



---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA DE INMUNOLOGÍA**

**Análisis de la capacidad de las células estromales  
mesenquimales (CEM) derivadas de neoplasias cervicales  
(NIC y CaCu) para inducir linfocitos T reguladores.**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA  
P R E S E N T A :  
Biol. Rosario García Rocha**

**DIRECTORES:**

**Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont.  
Dr. Alberto Monroy García.**



México, D. F. 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

SIP-14 BIS

En la Ciudad de México D.F., siendo las 11:00 horas del día 18 del mes de marzo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Análisis de la capacidad de las células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de neoplasias cervicales (NIC y CaCu) para inducir linfocitos T reguladores**

Presentada por el alumno:

García

Apellido paterno

Rocha

materno

Rosario

nombre (s)

Con registro: A090362

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes:

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont

Dr. Alberto Monroy García

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres

Dr. Rommel Chacón Salinas

Dra. María de Lourdes Mora García

Dr. Rubén López Santiago

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. MANUEL JESÚS PIÑÓN LÓPEZ





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México D.F., el día 14 del mes de diciembre del año 2010, el(la) que suscribe Rosario García Rocha alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Inmunología con número de registro A090362, adscrito(a) a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont y el Dr. Alberto Monroy García cede los derechos del trabajo intitulado “Análisis de la capacidad de las células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de neoplasias cervicales (NIC y CaCu) para inducir linfocitos T reguladores”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo: [mmilafont@gmail.com](mailto:mmilafont@gmail.com) y [albertomon@yahoo.com](mailto:albertomon@yahoo.com) respectivamente. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont

Nombre  
Director interno

Dr. Alberto Monroy García

Nombre  
Director externo

  
Rosario García Rocha

Nombre  
Alumno

El presente trabajo se realizó en colaboración entre el Laboratorio de Inmunología Celular I del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; el Laboratorio de Inmunobiología del Cáncer de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero proporcionado por el CONACyT 82559/84071/106591/87183; SIP 20100710; FIS-IMSS C2007-060/G09-762/C2007/062 y DGAPA-PAPIIT IN223010.

Durante sus estudios de maestría la sustentante recibió los siguientes apoyos: beca del CONACyT con número de registro 228622 durante el periodo comprendido entre febrero de 2009 y enero de 2011; beca del programa PIFI-IPN de agosto 2009 a diciembre 2010; Beca Extraordinaria Institucional de Posgrado febrero-julio 2011; apoyo financiero como Becaria de Investigación con número de matrícula 99094427 proporcionado por Instituto Mexicano del Seguro Social en el periodo de marzo 2009 a febrero 2011; beca de Excelencia en Salud y Nutrición financiada por el grupo CARSO de agosto 2009 a julio 2011.

# ÍNDICE

	Página
Índice de figuras.	i
Índice de tablas.	v
Lista de abreviaturas.	vi
Resumen.	vii
Abstract.	viii
Introducción.	1
Cáncer cérvico-uterino (CaCu).	1
Virus de papiloma humano (HPV).	1
Sistema inmunológico y cáncer.	8
Regulación del sistema inmune.	9
Células estromales mesenquimales (CEM).	15
Justificación.	21
Hipótesis.	22
Objetivos.	23
Materiales y métodos.	24
Muestras biológicas.	24
Obtención de las CEM de tejidos cervicales normales y de pacientes con neoplasias intraepiteliales NIC y CaCu.	26
Inmunofenotipo de las CEM.	27
Capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.	27
Inducción de linfocitos T reguladores en presencia y ausencia de los péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y de las CEM .	29
Cultivo y estimulación de células T.	29

Análisis de la actividad inmunosupresora de las poblaciones de linfocitos T reguladores.	30
Resultados.	32
Obtención de estirpes de células estromales mesenquimales derivadas de tejido cervical normal, neoplasias intraepiteliales (NIC) y con cáncer cérvico-uterino (CaCu).	32
Capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.	34
Análisis de la capacidad de las CEM para inducir linfocitos T reguladores en presencia y ausencia de los péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16.	37
Evaluación de la actividad supresora de linfocitos T reguladores inducidos.	58
Discusión.	73
Conclusiones.	81
Perspectivas.	82
Bibliografía.	83
Anexo 1.	97

# ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Virus del papiloma humano.	2
Figura 2	Genoma del virus del papiloma humano.	2
Figura 3	Arquitectura de las células epiteliales estratificadas del cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección.	5
Figura 4	Progresión desde una lesión cervical benigna hacia cáncer cervical invasivo.	7
Figura 5	Esquema representativo de los principales tipos de células Treg.	11
Figura 6	Mecanismos básicos usados por las células Treg.	14
Figura 7	Potencial de diferenciación de las CEM.	17
Figura 8	Esquema representativo de la multipotencialidad de las CEM.	18
Figura 9	Morfología característica de las CEM obtenidas de biopsias de tejido cervical normal (CN) de cérvix con neoplasia intraepitelial cervical (cérvix-NIC), cérvix con cáncer cérvico-uterino (cérvix-CaCu) y CEM derivadas de médula ósea normal (MO).	32
Figura 10	Capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de las CEM.	36
Figura 11	Esquema de la selección de regiones para el análisis de las poblaciones de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^-$ .	37
Figura 12	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (04-10) (CEM-MON).	39
Figura 13	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (04-09) (CEM-MON).	40

Figura 14	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON).	41
Figura 15	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON).	42
Figura 16	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con CaCu (09-10) con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON).	43
Figura 17	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con CaCu (09-10) con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON).	44
Figura 18	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (01-08) (CEM-CN).	45
Figura 19	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (01-08) (CEM-CN).	46
Figura 20	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (02-08) (CEM-CN).	47
Figura 21	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (02-08) (CEM-CN).	48



Figura 22	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con NIC-I (02-09) (CEM-NIC).	49
Figura 23	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con NIC-I (02-09) (CEM-NIC).	50
Figura 24	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con NIC (03-09) (CEM-NIC).	51
Figura 25	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con NIC (03-09) (CEM-NIC).	52
Figura 26	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con CaCu (22-08) (CEM-CaCu).	53
Figura 27	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con CaCu (22-08) (CEM-CaCu).	54
Figura 28	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con CaCu (31-09) (CEM-CaCu).	55
Figura 29	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix con CaCu (31-09) (CEM-CaCu).	56

