porcentaje de células que se encuentran en la fase S y G2/M del ciclo celular, indicando que se han activado adecuadamente y se encuentran proliferando. Sin embargo, cuando los cultivos de linfocitos activados con PHA son tratados con el TGF- $\beta$  recombinante o TGF- $\beta$  contenido en el MC de las células tumorales, se produce una pequeña recuperación en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G0/G1 (51-58%) excepto con el medio de C33A donde disminuye al 38%, acompañado de una disminución en las fases S y G2/M, indicando que el MC de las células tumorales no afecta significativamente el ciclo celular de los linfocitos. Cabe destacar que a pesar de que no se afecta significativamente el ciclo celular de los linfocitos tratados con el MC de células tumorales, si se produce un incremento importante en la región sub-G1 (hasta un 44.6% con el MC de células C-33A), indicando que el MC produce daño en el ADN, y por tanto induce muerte en los cultivos tratados. No obstante, este resultado no nos permite determinar si la muerte producida es debida a una muerte por necrosis o se induce una muerte por apoptosis. Para esclarecer esta observación, se procedió a evaluar si el TGF- $\beta$  del MC de células tumorales induce necrosis en los cultivos de linfocitos midiendo la liberación de LDH, o induce una muerte por apoptosis a través de la detección de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana citoplasmática.

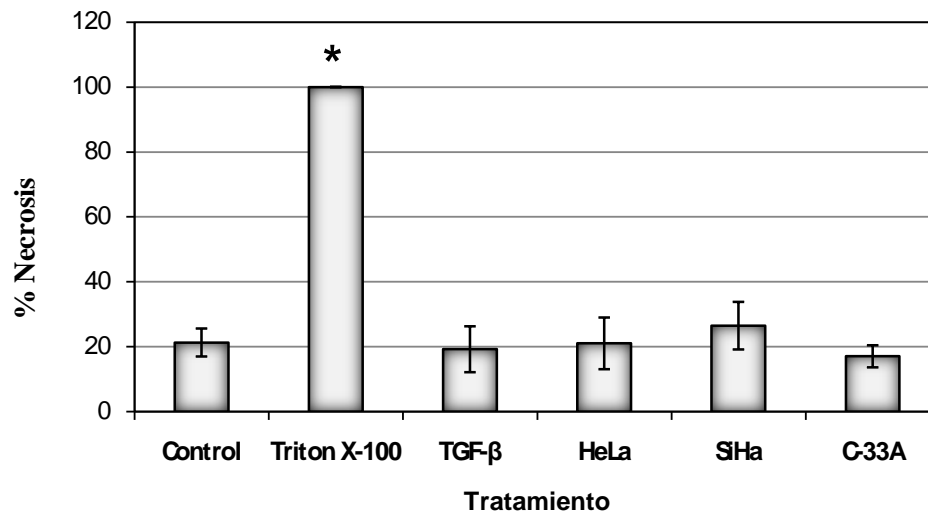


Figura 11 Inducción de muerte por necrosis en cultivos de linfocitos por el TGF- $\beta$  soluble contenido en el MC de células tumorales. Los linfocitos fueron sembradas en placas de 96 pozos, activadas con 10  $\mu$ g/ml de PHA y tratados con 5ng de TGF- $\beta$  recombinante o 815 pg/ml TGF- $\beta$  presente en el MC de las diferentes líneas celulares de CaCu. La evaluación fue realizada a las 72h por liberación de LDH.

\*  $p < 0.05$  vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

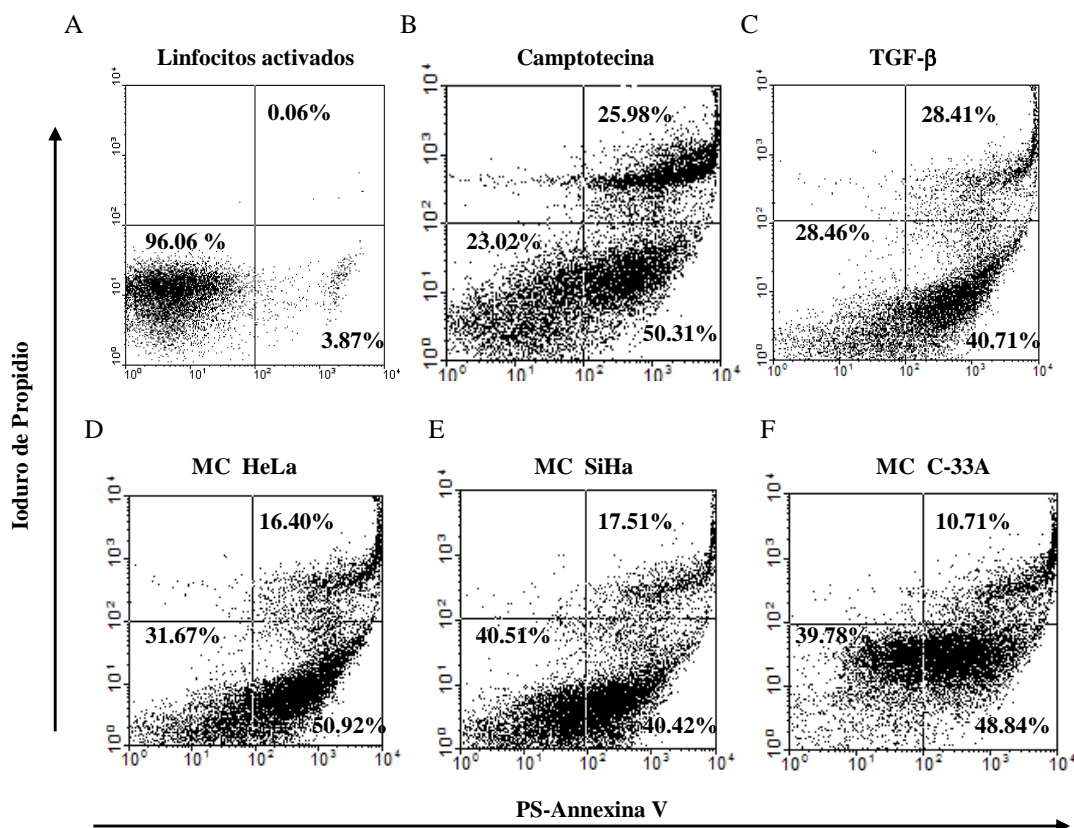


Figura 12. Detección de Fosfatidilserina-Anexina V en la cara externa de la membrana celular en cultivos de linfocitos tratados con TGF- $\beta$  recombinante o con 815 pg/ml de TGF- $\beta$  contenido en el MC de células tumorales. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, activados con 10 $\mu$ g/ml de PHA y evaluados a las 72h por citometría de flujo. A) Linfocitos sin tratamiento. B) Linfocitos tratados con 1mM de camptotecina C) Linfocitos tratados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  recombinante D) Linfocitos tratados con el MC de HeLa. E) Linfocitos tratados con el MC de SiHa. F) Linfocitos tratados con el MC de C-33A.

En los datos mostrados (Figura 11), se observa que el TGF- $\beta$  presente en el MC de las células tumorales no induce liberación de LDH, ya que si bien, se presenta un 20% de su liberación en comparación con el control positivo (células lisadas con tritón X-100), no existe diferencia significativa con respecto a los linfocitos activados (control), lo que demuestra que no se induce muerte por citotoxicidad en los cultivos de linfocitos.

Por otro lado, podemos observar el comportamiento del cultivo al ser marcado con anexina-V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que se une a la fosfatidilserina (PS) que se encuentra en la cara externa de la membrana celular y que indica la inducción de muerte apoptótica, además de marcar al mismo tiempo el cultivo con ioduro de propidio (IP) el cual se introduce a la célula si existe un daño en su membrana (Figura 12). De este modo podemos observar que en el cultivo de linfocitos

activados hay un 3.87% de células con marca para PS y solo un 0.06% de doble marca, indicando una baja tasa de muerte por apoptosis. Sin embargo al tratar el cultivo con camptotecina, la cual induce apoptosis, se observa marca positiva para PS de 50.31% indicando una fuerte inducción del cultivo a muerte apoptótica; además observamos que la camptotecina induce un 25.98% de incorporación de IP/PS lo que ha sido interpretado como una muerte apoptótica tardía. Al tratar los cultivos con el MC de células tumorales, se observa una tinción positiva para PS de entre 40.45 y 50.9% que es muy similar a la apoptosis generada por la camptotecina, además de un incremento de 10.7% al 17.5% en tinción positiva a la doble marca indicando también una apoptosis tardía. En el caso del tratamiento con TGF- $\beta$  recombinante se obtuvieron resultados similares.

Con estos resultados podemos asumir que las células tumorales son capaces de secretar al medio de cultivo TGF- $\beta$  activo, el cual inhibe la proliferación de células linfocíticas induciéndolas a una muerte apoptótica. Sin embargo, dado que en nuestros experimentos se utilizó el paquete total de linfocitos, surge la duda si el TGF- $\beta$  del MC ejerce su efecto sobre una sub-población específica de células linfocíticas. En ese sentido, se sabe que el TGF- $\beta$  es un potente modulador negativo de los linfocitos y que ejerce su efecto principalmente sobre los linfocitos T por lo que se evaluó si el MC disminuye la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+.

