



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES
MESENQUIMALES DERIVADAS DE NEOPLASIAS
CERVICALES EN EL RECONOCIMIENTO INMUNE DE
CÉLULAS TUMORALES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

VIANEY GUTIERREZ SERRANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALBERTO MONROY GARCÍA



MÉXICO. D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres: Mary y Constantino

Por el apoyo incondicional que siempre me brindaron, por ser las grandiosas y maravillosas personas que me dieron el ejemplo de salir adelante en contra de todas las adversidades, gracias, los amo.

A mis hermanos: Dany, Lulú y Roly

Más que a nadie les dedico a ustedes este trabajo, ya que este sueño les pertenece por igual, gracias por su amor, apoyo y sobre todo por soportarme.

A mis angelitos: Vanne y Angel Uriel

A mi princesita Vanne y a mi gordito Uriel que llegaron en el momento más preciso y que le han dado alegría y felicidad a mi vida.

A mi amor: Marco Daniel

A pesar de todas las adversidades que hemos vivido, llegaste en el momento que más te necesitaba dando luz a mi vida, gracias por tu amor, apoyo y por regalarme esos momentos hermosos, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida y ponerme enfrente a todas las personas maravillosas que en algún momento se han cruzado en mi camino, y que de alguna manera han contribuido en la persona que soy.

Al **Dr. Alberto Monroy García**, sin usted este trabajo no hubiera podido realizarse, gracias por el apoyo y conocimientos brindados; es una persona digna de admirarse y seguir sus pasos.

A la **Dra. María de Lourdes Mora García**, le agradezco enormemente el haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y el brindarme todo el apoyo y enseñanzas.

Al **Dr. Jorge Hernández Montes**, sinceramente lo aprecio demasiado, ya que desde que llegue a laboratorio siempre se mostró alegre, entusiasta, y sobre todo por crear ese ambiente de confianza como amigo para aclararme cualquier duda, gracias por sus conocimientos brindados.

A mis sinodales **Dr. Alberto Monroy García, Dra. María de Lourdes Mora García, Dr. Benny Weiss Steider, M. en C. Hugo López Muñoz y Dr. Edelmiro Santiago Osorio**, a quienes les agradezco por sus sugerencias para enriquecer este trabajo.

A mi amiga **Azucena**, gracias por apoyarme incondicionalmente en todo momento para realizar este trabajo y por los momentos hermosos que hemos vivido, por soportarme y escucharme siempre.

A mis amigas **Carmen Z, Carmen S y Claudia**, les agradezco todos los momentos buenos, y sobre todo los momentos malos por que en ellos fue donde crecí como persona, gracias chicas por ser unas de mis mejores amigas.

A mis amigos de laboratorio **Karyna, Carmen, Azucena, Mariel, Jessica, Jesús, Selene, Pako, Arturo, Luis**, y a mi amiga **Ivonne** quien es una grandiosa persona, les agradezco por hacer el ambiente ameno en nuestro laboratorio y que nunca fuera aburrido, por el apoyo que me han brindado, suerte en todo momento, los aprecio mucho.

A mis amigos **Juan, niño (José Luis), Jazmín, Carmen L, Nallely**, en fin quiero agradecer a tantas personas que en algún momento se hicieron parte de mi vida, gracias.

El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Inmunología de la UMIEZ de la FES ZARAGOZA, UNAM; y fue realizado gracias al apoyo financiero del proyecto CONACYT N°106591; FIS/IMSS/ Protocolos C2007-060 y G09-762; y DGAPA-PAPIIT No. IN223010. Además de contar con la beca de COMECYT 2009 con número de folio 09BTL0237.

ÍNDICE

Página

Resumen	1
Introducción	3
Marco teórico	5
Virus del Papiloma Humano (VPH).....	5
Ciclo biológico del VPH.....	7
Sistema Inmune.....	9
Complejo principal de histocompatibilidad (CPH).....	10
Complejo principal de histocompatibilidad Clase I (CPH-I).....	11
Procesamiento de antígenos.....	12
Respuesta inmune contra el cáncer.....	13
Células estromales mesenquimales (CEMs).....	14
Planteamiento del problema y Justificación	18
Hipótesis	21
Objetivos	20
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
Hipótesis	21
Estrategia experimental	22
Materiales y Métodos	23
Muestras biológicas.....	23
Co-cultivos de CEMs con TC-1.....	24
Proliferación celular.....	24
Citometría de flujo para la determinación de moléculas clase I del CPH (H-2 D ^b).....	25
Determinación del reconocimiento inmune de células tumorales TC-1 por linfocitos T citotóxicos.....	25
Análisis de citocinas Th1/Th2.....	26
Resultados	28
Células estromales mesenquimales de tejido cervical normal y tumoral incrementan la proliferación de células tumorales TC-1.....	28

Células estromales mesenquimales inducen disminución en la expresión de moléculas clase I del CPH- I (H2-D ^b) en células tumorales TC-1.....	34
Células estromales mesenquimales participan en la disminución del reconocimiento inmune de células tumorales TC-1 por linfocitos T citotóxicos.....	39
Análisis de citocinas en los co-cultivos de Células estromales mesenquimales con células TC-1.....	42.
Discusión y análisis de resultados	47
Conclusiones	51
Perspectivas	52
Abreviaturas de uso frecuente	53
Bibliografía	55

Resumen

Los virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, como el VPH-16, se asocian con el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (CaCu). Una vez que su genoma se integra en el de las células infectadas, las proteínas virales E6 y E7 que generalmente son sobre-expresadas, juegan un papel importante en la transformación celular e inducción de tumores cervicales. Aunque estas proteínas oncogénicas representan antígenos diana, para el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos, factores confinados al microambiente tumoral pueden inhibir la respuesta efectora de linfocitos T citotóxicos (LTC), tal como la presencia de linfocitos T reguladores, células dendríticas tolerogénicas y células estromales mesenquimales (CEMs). El papel de CEMs en el microambiente tumoral aún es incierto, sin embargo, algunos estudios con modelos tumorales singénicos, alogénicos y xenogénicos, han mostrado que las CEMs alogénicas y xenogénicas injertan de manera independiente al Complejo principal de histocompatibilidad del huésped, favoreciendo el implante y crecimiento tumoral. No obstante se desconoce si éstas participan en el reconocimiento inmune de las células tumorales.

En este trabajo se evaluó si CEMs derivadas de médula ósea normal (MON), cérvix normal (CN), neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y de cáncer cérvico-uterino (CaCu) influyen en el reconocimiento inmune de linfocitos T citotóxicos (LTC) sobre células tumorales positivas a la infección por VPH-16.

Para ello, se utilizó un modelo *in vitro*, en el cual células tumorales de ratón, denominadas TC-1 (positivas a la expresión de las proteínas E6 y E7 de VPH-16) derivadas de la cepa de ratón C57BL/6 (haplotipo H2-D^b), fueron co-cultivadas con las diferentes CEMs, en diferentes proporciones, para evaluar la proliferación celular, la expresión de moléculas H2-D^b en membrana y el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos, inducidos en ratones C57BL/6 mediante la inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16. De acuerdo a los resultados obtenidos, este modelo *in vitro*, nos permitió tener los siguientes resultados: 1) las CEMs derivadas de tejido cervical neoplásico y normal, indujeron una mayor proliferación de las células tumorales TC-1, esencialmente cuando fueron co-cultivadas en la mayor proporción (1:1) con las células tumorales; 2) la expresión de las moléculas H2-D^b en las células TC-1, disminuyó de manera dosis

dependiente con la cantidad de CEMs colocadas en los co-cultivos; 3) el reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1 por los linfocitos T citotóxicos (LTC), disminuyó de manera muy importante, después de ser co-cultivadas con las diferentes CEMs; finalmente, 4) en los co-cultivos de células tumorales TC-1 con las CEMs, se lograron detectar citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-5, las cuales pueden modular la expresión de moléculas CPH-I en las células tumorales.

Estos resultados nos permiten concluir que las CEMs contribuyen de manera importante, al disminuir la expresión de moléculas del CPH-I (H2-D^b), y por tanto en la evasión del reconocimiento inmune por linfocitos T citotóxicos CD8⁺.

Introducción

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres Mexicanas con cáncer (INEGI, 2008). Cada año se diagnostican alrededor de 11,000 casos nuevos de cáncer cérvico uterino invasor. La mayoría de las pacientes ingresan con enfermedad avanzada, con un mal pronóstico y representan una enorme pérdida de recursos humanos y económicos. Esta enfermedad se encuentra fuertemente asociada (cercana al 100%) con la infección por los virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo (Walboomers *et al*, 1999). La presencia de VPH en este tipo de cáncer genital, también se ha asociado con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos y la presencia de células inmunoregulatoras en el microambiente tumoral y su influjo en nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser *et al*, 2007; Molling *et al*, 2007; Nakamura *et al* 2007; Piersma *et al* 2007). Estas evidencias han sugerido que durante el desarrollo de la enfermedad se genera tolerancia inmunológica hacia el tumor, con la concomitante aparición de células inmunosupresoras. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos mediante los cuales estas células regulan e inhiben el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos.

Por otra parte se ha demostrado que las células neoplásicas se localizan inmersas en un microambiente celular denominado estroma tumoral, el cual está compuesto de fibroblastos, vasos sanguíneos y también de las células inmunes mencionadas. Estos elementos estromales responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del tumor, incluyendo soporte estructural, vasculatura y matriz extracelular (Albini *et al*, 2007). A la fecha, no se sabe cual es el origen de los componentes estromales, sin embargo una posibilidad es que se formen a partir de las células estromales mesenquimales (CEMs). De manera interesante, se ha demostrado que las CEMs participan en la generación de inmunosupresión de la respuesta inmune de manera directa y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función de linfocitos T reguladores (Pittenger *et al*, 1999; Dominici *et al*, 2006; Prevosto *et al*, 2007; y Di Ianni *et al*, 2008). Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar

CEMs de tejidos normales de cuello uterino y de tumores avanzados de cáncer cérvico-uterino (Montesinos *et al*, 2010, manuscrito en preparación). En estudios previos hemos encontrado que estirpes celulares de CEMs provenientes de tumores cervicales, inducen la disminución de la expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad en células tumorales de cáncer cérvico-uterino cuando son co-cultivadas *in vitro*, lo cual sugiere que las CEMs pueden promover que las células tumorales evadan el reconocimiento inmune de linfocitos T citotóxicos. Por tanto, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar si CEMs obtenidas de neoplasias cervicales (NIC y CaCu) influyen en el reconocimiento inmune de células tumorales mediado por linfocitos T citotóxicos CD8+. Para ello se utilizó un modelo *in vitro*, en el cual células tumorales de ratón denominadas TC-1 (positivas a las proteínas E6 y E7 de VPH-16) derivadas de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D^b), fueron co-cultivadas con CEMs derivadas de neoplasias cervicales humanas, para evaluar la expresión de moléculas H2-D^b en membrana y el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos, inducidos en ratones C57BL/6 mediante la inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16.

Marco Teórico

Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece al género *Papillomavirus* y a la familia *Papovaviridae* (Dias *et al*, 2005), de cápside icosaédrica no envuelta que contiene el genoma viral que posee un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb y 8,000 pares de bases de longitud (Figura 1) (Hebner *et al*, 2006).

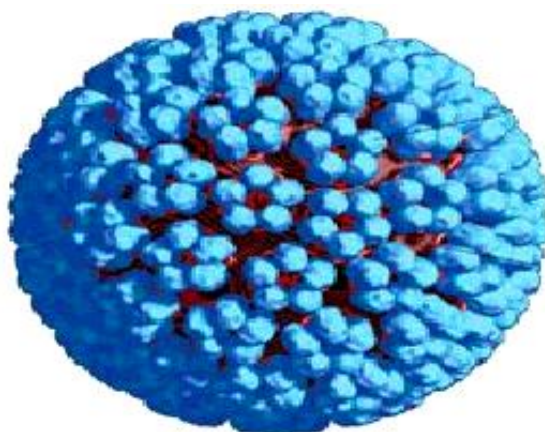


Figura 1. Virus de Papiloma Humano.

Tomado de: www.prn.org/images/uploads/hpv_3d_high.jpg

Según su genoma puede ser dividido en regiones tempranas y regiones tardías basados en el tiempo de la expresión del gen durante el ciclo de vida viral, y una tercera región, denominada *long control region* (LCR), por sus siglas en inglés (Damania and Pipas, 2009). La región temprana o región reguladora que contiene secuencias que controlan la transcripción y replicación la cual contiene genes involucrados principalmente en actividades enzimáticas (como E6, E7, E1, E2, E4 y E5), la región tardía o estructural que consiste de las proteínas de la cápside L1 y L2 que facilitan el empaquetamiento viral. (Chen *et al*, 2007). La región LCR, es la encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E7 (Rincón *et al*, 2007), que en los tipos de VPH de alto riesgo son capaces de interactuar con proteínas reguladoras del ciclo celular, y por tanto, de inducir un estado transformado a la célula hospedera (Figura 2) (Galloway *et al*, 1996).

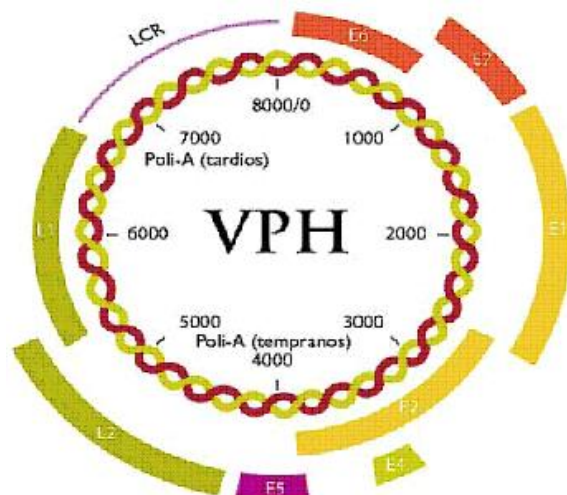


Figura 2. Genoma del VPH. Tomado de: (López y Lizano, 2006)

Los VPH, al igual que otros virus, aprovechan la maquinaria celular para replicarse, en determinadas circunstancias fisiológicas de “permisividad inmunológica”, y tras un periodo de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas de ADN viral (que se encuentran en forma episomal), sufren un proceso de integración dentro del genoma celular. En consecuencia una serie de acontecimientos conducen a un bloqueo de proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb) y, alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical, seguidas de una acumulación de errores genéticos, base de la transformación tumoral (Rincón *et al*, 2007).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de tumores cancerosos, se incluyen las infecciones con VPH de alto riesgo, un alto número de parejas sexuales, coinfección con virus de inmunodeficiencia humana, la inmunosupresión, y el fumar cigarros.

La infección por VPH es muy frecuente y muchos individuos infectados nunca llegan a tener manifestaciones clínicas, y pocos son los que progresan a cáncer cervical invasivo.

Un factor bien establecido que explica parcialmente el riesgo diferencial de desarrollar cáncer cervical es el tipo de VPH infectante, (García, 2007), ya que un pequeño grupo de VPH son agentes causales de cáncer cervical, y hasta el 99% de los tumores, son positivos

para ADN de VPH. Se tienen datos de más de 100 diferentes tipos virales que han sido identificados, y cerca de la tercera parte de éstos infectan células epiteliales en el tracto genital (Longworth and Laimins, 2004).

Los tipos virales que infectan el tracto genital se separan en dos categorías: de alto riesgo y de bajo riesgo. Los tipos de alto riesgo más comunes incluyen VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, y VPH-45; y los tipos de bajo riesgo son VPH- 6 y VPH-11. Entre los VPH de alto riesgo, los tipos 16 y 18 están presentes en un 74.6% de los cánceres cervicales, (Dias *et al*, 2005).

Ciclo biológico del VPH

El ciclo del VPH está regulado por el estado de diferenciación de sus células hospedadoras, los queratinocitos. La infección está intencionada para ocurrir en células troncales o células de la capa basal del epitelio que llegan a ser susceptibles a la infección a través de microlesiones. Al entrar, el ADN viral es establecido en el núcleo como elemento extracromosomal y el promotor temprano es activado. Como resultado de la expresión incrementada de la replicación de las proteínas E1 y E2, los genomas virales son amplificados rápidamente a 50-100 copias episomales por célula. Seguido de esta fase de establecimiento inicial, un número de copias es mantenido constantemente y ocurren replicaciones en sincronía con el ADN celular. Mientras las células infectadas-VPH se dividen, una célula hija migra fuera de la capa basal y comienza un programa de diferenciación, la otra célula hija permanece en la capa basal y provee un reservorio continuo de células no diferenciadas que mantienen su ADN viral latente. Mientras las células infectadas-VPH se diferencian, el último promotor es activado, el cual conduce a la amplificación del genoma viral a miles de copias, expresión del gen tardío y el ensamblaje del virión (Figura 3) (Damania and Pipas, 2009).