Figura 30	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora con CaCu (07-10) con células estromales mesenquimales de cérvix con CaCu (31-09) (CEM-CaCu).	57
Figura 31	Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora con CaCu (07-10) con células estromales mesenquimales de cérvix con CaCu (31-09) (CEM-CaCu).	58
Figura 32	Esquematación de selección de regiones para el análisis del porcentaje de células proliferantes en el cultivo.	59
Figura 33	Capacidad inmunosupresora de iTreg derivados del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-MON (04-09).	60
Figura 34	Capacidad inmunosupresora de iTreg derivados del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-MON (01-10).	61
Figura 35	Capacidad inmunosupresora de iTreg derivados del cultivo de CMSP de una paciente con CaCu (09-10) con CEM-MON (01-10).	62
Figura 36	Capacidad inmunosupresora de iTreg derivados del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CN (01-08).	63
Figura 37	Capacidad inmunosupresora de iTreg derivados del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CN (02-08).	64
Figura 38	Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-NIC (02-09).	65
Figura 39	Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-NIC (03-09).	66
Figura 40	Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CaCu (22-08).	67
Figura 41	Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CaCu (31-09).	68
Figura 42	Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una paciente con CaCu (07-10) con CEM-CaCu (31-09).	69

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Funciones de los productos génicos del virus de papiloma humano	3
Tabla 2 Sistema de clasificación de las lesiones precursoras del cáncer cérvico-uterino	6
Tabla 3 Antecedentes clínicos de las de las pacientes con NIC y con CaCu y de las donadoras sanas.	25
Tabla 4 Caracterización inmunofenotípica de las células estromales mesenquimales	34
Tabla 5 Porcentaje de linfocitos Treg inducidos con fenotipo CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> obtenidos a partir de co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con diferentes estirpes de células estromales mesenquimales (CEM).	70
Tabla 6 Porcentaje de linfocitos Treg de memoria inducidos con fenotipo CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> obtenidos a partir de co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con diferentes estirpes de células estromales mesenquimales (CEM).	71
Tabla 7 Capacidad inmunosupresora de linfocitos iTreg contenidas en las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (CMSP-iTreg) cultivadas en presencia de diferentes estirpes de células estromales mesenquimales (CEM).	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosinmonofosfato.
APC	Célula presentadora de antígeno.
CaCu	Cáncer cérvico-uterino.
CEM	Células estromales mesenquimales.
CFSE	Carboxifluorescein succinimidil éster.
CMSP-iTreg	Linfocitos T reguladores inducidos a partir de células mononucleares de sangre periférica.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico.
CTM	Células troncales mesenquimales.
FoxP3	Del inglés <i>forkhead box P3 transcription factor</i> .
HPV	Virus de papiloma humano.
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa.
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$ .
IL	Interleucina.
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular.
iTreg	Linfocitos T reguladores inducidos.
LAG3	Gen de activación de linfocitos 3.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
MON	Médula ósea normal.
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Células asesinas naturales.
NKT	Células T asesinas naturales.
nTreg	Linfocitos T reguladores naturales.
PBS	Solución salina amortiguador de fosfatos.
PHA	Fitohemaglutinina.
SFB	Suero fetal bovino.
TCR	Receptor de células T.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ .
Th	Linfocitos T cooperadores.
Treg	Linfocitos T reguladores

## RESUMEN.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un problema de salud pública en la población mexicana. Esta enfermedad se asocia con la infección por el virus del papiloma humano (HPV), principalmente el HPV-16. El fracaso de la respuesta inmune en pacientes con CaCu se ha asociado con la persistencia de la infección por HPV-16, y por la inducción de células T reguladoras (Treg)  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  durante el desarrollo del tumor. Sin embargo, hasta ahora los mecanismos de su inducción son desconocidos. Por otra parte se sabe que las células estromales mesenquimales (CEM) se caracterizan por tener actividad supresora sobre la activación y proliferación de linfocitos T y por su capacidad de inducir linfocitos T reguladores (Treg). En consecuencia, su presencia en tejidos tumorales puede ser importante para suprimir la respuesta inmune contra el tumor. En este estudio se postula que las CEM derivadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y CaCu pueden tener la capacidad de inducir células Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ . Para probar esta hipótesis, se establecieron co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donante sana y de una paciente con CaCu, con diferentes estirpes de CEM en la presencia o ausencia de péptidos antigénicos (15-25 aminoácidos) derivados de las proteínas E6 y E7 del HPV-16. Después de cuatro días de cultivo, se observó que las CEM derivadas de las neoplasias cervicales, indujeron células Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ , con frecuencias de 0.10 a 0.94% y de 0.03 a 0.61% respectivamente, respecto al total de CMSP. Mientras que CEM provenientes de cervix normal indujeron frecuencias de 0.19 a 0.76% y de 0.07 a 0.19% respectivamente. En todos los casos, la inducción de células Treg  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  fue asociada fuertemente con la presencia de péptidos E6 y E7 de HPV-16 en los cultivos celulares. Por otra parte, la adición de anti-CD3/CD28, incrementó fuertemente la inducción de Treg pero de manera independiente de la presencia de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. Por último, la capacidad inmunosupresora de las células Treg inducidas en estos cultivos celulares (CMSP-iTreg) se realizó en ensayos de inhibición de la proliferación de CMSP, la inhibición observada correlacionó con las frecuencias de Treg detectadas en los cultivos celulares. Estos resultados sugieren que las CEM derivadas de neoplasias cervicales y la presencia de los péptidos antigénicos de E6 y de E7 de HPV-16 pueden desempeñar un papel importante en la inducción de células Treg.

## ABSTRACT.

Cervical cancer (CC) is a public health problem in the Mexican population. This disease is associated with human papilloma virus (HPV) infection, mainly HPV-16. The failure of the immune response in patients with CC has been associated, among other factors, to the persistence of HPV-16 infection as well as with increasing amounts of T regulatory cells (Treg)  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  during malignancy development. However, until now the mechanisms of their induction are unknown. On the other hand, it has been recently reported that mesenchymal stromal cells (MSC) are characterized by their immunosuppressive effects on T cells through the production of immunosuppressive factors as well as in the induction of regulatory T cell (Treg). In consequence, their presence in tumor tissues may be important to suppress the immune response against the tumor. In this study we postulated that MSC derived from cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and CC may have the capability to induce  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  Treg cells. To test this hypothesis, we established co-cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and patients with CC with different strains of MSC in the presence or absence of antigenic peptides (15-25mers) derived from HPV-16 E6 and E7 proteins.