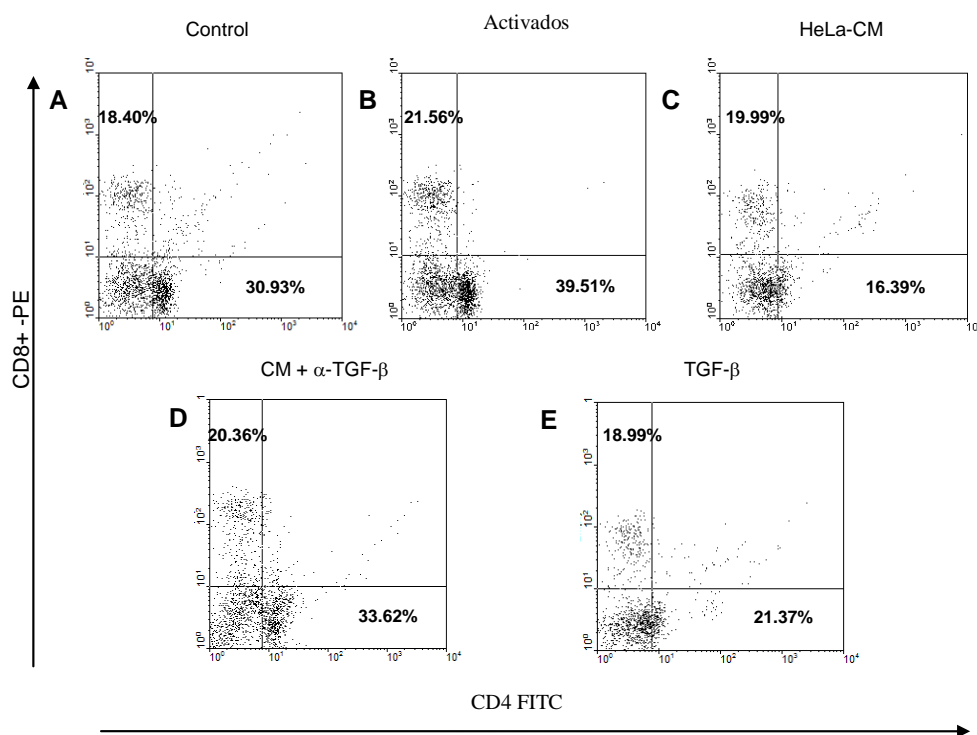


Figura 13. Efecto del MC de células tumorales sobre las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos activados con 10 $\mu$ g/ml de PHA y tratados con 815pg/ml del TGF- $\beta$  presente en el MC de células HeLa o con TGF- $\beta$  recombinante y marcados con anticuerpos conjugados anti CD4-FITC y anti CD8-PE. Los linfocitos fueron evaluados a las 72 h de cultivo por citometría de flujo. A. Linfocitos sin activar B. Linfocitos activados C. Linfocitos tratados con 815 pg/ml del TGF- $\beta$  presente en el MC de células HeLa D. Linfocitos tratados con el MC de Hela previamente incubado con  $\alpha$ -TGF- $\beta$ . E. Linfocitos tratados con 5 ng /ml de TGF- $\beta$  recombinante.

Al analizar los datos obtenidos por citometría de flujo (Figura 13), observamos que los porcentajes relativos de linfocitos TCD4+ y TCD8+ activados con PHA son de 39.5 y 21.5% respectivamente, sin embargo al tratar los cultivos con MC de células tumorales se produce una disminución considerable en el porcentaje de linfocitos TCD4+ quedando en 16% mientras que en los linfocitos TCD8+ sólo se observa una disminución aproximada del 1.5%. Al tratar los cultivos con TGF- $\beta$  recombinante, se produce una importante disminución en la subpoblación de linfocitos TCD4+ quedando en 21.3%, mientras que la de linfocitos TCD8+ sólo se ve afectada en un 2.5%, porcentajes muy similares a los obtenidos con el MC de células de CaCu. Adicionalmente al tratar al cultivo de linfocitos con el MC de células tumorales previamente incubado con un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$ , se obtiene que el porcentaje de linfocitos TCD4+ es de 33.6% y el de linfocitos TCD8+ de 20.3% que son muy similares al cultivo de linfocitos activados. Este hecho confirma, por un lado que la actividad inhibitoria de la proliferación de linfocitos presente en el MC de células de CaCu se debe al TGF- $\beta$ , y que la subpoblación de

linfocitos T más sensible al TGF- $\beta$  del MC es la TCD4+ y posiblemente sea esta población la que esté siendo inducida a una muerte apoptótica. Para confirmar este hecho se procedió a evaluar por citometría de flujo la presencia de caspasa 3 activa en esta subpoblación como parámetro para determinar la inducción de muerte por apoptosis.

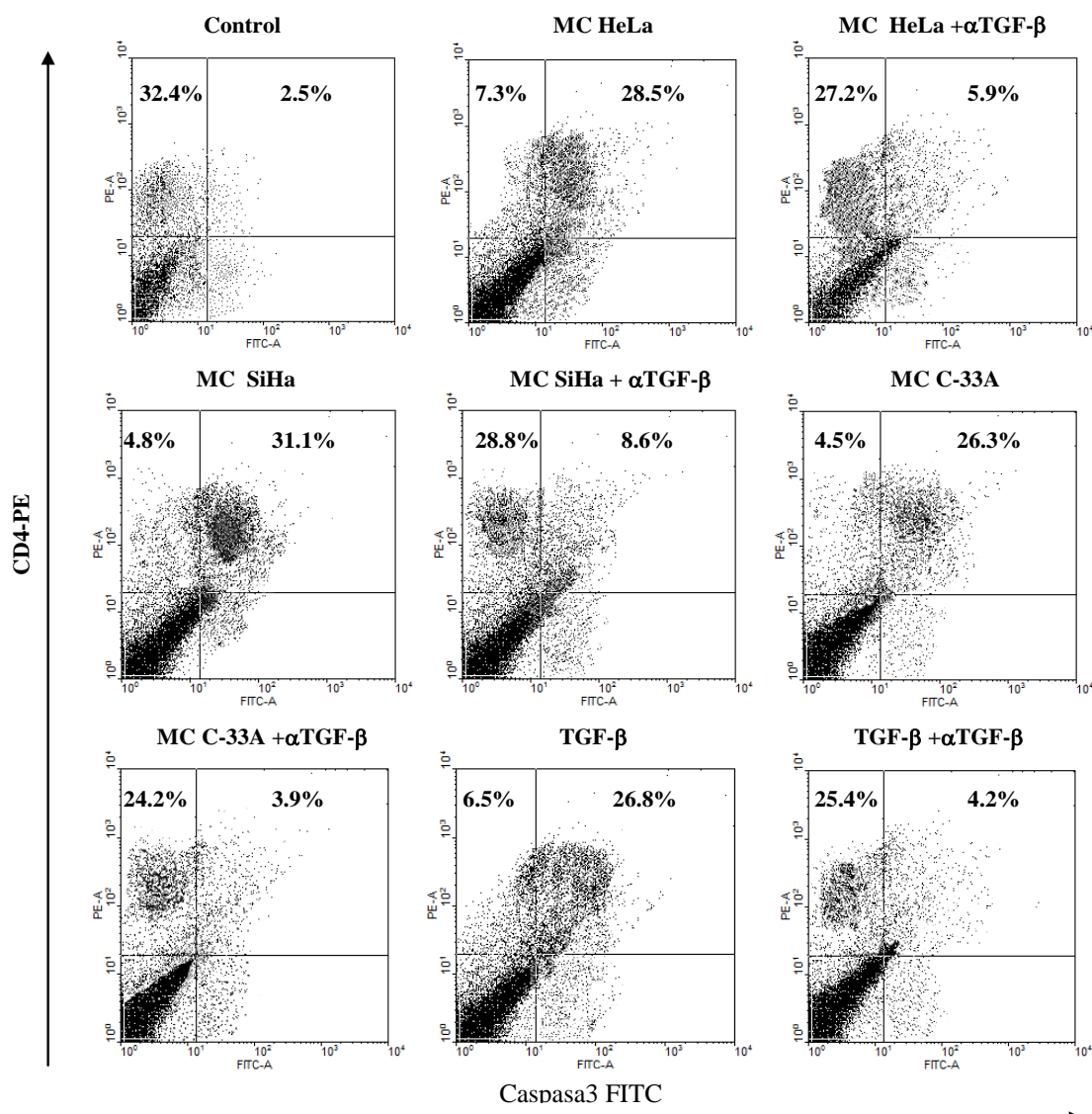


Figura 14. Efecto del MC de células de CaCu sobre la inducción de muerte por apoptosis en la subpoblación de linfocitos TCD4+. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratados con el TGF- $\beta$  presente en el MC de células de CaCu o con MC tratados con un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$  y marcadas con anticuerpos conjugados anti CD4-PE y anti-Caspasa 3 activa-FITC. Los linfocitos fueron evaluados a las 72 h de cultivo por citometría de flujo.

Los resultados muestran que en el cultivo de linfocitos activados aproximadamente el 35% de la población corresponde a linfocitos TCD4+, de los cuales solo el 2.5% son positivos a caspasa3 (Figura 14). Sin embargo, al tratar los cultivos con el MC de las células tumorales



el porcentaje de linfocitos TCD4+ positivos a caspasa3 se incrementa a 28.5% con el MC de Hela, 31.1% con el MC de SiHa y 26.3% con el MC de C-33A. Adicionalmente, al tratar el cultivo de linfocitos con TGF- $\beta$  recombinante, se produce un 26.8% de linfocitos TCD4+ positivos a caspasa3. Sin embargo, al cultivar a los linfocitos en presencia de los MC de células tumorales o TGF- $\beta$  recombinante previamente tratados con un anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$ , el porcentaje de linfocitos TCD4+ que expresan caspasa 3 disminuye dramáticamente. Lo anterior nos permite concluir que el MC de las células tumorales ejerce su actividad principalmente sobre los linfocitos TCD4+, afectando no solamente su proliferación, sino induciéndolos a una muerte por apoptosis y confirmando además que la inducción de la apoptosis se debe a la presencia del TGF- $\beta$  en el MC de las células tumorales, ya que al incubarlos previamente con anti-TGF- $\beta$ , se pierde dicho efecto.