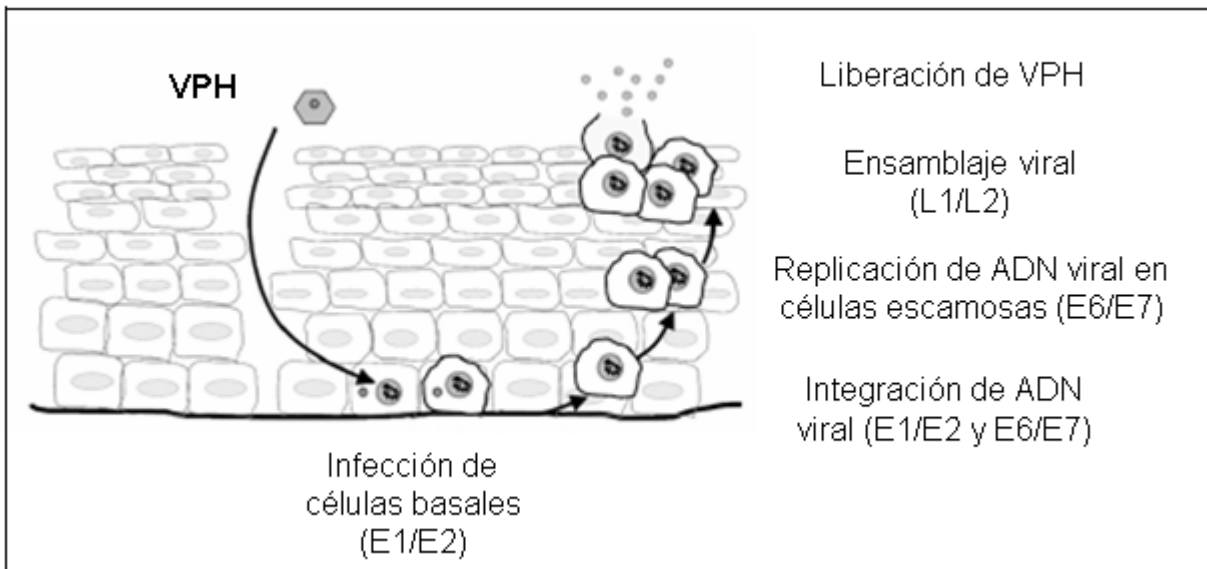


Figura 3. Ciclo de vida de VPH. Tomado de: (Stanley, 2008)

El establecimiento y mantenimiento de las fases del ciclo de vida viral requiere la expresión de los transcritores para el promotor temprano, los cuales codifican para las oncoproteínas E6 y E7, así como las proteínas de replicación E1 y E2 (Howley, 1996).

La proteína E6 unida a la proteína supresora de tumor p53 actúa como parte de un complejo trimérico con la ubiquitina ligasa celular, E6AP, llevando al rápido regreso de p53. E7 unida al retinoblastoma (Rb), familia de los supresores del tumor, bloquea la unión de factores de transcripción E2F así como otras proteínas envueltas en la regulación del ciclo celular. Mientras las células infectadas abandonan la capa basal, ellas permanecen activas en el ciclo celular debido a la acción de la proteína E7, resultando en la activación constitutiva de genes de fase S a células altamente diferenciadas y activan la expresión de factores de replicación celular requeridas para la replicación viral. Por lo que las oncoproteínas E6 y E7 son necesarias para la inmortalización y retención de capacidad de diferenciación en el ciclo celular (Wilson, 2005).

Las proteínas L1 y L2 son ensambladas tardíamente, formando la cápside del virión, y finalmente los virus maduros son liberados en las capas más elevadas del epitelio (Longworth and Laimins, 2004).

Sistema inmune

Los organismos superiores defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, procedentes del exterior. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como *sistema inmune* (Roitt, 2003).

En los vertebrados persisten elementos del sistema inmunitario primitivo (inmunidad innata) además de un sistema más evolucionado de reacciones específicas denominado inmunidad adaptativa (Goldsby *et al*, 2003).

Las células y las moléculas de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo identifican y eliminan los microorganismos que han superado las barreras físicas y químicas y han logrado entrar en los tejidos blandos. Para responder a la infección el sistema inmunitario usa mecanismos innatos que son rápidos pero limitados y mecanismos adaptativos que se inician con lentitud pero que finalmente son poderosos y de memoria rápida. Además los vertebrados han desarrollado la defensa adicional de las respuestas inmunitarias adaptativas, que incluyen la participación de linfocitos T y B (Roitt, 2003).

El sistema inmune cuenta con un grupo de proteínas que se designan en conjunto ***citocinas*** para indicar su acción en la comunicación intercelular, mediando las interacciones complejas entre las células (Goldsby *et al*, 2003). Las citocinas son factores paracrinos o autocrinos que regulan la proliferación, diferenciación y función de sus células blanco (Ravinovich, 2004).

Se han identificado dos poblaciones distintas de clones murinos T helper o colaboradores (Th). Los linfocitos Th1 se desarrollan en respuesta a bacterias intracelulares y algunos virus, mientras que los Th2 predominan en respuestas a nematodos gastrointestinales. Los Th1 secretan Interleucina-2 (IL-2), Interferón- γ (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral- β (TNF- β) y están fundamentalmente involucrados en las respuestas mediadas por células. En cambio las células Th2 que secretan Interleucina-4 (IL-4), (IL-5), (IL-6), (IL-9), (IL-10) e (IL-13) tienen un papel importante en las respuestas humorales (Tabla 1) (Ravinovich, 2004).

CITOCINA	FUNCIÓN EFECTORA
<i>IL-2</i>	Induce la proliferación de células T y B; aumenta la citotoxicidad por NK, así como la destrucción de células tumorales y bacterias por monocitos; antiinflamatorio.
<i>IL-4</i>	Induce las células Th2, estimula la proliferación de células T y B.
<i>IL-5</i>	Induce proliferación de eosinófilos y linfocitos B activados, induce cambio a IgA.
<i>IFN-γ</i>	Inhibe la replicación viral, incrementa la expresión de CPH I y II, inhibe la proliferación de Th2.
<i>TNF-α</i>	Citotoxicidad tumoral, induce secreción de citocinas, mediadora de la respuesta aguda inflamatoria.

Tabla 1. Citocinas y sus funciones. Tomado de: Roitt, 2003; Murphy, 2008.

Dentro de las funciones más importantes de los linfocitos T están la defensa frente a microorganismos intracelulares y la activación de otras células, como macrófagos y linfocitos B. La tarea de mostrar los antígenos de los microorganismos asociados a células para su reconocimiento por las células T es realizada por proteínas especializadas codificadas por genes situados en un locus llamado *Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH)* (Roitt, 2003)

Complejo principal de histocompatibilidad (CPH)

Las moléculas de histocompatibilidad pueden influir en la capacidad de respuesta inmunitaria frente a antígenos particulares moldeando el repertorio de células T maduras llamadas en su conjunto como genes de histocompatibilidad. Las moléculas codificadas por los genes de histocompatibilidad en humanos son conocidas como Antígenos Linfocitarios Humanos (*HLA*, del inglés *Human Leukocyte Antigens*); mientras que en ratón son denominados como antígenos *H-2* (Rojas *et al*, 2001; Anibal *et al*, 1996; Guizar, 2001).

Existen cuando menos cuatro familias de antígenos codificados por genes situados en la región CPH: los antígenos de clase I, II, III y IV. Este sitio contiene más de 200 genes, de los

cuales alrededor de 40 codifican para antígenos de leucocitos y participan, en diversas formas, en la respuesta inmunitaria. Dos de estas familias de antígenos CPH (antígenos de clase I y II) corresponden a los antígenos principales de histocompatibilidad por ser las que participan en la comunicación entre células (célula-linfocito o linfocito-linfocito), la presentación de antígenos, regulación inmune, vigilancia inmunológica (importante para la detección y eliminación de células tumorales) y también como potentes antígenos de trasplante (Anibal *et al*, 1996).

Complejo principal de histocompatibilidad Clase-I (CPH-I)

Las moléculas de CPH de clase I están constituidos por dos cadenas polipeptídicas separadas; una de 338 aminoácidos codificada por el CPH, denominada pesada, con un peso molecular de 44-47 kD (cadena α) y otra cadena de 12 a 16 aminoácidos denominada β 2-microglobulina asociada no covalentemente a la cadena α y no unida directamente a la célula. Los genes que codifican para la cadena pesada de las moléculas de histocompatibilidad se encuentran en el cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 en ratón; mientras que β 2-microglobulina es codificada en el cromosoma 15 en humanos y 2 en ratón (Trigo *et al*, 1997). En el hombre existen tres CPH de clase I distintas, éstas son HLA-A, HLA-B y HLA-C, mientras que en ratón son H2-K, H2-D y H2-L, todas ellas cumplen la función de presentación de péptidos a los linfocitos T CD8. En cada caso, las moléculas codificadas por los tres locus se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células con excepción de los glóbulos rojos y el sincitio del trofoblasto. Por otra parte, en el caso del humano, existen otras tres moléculas de HLA de clase I que se consideran como genes HLA no clásicos, los HLA-E, F y G, cuyas funciones son esencialmente las mismas que los primeros pero mucho más polimórficas y por ende contienen más alelos (Figura 4) (Trigo *et al*, 1997; Roitt, 2003).

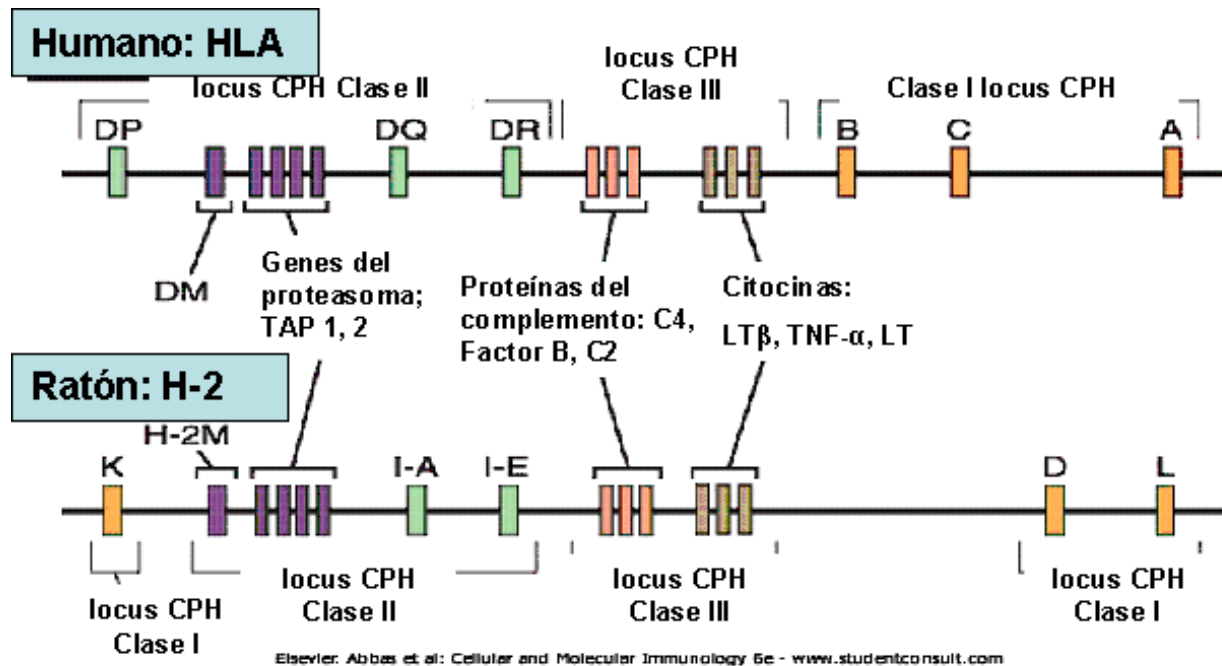


Figura 4. Mapa genético del CPH de humano y ratón. Tomado de Abbas *et al*, 2000.

Las moléculas de CPH de clase I, se expresan de manera constitutiva en prácticamente todas las células, este patrón de expresión está ligado a las funciones de las células T con restricción por moléculas clase I del CPH. Debido a que los virus pueden infectar cualquier célula nucleada, todas las células de este tipo deben presentar los ligandos que serán reconocidos por las células T $CD8^+$, proporcionando así un sistema de presentación de los antígenos virales (Goldsby *et al*, 2003; Estupiñán, 2004).

Procesamiento de antígenos

Las moléculas CPH clase I son sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) y en este sitio adquieren péptidos derivados de la degradación de proteínas citosólicas, provenientes de virus o de proteínas propias transformadas (en el caso de células tumorales); que son fragmentadas por proteasas multicatalíticas, constituídas por dos subunidades de bajo peso molecular denominadas LMP2 y LMP7, este conjunto enzimático es llamado proteasoma. Los péptidos generados por proteasomas son transportados al interior del RE por una proteína heterodímera denominada TAP (TAP-1/TAP-2) localizada en la membrana del RE

y directamente comunicada con las moléculas CPH recién sintetizadas. Los péptidos se unen entre los dominios alfa 1 y alfa 2 de la cadena pesada del CPH y al ensamblarse con la subunidad β 2-microglobulina, el complejo formado (CPH-péptido) es trasladado a la membrana celular para ser presentado al receptor del linfocito T (Figura 5) (Murphy *et al*, 2008).

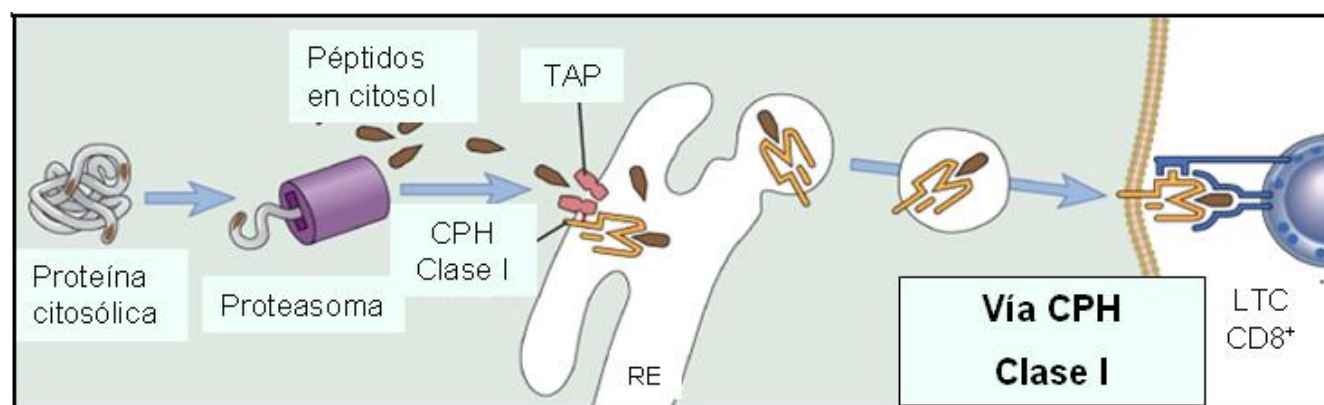


Figura 5 .Procesamiento y presentación de antígeno. Tomado de: Abbas *et al*, 2000.

Respuesta inmune contra el cáncer

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

La disminución parcial o total de moléculas clase I del CPH en la membrana de las células infectadas por virus o de células tumorales, es un mecanismo celular para evitar el reconocimiento antigénico por linfocitos T citotóxicos y por tanto se da lugar al escape inmunológico (Ostrand-Rosenberg, 2004; Knutson and Disis, 2005). La deficiencia en la

expresión de moléculas CPH clase I en membrana puede deberse a varios mecanismos moleculares que incluyen: anomalías estructurales de los genes HLA, defectos en la regulación de la transcripción y transducción de estos genes; y más recientemente se han descrito factores epigenéticos tales como la hipermetilación y desacetilación de histonas. En conjunto inhiben la transcripción y traducción de varios genes que participan en el procesamiento y presentación de antígenos (transportadores asociados al procesamiento de antígenos, enzimas proteolíticas, cadenas pesadas del CPH, etc.) y por tanto en la presentación antigénica para el reconocimiento por linfocitos T (Magner *et al*, 2000; Tomasi *et al*, 2006; Setiadi *et al*, 2007).

Por otro lado, se sabe que durante el desarrollo de tumores existen diversos mecanismos que en conjunto conducen a un ambiente de inmunosupresión (Turley *et al*, 2008). En este contexto, la presencia de linfocitos T reguladores (CD4⁺, CD25⁺ y FoxP3), células dendríticas inmunosupresoras y células estromales mesenquimales (CEMs) pueden generar un microambiente tumoral de inmunosupresión de la respuesta inmune adaptativa, vía la producción de citocinas supresoras como TGF- β e IL-10; factores que inhiben la actividad de linfocitos T citotóxicos como son arginasa e indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO); o factores que promueven el crecimiento tumoral y angiogénesis como son factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) e IL-1 β (Yen and Yen, 2008; Jodele *et al*, 2006).

Células estromales mesenquimales (CEMs)

El estroma de la medula ósea incluye células progenitoras, denominado comúnmente como células estromales mesenquimales (CEMs) que sostienen la hematopoyesis y diferenciación de múltiples linajes de origen mesodérmico, tales como osteocitos, condrocitos, adipocitos y fibroblasto estromal (Figura 6), y en células de otros linajes como células del músculo, hepatocitos, células endoteliales y neuronas (Morandi *et al*, 2008).

Las CEMs son principalmente aisladas de la medula ósea, pero han sido también identificadas en otros tejidos incluyendo sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, músculo y membrana sinovial (Morandi *et al*, 2008).

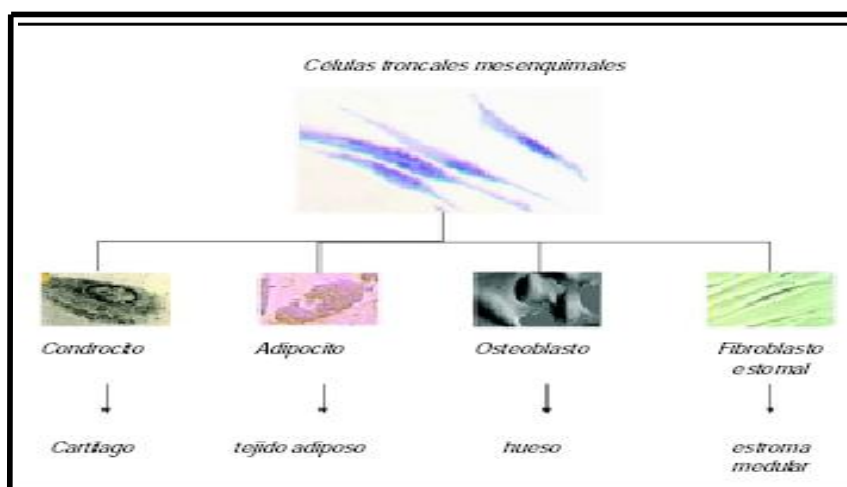


Figura 6. Diferenciación de células estromales mesenquimales de medula ósea en células de linaje mesodérmico: condrocitos, adipocitos, osteoblastos y fibroblasto estromal. Tomado de: (Flores-Figueroa, 2006)

Todas las células secretan varios agentes bioactivos que reflejan su estado funcional y la influencia de su microambiente local. El modelo y cantidad de tales factores secretados son bien conocidos en mecanismos de retroalimentación (feed back) en las mismas células y ambos rigen su estado funcional y fisiológico.