After four days of culture, we observed that MSC derived from cervical neoplasias (CIN and CC) were capable to induce  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  and  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  Treg with frequencies from 0.10 to 0.94% and from 0.03 to 0.61% respectively of the total of PBMC. While, MSC derived from normal cervix induced frequencies from 0.19 to 0.76% and from 0.07 to 0.19% respectively. In all cases the induction of  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  Treg was strongly associated with the presence of HPV-16 E6 and E7 antigenic peptides into the cell cultures. On the other hand, the addition of anti-CD3/CD28 antibodies to the cell cultures strongly increased the frequency of Treg and this induction was independent of the presence of HPV-16 E6 and E7 antigenic peptides. Finally, the suppressive capability of the Treg induced in these cell cultures (PBMC-iTreg) was performed in inhibitory PBMC proliferation assays and it was correlated with the frequencies of the Treg found in the cell cultures. These results suggest that tumor derived MSC and the presence of HPV-16 E6 and E7 antigens may play an important role in the induction of Treg.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **Cáncer cérvico-uterino (CaCu).**

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, pues en el mundo es la segunda causa de muerte debida a padecimientos oncológicos en mujeres, con unas 300,000 muertes al año, siendo la mayor tasa de incidencia entre la población femenina de los países en vía de desarrollo (Parkin *et al.*, 1999). En México, representa la segunda causa de muerte por tumores malignos, con un 13.9% del total, representando más de 4,000 muertes por año (INEGI, 2008).

Actualmente, es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es atribuible a la infección por el virus del papiloma humano (HPV) (Bosch & Munoz, 2002), ya que más del 99% de los tumores de CaCu presentan algún tipo de HPV y la infección por este virus es una de las enfermedades de transmisión sexual más común en las personas sexualmente activas (Bosch *et al.*, 2002; Walboomers *et al.*, 1997; Walboomers *et al.*, 1999). No obstante, la mayoría de estas infecciones son transitorias y no son clínicamente evidentes, debido a que entre el 70-90% de las mujeres infectadas resuelven la infección entre 12 y 30 meses (Evander *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1998); sin embargo se estima que 5- 8% de las mujeres que padecen infección persistente desarrollan CaCu (Torroella *et al.*, 1998).

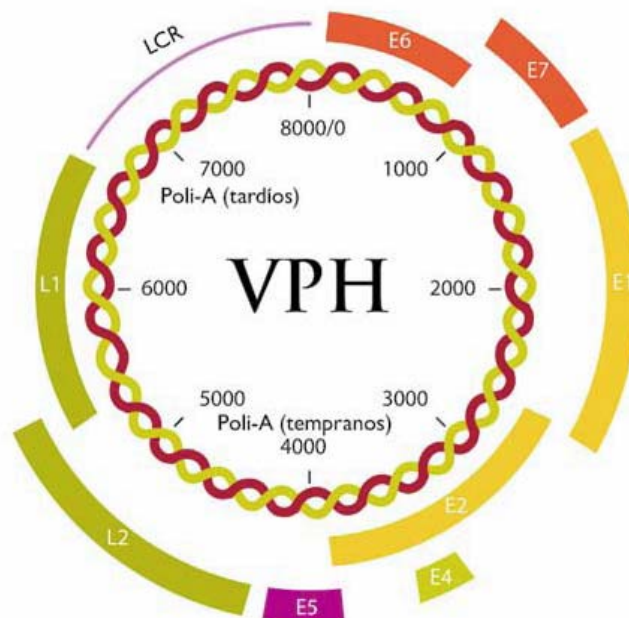
### **Virus del papiloma humano (HPV).**

El HPV tiene una estructura icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) con un diámetro de aproximadamente 55 nm que contiene el genoma viral, compuesto de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases de longitud (Figura 1) (Hebner & Laimins, 2006).



**Figura 1. Virus de papiloma humano.** Se muestra la estructura icosaédrica de 72 capsómeros. (Tomado de: [http://www.cervicalcancerinfo.co.uk/images/hpv\\_virus.jpg](http://www.cervicalcancerinfo.co.uk/images/hpv_virus.jpg))

El genoma del HPV se divide en tres regiones: la región de control grande (*large control region*, LCR) que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (*early region*, E1 a E7) y la región que corresponde a las proteínas tardías (*late region*, L1 y L2) (Figura 2 y Tabla 1) (McMurray, *et al.*, 2001).



**Figura 2. Genoma del HPV.** Se muestra la región de control grande (LCR), la región de transcripción temprana (ER) que contiene los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7; y la región de transcripción tardía (LR) que tiene los genes L1 y L2, las cuales constituyen la cápside (Tomado de: Muñoz *et al.* 2006).



**Tabla 1. Funciones de los productos génicos del HPV.** (Tomado de Zur, 2000; Huibregtse *et al.*, 1991; Munger *et al.*, 1992; DiMaio *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Syrjanen & Syrjänen, 1999).

		<b>Funciones</b>
<b>Proteínas virales tempranas</b>	E1	Replicación del DNA viral y mantenimiento episomal.
	E2	Transcripción viral, replicación y transformación.
	E4	Modifica el citoesqueleto para permitir la liberación del virus.
	E5	Proteína transformante: inhibición de la degradación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).
	E6	Proteína transformante: inactiva la proteína p53 e inhibe la apoptosis.
	E7	Proteína transformante: interfiere con las proteínas supresoras del retinoblastoma (Rb).
<b>Proteínas virales tardías</b>	L1 y L2	Proteínas principales de la cápside, L1 constituye el 90% y L2 el 10%.

El virus del papiloma humano tiene afinidad por las células epiteliales por lo que puede infectar la piel, el tracto ano genital, boca, laringe y esófago (Tewari, *et al.*, 2000), hasta ahora, por lo menos se han identificado 100 tipos (Zur, 2008) y los tipos de HPV's genitales son clasificados según su potencial para inducir malignidad en:

- \* Alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 36, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59.
- \* Probable alto riesgo: 26, 53, 66, 68, 73, 82.
- \* Bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 (Barzon *et al.*, 2008).