## Discusión

Las células tumorales son capaces de modificar su microambiente generando ventajas selectivas sobre el resto de las poblaciones celulares del organismo y garantizar de este modo su sobrevivencia (Balkwill, 2003). A la fecha se han realizado diferentes estudios para comprender este proceso, sin embargo, el mecanismo que utilizan estas células para escapar al control normal que impone el organismo para regular el crecimiento, no es claro, al igual que los procesos que permiten a una célula tumoral generar metástasis. Se ha sugerido que las células tumorales pueden aumentar la expresión de diferentes citocinas, tales como FGF, VEGF, IL-4, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$  (Soufla G *et al.* 2005; Baritaki S. *et al.* 2007; Crema *et al.* 2012), lo que puede favorecer su crecimiento, inducir el proceso de angiogénesis y contribuir a disminuir la respuesta antitumoral, generando un microambiente inmunosupresivo (Vicari *et al.*, 2002; Balkwill, 2001; Murphy, 2001). Por otro lado, se han encontrado macrófagos y linfocitos infiltrados en algunos tumores sólidos como el de mama, cervical, gliomas y sarcomas (Bottazzi *et al.*, 1983; Luboshits *et al.*, 1999; Galazka *et al.* 2012), dichas células mantienen en principio la masa tumoral localizada, sin embargo, en algún momento dejan de responder ante el tumor permitiendo que el proceso avance. En nuestro laboratorio, hemos encontrado que las células de cáncer cervical secretan un factor proteico con actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos humanos, que además tiene la capacidad de inducir a los linfocitos a una muerte apoptótica, promoviendo de ese modo el crecimiento tumoral. En ese sentido, se sabe que en el microambiente tumoral en cáncer de mama y de pulmón, se incrementa el perfil de citocinas TH2, particularmente IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$  (Drabsch *et al.* 2011), propiciando un ambiente supresor de la respuesta inmunológica durante el desarrollo tumoral. Nuestros datos muestran que las células de cáncer cervical secretan TGF- $\beta$  al medio de cultivo, y este TGF- $\beta$  se encuentra biológicamente activo, como lo evidencia la inhibición de la proliferación de cultivos de la línea celular MV1Lu. Este dato es relevante, ya que el TGF- $\beta$  que es producido en el organismo se secreta como una molécula inactiva (pre-pro TGF- $\beta$ ) que se acumula en la matriz extracelular, y necesita de dos cortes proteolíticos para adquirir su actividad biológica. Hay reportes que indican que la activación extracelular de los complejos latentes del TGF- $\beta$  y con ello, la adquisición de la actividad biológica, ocurre en el momento que se rompe la interacción entre el TGF- $\beta$  y LAP (péptido asociado a la latencia) y que la liberación del TGF- $\beta$  a nivel extracelular es mediada por el receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II/fosfatasa-6-manosa (M6P/IGF2) (Buenemann *et al.*, 2001). También se ha reportado que pueden intervenir otras proteasas en la fragmentación del complejo TGF $\beta$ -LAP tales como la

plasmina, trombina, transglutaminasa plasmática y endoglicosilasas, o por interacciones físicas del LAP con otras proteínas presentes en la matriz extracelular como la trombospondina-1 (TSP-1) (Verrecchia *et al*, 2002). El hecho de encontrar que las células de CaCu lo secretan, ya con actividad biológica, indica que han desarrollado un mecanismo para procesarlo inmediatamente después de producirlo probablemente produciendo enzimas proteolíticas como la TSP-1.

Se ha mostrado que en algunos tipos de cáncer como el gástrico y el de mama, las células tumorales pueden estar sobre-expresando además de TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-6 y les han atribuido a estas citocinas un efecto inhibitor de la respuesta inmunológica, no obstante en nuestro modelo de estudio mostramos que la principal molécula responsable de la inhibición de los linfocitos es el TGF- $\beta$ , ya que cuando los MC son tratados con un anticuerpo neutralizante contra TGF- $\beta$ , se bloquea la actividad inhibitora hasta en un 100% en el caso de las células HeLa. Sin embargo, el hecho de no observar un bloqueo total al tratar los MC de SiHa y C33-A nos hace pensar que en el medio condicionado se pueden encontrar presentes no sólo la IL-10 e IL-6, sino otras citocinas que pudieran ejercer un efecto sinérgico con el TGF- $\beta$ . A pesar de ello, resulta relevante encontrar que el TGF- $\beta$  parece ser el principal responsable de la inhibición inmunológica producida por el MC de las células de CaCu. Adicionalmente existen reportes que le atribuyen al TGF- $\beta$  una gran variedad de funciones inmunoregulatoras, tales como inhibición de la activación y diferenciación de linfocitos TCD4+ (Wolfraim *et al*, 2004), la capacidad de inhibir las funciones efectoras de los linfocitos TCD8+ (Thomas *et al*, 2005), también puede modificar el fenotipo de los linfocitos CD25- a CD25+ (Fantini *et al*, 2004) convirtiéndolo en linfocitos T reguladores. En los linfocitos B se ha encontrado que además de inhibir su activación y proliferación, induce una muerte por apoptosis, además de favorecer el cambio de isotipo hacia IgA (Patil *et al*, 2000, Roes *et al*, 2003). En células NK, bloquea la síntesis de IFN- $\gamma$  y de sus funciones efectoras, disminuyendo la expresión de Nkp30 y NKG2D. En los monocitos bloquea la síntesis de IL-2 e IL-12, además de inhibir la expresión de sus receptores y disminuye su capacidad fagocítica y de presentación de antígenos (Takeuchi *et al*, 1998). Se ha reportado también que inhibe la maduración de las células dendríticas disminuyendo su capacidad fagocítica y presentación de antígenos (Strobl *et al*, 1999), inhibe la activación de granulocitos además de disminuir su capacidad fagocítica e inhibir su función mediante el bloqueo de la expresión de peroxidasa (Park *et al*, 2000).

Por otro lado, se ha reportado que en el CaCu el incremento en la expresión del TGF- $\beta$  se debe a la infección con el Virus del Papiloma Humano (HPV), el cual es también el principal factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer (peralta –Zaragoza *et al*, 2001). Sin embargo, nuestros resultados muestran que tanto las células infectadas con el HPV-18 (HeLa, CaLo e InBl), HPV-16 (SiHa y CaSki), así como las células negativas al HPV (C33-A y ViBo), secretan TGF- $\beta$  con una actividad inhibidora de la proliferación e inductora de apoptosis similar en linfocitos T CD4+, lo que indica que el efecto biológico observado es independiente de la presencia del HPV. En ese sentido, se ha reportado que existe una relación directa entre la concentración de TGF- $\beta$  y la progresión de tumores como el de mama, ovario y cervical, el cual en etapas tempranas del desarrollo puede participar en la selección clonal de la células tumorales, lo que coincide con los reportes que muestran que los tumores en estados tempranos de desarrollo son sensibles al efecto inhibidor del TGF- $\beta$ , pero que esta sensibilidad se pierde conforme avanza el tumor (Fynan *et al*, 1993). Este mismo efecto se observa en cultivos de células transformadas en donde se pierde la sensibilidad al TGF- $\beta$  después de prolongados periodos de cultivo. Este fenómeno puede explicar el que las células tumorales incluyendo al CaCu secreten de forma constitutiva al TGF- $\beta$ , ya que lo producen para inhibir su proliferación, pero al perder la sensibilidad ante su efecto inhibidor, aumentan gradualmente su producción (Lin *et al*, 1992). La pérdida de sensibilidad a esta citocina en células tumorales, se debe también a la adquisición de mutaciones tanto en los receptores como son el T $\beta$ RI y T $\beta$ RII, así como en algunas moléculas que transducen su señal, sobre todo en Smad4, como se ha reportado (Biere *et al*, 2006, Pinkas *et al*, 2006).

El hecho de encontrar que el TGF- $\beta$  presente en el MC de células de CaCu, afecte principalmente a los linfocitos T CD4+, resulta relevante, ya que se ha descrito que esa sub-población de linfocitos tiene un papel fundamental en el inicio y desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa (Maloy *et al*, 2001). Esa subpoblación de linfocitos es importante porque se ha mostrado que están directamente relacionadas con la diferenciación de linfocitos hacia el perfil T<sub>REG</sub> en presencia de TGF- $\beta$ , lo que en condiciones normales lleva a la regulación negativa y término de la respuesta inmunológica en el organismo (Sakaguchi, 2000; Julien *et al*, 2005). En adición, se sabe que las células T<sub>REG</sub> secretan de manera constitutiva al TGF- $\beta$ , creando un microambiente enriquecido en esta citocina y bloqueando, por un lado la activación de los linfocitos TCD4+ (Song *et al*, 2002; Park *et al*, 2004), y creando un mecanismo de regulación positiva hacia el perfil T<sub>REG</sub> (Nakamura *et al*, 2001; Julien *et al*, 2005). Este mecanismo de

regulación negativa de la respuesta inmunológica que se produce de manera natural en el organismo, podría estarse produciendo en el microambiente tumoral, ya que al secretar al TGF- $\beta$  de forma constitutiva, se genera un microambiente inmunosupresor que favorece el proceso tumoral. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que el MC de células de cáncer cervical, no sólo inhibe la proliferación de los linfocitos TCD4+, sino que los inducen a una muerte por apoptosis, suprimiendo todas sus funciones inmunoregulatoras y favoreciendo con ello la evasión inmunológica durante el desarrollo del cáncer. Finalmente, sería interesante evaluar si otros tipos de tumores tienen la capacidad de inducir apoptosis en linfocitos TCD4+ como mecanismo para evadir la vigilancia inmunológica y encontrar una posible aplicación clínica.

## Conclusiones

Las células tumorales de CaCu secretan al medio de cultivo un factor inhibidor de la proliferación de linfocitos humanos (AIPLH).

La AIPLH se debe a la presencia del TGF- $\beta$  en el medio condicionado (MC).

El TGF- $\beta$  contenido en el MC de células de CaCu disminuye la distribución de células en la fase G1 del ciclo celular incrementando la región sub-G1.

El TGF- $\beta$  contenido en el MC de células de CaCu no induce muerte necrótica en cultivos de linfocitos humanos

El TGF- $\beta$  del MC de células de CaCu afecta principalmente a los linfocitos TCD4+.