Tales secreciones funcionales (autocrina y paracrina) de factores bioactivos pueden tener efectos profundos en la dinámica celular local. De este modo, las células estromales mesenquimales pueden tener dos funciones distintas: pueden proveer unidades de reemplazamiento para células muertas en tejidos mesenquimales y pueden tener efectos trópicos en células fuera de su vecindario generando nuevamente fenotipos de mesenquimales diferenciadas y también influyendo la regeneración de células o tejidos, (Caplan and Dennis, 2006).

Debido a sus capacidades de diferenciación, han emergido como una prometedora herramienta para aplicaciones terapéuticas en ingeniería de tejidos así como terapia génica y celular.

Desde el punto de vista funcional, las CEMs se caracterizan por tener actividad inmunosupresora sobre células de la respuesta inmune, por lo cual son considerados como supresores universales (Uccelli *et al*, 2007), además de su gran potencial multilinaje y plasticidad, ellas también muestran propiedades inmunoregulatorias, que las hacen un

blanco perfecto para su aplicación clínica. Su uso clínico, presente y futuro, abarca enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros, (Figura 7) (Flores-Figueroa, *et al* 2006). Debido a ello, actualmente son utilizadas en el trasplante alogénico de médula ósea para evitar el rechazo de injerto contra huésped (Ringden *et al* 2006; Le Blanc *et al*, 2006).

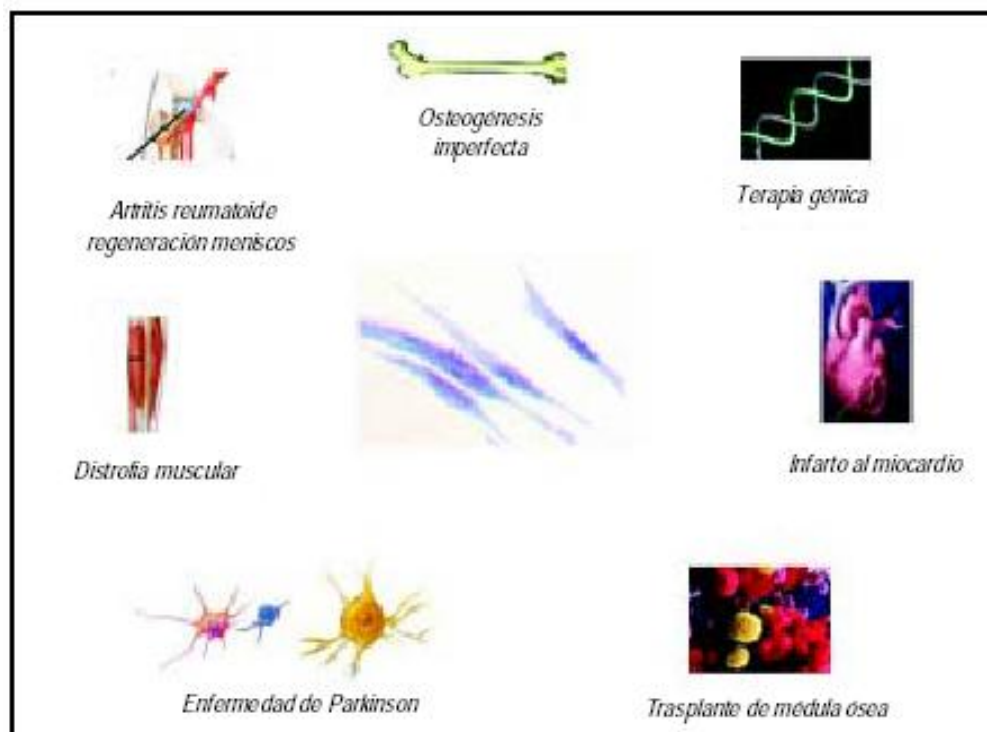


Figura 7. Esquema representativo de los diferentes usos en la clínica de las células estromales mesenquimales. Tomado de: (Flores-Figueroa, 2006)

Estas células residentes en la médula ósea, pueden ser separadas de células hematopoyéticas por sus características de adherencia y expansión en cultivos sin pérdida de su potencial diferenciación multilineaje. Fenotípicamente, las CEMs son identificadas por la ausencia de los marcadores CD34 y CD45, y son positivas para Thy-1, CD90, CD105, molécula-1 de adhesión de célula vascular (VCAM-1/CD106), SH2, SH3, CD44 y CD73. Las CEMs expresan el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) clase I, pero no expresan CPH clase II, moléculas B7-1, B7-2, CD40 y CD40L. Además estas células troncales

secretan un número de citocinas y moléculas regulatorias que juegan un papel importante en la maduración de células hematopoyéticas troncales (Selmani *et al*, 2007).

Estas células pueden ser encontradas en varios tejidos en especial en sitios llamados “stem cell niches” las cuales sirven como reservorios de células troncales. Ellas permanecen inertes y poseen la capacidad para auto-renovarse después de una lesión, enfermedad o envejecimiento (Bobis *et al*, 2006).

Además, factores de crecimiento y citocinas tales como factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante- β o factor-1 (TGF- β 1) derivado de célula estromal (SDF-1), también tienen papeles prominentes en carcinogénesis relacionadas a células estromales y progresión epitelial del tumor (Yen and Yen, 2008).

Recientemente se ha postulado que células estromales mesenquimales (CEMs) participan en la generación de linfocitos T reguladores en los tumores, debido a que éstas, además de ser ubicuas en diferentes tejidos y soportar la hematopoyesis en la médula ósea, se caracterizan por tener actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función reguladora de linfocitos T reguladores (Pittenger *et al* 1999; Dominici *et al* 2006; Prevosto *et al* 2007; Di Ianni *et al* 2008; Maccario *et al* 2005b; Ren *et al* 2008).

Se ha demostrado la interacción y establecimiento de CEMs en tumores malignos inicialmente en un modelo *in vivo* de ratones (Studený *et al*, 2002), así mismo, se mostró que el co-transplante de CEMs (derivadas de médula ósea humana) con células de melanoma en ratón, favorece el implante y crecimiento del tumor. (Djouad *et al*, 2003), Otro autor encontró que cuando CEMs son mezcladas con células tumorales, se incrementa el potencial metastático de varias líneas celulares de cáncer de mama (Karnoub *et al*, 2007). Estos fenómenos se han atribuido a las características inherentes de estas células estromales: a sus propiedades inmunosupresoras y a su habilidad para migrar al sitio de la lesión.

Planteamiento del problema y Justificación

La infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, es el factor etiológico más importante en el desarrollo de cáncer cervical, predominando el tipo 16 (VPH 16) en aproximadamente 50% de los casos (Dias *et al*, 2005).

Una vez que el genoma del VPH se integra en el de las células infectadas, las proteínas oncogénicas E6 y E7 son importantes en la inducción y mantenimiento de la transformación celular y son sobre-expresadas en la mayoría de los cánceres cervicales. Por lo tanto, estas proteínas representan antígenos blanco, los cuales son presentados junto con moléculas Clase I del CPH en la superficie de la célula infectada, para su reconocimiento y eliminación por linfocitos T citotóxicos (Torréns *et al*, 2008). No obstante varios factores intrínsecos, inherentes a la expresión de genes que participan en el procesamiento y la presentación de antígenos por las moléculas Clase I del Complejo principal de histocompatibilidad (CPH-I) en las células tumorales; o extrínsecos, confinados al microambiente tumoral de inmunosupresión mediada por linfocitos T reguladores, células dendríticas plasmacitoides y células estromales mesenquimales (CEMs) entre otras, pueden suprimir la respuesta efectora de linfocitos T citotóxicos. En algunos estudios se ha reportado que CEMs derivadas de médula ósea, favorecen el crecimiento y la metástasis tumoral en ratones inoculados simultáneamente con CEMs y células Tumorales (Clark *et al*, 2008; Ramasamy *et al*, 2008; Prevosto *et al*, 2007; y Di Ianni *et al*, 2008).

Con base en evidencias recientes obtenidas por nuestro grupo de trabajo, hemos encontrado que células estromales mesenquimales (CEMs), obtenidas a partir de tejidos tumorales de cuello uterino, son capaces de disminuir la expresión de moléculas del CPH-I de líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino a manera dosis dependiente, (Montesinos *et al*, 2010 Manuscrito en preparación), pero no se conoce si las CEMs pueden promover que las células tumorales evadan el reconocimiento inmune de linfocitos T citotóxicos.

Bajo esta premisa el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar la influencia de las CEMs, obtenidas de neoplasias cervicales (NIC y CaCu), en el reconocimiento inmune de células tumorales mediado por linfocitos T citotóxicos CD8+. Para ello se utilizó un modelo *in*

in vitro xenogénico, en el cual células tumorales de ratón denominadas TC-1 (positivas a las proteínas E6 y E7 de VPH-16) derivadas de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D^b), fueron co-cultivadas con CEMs derivadas de neoplasias cervicales humanas, para evaluar la expresión de moléculas H2-D^b en membrana y el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos, inducidos en ratones C57BL/6 mediante la inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16.

Los resultados de este modelo de estudio nos permiten conocer la participación de las CEMs derivadas de neoplasias cervicales, en la evasión del reconocimiento inmune de células tumorales a través de la disminución de la expresión de moléculas del CPH-I, siendo un evento muy importante en la respuesta inmune antitumoral, que debe tomarse en cuenta en el desarrollo de protocolos de inmunoterapia hacia tumores.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la participación de células estromales mesenquimales (CEMs) derivadas de neoplasias malignas de cuello uterino (NIC y CaCu) sobre el reconocimiento inmune de células tumorales.

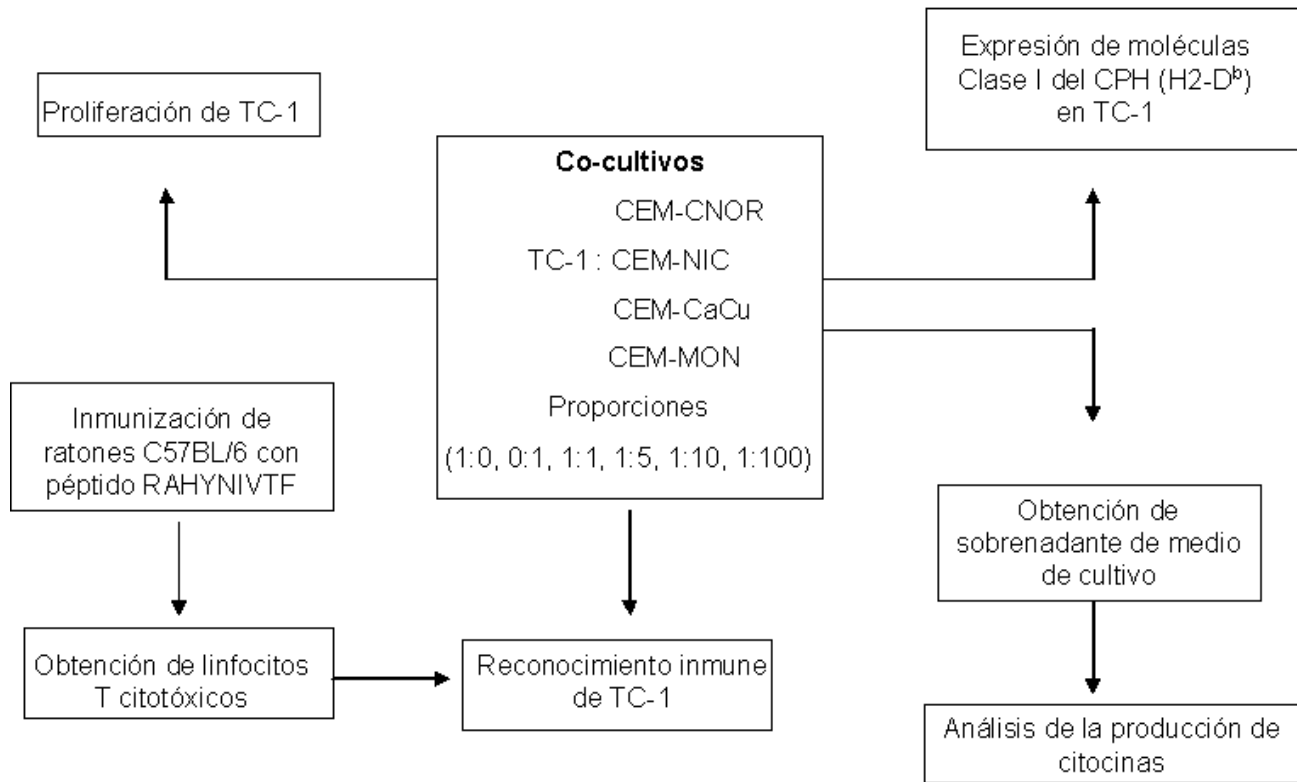
Objetivos particulares

1. Analizar el efecto de CEMs obtenidas de médula ósea, cérvix normal, y neoplasias cervicales (NIC y CaCu), sobre la proliferación de las células tumorales TC-1.
2. Evaluar el efecto de CEMs sobre la expresión de moléculas clase I del CPH (H2- D^b) en las células tumorales TC-1.
3. Analizar *in vitro* el efecto de CEMs, sobre el reconocimiento inmune de células tumorales TC-1.
4. Evaluar la producción de citocinas Th1/Th2 por las células tumorales TC-1 bajo condiciones de co-cultivo con CEMs.

Hipótesis

Evidencias recientes reportan que las células estromales mesenquimales (CEMs), suprimen la respuesta inmune y favorecen el implante, crecimiento y metástasis de tumores malignos, tanto en modelos heterólogos como xenogénicos. Con base a resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de investigación, se ha encontrado que las CEMs disminuyen la expresión de moléculas Clase I del CPH en la membrana de células tumorales. Por tanto, si co-cultivamos CEMs humanas, derivadas de neoplasias malignas de cuello uterino (NIC y CaCu), con células tumorales TC-1 de ratón, entonces encontraremos disminución tanto en la expresión de moléculas CPH-I en las células tumorales como en el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos.

Estrategia Experimental



Materiales y Métodos

Muestras biológicas

Las muestras biológicas consistieron de células tumorales TC-1 derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6, las cuales expresan de manera permanente los genes E6 y E7 de VPH-16 junto con el gen Ras (Lin *et al*, 1996). Estas células fueron cultivadas con medio de cultivo RPMI de GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 10%. También se emplearon 4 estirpes de células estromales mesenquimales (humanas), las cuales fueron previamente obtenidas de Médula Ósea Normal (CEM-MON), Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical grado II (CEM-NIC) y de un tumor de Cáncer Cérvico-Uterino IIB (CEM-CaCu). Estas estirpes celulares fueron establecidas en colaboración con el Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales a cargo del Dr. Juan José Montesinos Montesinos, en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN SXXI.

Todas las estirpes de CEMs utilizadas en este proyecto fueron caracterizadas bajo los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para definir a las Células estromales mesenquimales (Dominici *et al*, 2006) y que consisten en: ser adherentes en condiciones estándar de cultivo; expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecer de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR en la membrana celular; y finalmente tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Las CEMs fueron cultivadas con medio de cultivo consistente en DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 15%. Las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C con 5 % de CO₂ y humedad saturante.

Finalmente, también se contó con ratones de la cepa C57BL/6 como fuente de linfocitos T citotóxicos antígeno específicos, después de ser inmunizados de acuerdo con el siguiente esquema: los ratones fueron inmunizados durante 3 ocasiones, vía cavidad intraperitoneal, con 100 µg del péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de HPV-16. En la primera

inmunización los péptidos aplicados fueron disueltos en Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) y emulsionados con Adyuvante Completo de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1; y en las dos posteriores inmunizaciones se utilizaron 100 µg de péptido emulsionado con Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1. El espacio entre cada inmunización fue de 10-12 días.

Co-cultivos de CEMs con TC-1.

Para analizar el efecto de las CEMs sobre la proliferación y expresión de moléculas H2-D^b en las células tumorales TC-1, se realizaron co-cultivos de forma directa de las células estromales mesenquimales (CEMs) derivadas de Médula Ósea Normal (CEM-MON), Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC) y Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) con las células tumorales TC-1, en diferentes proporciones de TC-1:CEMs (1:1, 1:5, 1:10 y 1:100). Para la expresión basal de moléculas H2-D^b, las células TC-1 se cultivaron de manera independiente. Los co-cultivos se mantuvieron con 60% de medio de cultivo RPMI de GibcoBRL (Life Technologies, USA) y 40% de medio de cultivo consistente en DMEM de GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 15%, en condiciones de esterilidad y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific) durante 4 días (96 horas) a 37 °C con 5% de CO₂.

Proliferación celular.

Para medir la proliferación de las células tumorales TC-1 bajo las condiciones de co-cultivo, estas células fueron marcadas previamente con 2µM de *Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester* (CFSE, Sigma) en PBS (1×10^6 células/ml) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a lavar las células con PBS para eliminar el exceso de CFSE y se procedió a contarlas para realizar los co-cultivos con las diferentes estirpes de CEMs.

Al término de 4 días de co-cultivo, se analizaron los niveles de CFSE en las células TC-1 a través de citometría de flujo. El tiempo inicial (T₀) de marcaje con CFSE se determinó en el

momento de la cosecha al marcar células TC-1 durante 15 minutos y determinar los niveles iniciales de la incorporación de CFSE. La respuesta proliferativa total (T1) de TC-1 se determinó sobre las células marcadas y cultivadas en ausencia de cualquier tipo de CEMs. Los resultados fueron analizados en el programa WinMDI 2.8 Software.

Citometría de Flujo para la determinación de moléculas clase I del CPH (H2-D^b).