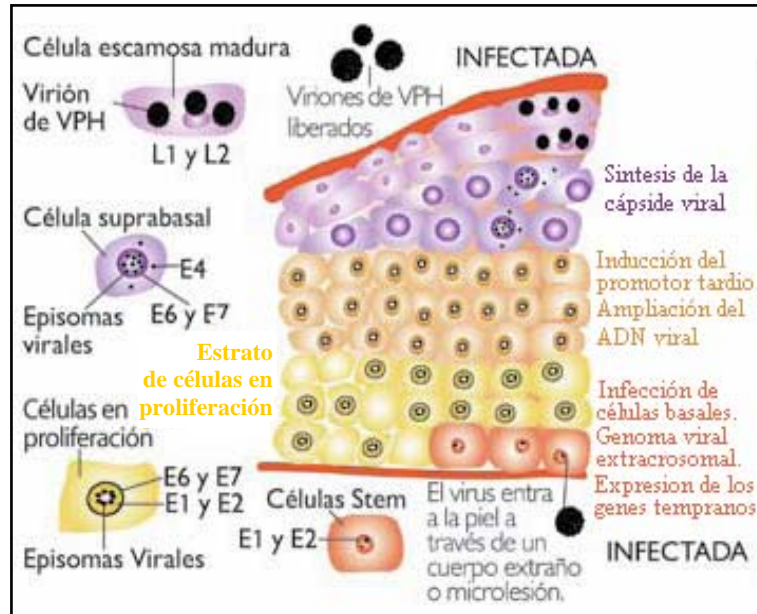
El tipo 16 es el que se presenta con mayor frecuencia en el cáncer de células escamosas, seguido por el tipo 18, asociado preferentemente al adenocarcinoma (Cuzick *et al.*, 1996). Se estima que los tipos de alto riesgo se encuentran en cerca del 94% de los casos de cáncer cervical y únicamente el tipo 16 se encuentra en la mitad de ellos (Bosch *et al.*, 1995). Mientras que en el 40% de las infecciones presentan varios tipos virales (Chaturvedi *et al.*, 2011).

La infección por el HPV aparentemente se produce de manera sencilla y relativamente pronto tras el contacto con células infectadas de la mucosa genital. La probabilidad acumulada de adquirir una infección cervical por el HPV es muy alta en individuos sexualmente activos (Ponten & Guo, 1998).

El ciclo del HPV se inicia cuando las partículas infecciosas alcanzan la capa basal del epitelio cervical. Se sugiere que para mantener la infección, el virus tiene que infectar a más de una célula germinal del epitelio (Muñoz *et al.*, 2006).

El ciclo de replicación dentro del epitelio puede dividirse en dos partes. Inicialmente, el genoma viral se encuentra en forma episomal, manteniendo un número bajo de copias, pero aún replicándose dentro de una célula competente infectada. Las proteínas virales E1 y E2 son esenciales para esta replicación (Douglas *et al.*, 2006). Una vez que las células basales son empujadas hacia los compartimentos suprabasales, pierden su capacidad para dividirse y en su lugar inician el programa terminal de diferenciación. El HPV se replica en este compartimiento, y para su liberación dentro del ambiente, toma ventaja de la desintegración de las células epiteliales debida a su recambio natural en las capas superficiales, las moléculas críticas en este proceso de replicación viral son las proteínas E6 y E7 (Muñoz *et al.*, 2006).

Durante la fase de diferenciación celular, la degradación de p53 por la proteína E6 y la abolición de las funciones de pRB por la proteína E7 conducen a la reactivación de la maquinaria de síntesis de DNA (Burd, 2003; Kanda & Kukimoto 2006) (Figura 3). Después de la propagación viral las células del huésped usualmente mueren. En raras ocasiones, en algunas de las células infectadas, los genes que corresponden a las proteínas de E6 y E7 son integrados dentro del DNA celular y las células que expresan continuamente proteínas E6 y E7 son inmortalizadas y algunas veces adquieren fenotipos malignos inducidos por los daños acumulados del DNA (Figura 3) (Kanda & Kukimoto, 2006).



**Figura 3. Arquitectura de las células epiteliales estratificadas del cérvix y expresión de las proteínas virales después de la infección.** Las células normales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio. Después de que el HPV infecta estas células en la membrana basal, se expresan las proteínas tempranas. Bajo la influencia de estas proteínas, las células que están en división se expanden verticalmente y la diferenciación celular es retrasada e incompleta. Las proteínas virales se expresan secuencialmente con la diferenciación y los viriones se producen en las capas superiores del epitelio. (Tomado de López -Saavedra & Lizano-Soberón. 2006).

La evolución a cáncer invasor, a partir de la lesión inicial, puede durar hasta 20 años y no todas las mujeres que presentan las lesiones precursoras desarrollan la forma invasora de esta enfermedad. La lenta evolución de la enfermedad y la accesibilidad de las células del cérvix para su estudio permiten tener tiempo y herramientas para detectar y erradicar la enfermedad, si el diagnóstico se hace oportunamente (Kiviat, 1996).

Uno de los avances más importantes en el tratamiento de la neoplasia de cérvix ha sido la identificación de las lesiones precursoras. La primera clasificación se realizó en 1930 y se designó con el término de displasia. De acuerdo a su gravedad se denominaba: leve, moderada o severa y en 1968 se acuñó el concepto de neoplasia cervical intraepitelial (NIC), con diferentes grados: NIC I, NIC II, NIC III o carcinoma *in situ* (Hadzic *et al.*, 1999) (Tabla 2).