El TGF- $\beta$  del MC de células de CaCu induce a muerte por apoptosis a los linfocitos TCD4+

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmadzadeh M, Rosenberg S. 2005. TGF- $\beta$ 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol.* 174:5215–23.
- Attisano L, Wrana JL. 2002. Mads and Smads in TGF $\beta$  signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 10:188-94.
- Arjaans M, Oude T, Timmer H, Schroder P. 2012. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  expression and activation mechanisms as potential targets for anti-tumor therapy and tumor imaging. *Pharmacol Ther.* 135:123-32.
- Balkwill F. 2003. Chemokine biology in cancer. *Sem Immunol.* 15: 49-55.
- Balkwil F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet.* 357: 539-545.
- Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S, Ioannis K. 2007. Overexprssion of VEGF and TGF- $\beta$ 1 mRNA in pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: Implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. *Int J Oncol.* 31: 69-79.
- Bierie B, Moses H. 2006. TGF- $\beta$  and cancer. *Cyt Gro Fact Rev.* 17: 29-40
- Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R, Balsari A, Boraschi D, Ghezzi P. 1983. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemo attractants. *Sciences.* 220: 210-212.
- Bollar CM, Rössing C, Calonge MJ, Huls H, Wagner HJ, Massagué J, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM. 2000. Adapting transforming growth factor  $\beta$ -related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood.* 99:3179-87.
- Buenemann CL, Willy C, Buchmann A, Schmiechen A, Schwarz M. 2001. Transforming growth factor-beta1-induced Smad signaling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *Carcinogenesis.* 22:447-52.
- Castriconi R, Cantoni C, Della M, Vitale M, Marcenaro E. 2003. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 100:4120–25.
- Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. 2002. Synergistic anti-herpes effect of TNF- alpha and IFN- gamma in human corneal epithelial cells compared with that in corneal fibroblasts. *Antiviral Res.* 25:201-213.
- Chin D, Glen MB, Peter G, William BC. 2004. What is transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )? *BJPS.* 57: 215-21.
- Cho Y. 2001. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett.* 501:139–145.
- Ciaran B, Stuart I, Lawrence S. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev.* 7:11-21.
- Cottrez F, Groux H. 2001. Regulation of TGF- $\beta$  response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol.* 167:773–78.
- Crema B, Reis D, Macedo AC, Antoniazzi M. 2012. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Human Immunol.* 73:920-26.
- De-Larco JE, Todazo GJ. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Csi.* 75:4001.

Drabsch Y, ten Dijke P. 2011. TGF- $\beta$  signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16:97-108.

Drabsch Y, ten Dijke P. 2012. TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. online Jun. 2012.

Eifel P, Berek, Thigpen J. 2001. Cancer of cervix, vagina and vulva. In: De Vita V. Hellman S, Rosenberg S. (Eds.) *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 1526-1572.

Elliot RL, Blobel GC. 2005. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol*. 23:2078-2093.

Espinosa E, Bermúdez F. 2001. Relación conducta-inmunidad: el papel de las citocinas. *Rev Invest Clin*. 53:240-53.

Fahey MS, Dawbarn D, Allen SJ, Paterson IC, Prime SS. 2001. Expression of recombinant extracellular domain of the type II transforming growth factor-beta receptor: utilization in a modified enzyme-linked immunoabsorbent assay to screen TGF-beta agonists and antagonists. *Anal Biochem*. 290:272-273.

Fantini M, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle P, Neurath F. 2004. Cutting edge: TGF- $\beta$  induces a regulatory phenotype in CD4+CD25+ T cells through Foxp3 induction and down regulation of Smad7. *J Immunol*. 172:5149-53.

Feldmann K, Sebald W, Knaus P. 2002. Resistance to TGF- $\beta$ 1-mediated growth inhibition correlates with sustained Smad2 phosphorylation in primary murine splenocytes. *Eur J Immunol*. 32:1393-1402.

Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. 2000. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 96:2022-36.

Fynan T, Reiss M. 1993. Resistance to inhibition of cell growth by Transforming Growth Factor- $\beta$  and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncogen*. 4:493-540.

Galazka K, Oplawski M, Windorbska W, Wicherek L. 2012. The Immunohistochemical Analysis of Antigens such as RCAS1 and B7H4 in the Cervical Cancer Nest and within the Fibroblasts and Macrophages Infiltrating the Cancer Microenvironment. *Am J Rep Immunol*. 68:85-93.

Genestier L, Kasibhatla S, Brinner T, Green D. 1999. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cell via down regulation of c-Myc. *J Exp Med*. 189: 231-239.

Gorelik L, Fields P, Flavell R. 2000. Cutting edge: TGF- $\beta$  inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol*. 165:4773-77.

Hamerman J, Ogasawara K, Lanier L. 2005. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 17:29-35.

Heusinkveld M, de Vos P, Goedemans R. 2011. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activate M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol*. 187:1157-65.

INEGI

[http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/socio-demografico/mujeresyhombres/2009/myh\\_2009\\_1.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/socio-demografico/mujeresyhombres/2009/myh_2009_1.pdf)

Inman G, Nicolas F, Hill, C. 2002. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- $\beta$  receptor activity. *Mol Cell*. 10:283-294.



- Janeway-Travers. 2001. Immunobiology, the immune system in health and disease. Fourth edition. Garland Publishing. New York. 774pp.
- Jiménez LF, Merchant LH. 2003. Biología celular y molecular. Pearson Educación México. 853 pp.
- Jakowlew BS. 2006. Transforming growth factor- $\beta$  in cancer and metastasis. *Cancer Met Rev.* 10:1007-36.
- Julien CM, John JL, Marric G, Alexander YR. 2005. TGF- $\beta$ 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 201: 1061-1067.
- Kehrl J, Wakefield L, Roberts A, Jakowlew S, Alvarez-Mon M. 1986. Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 163:1037-50.
- Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, Studer H. 1999. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas a comparative study. *Thyroid.* 9:119-125.
- Kopfstein I, Christofori G. 2006. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contribution by the tumor microenvironment. *Cel Mol Life Sci.* 63:449-68.
- Kulkarni A, Huh C, Becker D, Geiser A, Lyght M. 1993. Transforming growth factor  $\beta$ 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci.* 90:770-74.
- Lagman L. 2001. Embriología Médica. 8ª edición, Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 643 pp.
- Lee, S. 2001. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN- $\gamma$  production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol.* 167:497-504.
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. 1992. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell.* 68: 775-785.
- Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 59: 4681-4687.
- Maloy K, Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2: 816-822.
- Massagué J. 2000. How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:169-178.
- Meulmeester E, ten Dijke P. 2011. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol.* 223:205-18
- Ming O, Yisong Y, Shomyseh S, Ana K, Richard A. 2006. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 24:99-146.
- Mire-Sluis AR, Torpe R. 1998. Cytokines. Ed. Academic Press. USA. 480 pp.
- Monroy GA, Rangel CR, Rocha ZL, Trejo BC, Ramírez GJ, Martínez RD, and Weiss-Steider B. (1992). Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1. *Rev Mex Oncol* 7: 69-76.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin C. 2002. Mechanisms of TGF- $\beta$  signalling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* 82:85-91.

- Murphy P. 2001. Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *New Engl J Med.* 354: 833-835.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 194:629-44.
- Park HB, Doo-Jin P, Eunkyong J, Seokmann H, Jeehee Y. 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor- $\beta$ -coactivated CD4+ CD25- T cell. *Int Immunol.* 16: 1203-1213.
- Park S, Yang W, Lee S, Ahn H, Park J. 2000. TGF- $\beta$ 1 down-regulates inflammatory cytokine-induced VCAM-1 expression in cultured human glomerular endothelial cells. *Nephrol Dial Trans.* 15:596-604.
- Patil S, Wildey G, Brown T, Choy L, Derynck R, Howe P. 2000. Smad7 is induced by CD40 and protects WEHI 231 B-lymphocytes from transforming growth factor- $\beta$ - induced growth inhibition and apoptosis. *J Biol Chem.* 275:38363-70.
- Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martinez A, Madrid-Marina V. 2001. TGF $\beta$ 1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública Mex.* 43:340-5.
- Phelps W, Yee C, Munger K, Howley P. 1988. Benign human larynx lesions and human papilloma virus type 6. *Cell* 53:539.
- Pinkas J, Beverly AT. 2006. TGF- $\beta$  in cancer and as a therapeutic target *Biochem Pharmacol.* 72:523:29.
- Richards SM, Garman RD, Keyes L, Kavanagh B, McPherson JM. 1998. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol.* 184:85-91.
- Ryungsa K, Manabu E., Kazuaki T. 2006. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumor immunity. *Immunology.* 119:254-64.
- Roden R, Wu T. 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev.* 6:753-63.
- Roes J, Choi B, Cazac B. 2003. Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor  $\beta$  receptor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100:7241-46.
- Rommery SL. 1980. Gynecology and obstetrics: The health care of women. Second edition. Mc. Graw Hill. Mexico. 430 pp.
- Sakaguchi S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 101: 455-458
- Siegel P, Massague J., 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:807-21.
- Song GZ, Gray JD, Kazuo O, Satoshi Y, Horwitz AD. 2002. Generation *ex vivo* of TGF- $\beta$  producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol.* 169:4183-4189.
- Soufla G, Sifaki S, Baritaki S, Spandidos D. 2005. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Lett.* 221:105-18.
- Strobl H, Knapp W. 1999. TGF- $\beta$ 1 regulation of dendritic cells. *Microb Infect.* 1:1283-90.
- Takeuchi M, Alard P, Streilein J. 1998. TGF- $\beta$  promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol.* 160:1589-97.

- Thomas D, Massague J. 2005. TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*. 8: 367-81.
- Tsukazaki T, Chiang T, Davison A, Attisano L, Wrana J. 1998. SARA, FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- $\beta$  receptor. *Cell*. 95: 779–791.
- Vicari A, Caux C. 2002. Chemokines in cancer. *Cyt Grow Fact Rev*. 13: 143-145.
- Verrecchia F, Tacheau C, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauviel A. 2002. Induction of the AP-1 members' c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene*. 20:2205-11.
- Wahl S, Allen J, Weeks B, Wong H, Klotman P. 1993. Transforming growth factor  $\beta$  enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90:4577–81.
- Willey G, Patil S, Howe P. 2003. Smad3 potentiates transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induced apoptosis and expression of the BH3-only protein Bim in WEHI 231 B lymphocytes. *J Biol Chem*. 278:18069–77.
- Wolfrum L, Walz T, James Z, Fernandez T, Letterio J. 2004. p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naïve T cells to TGF- $\beta$ -mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J Immunol*. 173:3093–102.
- Yigong S, Massague J. 2003. Mechanism of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113:685-700.