Las células obtenidas después de los co-cultivos de 4 días, por remoción con tripsina 0.05% en EDTA, fueron colocadas en placas con 96 pozos fondo U e incubadas con 100µl del anticuerpo monoclonal anti-H2-D^b (derivado del sobrenadante del hibridoma (281485 ATCC, USA), durante 30 minutos en incubación sobre hielo (<5°C). Después de este tiempo, las células fueron lavadas con PBS-SFB al 3% durante dos ocasiones, para eliminar el exceso del anticuerpo. Finalmente las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario (FITC-Goat anti-mouse IgG Zymed Laboratories Invitrogen immunodetection, USA) (dilución 1:100) por 30 minutos a 4°C. Por último las células se colocaron en tubos de plástico con 200 µl de solución PBS-SFB y con 200µl de paraformaldehído al 4% para fijar las células y realizar su análisis en un citómetro de flujo (FACScalibur Becton Dickinson, USA). La lectura basal de la expresión de moléculas Clase I del CPH se realizó en células TC-1 incubadas de manera independiente y teñidas con el anticuerpo anti H2-D^b. El citómetro fue calibrado con células teñidas con anticuerpo secundario cabra anti ratón marcado con FITC (Zymed, USA) y las lecturas reportadas como la Intensidad Media de Fluorescencia, de 10 000 eventos fueron analizados mediante el programa WinMDI 2.8 Software.

Determinación del reconocimiento inmune de células tumorales TC-1 por linfocitos T citotóxicos.

Diez días después de la 3^a inmunización, con el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, los ratones fueron sacrificados para obtener los bazos y aislar los linfocitos con ayuda de un cedazo. Los eritrocitos del tejido fueron lisados con buffer ACK (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA) y los linfocitos se mantuvieron durante 15 días en cultivo con medio Iscove's Modified Dulbecco médium (GIBCO) + 10% de SFB (HyClone),

suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco USA), β -mercaptoetanol 5 μ M (Gibco), piruvato de sodio 50 μ M (Gibco) y L-glutamina 2 mM (Sigma) en presencia de 20ng/mL de interleucina-2 recombinante de ratón (rmIL-2, R&D, USA) y 10 μ g/mL del péptido RAHYNIVTF. A los días 2 y 5 de cultivo se adicionaron 2 ml de medio fresco con rmIL-2 a la misma concentración. Después de dos rondas de estimulación, bajo estas condiciones, los linfocitos estimulados se utilizaron para realizar ensayos de citotoxicidad sobre las células TC-1 (células blanco) obtenidas de los co-cultivos con las CEMs de las diferentes fuentes (médula ósea normal, cérvix normal, NIC y CaCu). Las células blanco fueron marcadas con una solución salina de ^{51}Cr (50 μ Ci) (Dupont, USA) durante 2 horas a 37°C. Después de lavar las células durante 4 ocasiones con medio RPMI-1640 para eliminar el exceso de ^{51}Cr , éstas fueron incubadas con diferentes proporciones de linfocitos T CD8⁺ pre-estimulados (1:25, 1:50 y 1:100) y después de 4 horas de co-cultivo, se colectaron 100 μ l del sobrenadante (libre de células) y se analizó la liberación de ^{51}Cr .

La liberación total de ^{51}Cr en las células blanco se determinó mediante la lisis con tritón al 5%, mientras que la liberación espontánea se determinó a partir del sobrenadante de las células blanco bajo condiciones normales de cultivo. El porcentaje de lisis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\% \text{citotoxicidad} = 100 \times [(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación total} - \text{liberación espontánea})]$.

Análisis de citocinas Th1/Th2

Después de 4 días de co-cultivo de TC-1:CEMs en placas de 24 pozos de fondo U, se colectó el medio de cultivo sobrenadante para cuantificar las citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Th2 (IL-4 e IL-5) generadas en dichos co-cultivos mediante citometría de flujo utilizando el protocolo anexo al paquete para determinación de citocinas [Kit Mouse Th1/Th2 Cytokine (BDTM Cytometric Bead Array (CBA), USA)]. La detección de estas citocinas se basa en esferas con dos tipos de fluorescencia: la primera con anticuerpos específicos para cada tipo de citocina; y la segunda se basa en la intensidad del fluorocromo PE (por sus

siglas en inglés *streptavidin- phycoerytryn*) la cual, con base en la diferencia en la intensidad de fluorescencia, nos permite calcular la cantidad de citocina unida a las perlas que contiene anticuerpos anti-citocina (la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de citocinas unidas a las perlas de detección).

De acuerdo al protocolo primero se reconstituyó el estándar de citocinas Th1/Th2 de ratón en disolvente de ensayo, y se realizaron diluciones seriales, usando el mismo disolvente. Posteriormente se mezclaron 10 µl de cada tipo de esferas específicas para las citocinas, antes de colocarlas a las diluciones estándar o a las muestras de suero problema (50 µl de esferas/tubo). Enseguida se adicionó el reactivo PE de detección (50 µl/muestra) y se incubaron los tubos por 2 horas a temperatura ambiente, protegiéndolos de la luz. Posterior a la incubación se lavaron las muestras con 1 ml de buffer de lavado y se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de cada tubo de ensayo con 300 µl de buffer de lavado y se analizaron las muestras, agitando 3 o 5 segundos cada muestra antes de colocarla en el citómetro de flujo (FACScalibur BD Biosciences, USA).

Para determinar la concentración de cada una de las citocinas analizadas, a cada muestra se le determinó el promedio de 2 500 eventos, el cual fue interpolado en la correspondiente curva patrón de acuerdo con inserto del Kit para citocinas Th1/Th2 (CBA).

Resultados

Células estromales mesenquimales de tejido cervical normal y tumoral incrementan la proliferación de células tumorales TC-1.

Las células estromales mesenquimales (CEMs) son una población de células madre no hematopoyéticas localizadas alrededor de la vasculatura y trabécula de la médula ósea. No obstante también se encuentran distribuidas en prácticamente todos los tejidos (Friedenstein *et al*, 1974). Las CEMs también se caracterizan por su capacidad de migrar a una variedad de órganos y tejidos, de hecho, su presencia se ve incrementada en sitios de inflamación, heridas y ciertas patologías, debido a su propiedad de reparación y remodelación de tejidos (Chapel *et al*, 2003). Recientemente se ha reportado que las CEMs participan de manera importante en el microambiente tumoral, favoreciendo el implante, crecimiento y metástasis de células tumorales *in vivo* (Djouad *et al*, 2003; Karnoub *et al*, 2007). Además, es ampliamente conocida su capacidad inmunosupresora sobre células de la respuesta inmune, al suprimir la respuesta de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales y generar células dendríticas tolerogénicas inmaduras, e inducción de linfocitos T reguladores (Uccelli *et al*, 2007; Rasmusson *et al*, 2003; Prevosto *et al*, 2007 y Di Ianni *et al*, 2008). Sin embargo, se desconoce si las CEMs participan en el escape inmunológico de las células tumorales hacia el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos. Por tanto, en el presente estudio establecimos un modelo *in vitro*, para analizar si las CEMs provenientes de diferentes fuentes: Médula Ósea Normal (CEM-MON), Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC) y Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu), influyen en el reconocimiento inmune de células tumorales.

Las estirpes de CEMs utilizadas en este estudio, como se mencionó en materiales y métodos, fueron previamente caracterizadas de acuerdo a los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, que consisten en ser adherentes, tener los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecer de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11 β , CD79 α /CD19 y HLA-DR en la membrana celular, asimismo, por su capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Montesinos *et al*, 2010, manuscrito en preparación). Las células tumorales consistieron de la línea celular TC-1

derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6, las cuales expresan de manera permanente los genes E6 y E7 de VPH-16 junto con el gen Ras (Lin *et al*, 1996).

Para analizar si las diferentes estirpes de CEMs influyen en la proliferación de las células tumorales, se realizaron co-cultivos de CEMs con células TC-1 en diferentes proporciones (1:1, 1:5, 1:10, 1:100). Para ello las células TC-1 fueron previamente marcadas con *Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester* (CFSE) y después de 4 días de co-cultivo con las CEMS, se determinó la proliferación celular mediante citometría de flujo. La proliferación celular se observó a través de la disminución del marcaje celular (fluorescencia) como consecuencia de la división celular. En la (figura 8.1 A), se aprecia el marcaje inicial en tiempo cero (T0) de las células tumorales TC-1 cultivadas de manera independiente, después de cuatro días de cultivo, el marcaje celular disminuyó notablemente (T1), sin embargo, cuando las células TC-1 fueron co-cultivadas con CEM-CNOR (T1cn), se observó una mayor disminución en el marcaje celular respecto al mostrado por las células TC-1 cultivadas de manera independiente, esta disminución fue mayor a medida que se incrementó la proporción de CEM-CNOR, siendo más notable a partir de la proporción 1:10 TC-1:CEM-CNOR (Figura 8.1 B-E). En el caso particular de los co-cultivos de TC-1 con CEM-NIC y CEM-CaCu, se observó mayor proliferación de las células TC-1 sólo cuando fueron co-cultivadas en proporción 1:1 con las CEMs (Figuras 8.2 y 8.3). Finalmente en los co-cultivos de CEM-MON con las células TC-1, no se observó un efecto apreciable sobre la proliferación de las células TC-1 en ninguna de las proporciones celulares realizadas (Figura 8.4).

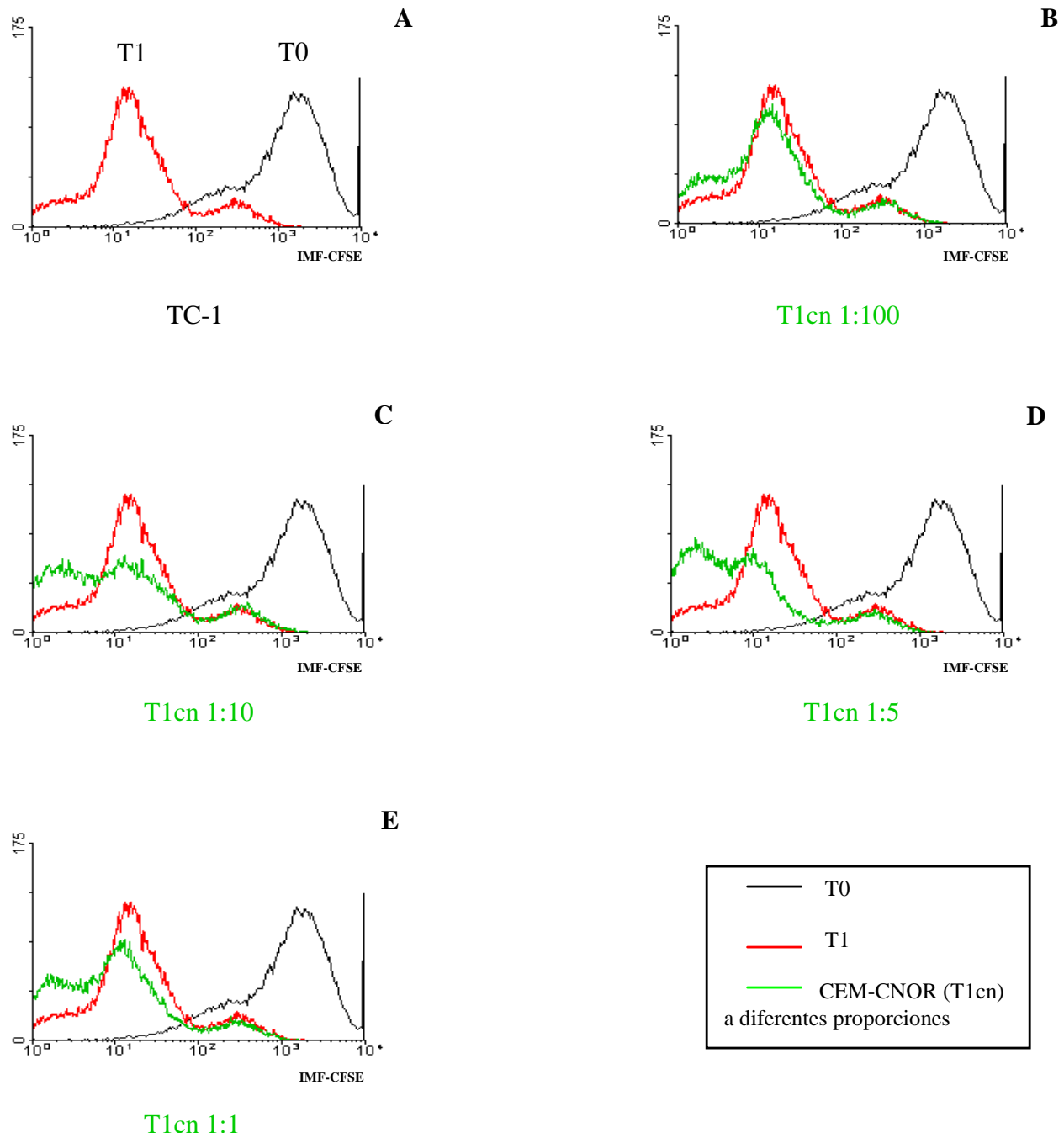


Figura 8.1. CEM-CNOR incrementa la proliferación de las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron marcadas con CFSE $2\mu\text{M}$ durante 15 minutos. El marcaje celular fue determinado mediante un citómetro de flujo al inicio de cultivo (T0) y después de cuatro días de cultivo en ausencia (T1) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-CNOR (T1cn), 1:1, 1:5, 1:10, y 1:100 TC-1:CEM-CNOR. IMF-CFSE, intensidad media de fluorescencia de las células marcadas con CFSE.

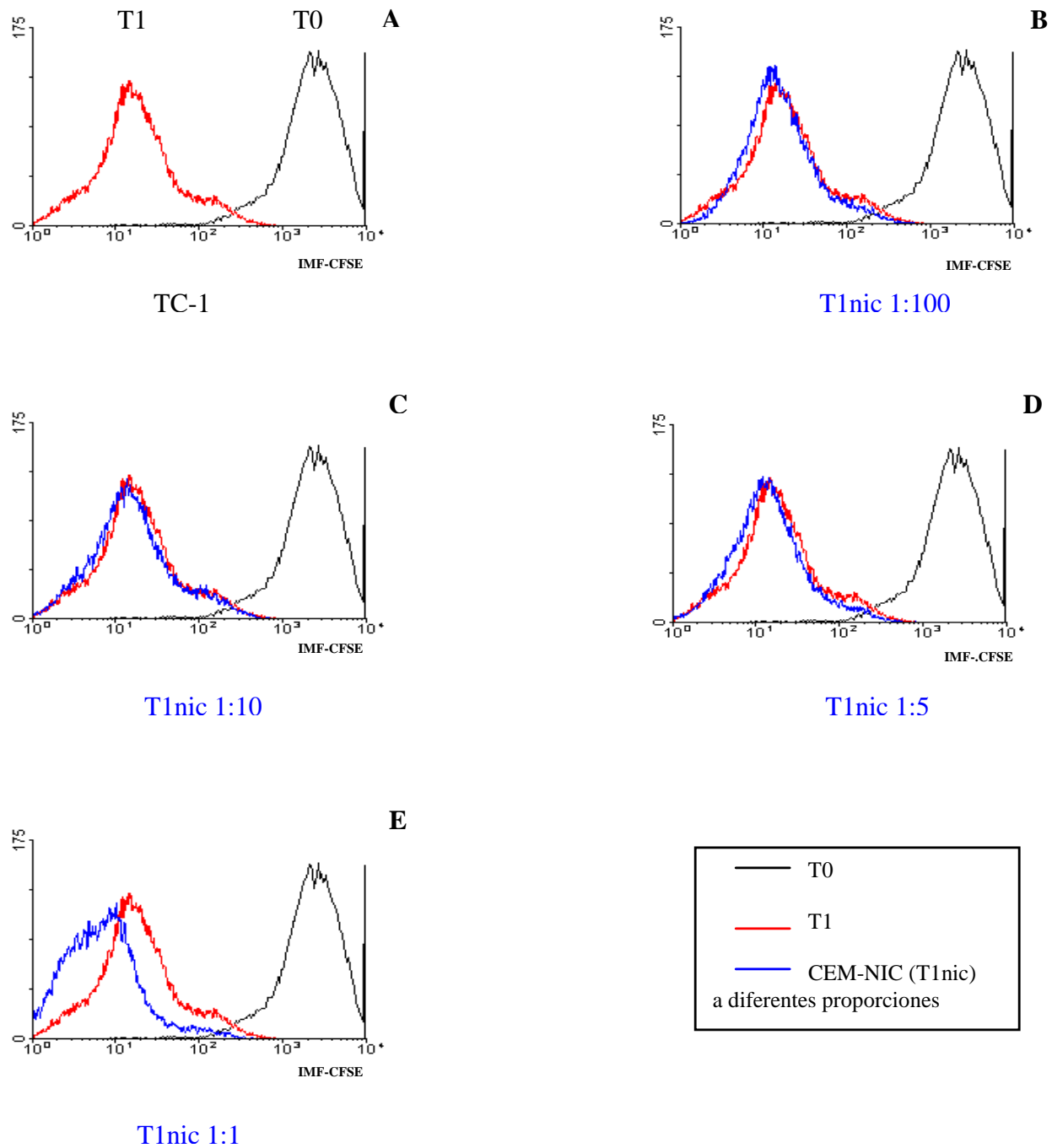


Figura 8-2. CEM-NIC incrementa la proliferación de las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron marcadas con CFSE $2\mu\text{M}$ durante 15 minutos. El marcaje celular fue determinado mediante un citómetro de flujo al inicio de cultivo (T0) y después de cuatro días de cultivo en ausencia (T1) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-NIC (T1nic): 1:1, 1:5, 1:10, y 1:100 TC-1:CEM-NIC. IMF-CFSE, intensidad media de fluorescencia de las células marcadas con CFSE.