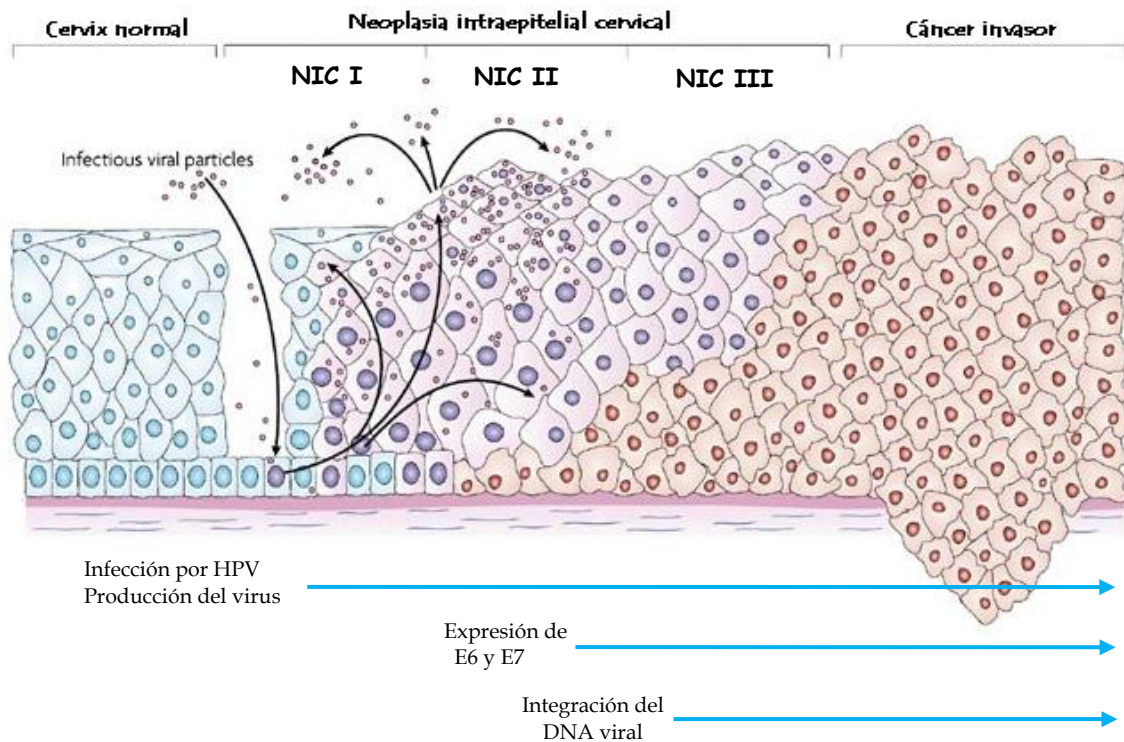
**Tabla 2. Sistema de clasificación de las lesiones precursoras del cáncer cérvico-uterino.** (Modificado de: Lacruz, 2003).

<b>Grado de lesión</b>	<b>Clasificación</b>
Infección por HPV	
*NIC I	Displasia leve
NIC II	Displasia moderada
NIC III	Displasia severa o carcinoma <i>in situ</i>

\*NIC: neoplasia cervical intraepitelial.

Las lesiones premalignas más leves son las NIC I, que consisten en la presencia de células anormales en la tercera parte inferior del epitelio, conservando su arquitectura normal las otras dos terceras partes. El siguiente cambio en el espectro de la enfermedad, consiste en la aparición de células anormales en dos terceras partes del epitelio, presentando diferenciación persistente (pero anormal), estas lesiones entran dentro de los límites de la NIC II. A medida que la enfermedad avanza, hay una pérdida progresiva de la diferenciación que afecta a más y más capas del epitelio, hasta que éste queda sustituido totalmente por células anormales, que no muestran ninguna diferenciación en su superficie. Esta lesión pertenece a las NIC III o el llamado cáncer *in situ* (Coppleson *et al.*, 1993).

Cuando las células neoplásicas del epitelio cervical logran invadir el estroma hasta la profundidad máxima de 3 mm bajo la base del epitelio y no hay datos de invasión del espacio vascular linfático, se le llama cáncer cérvico-uterino microinvasor y cuando la invasión excede de 3 mm o hay invasión del espacio linfático vascular, la lesión se considera como cáncer cérvico-uterino francamente invasor (Figura 4) (Depriest *et al.*, 1990)



**Figura 4. Progresión desde una lesión cervical benigna hacia cáncer cervical invasivo.** NIC I, presencia de células anormales en la tercera parte inferior del epitelio. NIC II, aparición de células anormales en dos terceras partes del epitelio. NIC III, el epitelio queda totalmente sustituido por células anormales (Coppleson *et al.*, 1993). Cuando las células neoplásicas invaden el estroma la lesión se considera cáncer (Depriest *et al.*, 1990).

Las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o desactivar los mecanismos efectoros de células T anti-tumorales. Dichos mecanismos incluyen alteraciones en la presentación antigénica, defectos en señales intracelulares de células T, incremento de la secreción de factores inmunosupresores, activación de vías de señalización inhibitorias en células del sistema inmune y reclutamiento selectivo de poblaciones reguladoras. En conjunto estos mecanismos se combinan en estados avanzados del cáncer limitando la capacidad del sistema inmune de contrarrestar el crecimiento del tumor (Rabinovich *et al.*, 2007).

## **Sistema inmunológico y cáncer.**

El sistema inmune de los mamíferos ha evolucionado para proteger al organismo de una gran diversidad de agentes dañinos, incluso los tumores. Sin embargo, los tumores malignos presentan un desafío especial al sistema inmune (Qin, 2009).

El papel del sistema inmune en la oncogénesis se menciona por primera vez en el siglo XVIII, debido a que algunos pacientes con cáncer experimentaban regresiones de la enfermedad, luego de haber presentado infecciones bacterianas (Starnes, 1992). Posteriormente, Burnet y Thomas en 1957, describieron lo que se conoce como el principio de la “inmunovigilancia” que postula que el sistema inmune monitorea todas las células del cuerpo, detectando antígenos anormales provenientes de una célula o de un grupo de células que pudieran ser cancerosas, procurando destruirlas y previniendo el crecimiento de tumores (Burnet, 1970).

Actualmente el término inmunovigilancia ha sido reemplazado por el de “inmunoedición”, el cual explica de mejor manera, lo que ocurre entre el sistema inmune del huésped y el tumor. Esta interacción se da en las tres fases de la inmunoedición (Dunn *et al.*, 2004).

**Eliminación.** El sistema inmunológico del huésped puede prevenir un crecimiento tumoral, trabajando en conjunto con la respuesta inmune innata y adaptativa sin que haya progresión a las siguientes fases. Esto produce liberación de citocinas proinflamatorias, las que reclutan células del sistema inmune innato, como las células NK, NKT, linfocitos  $T\gamma\delta$ , macrófagos y células dendríticas. Éstas producen  $IFN\gamma$  e IL-12 capaces de producir la muerte tumoral al afectar la proliferación, efecto anti-angiogénico y promover la apoptosis. Las células tumorales muertas son endocitadas por las células dendríticas y migran a los ganglios linfáticos, en donde presentan los antígenos asociados al tumor a las células T. De los ganglios linfáticos, los linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  migran al tumor, identificando y eliminando a las células tumorales, además de producir  $IFN\gamma$  y otras citocinas que ayudan a la muerte tumoral (Shankaran V, *et al.*, 2001, Street, *et al.*, 2004).

**Equilibrio.** Debido a la rápida tasa de reproducción y mutación que tienen las células tumorales, se produce una selección de clones resistentes al sistema inmune del huésped. Este

estado se puede mantener durante muchos años, en donde las células tumorales son eliminadas, mientras las clonas resistentes permanecen (Burnet, 1970).