Arch Gynecol Obstet  
DOI 10.1007/s00404-012-2621-y

GYNECOLOGIC ONCOLOGY

## Cervical cancer cells induce apoptosis in TCD4+ lymphocytes through the secretion of TGF- $\beta$

Hugo López-Muñoz · Ma. Luisa Escobar-Sánchez · Rebeca López-Marure · Ricardo Lascurain-Ledesma · Edgar Zenteno · José M. V. Hernández-Vazquez · Benny Weiss-Steider · Luis Sánchez-Sánchez\*

Received: 31 January 2012 / Accepted: 2 November 2012  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

### Abstract

**Purpose** Tumor cells are known to secrete cytokines that modify their microenvironment in order to favor their survival and continuous proliferation. In this work, we evaluated if TGF- $\beta$  secreted in vitro by cervical cancer cells could interfere with the proliferation and survival of lymphocytes.

**Methods** Lymphocytes were obtained from peripheral blood of healthy human volunteers, and isolated by density gradient centrifugation and cultured in 96-well plates. Lymphocyte proliferation was induced with phytohemagglutinin and co-cultured with conditioned media (CM) from cervical cancer cell lines, and the inhibition of proliferation was evaluated after 72 h by the incorporated radioactivity and a CFSE-labeling assay. TGF- $\beta$  quantification on these

CM was evaluated by ELISA. Non-apoptotic cellular death was evaluated through disruption of cell membrane integrity by measuring the liberation of lactate dehydrogenase. The apoptosis process was evaluated by annexin-V and active caspase-3. The presence of CD4+ or CD8+ lymphocytes was evaluated by flow cytometry using specific antibodies.

**Results** It was found that the conditioned media from these cells significantly inhibited the proliferation of lymphocytes and induced them to go into apoptosis. Antibodies against TGF- $\beta$  almost completely blocked this activity, suggesting that this cytokine is responsible for the inhibitory activity. When the induced apoptosis on subpopulations of lymphocytes was evaluated, it was detected that the CD4+ cells were specifically targeted.

**Conclusions** Cervical cancer cells secrete TGF- $\beta$  that inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis in CD4+ , but not in CD8+ lymphocytes.

**Keywords** Apoptosis · Cervical cancer · HeLa cells · TCD4+ lymphocytes · TGF- $\beta$

H. López-Muñoz · J. M. V. Hernández-Vazquez · B. Weiss-Steider · L. Sánchez-Sánchez (\*)  
Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 09230 Mexico D.F., Mexico  
e-mail: [luisss@unam.mx](mailto:luisss@unam.mx)

H. López-Muñoz  
e-mail: [hugogris@hotmail.com](mailto:hugogris@hotmail.com)

Ma. L. Escobar-Sánchez  
Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico

R. López-Marure  
Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico, Mexico

R. Lascurain-Ledesma · E. Zenteno  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico

### Introduction

Tumor cells have the capacity to modify their microenvironment to suppress the immunological response and to favor their own proliferation [1, 2]. Several cytokines have been identified with these properties, in particular IL-10, IL-6, and TGF- $\beta$  [1, 2]. TGF- $\beta$  is known to be a strong proliferation inhibitor of almost all cell types in the organism, including tumor cells [3, 4]. Nevertheless, it has been identified that during tumor progression the cells can lose their sensitivity to this factor [3]. On the other hand, a correlation has been found between the levels of TGF- $\beta$  in

cervical cancer cells and malignancy; in consequence several research groups have tried to discover if there is a predictive degree of malignancy in the levels of TGF- $\beta$  in sera and biopsies of cervical cancer patients [5–8]. Normally, the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) has been related to a good prognosis in several types of cancer [9–11] but with conflicting results in cervical cancer [12]; nevertheless, augmentation of lymphocytes with Treg in the TIL in these patients has been associated with a bad prognosis [13]. On the other hand, conflicting evidence has been found regarding the levels of TGF- $\beta$  in sera of cancer patients; some have found an increase in this factor as the degree of malignancy increases, while others found the opposite [5–8, 14]. Cervical cancer cells are known to be producers of TGF- $\beta$  [15], which, together with the one produced by TIL, could favor immunosuppression, and thus, tumor growth. In CD4+ lymphocytes, TGF- $\beta$  has been found to inhibit not only their proliferation but also their differentiation into Th1 or Th2 cells, and favor acquisition of the Treg phenotype [16]. If cervical cancer cells are known to secrete TGF- $\beta$ , then TGF- $\beta$  is known to induce the apoptotic death of CD4+ lymphocytes, then we could expect that the cervical cancer cells could be able to induce apoptosis of CD4+ lymphocytes. For this purpose, in this work, we cultured seven different cervical cancer cell lines infected by either HPV-16, HPV-18, or with no HPV infection, and evaluated if the TGF- $\beta$  produced by them could inhibit lymphocyte proliferation and induce apoptosis on CD4+ cells.

## Materials and methods

### Enriched lymphocyte population (ELP)

Heparinized blood samples were obtained from healthy human volunteers, that is, without inflammatory, rheumatic, infectious or chronic diseases. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using Hystopaque density gradient centrifugation, and the cells in the interphase were incubated at 37° C with 5 % CO<sub>2</sub> for 1 h with RPMI-1640 medium containing 20 % fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Grand Island, NY). The lymphocyte population was further enriched (ELP) by the elimination of adherent cells. Finally, cells were washed twice and kept in RPMI-1640 containing 20 % FBS until used.

### Cells and cell culture

Seven different cervical cancer cell lines were used: CaLo, InBl, and ViBo were obtained in our laboratory from tumor samples of three different patients, whereas HeLa, SiHa, CaSki, and C33-A were obtained from the American Type

Culture Collection (ATCC Rockville, MD). The cervical cancer cell lines were cultured in RPMI-1640 medium containing 10 % FBS. Mv1Lu cells were obtained from the ATCC and maintained in D-MEM (GIBCO) containing 10 % FBS. Non-tumor cells were obtained from explants of cervixes taken from 30 patients undergoing hysterectomy without a malignant disease diagnosis. The tissue was cut in 5-mm segments and incubated with trypsin at a concentration of 0.05 % at 37° C under constant agitation. The cellular suspension was filtered and cultured with RPMI-1640 and 10 % FBS. The cells attached to the substrate, consisting of fibroblasts, were sub-cultured twice. All the cultures were maintained at 37° C with 5 % CO<sub>2</sub> and kept in a saturating humid atmosphere.

### Conditioned media (CM)

Forty million cells from the different cervical cancer cell lines or non-tumor cells were seeded in 80-ml culture bottles (Corning Inc. Bog Flats, NY) for 24 h in RPMI-1640 with 10 % FBS. The adherent cells were washed five times with PBS (phosphate buffer solution) and then cultured for 24 h in RPMI-1640. The conditioned media from the cells was then removed and lyophilized in a Speed-Vac (SAVANT-AES2000), and dialyzed with a 1-kDa membrane concentrated 10 times and finally kept at -70° C until use. The total protein content was determined with a bicinchoninic acid kit (BCA) (Pierce, Rockford IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

### TGF- $\beta$ quantification

Soluble human TGF- $\beta$  content was measured in the cervical cancer cells CM and non-tumor cells CM with an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN), and normalized by cell number (1.9  $\times 10^6$  cells/ml). Protein concentration was determined with the BCA kit.

### Evaluation of cell proliferation

To evaluate ELP proliferation, 1.9  $\times 10^6$  cells were seeded in 96-well plates and activated with 10  $\mu$ g/ml of PHA in the presence of 815 pg/ml of TGF- $\beta$  from the MC of the different cervical cancer cell lines. A proliferation control with PHA was previously made from 12 h and then daily up to 4 days obtaining the best induction with 72 h. In consequence, this induction time was used throughout our work. Cells were washed with RPMI-1640 and incubated with 1  $\mu$ Ci/ml of tritiated thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) (NEN, Boston, MA) for 24 h. The cells were then collected, washed three times in PBS, and the incorporated radioactivity was evaluated using a scintillation counter LS-6500

(Beckman, Richmond, CA). For the carboxy-fluorescein-diacetate-succinimidy1-ester (CFSE) labeling assay, ELP were suspended into RPMI-1640 medium at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml. CFSE (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the cell suspension at a final concentration of  $12 \mu\text{M}$  and incubated for 15 min at room temperature in darkness. Labeling was completed by adding the same volume of FBS to quench the free CFSE during 5 min at room temperature. Labeled cells were washed 3 times with sterile PBS containing 10 % FBS, counted, and re-suspended into RPMI-1640 medium at  $1 \times 10^6$  cells/ml.

MV1Lu cells were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in RPMI-1640 with 10 % FBS. The cells were then cultured for 24 h before being used. MV1Lu cell proliferation was evaluated by crystal violet staining using an ELISA plate reader at 570 nm (Beckman).

#### CD4+ CD8+ analysis

ELP cells were incubated for 15 min with conjugated antibodies: anti-CD4-FITC (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA) and anti-CD8-PE (Sigma-Aldrich) at a concentration of  $10 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  cells/100  $\mu\text{l}$ . The cells were washed two times with ice-cold PBS (pH 7.2) containing 0.2 %  $\text{NaN}_3$  and 0.2 % bovine serum albumin (BSA), and suspended in 200 ml PBS. CD4+ and CD8+ cells were determined with a flow-cytometer using BD-FACS-Diva software.

#### Lactic dehydrogenase assay

Cervical cancer lines ( $1 \times 10^6$  cells) were seeded in 96-well plates and activated with  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  of PHA in the presence of 815 pg/ml of TGF- $\beta$  from the MC of the different cervical cancer cell lines. After 72 h, the cells were centrifuged at 250g for 10 min and  $100 \mu\text{l}/\text{well}$  of the CM was transferred to a new 96-well plate containing  $100 \mu\text{l}$  of the LDH kit reagent and then incubated, protected from light, for 30 min; a culture of lysed cells with Triton X-100 was added as a positive control. Absorbance was measured at 490 nm in an ELISA plate reader.