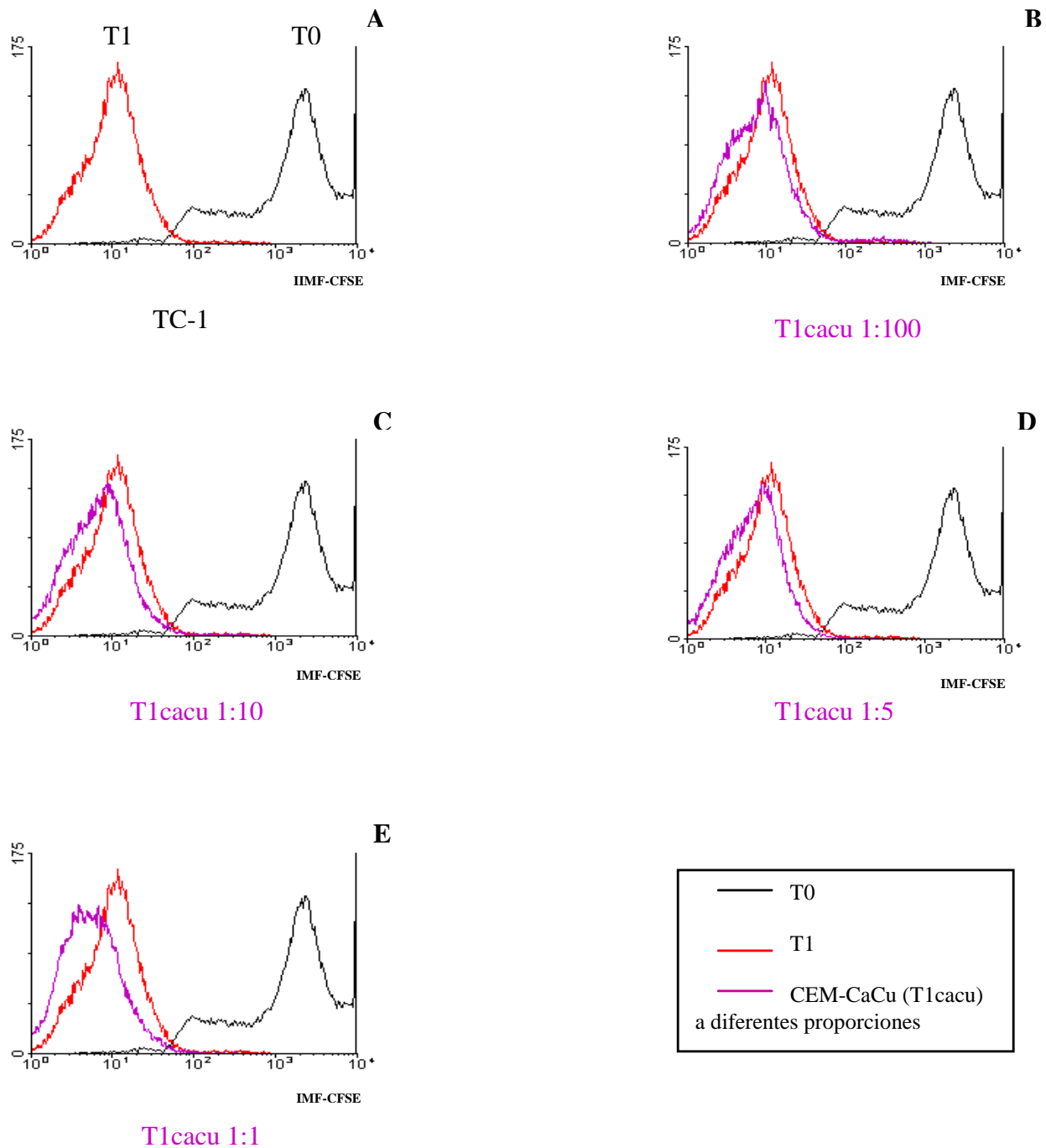


Figura 8-3. CEM-CaCu incrementa la proliferación de las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron marcadas con CFSE $2\mu\text{M}$ durante 15 minutos. El marcaje celular fue determinado mediante un citómetro de flujo al inicio de cultivo (T0) y después de cuatro días de cultivo en ausencia (T1) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-CaCu (T1cacu): 1:1, 1:5, 1:10, y 1:100 TC-1:CEM-CaCu. IMF-CFSE, intensidad media de fluorescencia de las células marcadas con CFSE.

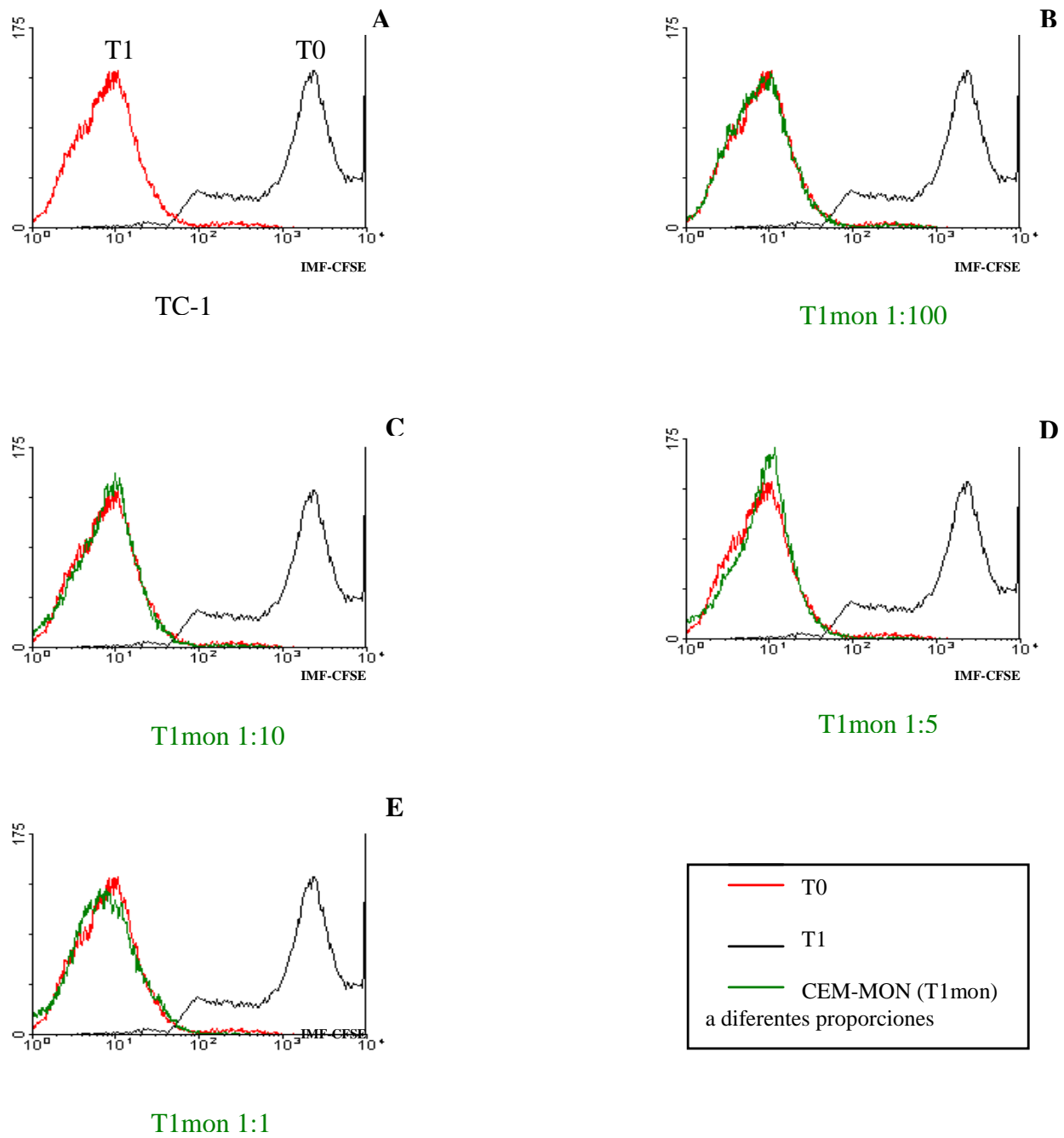


Figura 8-4. CEM-MON no afecta la proliferación de las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron marcadas con CFSE $2\mu\text{M}$ durante 15 minutos. El marcaje celular fue determinado mediante un citómetro de flujo al inicio de cultivo (T0) y después de cuatro días de cultivo en ausencia (T1) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-MON (T1mon): 1:1, 1:5, 1:10, y 1:100 TC-1:CEM-MON. IMF-CFSE, intensidad media de fluorescencia de las células marcadas con CFSE.

Células estromales mesenquimales inducen disminución en la expresión de moléculas clase I del CPH (H2- D^b) en células tumorales TC-1.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, hemos observado que CEMs heterólogas humanas derivadas de tejidos cervicales normales y de tumores cervicales, disminuyen la expresión de moléculas Clase I del CPH de líneas celulares de cáncer cérvico-uterino. Con la finalidad de evaluar si en el modelo de cultivo xenogénico, los diferentes tipos de CEMs obtenidas de tejidos humanos, afectan la expresión de moléculas H2-D^b en las células tumorales TC-1 de ratón, se realizaron co-cultivos de CEMs con células TC-1 en diferentes proporciones (1:1, 1:5, 1:10, 1:100) y después de 4 días se analizó la expresión de moléculas clase I del CPH (H2- D^b) en las células TC-1. En cada uno de los diferentes ensayos, se determinó la expresión basal de moléculas H2-D^b en las células tumorales TC-1 (D^b), así como el obtenido mediante la tinción con el anticuerpo secundario marcado con FITC (2°), utilizado como isotipo control (Figuras 9.1A-9.4A).

La expresión de las moléculas H2-D^b en las células TC-1 co-cultivadas con las diferentes estirpes de CEMs, disminuyó paulatinamente a medida que se incrementó la proporción de CEMs (Figuras 9.1-9.4). De manera interesante, se encontró una importante disminución de la expresión de moléculas H2-D^b cuando las células TC-1 fueron co-cultivadas con las CEMs en proporción 1:1 (Figura 9.5). Cuando las células TC-1 fueron co-cultivadas con CEM-CNOR, éstas disminuyeron su expresión en 31% (Figura 9.1); con CEM-NIC en 64% (Figura 9.2); con CEM-CaCu disminuyeron 51%(Figura 9.3); y con CEM-MON 49% (Figura 9.4). Por otro lado, las diferentes estirpes de CEMs utilizadas en este estudio, no mostraron expresión de moléculas H2-D^b en la membrana celular y la tinción con el anticuerpo anti-H2-D^b, fue muy similar a la obtenida con el anticuerpo secundario utilizado como isotipo control (Figuras 9.1F-9.4F).

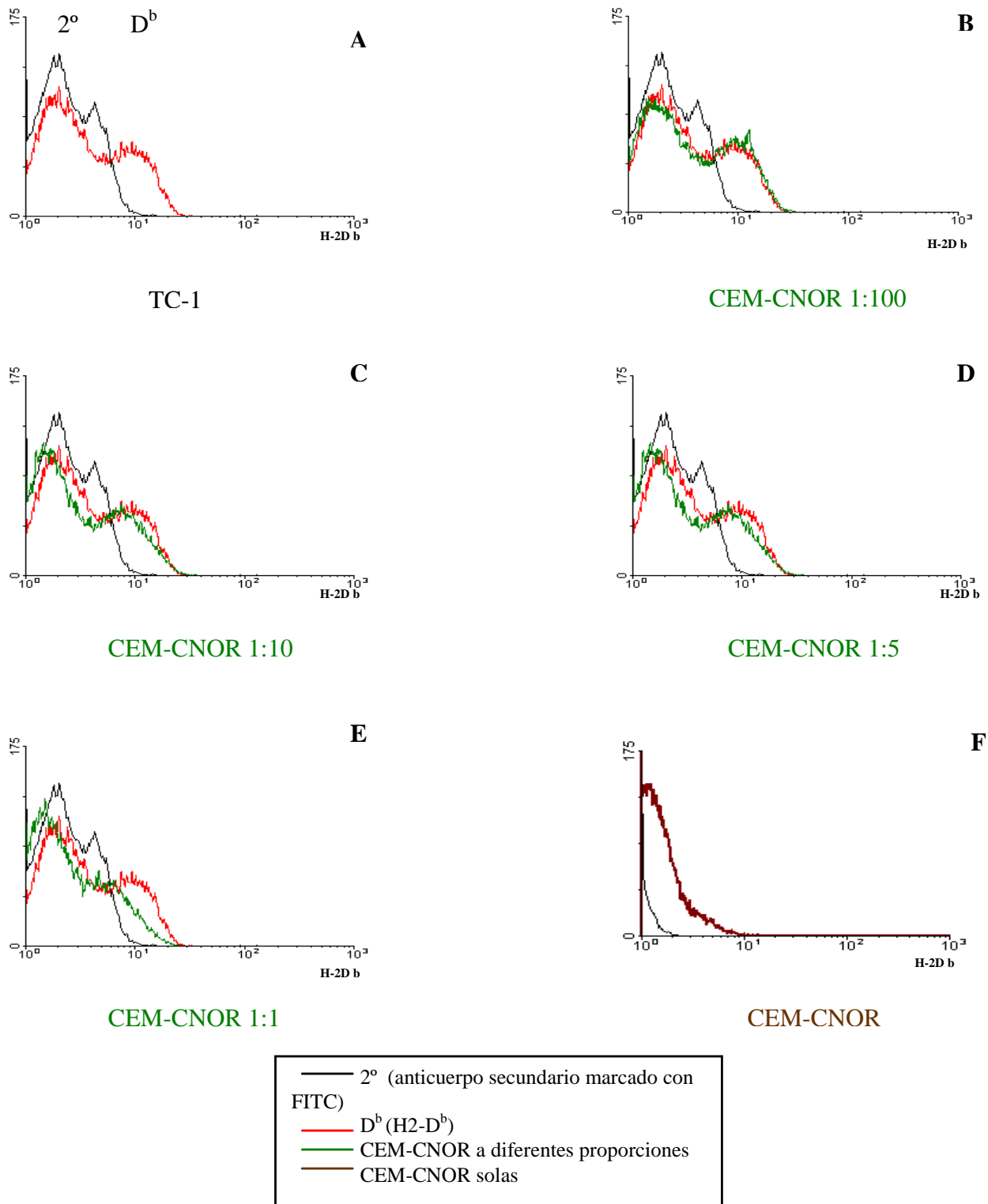


Figura 9.1. CEM-CNOR participan en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I ($H2-D^b$) en la membrana de la línea celular tumoral TC-1, cultivadas solas (A) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-CNOR (B-E). La expresión de $H2-D^b$ también fue determinada en las células CEM-CNOR (F).

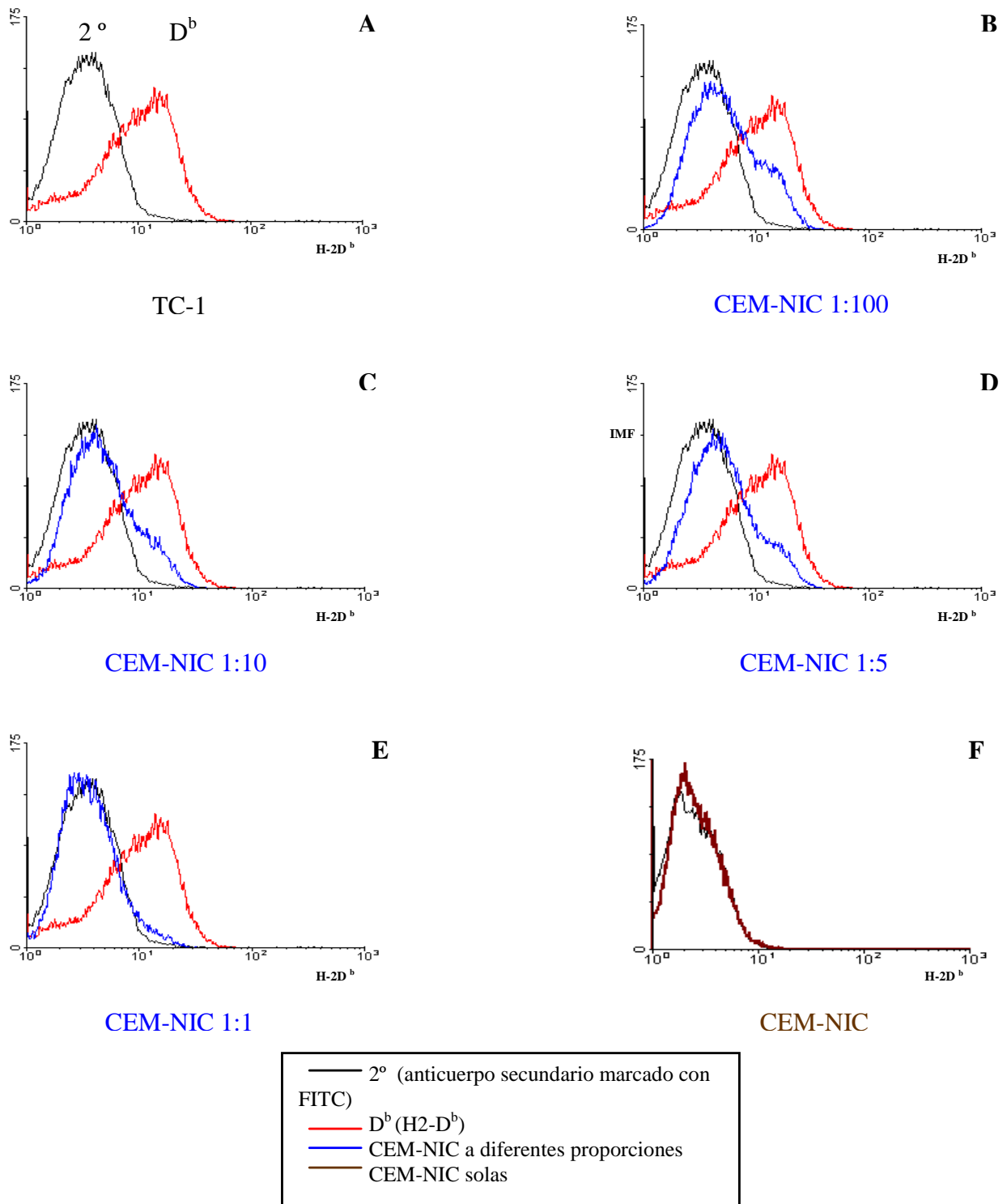


Figura 9.2. CEM-NIC participan en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (H2- D^b) en la membrana de la línea celular tumoral TC-1, cultivada sola (A) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-NIC (B-E). La expresión de H2- D^b también fue determinada en las células CEM-NIC (F).