**Escape.** En la fase final de la inmunoección, en donde los tumores desactivan el reconocimiento inmune permitiendo la progresión de la enfermedad, en donde se promueve la angiogénesis y la invasión de tejidos, el escape constituye distintos eventos y procesos que pueden incluir la pérdida de la maquinaria de presentación de antígenos, expresión de moléculas inhibitorias de apoptosis o anergia e inducir células T reguladoras (Dunn, *et al.*, 2002, Dunn *et al.*, 2004).

### **Regulación del sistema inmune.**

Durante la última década, se ha confirmado la hipótesis de que los tumores pueden alterar la inmunidad antitumoral promoviendo la expansión, el reclutamiento y la activación de distintas poblaciones de linfocitos T reguladores (Treg) (Sakaguchi, 2004, Zou, 2005). Los linfocitos T reguladores naturales (nTreg) expresan, desde su diferenciación en timo, el patrón de expresión CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y FoxP3 (*forkhead box P3 transcription factor*), fueron identificados por Sakaguchi y colaboradores en el 2005 como un subtipo natural de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (aproximadamente 5-10% de los linfocitos T presentes en sangre periférica) que constitutivamente expresan la molécula CD25 y que suprimen respuestas de linfocitos T efectoras (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) *in vivo* (Curiel *et al.*, 2004, Horwitz *et al.*, 2008). Otra subpoblación de linfocitos en sangre periférica, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y que por acción de TGF-β e IL-2, pueden llegar a expresar CD25 y FoxP3; se les conoce como Treg inducidos (iTreg) (Figura 5) (Horwitz *et al.*, 2008).

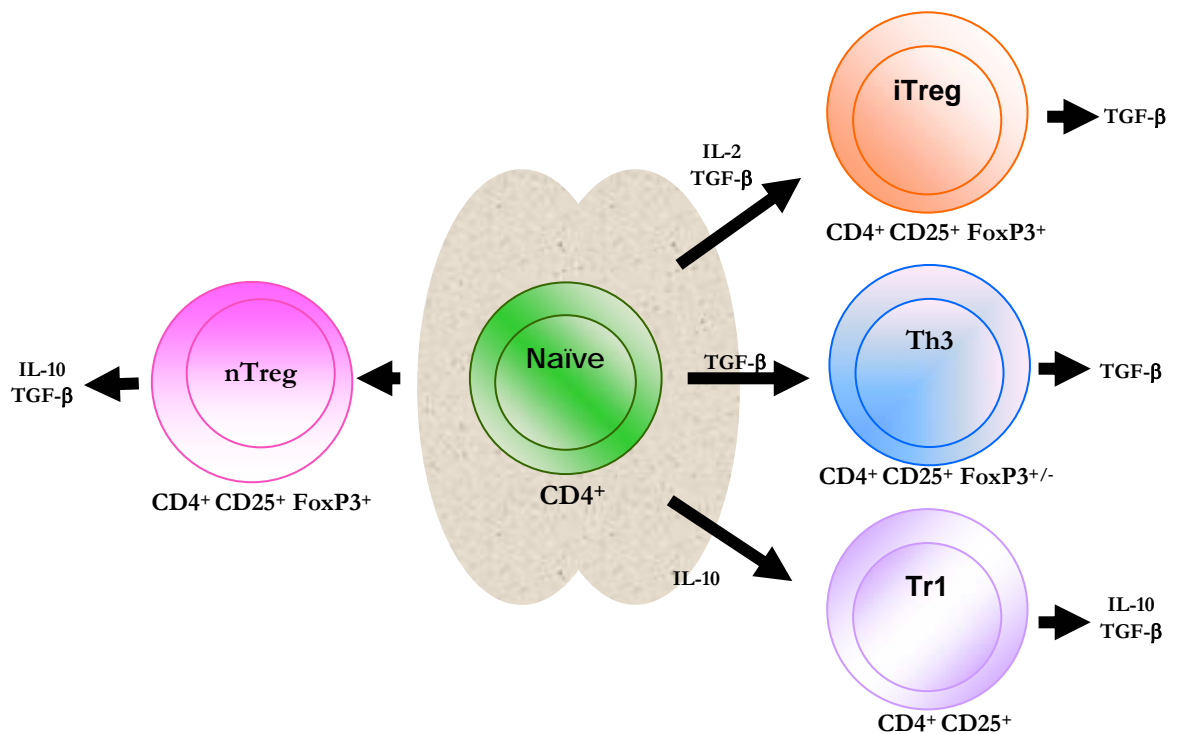
Los linfocitos Treg también se asocian con la expresión baja de CD127, (Seddiki *et al.*, 2006) De hecho, este marcador está asociado con la adquisición de la función reguladora (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007) y es inversa a la expresión de FoxP3 (Liu *et al.*, 2006). A pesar de ello, no se conoce aún el mecanismo molecular mediante el cual FoxP3 media la capacidad supresora, pudiendo ser tanto por la inhibición directa de la señalización a través del TCR o, de forma indirecta, mediante la transcripción de un factor que inhiba las señales inducidas por la señalización a través del TCR (Long & Word, 2007). La importancia de FoxP3 parece radicar

en su capacidad de amplificar y estabilizar la transcripción de genes específicos de regulación, lo que mantiene la homeostasis de las células Treg, más que iniciar la generación de las mismas (Gavin *et al.*, 2007). De hecho, FoxP3 se restringe a la población de células Treg en ratones, pero no en humanos, donde se expresa no sólo en células *naïve* recién activadas sino también en células T de memoria (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2006).

Además de estas células Treg se han descrito otro tipo de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, denominadas Tr1 (Figura 5). Estas células se generan en la periferia a partir de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> *naïve* tras la estimulación antigénica en condiciones de co-estimulación limitante. Entre los factores inductores están la citocina IL-10 y las células dendríticas inmaduras. Mientras que las células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> actúan a través del contacto celular, las Tr1 lo hacen a través de citocinas supresoras como IL-10 y TGF-β. Por otro lado, las células Tr1 no parecen expresar FoxP3; no existen marcadores de superficie celular que las identifiquen, aunque se distinguen de las células Th2 por el patrón de citocinas que secretan (IL-2<sup>low</sup>, IL-4<sup>-</sup>, IL-5<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, TGF-β<sup>+</sup>). Además, mientras que las células nTreg migran a los ganglios linfáticos (por ello expresan niveles elevados de CD62L), las células Tr1 migran hacia sitios de inflamación. Las células Tr1 suprimen las respuestas de células T *naïve* y de memoria así como la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias de las células presentadoras de antígeno. La inducción y activación inicial de estas células es antígeno-dependiente pero, una vez activadas, su capacidad supresora no es específica de antígeno (Roncarolo *et al.*, 2006, Roncarolo & Battaglia, 2007).