#### Annexin-V staining

To determine apoptosis, an annexin-V staining-kit (Sigma-Aldrich) was used. The treated cells were suspended in binding buffer at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml, and then  $5 \mu\text{l}$  of annexin-V-FITC conjugate and  $10 \mu\text{l}$  of propidium iodide solution were added. The cells were then incubated at room temperature, protected from light, for 10 min, and fluorescence was evaluated immediately

with a flow-cytometer. Data analyses were done using BD-FACS-Diva software.

#### Active caspase-3 evaluation

ELP cells were labeled with anti-CD4-PE (Sigma-Aldrich) at a concentration of  $10 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  cells/100  $\mu\text{l}$ , washed two times with ice-cold PBS containing 0.2 %  $\text{NaN}_3$  and 0.2 % BSA, fixed with paraformaldehyde (1 %), and labeled with anti-active-caspase3-FITC (Sigma-Aldrich). The cells were washed two times with ice-cold PBS (pH 7.2) containing 0.2 %  $\text{NaN}_3$  and 0.2 % BSA, and suspended in 200 ml PBS. Positive cells were detected with a flow-cytometer using BD-FACS-Diva software.

#### Statistical analysis

Experimental data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments with six replicates, and were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test with  $P < 0.05$ , when compared to controls.

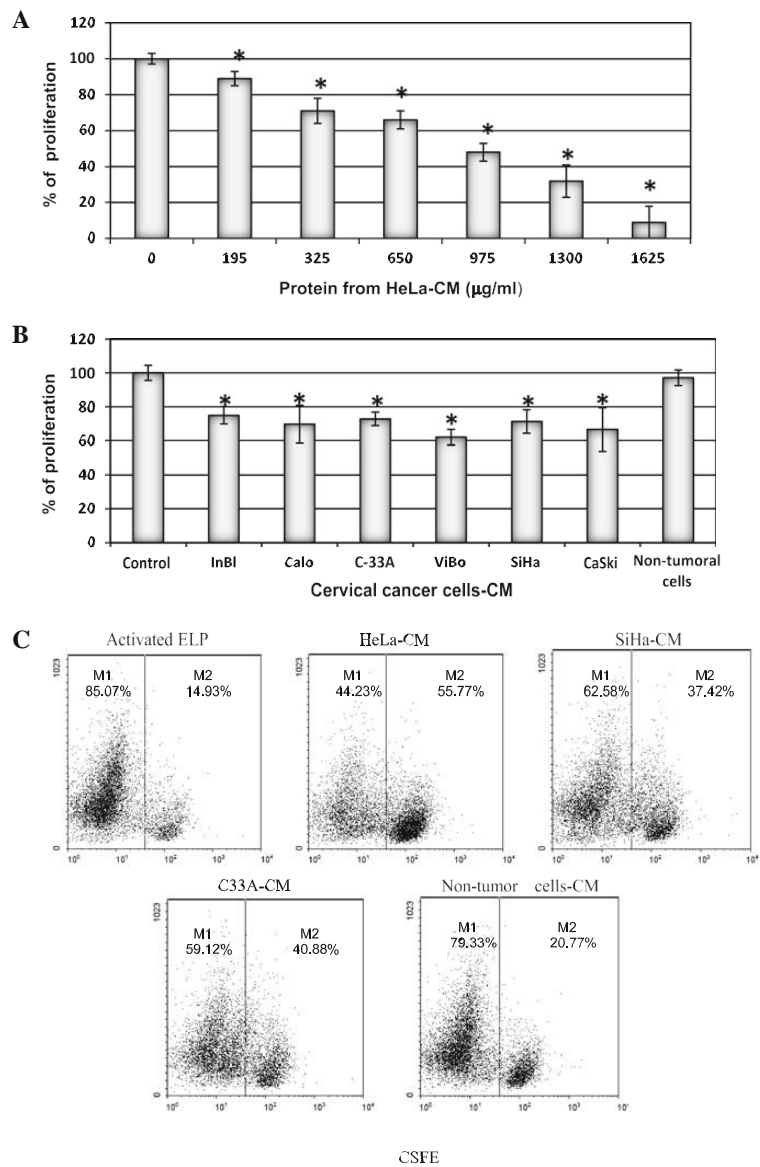
## Results

### Cervical cancer cell line CM inhibits ELP proliferation

To evaluate the capacity of cervical cancer cell lines to secrete a factor that inhibits lymphocyte proliferation, cells from ELP were co-cultured in the presence of different concentrations of protein content from HeLa cell CM. Our results showed that the CM inhibited lymphocyte proliferation in a dose-dependent way (Fig. 1a). As shown in Fig. 1b, CM at  $975 \mu\text{g}/\text{ml}$  protein content, as optimal dose, inhibited ELP proliferation by 50 %. To determine if other carcinoma cell lines, at the same protein concentration, have the property to inhibit ELP proliferation, we obtained CM from six different cell lines: CALO, INBL (HPV-18), SiHa, CaSki (HPV-16) ViBo, and C33-A (HPV negative), and evaluated the inhibition of PHA-induced ELP proliferation. A culture with protein from a CM, obtained from a culture of normal human cervical fibroblasts, was added as a control. We observed that the CM from the six carcinoma cell lines inhibited ELP proliferation (Fig. 1b).

To confirm that the CM was inhibiting the lymphocyte proliferation, the percentage of cells in the resting state was evaluated by cytometry assays. We used the CM from CaSki, HeLa, and C33-A for this purpose. We observed that more than 37 % of the cells were in a non-proliferative phase (Fig. 1c).

Fig. 1 The inhibition of ELP proliferation by cervical cancer cells CM. ELP were activated with 10 µg/ml of PHA and evaluated after 72 h. a ELP treated with different concentrations of protein from HeLa-CM. b ELP treated with 975 µg / m l of protein from cervical cancer cells CM or non-tumor cells CM. c ELP stained with 12 µM of CSFE and cultured in the presence of 975 µg / m l of protein from cervical cancer cell CM or non-tumor cell CM. M1 proliferating cells. Experimental data are presented as the mean ± SD of three independent experiments with six repetitions. \*P <0.05 vs. control (ANOVA followed by Tukey's test)



Cervical cancer cell CM inhibits the proliferation of TGF-β sensitive Mv1Lu cells and of ELP, whereas anti-TGF-β antibodies abrogate most of this inhibition

The presence of biological TGF-β activity secreted by tumor cells was evaluated on proliferation of the mink lung epithelial cell line Mv1Lu, which is markedly growth arrested by TGF-β. Our results showed that cervical cancer cell CM significantly inhibited the proliferation of Mv1Lu cells in a way similar to rTGF-β

(Fig. 2a), thus hinting that TGF-β is the factor responsible for this inhibition. This observation is further corroborated by the fact that anti-TGF-β abrogates this inhibition in Mv1Lu cells and also in ELP (Figs. 2a, b). It is interesting to mention that even though all CM contained 815 pg/ml of TGF-β not all of them inhibited Mv1Lu or ELP in the same way, and not all of them recovered 100 % when the antibody was used. Using an ELISA, we found that indeed TGF-β was present in all cervical cancer cell CM (Table 1).

Fig. 2 Therewith the equivalent of 815 pg/ml of TGF- $\beta$ , contained in cervical cancer cells CM or with 5 ng/ml of recombinant TGF- $\beta$  and incubated for 1 h, with and without anti-TGF- $\beta$ . a The MV1Lu cell number was evaluated after 48 h. b ELP were activated and the cell number was evaluated after 72 h. Experimental data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments with six repetitions. \*P < 0.05 vs. control (ANOVA followed by Tukey's test)

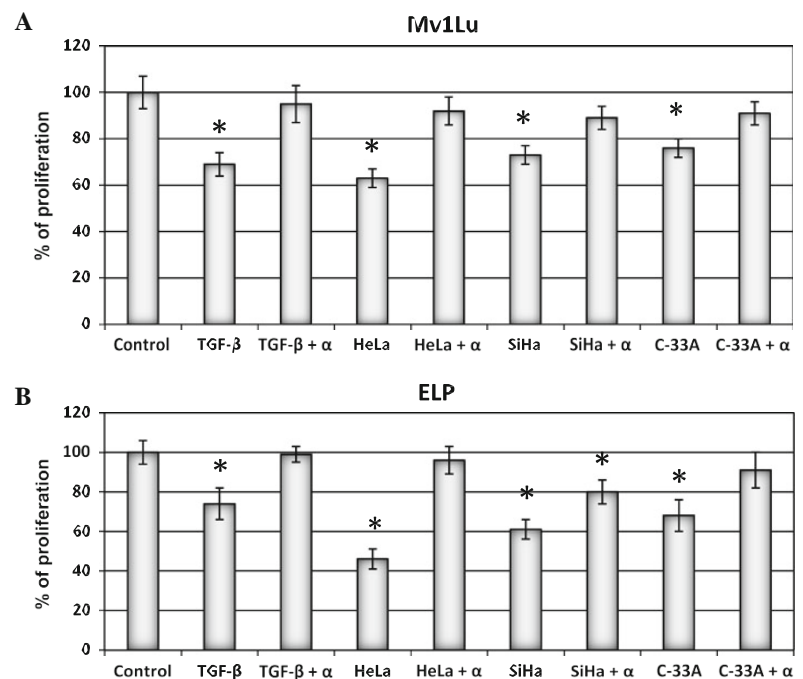


Table 1 TGF- $\beta$  concentration in CM from HeLa, SiHa and C33A cervical cancer cell lines and non-tumor cells from the human cervix

Cell	Mean of TGF- $\beta$ concentration (pg/ $\mu$ g of total protein)	Range of TGF- $\beta$ concentration (pg/ $\mu$ g of total protein)
HeLa	0.83	0.79–0.91
SiHa	0.38	0.32–0.43
C-33A	0.36	0.30–0.42
Non-tumor cells	0.00	ND

#### Cervical cancer cell CM induces apoptosis on ELP

The presence of phosphatidyl serine in the external face of the cytoplasmic membranes was measured using an annexin-V kit. Our results showed a strong presence of phosphatidyl serine in the cells cultured in the presence of the protein from cervical cancer cells CM (Fig. 3), thus suggesting that cervical cancer cells can induce apoptosis on lymphocytes. To evaluate if these CM could also induce a non-apoptotic cellular death, we cultured these cells under the same conditions through the evaluation of LDH secretion with the LDH kit. Our results showed no significant release of LDH (Fig. 4).