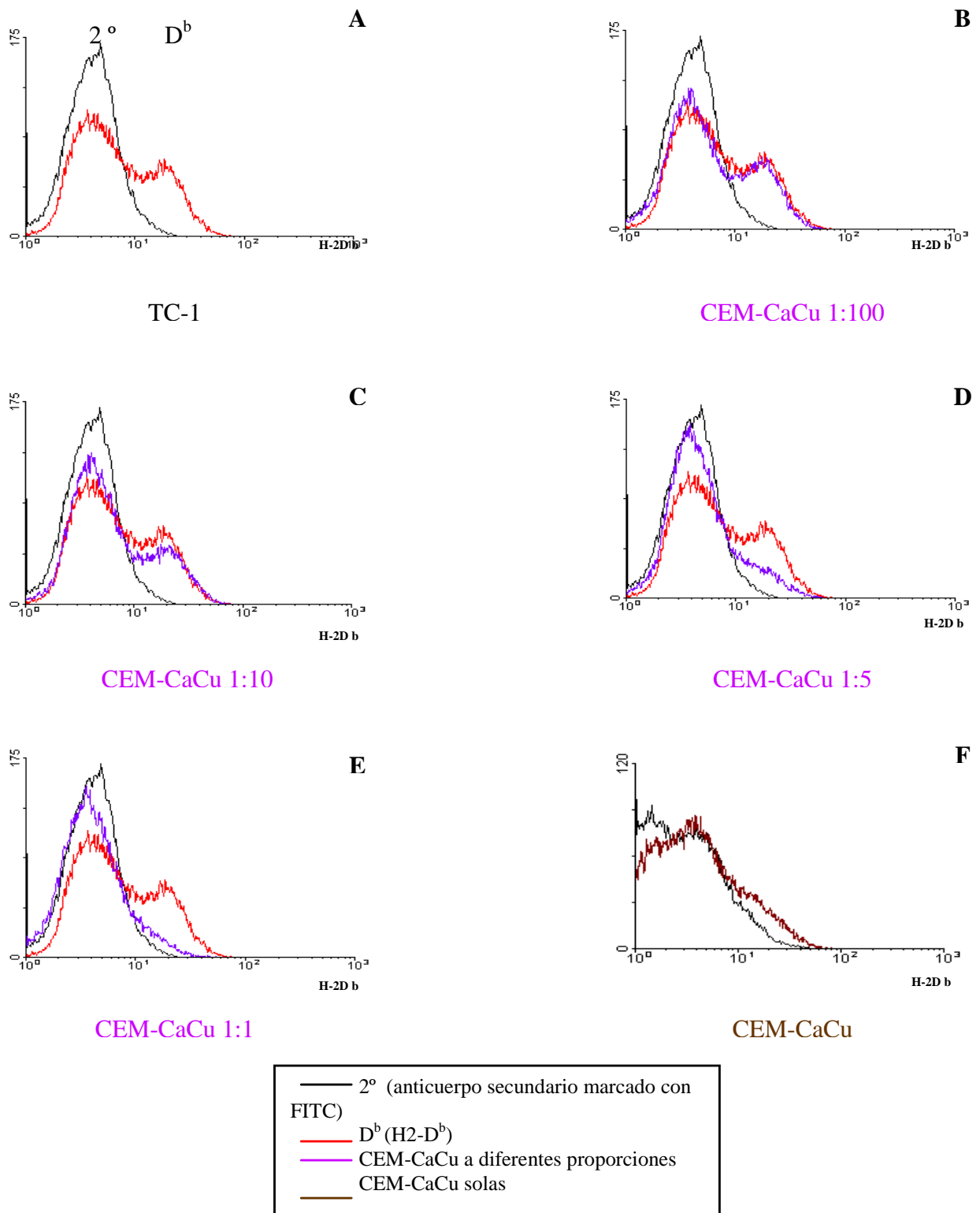


Figura 9.3. CEM-CaCu participan en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (H2-D^b) en la membrana de la línea celular tumoral TC-1, cultivada sola (A) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-CaCu (B-E). La expresión de H2-D^b también fue determinada en las células CEM-CaCu (F).

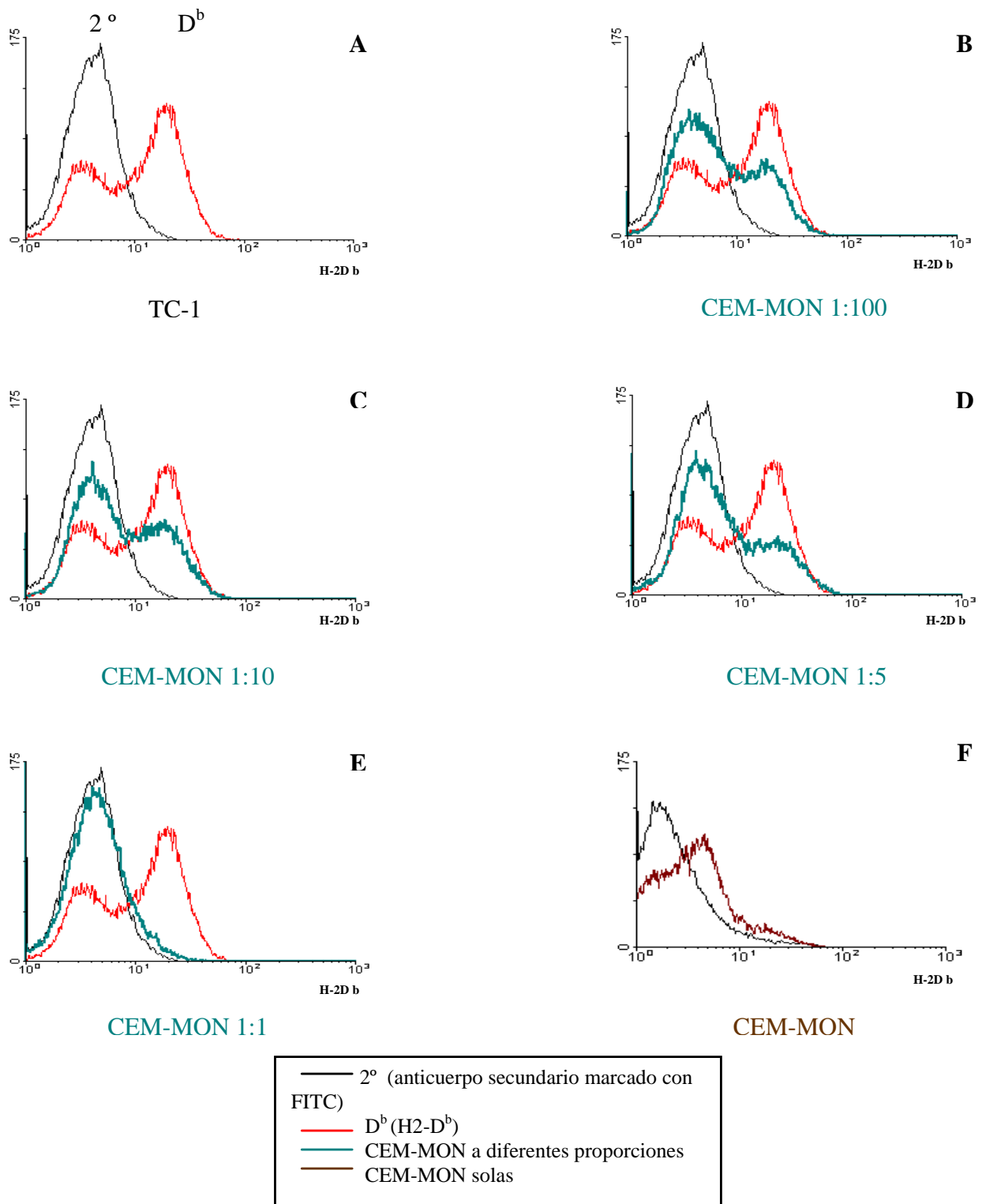


Figura 9.4. Expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (H2-D_b) en la membrana de la línea celular tumoral TC-1, cultivada sola (A) o en presencia de diferentes proporciones de CEM-MON (B-E). La expresión de H2-D_b también fue determinada en las células CEM-MON (F).

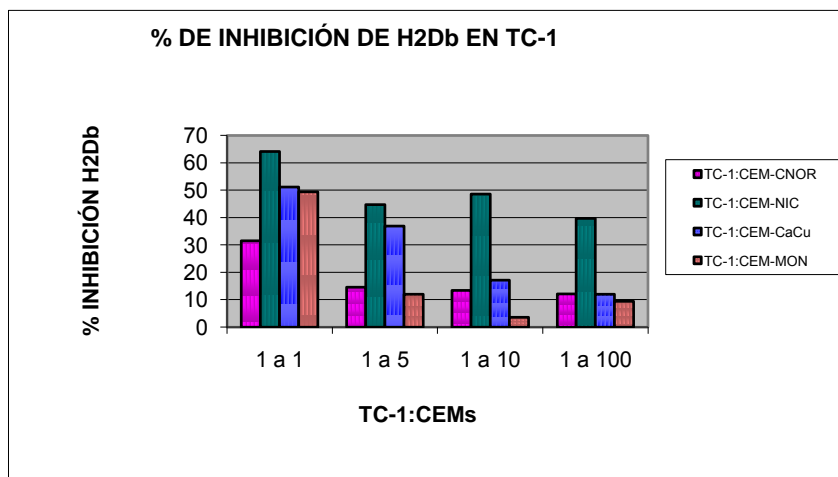


Figura 9.5 CEMs inhiben la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (H2-D^b) en la línea celular tumoral TC-1. Células tumorales TC-1 fueron co-cultivadas con CEMs obtenidas de tejido cervical normal (CEM-CNOR), neoplasia intraepitelial (NIC), cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu) y de médula ósea normal (CEM-MON) en diferentes proporciones.

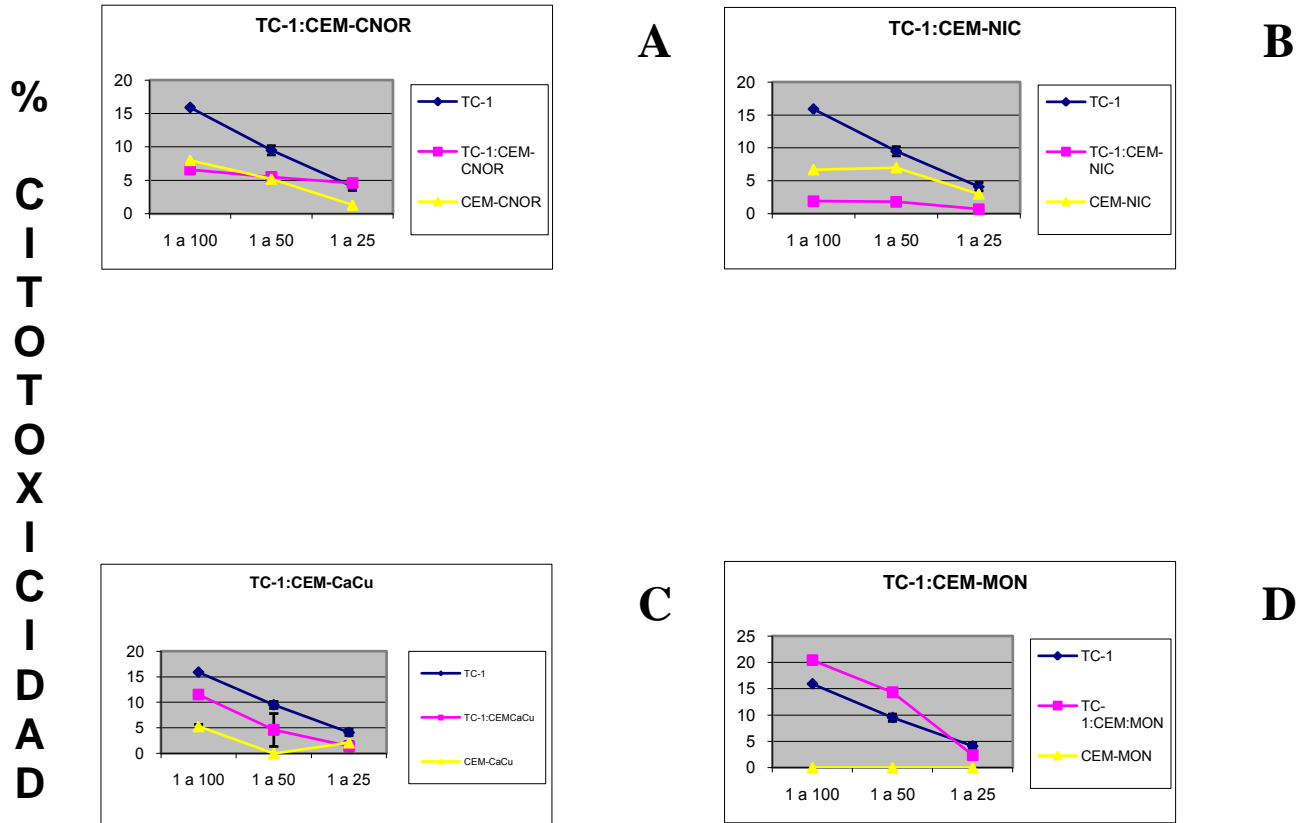
Células estromales mesenquimales participan en la disminución del reconocimiento inmune de células tumorales TC-1 por linfocitos T citotóxicos.

Tomando en consideración que las CEMs inducen la disminución de la expresión de moléculas H2-D^b en la membrana celular de las células tumorales TC-1, se procedió a evaluar si ésta disminución afectaba el reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1. Para ello, se generaron Linfocitos T Citotóxicos (LTC) específicos al péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, mediante la inmunización de ratones C57BL/6 con este péptido.

El efecto citotóxico de LTC obtenidos del bazo de los ratones inmunizados fue evaluado sobre células TC-1 co-cultivadas en proporción 1:1 con las diferentes estirpes de CEMs. La actividad citotóxica, evaluada mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr, fue comparada en cada caso, con la obtenida sobre células TC-1 cultivadas en ausencia de CEMs (Figura 10).

Como se puede apreciar, la máxima actividad citotóxica de LTC fue observada sobre la línea celular TC-1 cultivada en ausencia de CEMs, observándose una actividad de 15.9%, 9.5% y 4.1% en las proporciones 1:100, 1:150 y 1:25 de células blanco:efectoras respectivamente (Figura 10A-D). De manera interesante, cuando las células TC-1 fueron previamente co-cultivadas durante 4 días con las diferentes estirpes celulares de CEMs, el reconocimiento inmune de LTC determinado indirectamente por la actividad citotóxica de los LTC, disminuyó de manera muy importante. La actividad citotóxica sobre células TC-1 co-cultivadas con CEM-CNOR, disminuyó a 6.6%, 5.5% y 4.6% en las proporciones 1:100, 1:50 y 1:25 de células blanco:efectoras respectivamente (Figura 10A); en el caso de TC-1 co-cultivadas con CEM-NIC, ésta disminuyó drásticamente a 1.9%, 1.8% y 0.7% respectivamente (Figura 10B); en células TC-1 co-cultivadas con CEM-CaCu, la disminución fue de 11.5%, 4.6% y 1.4% respectivamente (Figura 10C); mientras que en el caso de TC-1 co-cultivada con CEM-MON, la disminución observada fue de 9%, 1.9% y 0.8% respectivamente. Cabe mencionar que la actividad citotóxica de los LTC sobre las diferentes estirpes de CEMs fueron bajas: en el caso de CEM-CNOR, CEM-NIC y CEM-CaCu éstas mostraron una actividad de 8%, 6.7% y 5.3% respectivamente, en proporción 1:100 células blanco:efectoras; mientras que en el caso de CEM-MON la actividad citotóxica fue muy baja, encontrándose valores de 0% (Figura 10A-D).

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que las diferentes estirpes de CEMs, ejercen en mayor o menor medida, una disminución en la expresión de moléculas clase I del CPH en las células tumorales, lo cual afecta de manera directamente en el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos antígeno específicos.



**BLANCO: EFECTORAS
(TC-1: LTC)**

9

Figura 10. CEMs participan en la disminución del reconocimiento inmune de células tumorales TC-1 por linfocitos T citotóxicos. Células tumorales TC-1 fueron cultivadas solas o en presencia de células estromales mesenquimales de Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC), de Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) y de Médula Ósea Normal (CEM-MON) durante 4 días. Las células TC-1 (blanco), obtenidas de los cultivos fueron retadas contra linfocitos T citotóxicos (células efectoras) obtenidos de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16. La actividad citotóxica de los linfocitos fue determinada en ensayos de liberación de ⁵¹Cr en co-cultivos de 4hrs de varias proporciones de células blanco:efectoras, los resultados se muestran como % de actividad citotóxica.

Análisis de citocinas en los co-cultivos de CEMs con células TC-1.

Por otra parte, se ha reportado que las CEMs secretan una gran cantidad de factores con actividad inmunosupresora, tales como Factor de Crecimiento Transformante- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Interleucina (IL-4), IL-5 y Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) entre otros (Locatelli *et al.*, 2007; Selmani *et al.*, 2008; Rasmusson *et al.*, 2006), los cuales son capaces de alterar el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, con un incremento en la secreción de Interleucina-10 (IL-10) e IL-4 y un decremento en la producción del Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) e Interferón- γ (IFN- γ) (Djouad *et al.*, 2007). Por tanto, con la finalidad de saber si la presencia de CEMs en los co-cultivos con células tumorales TC-1 inducían la producción de citocinas activadoras de la respuesta inmune celular Th1 (IL-2, TNF- α , IFN- γ) o supresoras de la misma Th2 (IL-4, IL-5), se llevó a cabo un análisis de estos factores en el sobrenadante de los co-cultivos celulares en las diferentes proporciones de células TC-1:CEMs estudiadas.