Existe un segundo tipo de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras inducidas que se denominan Th3 y secretan TGF-β (Figura 5) (MacDonald, 1998). Al igual que con las células Tr1, tampoco existen marcadores fenotípicos que las identifiquen (Liu *et al.*, 2007, Carrier *et al.*, 2007).





**Figura 5. Esquema representativo de los principales tipos de células T reguladoras.** (Modificado de: Jonuleit & Schmitt 2003).

Se han propuesto diferentes mecanismos supresores en los que participan las células Treg que han sido abordadas usando modelos *in vitro* e *in vivo* de ratón. Los múltiples mecanismos incluyen el contacto célula-célula y factores solubles (Shevach 2002; Sakaguchi, 2005).

### Supresión por citocinas.

La IL-10 es considerada como una de las moléculas clave que participan en la inmunosupresión. Inicialmente se reportó que una estimulación antigénica crónica *in vivo* podría resultar en la generación de células T CD4<sup>+</sup> anérgicas que secretaban IL-10 (Buer *et al.*, 1998).

En los últimos años se desarrolló un modelo *in vitro* e *in vivo* en donde se observó que la supresión puede estar mediada por citocinas como IL-10 y TGF-β que pueden interferir con la activación de las células. Se ha observado la participación esencial de TGF-β en la supresión y en la señalización del receptor de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 6) (von Boehmer 2005). También se ha descrito que la citocina inhibitoria llamada IL-35 que es expresada preferentemente por las células Treg, es necesaria para su actividad inmunosupresora. Es importante destacar que *in*

*vitro* es suficiente la expresión de IL-35 para que las células Treg supriman la proliferación de las células T (Collison *et al.*, 2007). Aún queda mucho por definir sobre la actividad de IL-35 y su contribución a la función de las células Treg o si está implicada en el funcionamiento y en el desarrollo de otros tipos de células tales como los macrófagos y las células dendríticas (Figura 6) (Vignali *et al.*, 2008).

### **Citolisis.**

Las células T CD8<sup>+</sup> y las células NK utilizan perforinas y granzimas para eliminar células infectadas y células tumorales. Se ha demostrado que las células Treg activadas de humanos presentan granzima y pueden matar a las células T efectoras y a las células presentadoras de antígeno a través de perforinas (Figura 6) (Grossman *et al.*, 2004).

### **I8**

#### **Interrupción metabólica.**

El receptor de IL-2 consiste en un complejo heterotrimérico compuesto por CD25 (cadena  $\alpha$ ), CD122 (cadena  $\beta$ ) y CD132 (cadena  $\gamma$ ). Las células Treg expresan este receptor heterotrimérico que tiene 100 veces mayor afinidad por la IL-2 que la forma dimérica (compuesta por CD122 y CD132). Por tanto, la competencia por la IL-2 entre las células Treg y las células T convencionales es sugerido como un mecanismo supresor (Figura 6) (Shevach 2002; von Boehmer 2005).

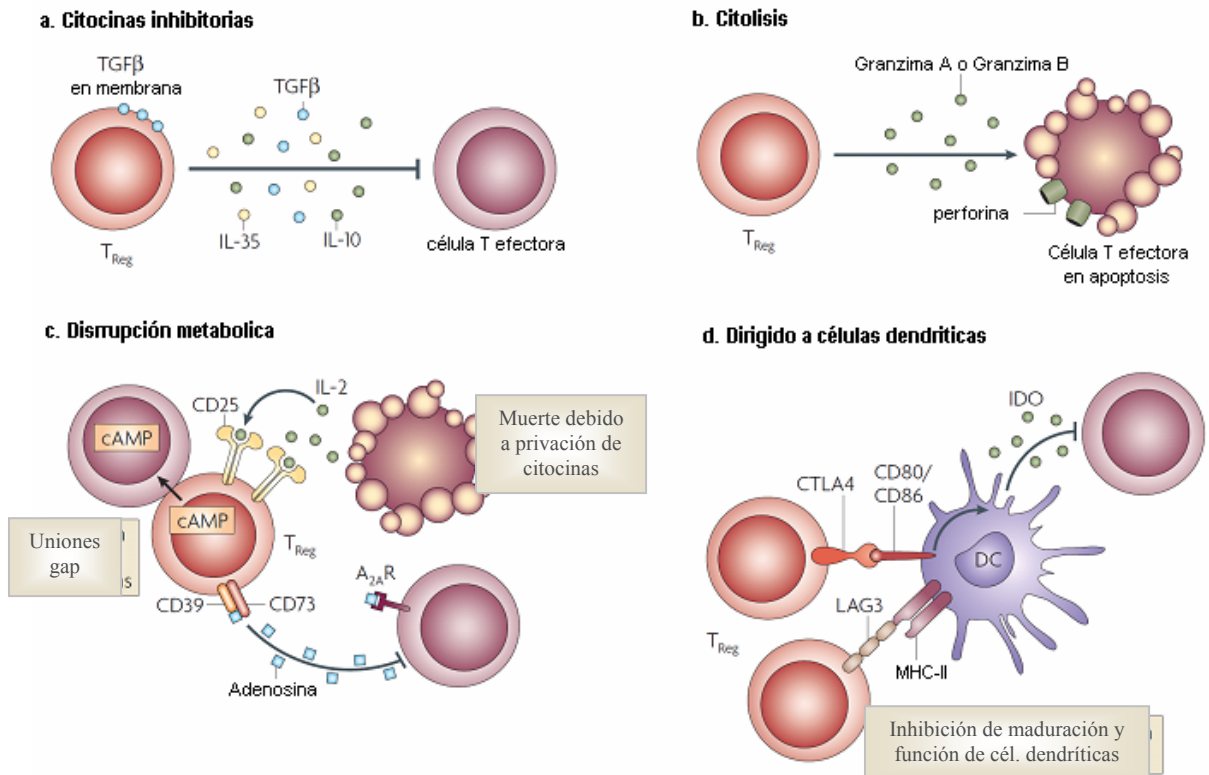
Recientemente se han propuesto dos nuevos mecanismos sobre la actividad de las células Treg: la inducción de la liberación intracelular y extracelular de nucleósidos de adenosina; relacionados con la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 que han demostrado generar adenosina pericelular que suprime la función de las células T efectoras a través de la activación del receptor de adenosina 2A (A<sub>2</sub>R) (Figura 6) (Deaglio *et al.*, 2007, Borsellino *et al.*, 2007). Por otro lado se ha sugerido que las células Treg suprimen la función efectora de las células T directamente mediante la transferencia de AMP cíclico (AMPc) que es un potente inhibidor mediante las uniones célula-célula (Figura 6) (Bopp *et al.*, 2007).