#### Cervical cancer cells CM inhibits proliferation and induces TCD4+ lymphocytes apoptosis

To evaluate the inhibitory effect that the cervical cancer cells CM can have on T-lymphocyte subpopulations, we cultured ELP in the presence of TGF- $\beta$  contained in the HeLa-CM. By flow cytometry, we obtained that the CD8+ lymphocytes subpopulation was almost unchanged by the presence of the protein from the CM, however, that of the CD4+ lymphocytes subpopulation was very strongly suppressed (Fig. 5). When anti-TGF- $\beta$  was added to the CM, the CD4+ lymphocyte subpopulation was not suppressed, thus pointing to TGF- $\beta$  in the CM as the inhibitory factor (Fig. 5d). For this experiment, a culture with TGF- $\beta$  was also added to evaluate if this factor by itself had any effect on the suppression of CD4+ lymphocytes (Fig. 5e). Once it was determined that cervical cancer cells CM induces apoptosis on total ELP and that it specifically inhibits the proliferation of CD4+ lymphocytes, we proceeded to determine if it can also induce apoptosis on these cells. Our results showed a very strong presence of double marked cells in the cultures with CM (Fig. 6), thus suggesting that cervical cancer cells can induce CD4+ lymphocytes into apoptosis. To evaluate if TGF- $\beta$  could be the factor responsible for this effect, another culture with CM plus anti-TGF- $\beta$  was added. We obtained that the presence of



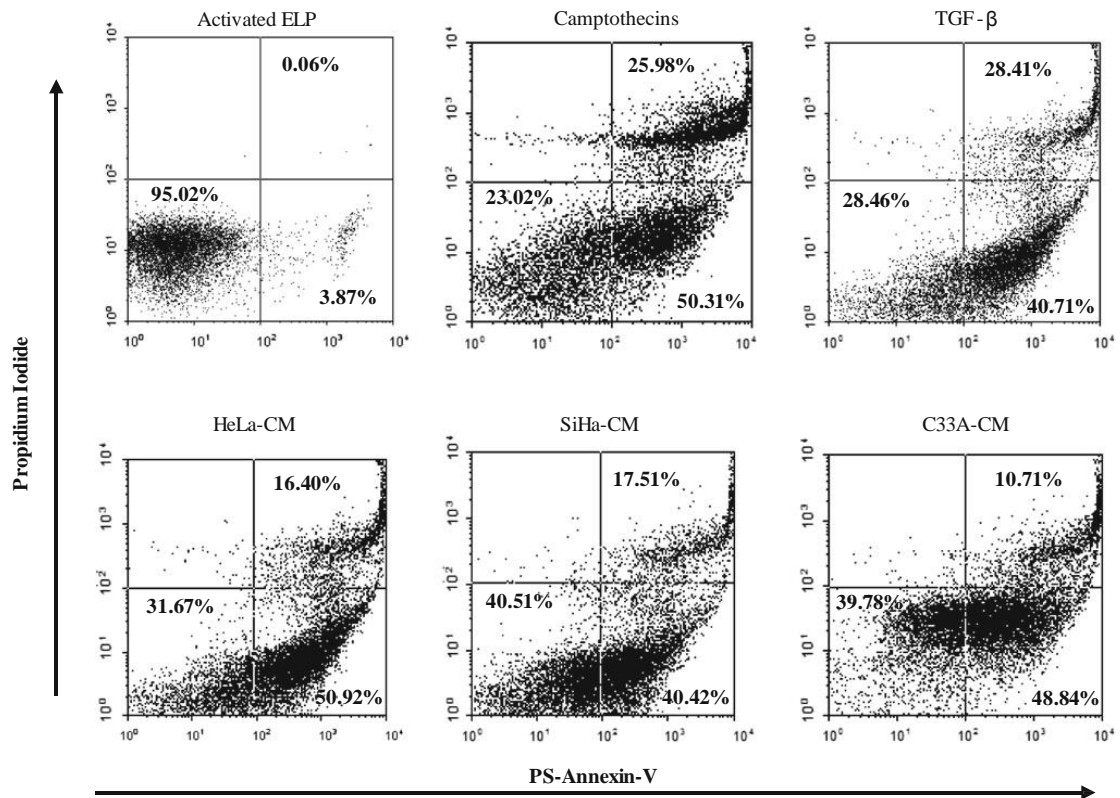


Fig. 3 Cervical cancer cell CM induces translocation of phosphatidyl serine in the cytoplasmic membrane on ELP. Activated ELP were cultured with the equivalent of 815 pg/ml of TGF-β contained in

cervical cancer cells CM or with 5 ng/ml of recombinant TGF-β, or with 1 mM of camptothecins, and evaluated after 72 h by flow cytometry. Quadrant 2 late apoptotic cells, Quadrant 4 apoptotic cells

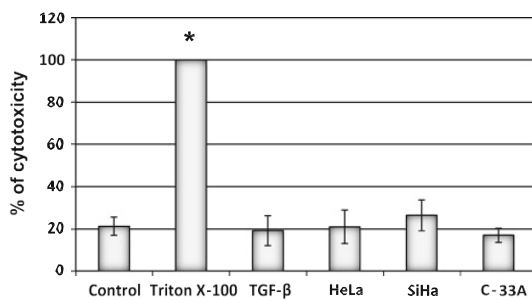


Fig. 4 Secretion of LDH by ELP induced by the CM of cervical cancer cells. Activated ELP were cultured with the equivalent of 815 pg/ml of TGF-β, contained in the different cervical cancer cells CM or with 5 ng/ml of recombinant TGF-β. Cells were lysed with triton X-100 as a positive control. LDH was measured using the LDH kit and the ELISA plates were read at 490 nm. Experimental data are presented as the mean ± SD of three independent experiments with six repetitions. \*P < 0.05 vs. control (ANOVA followed by Tukey's test)

anti-TGF-β canceled the apoptotic effect of the CM on CD4+ cells.

Discussion

In this work, we have shown that the conditioned media produced in vitro by cervical cancer cells infected by either HPV-16 (CaSki and SiHa), HPV-18 (HeLa, CALO, and INBL), or non-HPV infected (ViBo and C-33A) contains a factor that inhibits the induced proliferation of lymphocytes. This result agrees with previously published data where, in situ, the tumor cells secrete cytokines that can inhibit lymphocyte proliferation [17]. It is well known that in the tumor microenvironment of cervical cancer patients there is an alteration in the expression of regulatory cytokines by Th1, Th2, and Treg immunocompetent cells [17]. In low grade patients there is an increase in IL-2, IFN-γ, and TNF-α cytokines that favors the presentation of tumor

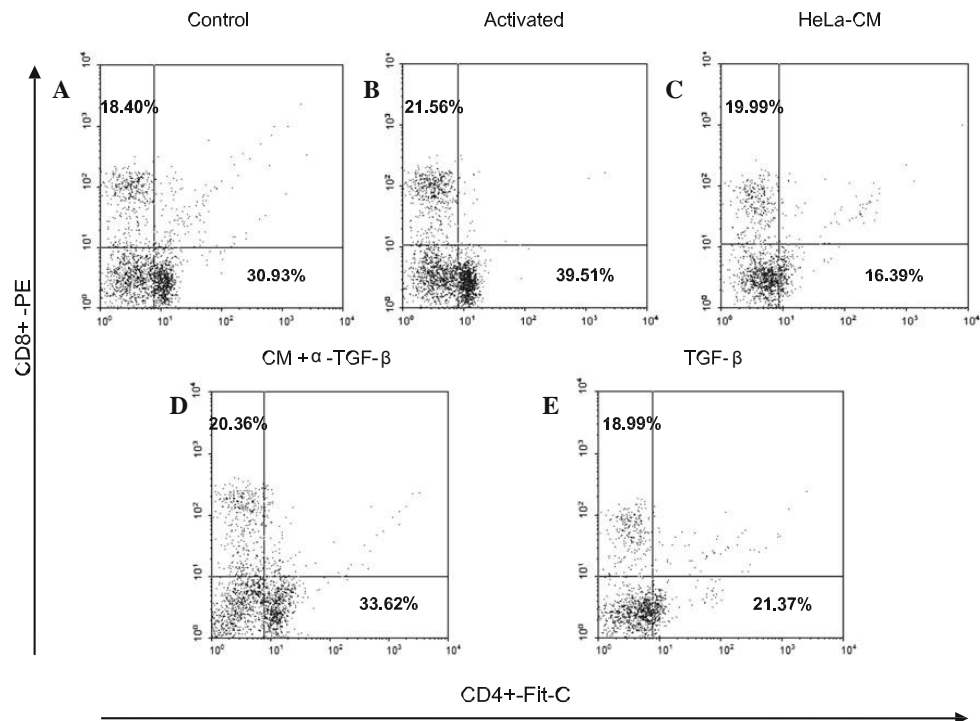


Fig. 5 Cervical cancer cells CM inhibits CD4+ lymphocyte proliferation. Activated ELP were cultured with the equivalent of 815 pg/ml of TGF- $\beta$ , contained in cervical cancer cells CM, labeled with conjugated antibodies anti-CD4-FitC, anti-CD8-PE and evaluated

antigens by monocytes. Nevertheless, in higher degree lesions these cytokines diminishes in favor of IL-4, IL-10, and IL-12 that in turn favors immune tolerance and finally, in invasive tumors IL-10 and TGF- $\beta$  are strongly secreted inhibiting the immune function of macrophages as antigen presenters favoring tumor growth [18–20].