Como puede observarse en la figura 11.1, los niveles de detección de IL-2 en los co-cultivos de células TC-1 con las diferentes estirpes de CEMs y en las diferentes proporciones celulares, fueron muy similares a los detectados en el medio de cultivo solo (3pg/mL) y en los sobrenadantes de las células TC-1 y CEMs cultivadas de manera independiente.

Por otra parte, TNF- α no fue detectado en el medio de cultivo ni en los diferentes tipos de CEMs, mientras que las células TC-1 solas produjeron 1.32 pg/ml; no obstante cuando éstas fueron co-cultivadas con las diferentes estirpes de CEMs se encontraron ligeros incrementos de esta citocina en los cultivos celulares. Por ejemplo en los co-cultivos 1:1 TC-1:CEMs la citocina se detectó en el co-cultivo de TC-1:CEM-NIC (4.82 pg/ml); en la proporción 1:5 se encontró en TC-1:CEM-NIC (4.37 pg/ml), TC-1:CEM-CaCu (2.13pg/ml), TC-1:CEM-CNOR (1.59 pg/ml), TC-1:CEM-MON (1.40 pg/ml); en la proporción 1:10, la mayor producción de TNF- α se encontró en TC-1:CEM-CaCu (7.14 pg/ml), TC-1:CEM-NIC (4.55 pg/ml), TC-1:CEM-CNOR (3.51 pg/ml), TC-1:CEM-MON (1.59 pg/ml); y en la proporción 1:100 sólo se detectó en los co-cultivos de TC-1:CEM-CNOR (6.84 pg/ml) y TC-1:CEM-MON (2.14 pg/ml) (Figura 11.2).

La secreción de IFN- γ , en el medio de cultivo fue de 1.76 pg/ml, mientras que en el sobrenadante de las células TC-1 solas produjeron (2.35 pg/ml), en las diferentes estirpes de CEMs los niveles de esta citocina estuvieron por debajo de los niveles encontrados en el medio solo, sin embargo solo fue detectado en CEM-NIC (2.71 pg/ml). De igual manera que en TNF- α , cuando fueron co-cultivadas con CEMs en algunos casos se encontraron ligeros incrementos de IFN- γ en los cultivos celulares. Por ejemplo en los co-cultivos 1:1 TC-1:CEMs la citocina se detectó en el co-cultivo de TC-1:CEM-CaCu (3.41 pg/ml), TC-1:CEM-NIC (2.91 pg/ml); en la proporción 1:5, se encontraron en TC-1:CEM-NIC (3.16 pg/ml), TC-1:CEM-CNOR (2.84 pg/ml), TC-1:CEM-CaCu (2.81 pg/ml); en la proporción 1:10, se encontró en TC-1:CEM-CaCu (2.73 pg/ml), TC-1:CEM-NIC (3.43 pg/ml); y en la proporción 1:100 sólo se detectó en los co-cultivos de TC-1:CEM-CNOR (3.58 pg/ml) (Figura 11.3).

En el caso de IL-4, la detección de esta citocina en el medio de cultivo fue de 2.72 pg/ml, al igual que en IFN- γ en los cultivos de las diferentes estirpes de CEMs y TC-1 así como en los co-cultivos de TC-1:CEMs, en la mayoría de los casos los niveles de esta citocina estuvieron por debajo de los niveles encontrados en el medio solo (Figura 11.4), de igual manera indicando que esta citocina no fue producida en los cultivos celulares.

Finalmente, en lo que respecta a la IL-5, ésta fue detectada en una concentración de 1.23 pg/ml en el medio de cultivo, mientras que en el sobrenadante de las células TC-1 en 1.89 pg/ml, y sólo en las estirpes de CEMs, CEM-NIC (3.46 pg/ml) y CEM-CaCu (2.40 pg/ml), fueron detectadas. En la proporción 1:1 de TC-1:CEM-CaCu (3.53 pg/ml) y TC-1:CEM-NIC (2.36 pg/ml); en la proporción 1:5 de TC-1:CEM-CNOR (4.05 pg/ml), TC-1:CEM-CaCu (2.94 pg/ml) y TC-1:CEM-NIC (2.70 pg/ml); en la proporción 1:10 TC-1:CEM-NIC (4.31 pg/ml), TC-1:CEM-CaCu (2.74 pg/ml) y TC-1:CEM-CNOR (1.95 pg/ml); y en la proporción 1:100, TC-1:CEM-CaCu (5.23 pg/ml), TC-1:CEM-CNOR (4.64 pg/ml) (Figura 11.5).

Los resultados obtenidos muestran que las células TC-1 en presencia de CEMs son inducidas a secretar bajos niveles de citocinas como TNF- α e IL-5, en algunos casos de manera dependiente a la proporción de CEMs, las cuales pueden tener un efecto importante en la expresión de moléculas clase I de CPH en estas células tumorales y por tanto en el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos.

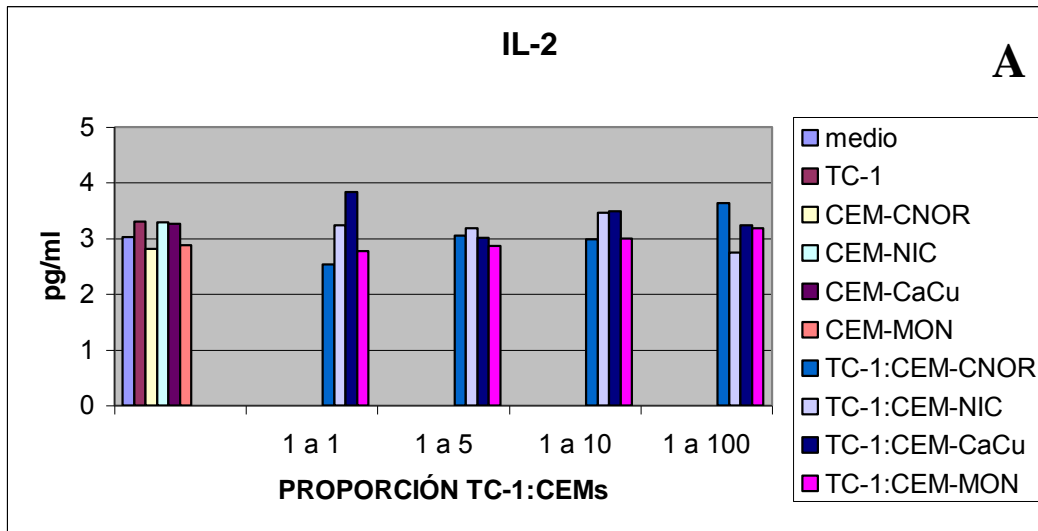


Figura 11.1. CEMs no inducen la producción de IL-2 en las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron cultivadas solas o en presencia de diferentes proporciones de células estromales mesenquimales de Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC), de Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) y de Médula Ósea Normal (CEM-MON) durante 4 días. Los niveles de IL-2 fueron detectados en el sobrenadante de los cultivos celulares por citometría de flujo.

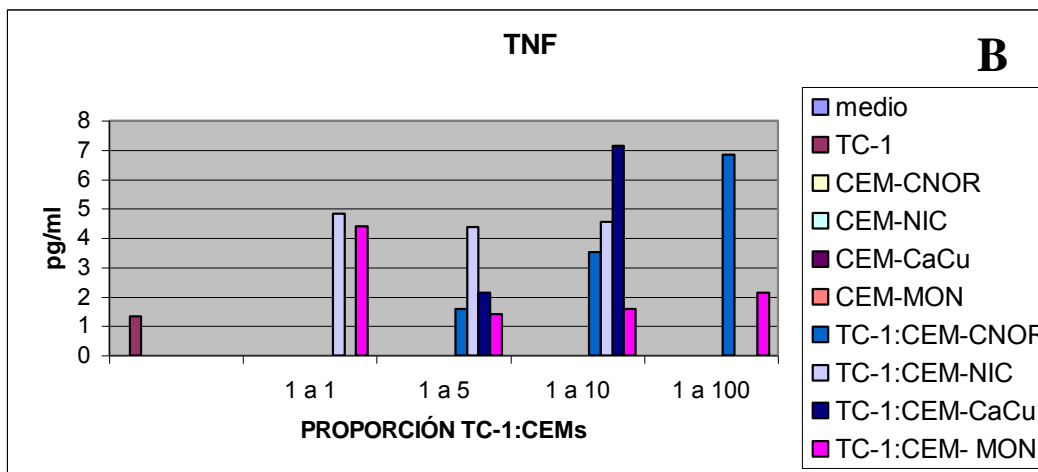


Figura 11.2. CEMs inducen la producción de TNF- α en las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron cultivadas solas o en presencia de diferentes proporciones de células estromales mesenquimales de Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC), de Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) y de Médula Ósea Normal (CEM-MON) durante 4 días. Los niveles de TNF- α fueron detectados en el sobrenadante de los cultivos celulares por citometría de flujo.

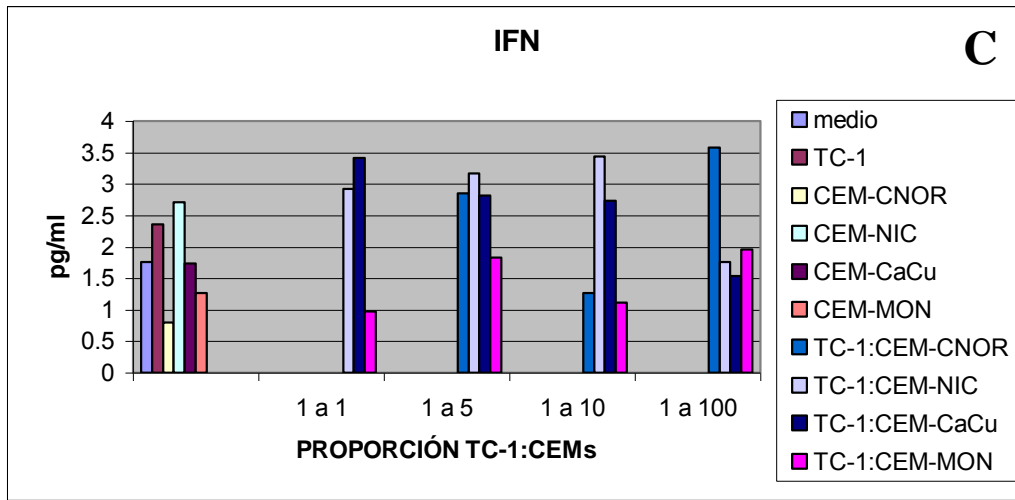


Figura 11.3. CEMs inducen la producción de IFN- γ en las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron cultivadas solas o en presencia de diferentes proporciones de células estromales mesenquimales de Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC), de Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) y de Médula Ósea Normal (CEM-MON) durante 4 días. Los niveles de IFN- γ fueron detectados en el sobrenadante de los cultivos celulares por citometría de flujo.

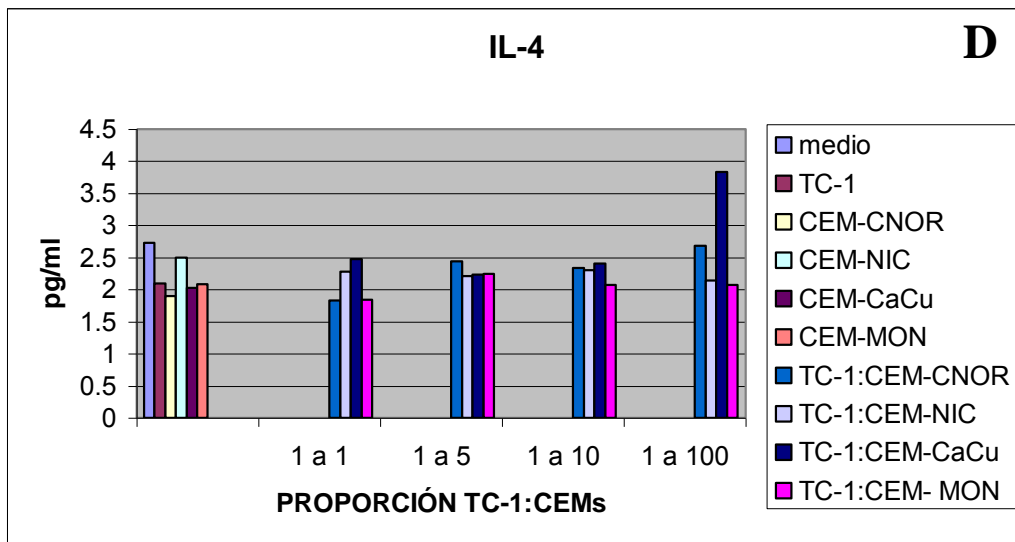


Figura 11.4. CEMs no inducen la producción de IL-4 en las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron cultivadas solas o en presencia de diferentes proporciones de células estromales mesenquimales de Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC), de Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) y de Médula Ósea Normal (CEM-MON) durante 4 días. Los niveles de IL-4 fueron detectados en el sobrenadante de los cultivos celulares por citometría de flujo.

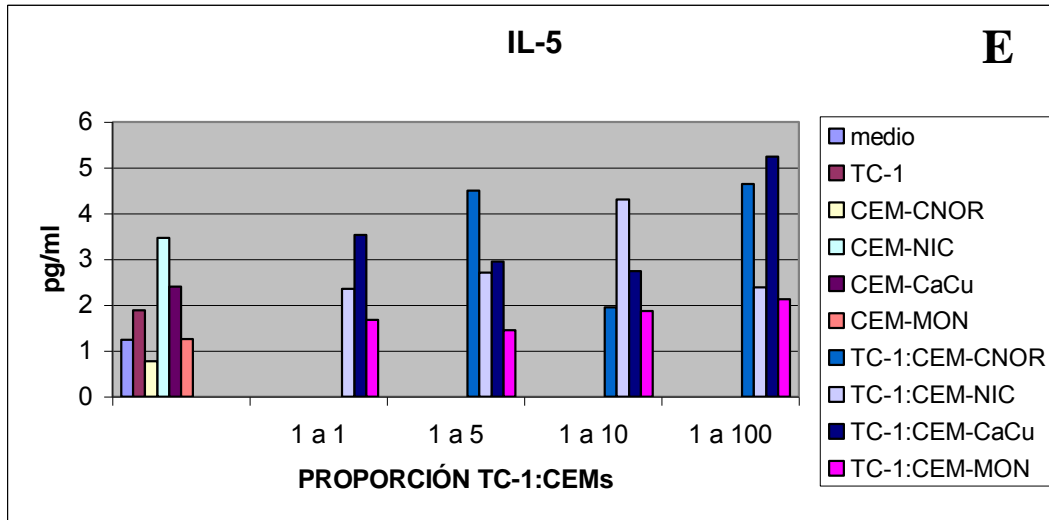


Figura 11.5. CEMs inducen la producción de IL-5 en las células tumorales TC-1. Células tumorales TC-1 fueron cultivadas solas o en presencia de diferentes proporciones de células estromales mesenquimales de Cérvix Normal (CEM-CNOR), Neoplasia Intraepitelial Cervical (CEM-NIC), de Cáncer Cérvico-Uterino (CEM-CaCu) y de Médula Ósea Normal (CEM-MON) durante 4 días. Los niveles de IL-5 fueron detectados en el sobrenadante de los cultivos celulares por citometría de flujo.

Discusión y análisis de resultados

Las células tumorales y células infectadas por virus pueden evadir el reconocimiento inmunológico a través de varios escenarios generales, dentro de los cuales destacan: 1) la pérdida o baja regulación de moléculas Clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH-I), críticas en el reconocimiento y activación de linfocitos T; 2) la expresión aberrante e interacciones que adversamente afectan la sobrevivencia de linfocitos o sus funciones efectoras; 3) la adquisición de alteraciones genéticas y epigenéticas que incrementan su resistencia apoptótica; y 4) factores confinados al microambiente tumoral de inmunosupresión (linfocitos T reguladores, células dendríticas tolerogénicas y células estromales mesenquimales (CEMs) inmunosupresoras), que pueden suprimir la respuesta efectora de linfocitos T citotóxicos (Ramasamy *et al*, 2008; Prevosto *et al*, 2007; y Di Ianni *et al*, 2008). En el caso particular de las CEMs, éstas células corresponden a una población de células madre no hematopoyéticas localizadas esencialmente alrededor de la vasculatura y trabécula de la médula ósea, aunque también se encuentran en muchos otros tejidos y debido a su gran capacidad de migrar, su presencia se ve incrementada en sitios de inflamación, heridas y ciertas patologías como el cáncer (Chapel *et al*, 2003). El papel de CEMs en el microambiente tumoral aún es incierto, sin embargo, algunos estudios con modelos tumorales singénicos, alogénicos y xenogénicos, han mostrado que las CEMs alogénicas y xenogénicas injertan de manera independiente al Complejo principal de histocompatibilidad del huésped, favoreciendo el implante y crecimiento tumoral (Yen and Yen, 2008; Karnoub *et al*, 2007; Djouad *et al*, 2003), en consecuencia, es posible que también puedan influir en la evasión de las células tumorales al reconocimiento inmune. Tomando en consideración esta premisa, el presente trabajo se realizó con la finalidad de analizar si CEMs derivadas de neoplasias intraepiteliales cervicales (CEM-NIC), de cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu), de tejido cervical normal (CEM-CNOR) y de otra fuente como la médula ósea (CEM-MON), influyen en la proliferación y reconocimiento inmune de células tumorales. Para ello, se utilizó un modelo *in vitro*, en el cual células tumorales de ratón, denominadas TC-1 (positivas a la expresión de las proteínas E6 y E7 de VPH-16) derivadas de la cepa de ratón C57BL/6 (haplotipo H2-D^b), fueron co-cultivadas con las diferentes CEMs, en diferentes proporciones, para evaluar la proliferación celular, la expresión de

moléculas H2-D^b en membrana y el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos, inducidos en ratones C57BL/6 mediante la inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16. De acuerdo a los resultados obtenidos, este modelo *in vitro*, nos permitió revelar los siguientes hallazgos: 1) las CEMs derivadas de tejido cervical neoplásico y normal, indujeron una mayor proliferación de las células tumorales TC-1, esencialmente cuando fueron co-cultivadas en la mayor proporción (1:1) con las células tumorales; 2) la expresión de las moléculas H2-D^b en las células TC-1, disminuyó de manera dosis dependiente con la cantidad de CEMs colocadas en los co-cultivos; 3) el reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1 por los linfocitos T citotóxicos (LTC), disminuyó de manera muy importante, después de ser co-cultivadas con las diferentes CEMs; finalmente, 4) en los co-cultivos de células tumorales TC-1 con las CEMs, se lograron detectar citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-5, las cuales pueden modular la expresión de moléculas CPH-I en las células tumorales.