We also provide data showing that the factor in the CM responsible for the inhibition of lymphocyte proliferation was TGF- $\beta$ . It has been published that cervical tumor cells and cell lines do secrete several cytokines including IL-10 and TGF- $\beta$  capable of interfering with the immune system, and there is strong evidence that an increment in TGF- $\beta$  is expressed in cancer patients as a function of tumor growth obtaining the highest values with metastatic ones [5, 7, 21]. In addition it has been found that in patients that respond to antitumor therapy, the concentration of TGF- $\beta$  in their sera diminishes [22]. In this work, we present evidence that in vitro cervical cells do secrete an active form of TGF- $\beta$  capable of inhibiting not only the induced proliferation of lymphocytes but also that of Mv1Lu, a TGF- $\beta$  sensitive cell line, and that they can induce apoptosis on CD4+

after 72 h by flow cytometry. a Untreated ELP. b Activated ELP. c Activated ELP and treated with CM. d Activated ELP and treated with CM incubated for 1 h with anti-TGF- $\beta$ . e Activated ELP treated with 5 ng/ml of recombinant TGF- $\beta$

lymphocytes, an effect that was inhibited by anti-TGF- $\beta$ . It is worthwhile to mention that the ELP used in this work is not a pure lymphocyte population and other cellular types and interactions could be taking place, but the CD4+ inhibition by cervical cancer cells CM and the participation of TGF- $\beta$  in this effect is evident. We identified that CM from cervical cancer cell lines that were either HPV-16, HPV-18 positive or with no HPV infection have the capacity to inhibit ELP proliferation and to lead CD4+ lymphocytes to an apoptotic death, thus suggesting that HPV infection is not necessary for these properties. Nevertheless, more tumors in different clinical stages would have to be tested in vivo in order to generalize this assumption. It would also be interesting to evaluate if these properties are shared by tumors with different cell types. TGF- $\beta$  was first described as a potent inhibitor of tumor cell proliferation, but it was also found that over time the tumor cells become insensitive to this inhibitory capacity and instead promote their proliferation [3, 4]. Thus, the secretion of an active form of TGF- $\beta$  by cervical cancer cells could have double the capacity to inhibit, on one hand, and the immune cellular response,

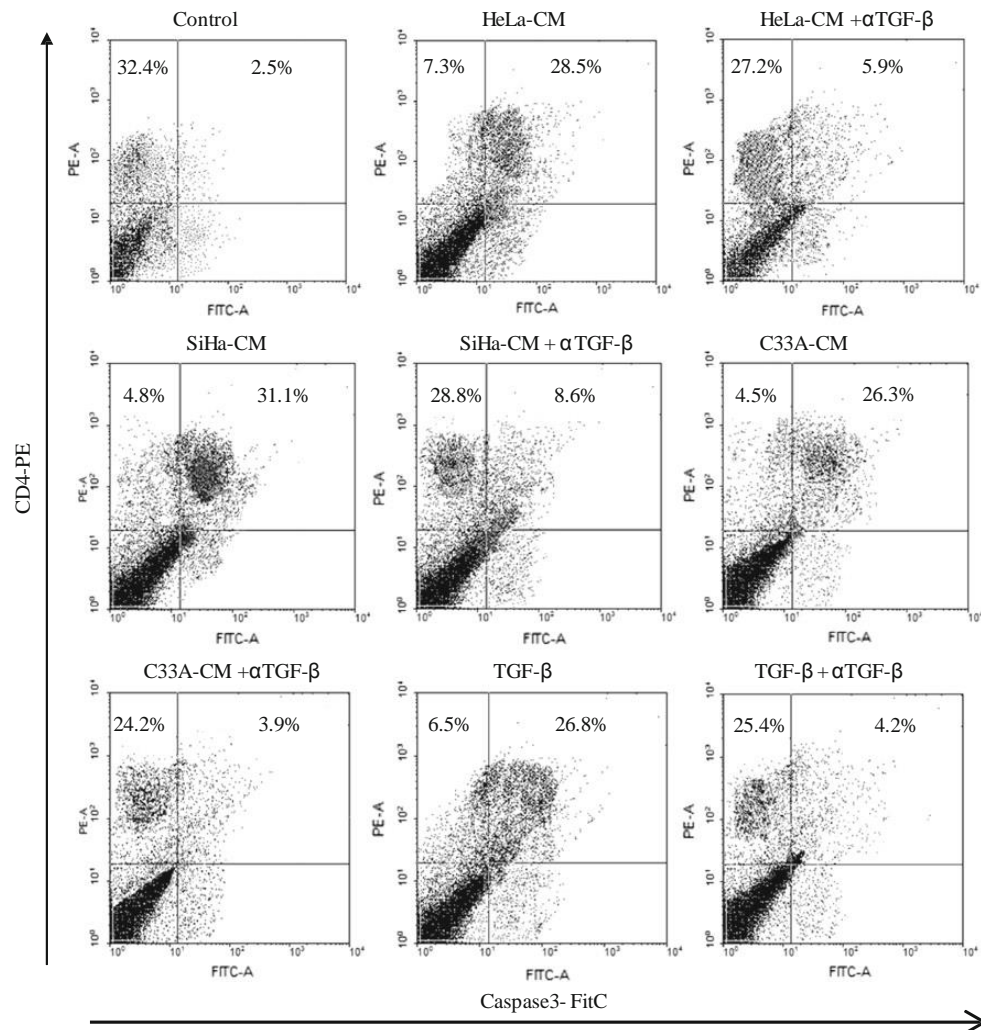


Fig. 6 Cervical cancer cell CM induce the expression of caspase3 in CD4<sup>+</sup> lymphocytes. Activated ELP were cultured with the equivalent of 815 pg/ml of TGF- $\beta$  contained in cervical cancer cells CM for 72 h

and then labeled with the conjugated antibody, anti-CD4-PE and anti-Caspase3-FitC, and evaluated by flow cytometry

and on the other, to induce further growth of the tumor itself. In this respect, it has been published that TGF- $\beta$  not only inhibits the proliferation and differentiation of CD4<sup>+</sup> cells, but also influences the effector function of CD8<sup>+</sup> lymphocytes and modifies the phenotype of CD25<sup>-</sup> cells into CD25<sup>+</sup>, aside from other important changes in leukocytes, thus presenting a vast array of regulatory functions [16]. In this work, we observed that the CM from cervical cancer cells inhibits the proliferation of CD4<sup>+</sup> lymphocytes and promotes cell death by apoptosis but not of CD8<sup>+</sup>, thus suggesting that its inhibitory activity might be specific against helper cells.

The important role that TGF- $\beta$  has in tumor development has favored the development of clinical strategies that considers this cytokine or their receptors as specific targets. On one side, the evaluation of TGF- $\beta$  is a useful parameter to help diagnosis and to follow tumor growth [23], on the other side therapies that combine monoclonal antibodies to TGF- $\beta$  [24], and antisense molecules [25], or against their receptors [26] have been proposed.

**Acknowledgments** This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM, 04510), acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and

Arch Gynecol Obstet

Technology (CONACyT), and PAPIME PE206812, UNAM. The authors would like to thank Dr. Dionisio Parra (Gynecoperinatology Department), Dr. Victor García (Teaching Department), Hospital General "Ignacio Zaragoza" ISSSTE, for technical cooperation.

Conflict of interest We declare that we have no conflict of interest.

## References

1. Sheu B, Chang W, Cheng C et al (2008) Cytokine regulation networks in the cancer microenvironment. *Front Biosci* 13:6255–6268
2. Yoo SY, Lee SY, Yoo NC (2009) Cytokine expression and cancer detection. *Med Sci Monit* 15(3):49–56
3. Pinkas J, Beverly A (2006) TGF- $\beta$  in cancer as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 72(5):523–529
4. Bierie B, Moses H (2006) TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(1–2):29–40
5. Ivanovic V, Demajo M, Krtolica K et al (2006) Elevated plasma TGF- $\beta$  levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. *Clin Chim Acta* 371(1–2):191–193
6. Lin Y, KiKuchi S, Obata Y et al (2006) Serum levels of transforming growth factor  $\beta$ 1 are significantly correlated with venous invasion in patients with gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 21(2):432–437
7. Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S et al (2007) Overexpression of VEGF and TGF- $\beta$ 1 mRNA in Pap smears correlate with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. *Int J Oncol* 31(1):69–79
8. Meulmeester E, Ten Dijke P (2011) The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol* 223(2):205–218
9. Chiou S, Sheu B, Chang W et al (2005) Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol* 67(1–2):35–50
10. Halama N, Michel S, Kloor M et al (2009) The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy. *Cancer Immunol* 19(9):1
11. Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K et al (2000) Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 70(5):1634–1640
12. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S et al (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR1 T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 81(3):424–432
13. Ming-Yih W, Tzu-Yun K, Hong-Nerng H (2011) Tumor-infiltrating lymphocytes contain a higher proportion of FOXP3+ T lymphocytes in cervical cancer. *J Formos Med Assoc* 110(9):580–586
14. Wu HS, Li YF, Chou CI et al (2002) The concentration of serum transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) is decreased in cervical carcinoma patients. *Cancer Invest* 20(1):55–59
15. Clerici M, Merola M, Ferrario E et al (1997) Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplastic: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 89(3):245–250
16. Qin FX (2009) Dynamic behavior and function of Foxp3+ regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell Mol Immunol* 6(1):3–13
17. Crema PB, Douglas RA, Macedo BA et al (2012) Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Human Immunol* 73(9):920–926
18. Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Alcocer-González JM et al (2011) IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 11(4):369–375
19. Sheu B, Lin R, Lien C et al (2001) Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 167(5):2972–2978
20. Heusinkveld M, Peggy VS, Goedemans R et al (2011) M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* 187(3):1157–1165
21. Tsushima H, Ito N, Tamura S et al (2001) Circulating transforming growth factor  $\beta$ 1 as a predictor of liver metastasis after resection in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 7(5):1258–1262
22. Moon HS, Kim SC, Ahn JJ, Woo BH (2000) Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta 1) in the serum of patients with cervical cancer: prediction of response. *Int J Gynecol Cancer* 10(2):151–156
23. Arjaans M, Thijs H, Munnink O et al (2012) Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  expression and activation mechanisms as potential targets for anti-tumor therapy and tumor imaging. *Pharmacol Ther* 135(2):123–132
24. Biswas S, Guix M, Rinehart C et al (2007) Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J Clin Invest* 117(5):1305–1313
25. Nemunaitis J, Nemunaitis M, Senzer N et al (2009) Phase II trial of belagenpumatucel-L, a TGF- $\beta$ 2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Ther* 16(8):620–624
26. Saunier E, Akhurst R (2006) TGF beta inhibition for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6(7):565–578