El papel de las CEMs en el crecimiento de células tumorales, ha sido reportado en varios modelos experimentales xenogénicos al inocular líneas de células tumorales humanas en ratones y los resultados han sido diversos. Por ejemplo, en un modelo xenogénico co-inyectando 4 tipos distintos de células de cáncer de mama con CEMs de médula ósea humanas en ratones, se pudo observar, en por lo menos uno de los 4 grupos co-inyectados, una cinética de crecimiento más acelerada gracias a la presencia de CEMs (Karnaub *et al*, 2007). Más recientemente se ha visto que al inocular CEMs por vía sistémica, estas células muestran un potente efecto antiproliferativo sobre células de Sarcoma de Kaposi; dicho efecto es conservado a pesar de que se inoculen al mismo tiempo o después de establecido el tumor (Khakoo *et al*, 2006). Otros estudios adicionales, han mostrado un crecimiento *in vivo* de las líneas celulares K6 (derivada de CEMs anormales) y SW480 (de un cáncer de colon) cuando fueron trasplantadas con CEMs normales (Zhu *et al*, 2006; Kidd *et al*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que células estromales derivadas de médula ósea tienen la capacidad de iniciar cáncer gástrico, al ser reclutadas en el sitio de inflamación crónica inducida por infección por *helicobacter pylori* en el estómago (Houghton *et al*, 2004; Kidd *et al*, 2008). En otro reporte, CEMs derivadas de tejido adiposo, fueron implicadas en el incremento de la proliferación y sobrevivencia de células tumorales (Yu *et al*, 2008; Kidd *et al*, 2008). En el caso particular de nuestro estudio, las células tumorales TC-1, co-cultivadas con

las diferentes CEMs, a excepción de CEM-MON, indujeron mayor proliferación de las células tumorales TC-1, en la proporción 1:1 CEM:TC-1, comparada con las células tumorales cultivadas de manera independiente, coadyuvando entonces, a favorecer la proliferación de las células tumorales, muy probablemente debida a factores solubles y al soporte estructural, de manera similar a cuando estas células son administradas *in vivo* al formar redes estromales en el sitio tumoral (Spaeth *et al*, 2009; Nakamizo *et al*, 2005; De Palma *et al*, 2003; Kidd *et al*, 2008).

Por otra parte, en el sistema de cultivo, logramos detectar, en los sobrenadantes, algunas citocinas Th-1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) y Th-2 (IL-4 e IL-5) en bajos niveles (3-7pg/mL), las cuales pudieran modular la presentación antigénica por células presentadoras de antígeno y el reconocimiento inmune de células tumorales. Por ejemplo IFN- γ ha sido reportado como una citocina que intensifica la característica supresora de CEMs, debido a que induce la expresión de moléculas inhibitorias B7-H1 y B7-H2 en la membrana celular, así como a la producción de indoleamina-2, 3 deshidrogenasa (IDO), que son factores importantes en la inmunosupresión de células T junto con TNF- α , (Sheng *et al*; 2008; Ryan *et al*, 2007). Sin embargo, puesto que varios estudios han mostrado que IFN- γ es un inductor importante de la presentación de antígenos al inducir la expresión de moléculas CPH-I y CPH-II en las células blanco (Romieu-Mourez *et al*, 2007), es probable que otros factores producidos por las mismas CEMs puedan inhibir la expresión de estas moléculas en las células tumorales, por ejemplo TGF- β , el cual se ha descrito como un inhibidor importante de la presentación antigénica por células dendríticas y mesenquimales, al disminuir la expresión de moléculas CPH-I (Strobl *et al* 1999; Delvig *et al*, 2002; Francois *et al*, 2010). En nuestro estudio observamos que todas las estirpes de CEMs utilizadas, indujeron una disminución importante de la expresión de moléculas H2-D^b en las células tumorales TC-1, de manera dependiente de la cantidad de CEMs colocadas en los co-cultivos.

Por otro lado, tomando en consideración que las CEMs inducen disminución de la expresión de moléculas H2-D^b en las células tumorales TC-1, se procedió a evaluar si la presencia de las CEMs en los co-cultivos afectaba el reconocimiento inmune de las células tumorales. De acuerdo con nuestros resultados, las células tumorales TC-1, después de ser co-cultivadas con las diferentes estirpes de CEMs, redujeron considerablemente el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos. Estos resultados fortalecen la premisa de que, las CEMs

además de suprimir la respuesta inmune celular mediante la inhibición de la proliferación y activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, así como de su capacidad citotóxica como ha sido previamente reportado (Di Nicola *et al*, 2002; Krampera *et al*, 2003; Feng y Chen 2009; Glennie *et al.*, 2005; Rasmusson *et al*, 2003), además contribuyen de manera importante en la evasión del reconocimiento inmune por las células blanco, al disminuir la expresión de moléculas del CPH-I, como lo reportamos en este trabajo.

En el caso particular de infecciones producidas por VPH, las células T CD8+, juegan un papel importante en la limpieza satisfactoria de células infectadas por virus y/o células tumorales (Delgado *et al*, 2008; Wang, *et al*, 2008). Sin embargo, la disminución de la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I, causada por la presencia de CEMs en el sitio de infección o de la lesión tumoral, podría contribuir a la evasión de la respuesta inmune y por tanto en el desarrollo del tumor.

Conclusiones

La línea celular tumoral TC-1 (positivas a las proteínas E6 y E7 de VPH-16) derivadas de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D^b), en co-cultivo con Células estromales mesenquimales (CEMs) derivadas de Cérvix Normal (CEM-CNor), de Neoplasia Cervical Intraepitelial (CEM-NIC), y de Cáncer Cérvico Uterino (CEM-CaCu) a excepción de Médula Ósea Normal(CEM-MON), de humano, nos permitió observar que su presencia en diferentes proporciones incrementa ligeramente la proliferación de las células TC-1, además de que contribuyen de manera importante, al disminuir la expresión de moléculas del CPH-I (H2-D^b) en la membrana de TC-1, así como en la expresión de citocinas del perfil Th1/Th2 y por tanto que participan en la evasión del reconocimiento inmune de dicha línea celular por linfocitos T CD8+.

Perspectivas

De acuerdo a nuestros resultados, se encontró que las CEMs derivadas de tejidos cervicales (normales y de tumores) humanos, al co-cultivarse *in vitro* con células tumorales TC-1 de origen murino, favorecen su proliferación e inducen disminución de la expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (H2-D^b) en la membrana de las mismas. Este fenómeno puede repercutir de manera importante en el crecimiento tumoral *in vivo* y en la evasión de la respuesta inmune antitumoral. Por lo que resulta relevante, evaluar el papel de las CEMs en el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo*, ya sea de manera experimental en animales, o mediante análisis retrospectivo de su presencia en tumores durante la evolución de la enfermedad. Asimismo, será de gran interés evaluar *in vivo*, la participación de las CEMs en la respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T citotóxicos específicos. Por lo que, el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares de las CEMs en el desarrollo tumoral y su repercusión en la respuesta inmune del huésped, será de gran importancia para establecer nuevas estrategias inmunoterapéuticas contra el tumor.

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

VPH.....	Virus de Papiloma Humano
CEMs.....	Células estromales mesenquimales
CaCu.....	Cáncer Cérvico Uterino
CPH.....	Complejo principal de histocompatibilidad
CPH-I.....	Complejo principal de histocompatibilidad- Clase I
IL.....	Interleucina
IFN- γ	Interferón gamma
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
CNOR.....	Cérvix Normal
NIC.....	Neoplasia Intraepitelial Cervical
MON.....	Médula Ósea Normal

BIBLIOGRAFIA

- ❖ Abbas A y Linchman AH. 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª ed. Ed. Elsevier. España. 83.
- ❖ Albini A y Sporn M. 2007. The tumor microenvironment as a target for hemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 7: 139-147.
- ❖ Aníbal M. 1996. *Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos*. 5ta ed. Ed. Médica Panamericana: Buenos Aires. 593-605.
- ❖ Bobis S, Jarocha D and Majka M. 2006. Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical. *Folia Histochem Cytobiol*. 44: 215-230.
- ❖ Caplan A and Dennis J. 2006. Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem*. 98: 1076-1084.
- ❖ Chen Z, Schiffman M, Herrero R, De Salle R, and Burk R. 2007. Human Papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology*. 360: 447-453.
- ❖ Chapel A, Bertho J, Bensidhoum M, Fouillard L, Young R, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin N, Gourmelon P, Thierry D. 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *Gene Med*. 5: 1028-1038.
- ❖ Damania B. and Pipas J. 2009. *DNA Tumor Viruses*. Ed. Springer Science. New York. USA.. 105-109.
- ❖ Delgado F, Martínez E, Céspedes M, Bravo M, Navas M and Cómbita A. 2008. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. *J Immunol*. 126: 523-534
- ❖ Delvig A, Lee J, Chrzanowska-Lightowlers Z, Robinson J. 2002. TGF-beta1 and IFN-gamma cross regulate antigen presentation to CD4 T cells by macrophages. *J Leukoc Biol*. 72: 163-166.

- ❖ De Palma M, Venneri M, Roca C, and Naldini L. 2003. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 9: 789-795.
- ❖ Dias D, Van Doren J, Schlottmann S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, Boerckel P, Kessler J, Antonello J, Green T, Brown M, Smith J, Chirmule N, Barr E, Jansen K and Esser M. 2005. Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diag Lab Immunol.* 12: 959–969.
- ❖ Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cechini Z, Sportoletti P, Falzetti F y Tabilio A. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 36: 309-318.
- ❖ Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni P, Malteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99: 3838-3843.
- ❖ Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 102: 3837-3844.
- ❖ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 315-317.
- ❖ Estupiñán T, Trujillo G. 2004. Complejo mayor de histocompatibilidad y desarrollo de vacunas. *Nova.* 2: 59-70.
- ❖ Feng B and Chen L. 2009. Review of Mesenchymal Stem Cells and Tumors: Executioner or Coconspirator?. *Cancer Biother Radiopharm.* 24: 6.
- ❖ Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. (2006). *Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica.* *Rev Invest Clin.* 58: 498-511.
- ❖ Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin M-N, Bramson J and Galipeau J. 2009. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Stem Cells* 114: 2632-2638.

- ❖ Friedenstein A, Chailakhyan R, Latsinik N, Panasyuk A. and Keiliss-Borok I. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplant*. 17: 331–340.
- ❖ Galloway D, Mc Dugall J. 1996. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem Cancer Biol*. 7: 309-315.
- ❖ García P. 2007. Que hay en el horizonte sobre el virus del papiloma humano, vacunas y el control del cáncer cervical. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 24: 272-279.
- ❖ Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E, Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 105: 2821.
- ❖ Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2004. *Inmunología*. 5ª ed. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México D.F.1-9
- ❖ Guizar J. 2001. *Genética clínica. Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias*. 3ª ed. Ed. Manual Moderno. México. 763-79.
- ❖ Hebner C, Laimins L. 2006. Human papillomavirus: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 16:83-97.
- ❖ Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers A, Carlson J, Li H, Cai X, Fox J, Goldenring J, Wang T. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 306:1568-1571.
- ❖ Howley P. 2006. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Amer Clin and Climatol Assoc*. 117:113-127.
- ❖ INEGI. 2008. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx. Inmunidad (medicina), recuperado 15 Enero 2009 de [http://es.wikipedia.org/wiki/Inmunidad_\(medicina\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Inmunidad_(medicina)).
- ❖ Imagen VPH. Consultado en: www.prn.org/images/uploads/hpv_3d_high.jpg, recuperado 15 Enero 2010.
- ❖ Jodele S, Blavier L, Yoon J, De Clerck Y. 2006. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metast Rev*. 25: 35-43.

- ❖ Karnoub A, Dash A, Vo A, Sullivan A, Brooks M, Bell G, Richardson A, Polyak K, Tubo R, Weinberg R. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 449: 557-563.
- ❖ Khakoo A, Pati S, Anderson S, Reid W, Elshal M, Rovira I, Nguyen A, Malide D, Combs C, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers T, Stetler-Stevenson W, Frank J, Reitz M, Finkel T. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *Exp Med*. 203: 1235-1247.
- ❖ Knutson K and Disis M. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 54: 721-728.
- ❖ Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 101: 3722-3729.
- ❖ Kidd S; Spaeth E; Klopp A; Andreeff M; Hall B; Marini Fc. 2008. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy*. 10: 657-667.
- ❖ Le Blanc K, Ringden O. 2006. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 18: 586-91.
- ❖ Lin K, Guarnier F, Staveley-o'Carroll K. 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*. 56:21-6
- ❖ Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?. *Hematol*. 92: 872-877.
- ❖ Longworth M and Laimins L. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 68: 362-372.
- ❖ López S y Lizano S. 2006. Cáncer cérvico-uterino y el virus de papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 1: 31-55.
- ❖ Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatucci A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. 2005b. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response

- favours the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematol.* 90:516-25.
- ❖ Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G. 2008. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells.* 26:1275-1287.
 - ❖ Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C. 2000. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol.* 165: 7017–7024.
 - ❖ Molling J, de Gruijl T, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer C, Van Den Eertwegh A, Scheper R, von Blomberg M, Bontkes H. 2007. CD4 (+) CD25 (hi) regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 121:1749-1755.
 - ❖ Murphy K, Travers P, Walport M. 2008. Janeway's Immunobiology. 7^aed. Ed. Garland Science. New York. 887.
 - ❖ Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65: 3307-3318.
 - ❖ Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 2007. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer.* 98: 874-881.
 - ❖ Ostrand-Rosenberg S. 2004. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Curr Opin Immunol.* 16: 143–150.
 - ❖ Piersma S, Jordanova E, Van Poelgeest M, Kwappenberg K, Van der Hulst M, Drijfhout J, Melief C, Kenter G, Fleuren G, Offringa R, Van der Burg S. 2007. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer.* 67: 354-361.

- ❖ Pittenger MF, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas r, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284: 143-147.
- ❖ Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. 2007. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematol*. 92: 881-888.
- ❖ Ramasamy R, Kong C, Fong H, Vidyadaran S, Dazzi F. 2008. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol*. 251:131-136.
- ❖ Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplant*. 76: 1208-1213.
- ❖ Ravinovich G. 2004. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Ed. Medica panamericana Argentina. 207-215.
- ❖ Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RCh, and Shi Y. 2008. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. 2: 141–150.
- ❖ Rincón L, Pareja L, Jaramillo S, Aristizábal B. 2007. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: Una relación compleja. *Rev Colomb Obs Gin*, 58: 202-212.
- ❖ Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplant*. 81: 1390-7.
- ❖ Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. 2007. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol*. 179: 1549-1558.
- ❖ Roitt IM. 2003. Inmunología Fundamentos. 10ª ed. Ed. Médica panamericana. Argentina. 177-178.
- ❖ Rojas Espinosa O. 2001. Inmunológica (de memoria), 2ª ed. Ed.: Médica Panamericana. México, D.F. 256-267.

- ❖ Ryan J, Barry F, Murphy J, Mahon B. 2007. Interferon-gamma does not break, but the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 149: 353-363.
- ❖ Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella E, Deschaseaux F. 2008. Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Regulatory T Cells. *Stem Cells.* 26: 212-222.
- ❖ Setiadi A, David M, Seipp R, Hartikainen J, Gopaul R, Jefferies W. 2007. Epigenetic control of the immune escape mechanisms in malignant carcinomas. *Mol Cell Biol.* 27: 7886–7894
- ❖ Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y. 2008. A critical role of IFN gamma in priming of B7-H1. *Cell Res.* 18: 846-857.
- ❖ Spaeth E, Dembinski J, Sasser K, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. 2009. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *Plos one.* 4: 1-11.
- ❖ Stanley M. 2008. Immunobiology of HPV and vaccines. *Gynecologic Oncology.* 109: S15-S21.
- ❖ Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. 2002. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 62: 3603-3608.
- ❖ Strobl H, Knapp W. 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1:1283-1290.
- ❖ Tomasi T, Magner W, Khan A. 2006. Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 10: 1159–1184.
- ❖ Torréns IC, Mendoza O, Reyes O, Batte A, Granadillo M, Fernandez L, Guillén G. 2008. Candidato vacunal contra el virus de papiloma humano: alternativa para el tratamiento de tumores Cervico-uterinos. *Biotechnol aplic.* 25: 177-185.
- ❖ Trigo M, Jiménez P. 1997. Complejo mayor de histocompatibilidad. *JANO.* 1237: 52-58.

- ❖ Turley E, Veiseh M, Radisky D, Bissell M. 2008. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol.* 5: 280-290
- ❖ Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 28:219-26.
- ❖ Visser J, Nijman H, Hoogenboom B, Jager P, Van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, Van der Zee A, and Daemen T. 2007. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 150: 199-209.
- ❖ Wang X, Moscicki AB, Tsang L, Brokman A and Nakagawa M. 2008. Memory T cells specific for novel human papillomavirus type 16 (HPV 16) E6 epitopes in women whose HPV 16 infection has become undetectable. *J Immunol.* 15:937-945.
- ❖ Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol.* 189: 12-19.
- ❖ Wilson R, Fehrmann F, and Laimonis A. 2005. Role of the E1,E4 Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. *J Virol.* 79: 6732–6740.
- ❖ Yen B and Yen M. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer - for better or for worse. *Cancer Mol.* 4: 5-9.
- ❖ Yu J, Jun E, Bae Y, Jung J. 2008. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells.* 17: 463-473.