### **Supresión por células dendríticas.**

Las células Treg pueden modular la maduración y la función de las células dendríticas que son necesarias para la activación de las células T efectoras. En este proceso se da la participación de la molécula antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) que es expresada constitutivamente por las Treg (Figura 6) (Read *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que las células Treg median la expresión de indolamina 2,2-dioxigenasa (IDO) en la células dendríticas, el cual es un potente regulador de la molécula que induce metabolitos pro-apoptóticos del catabolismo del triptófano, dando como resultado la supresión de las células T efectoras a través de un mecanismo dependiente de las interacciones entre CTLA-4 y CD80 y/o CD86 (Figura 6) (Mellor & Munn 2004; Fallarino *et al.*, 2003; Mellor 2004).

En estudios recientes también se demostró que el gen de activación de linfocitos 3 (LAG3, también conocido como CD223) puede bloquear la maduración de las células dendríticas. LAG3 es un homólogo de CD4 que se une con muy alta afinidad a las moléculas MHC de clase II, la expresión de esta molécula en los Treg tiene un efecto negativo sobre la función de las células dendríticas (Figura 6) (Workman & Vignali 2004; Huang *et al.*, 2004).



**Figura 6. Mecanismos básicos usados por las células Treg.** **a.** Inhibición por citocinas, IL-10, IL-35 y TGF-β. **b.** Citólisis por mecanismos de muerte dependientes de granzima A, granzima B y perforina. **c.** Disrupción metabólica incluye el receptor de alta afinidad CD25 (cadena α para receptor de IL-2), apoptosis mediante privación de citosina. Inhibición mediante el ciclo de AMP (cAMP) e inmunosupresión por generación de adenosina por CD39 y/o CD73 mediada por el receptor A<sub>2A</sub>. **d.** Inhibición de células dendríticas (DC) incluye mecanismos de modulación de la maduración y función de DC tales como la activación del gen LAG3 que inhibe la maduración de las DCs, y citotoxicidad por el Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) mediado por CD80 y CD86 induciendo indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que es una molécula inmunosupresora formulada por las DCs (Vignali *et al.*, 2008).

Un estudio demostró que las células Treg controlan el estímulo del linfocito T cooperador (Th) antígeno-específico en pacientes con cáncer (Nishikawa *et al.*, 2005). También se ha encontrado la presencia de Treg en el microambiente tumoral de pacientes con cáncer ovárico y de mama (Liyanage *et al.*, 2002, Curiel *et al.*, 2004) y se relaciona la acción inmunosupresora de estas células con la progresión tumoral y la resistencia a la quimioterapia, (Leong *et al.*, 2006, Okita *et al.*, 2005); observándose su acumulación en nódulos linfáticos no metastáticos (Shevach, 2002) y una población agrandada de Treg en sangre periférica de pacientes con diferentes tipos de cáncer (Woo *et al.*, 2001, Ormandy *et al.*, 2005, Hiraoka *et al.*, 2006).

Las células Treg pueden estar involucradas en el fracaso del sistema inmune para controlar el desarrollo de cáncer inducido por el HPV. Visser *et al.*, (2007) investigó la frecuencia, fenotipo

y actividad de las células Treg en pacientes con NIC y con cáncer cervical y mostraron frecuencias celulares aumentadas de  $CD4^+/CD25^{high}$  en sangre periférica, así como baja expresión de IFN- $\gamma$  y alta expresión de CTLA-4 y FoxP3. Las frecuencias aumentadas de las células Treg en las pacientes con cáncer cervical pueden suprimir la inmunidad HPV específica. Un año después de la cirugía curativa o de la quimiorradiación el análisis mostró una disminución en las frecuencias de células T  $CD4^+/CD25^{high}$ . Además, las células del tumor cervical pueden producir grandes cantidades de TGF- $\beta$  (Sheu *et al.*, 2001) y éste podría ser uno de los mecanismos que produce un aumento en los niveles de Treg en pacientes con cáncer. Estos resultados implican que las células Treg puede suprimir la respuesta inmune hacia la neoplasia cervical (Visser *et al.*, 2007).

Recientemente se ha demostrado la existencia de células que tienen capacidad inmunosupresora, éstas son las células estromales mesenquimales (CEM) y se ha probado su capacidad supresora de la respuesta de linfocitos T activados por aloantígenos (Di Nicola *et al.*, 2002, Potian *et al.*, 2003), por antígenos peptídicos (Krampera *et al.*, 2003), por mitógenos (Le Blanc & Pittenger, 2003) y por anticuerpos anti-CD3/CD28 (Krampera *et al.*, 2003, Le Blanc & Pittenger, 2003).

### **Células estromales mesenquimales (CEM).**

Las propiedades biológicas de las células troncales como autorenovación, plasticidad y regeneración tisular pueden ser utilizadas para su implementación en medicina regenerativa. En este grupo se destacan las células madre adultas, que pueden autorenovarse constantemente y dar origen a células especializadas para reparar eventualmente tejidos lesionados (Körbling & Estrov, 2003, Rodríguez, 2005). En la categoría de células madre adultas, se destacan las células madre hematopoyéticas, que han sido objeto de una extensa investigación ya que son responsables de la regeneración y mantenimiento de las células sanguíneas que se ubican en sangre periférica, médula ósea, hígado y timo (Szilvassy, 2003) y las células troncales mesenquimales (CTM) o células estromales mesenquimales (CEM), las cuales brindan el soporte necesario para regular la hematopoyesis a través de señales que inducen la diferenciación y proliferación de las células troncales hematopoyéticas y su progenie por medio

de interacciones directas célula a célula y la secreción de factores de crecimiento (Kang *et al.*, 2006, Beyer & Da Silva 2006).

Las CTM fueron inicialmente caracterizadas entre las décadas de los años 1960 y 1970 con los trabajos realizados por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico hacia osteocitos, condrocitos y adipocitos (citado en Beyer & Da Silva 2006, Gregory *et al.*, 2005).

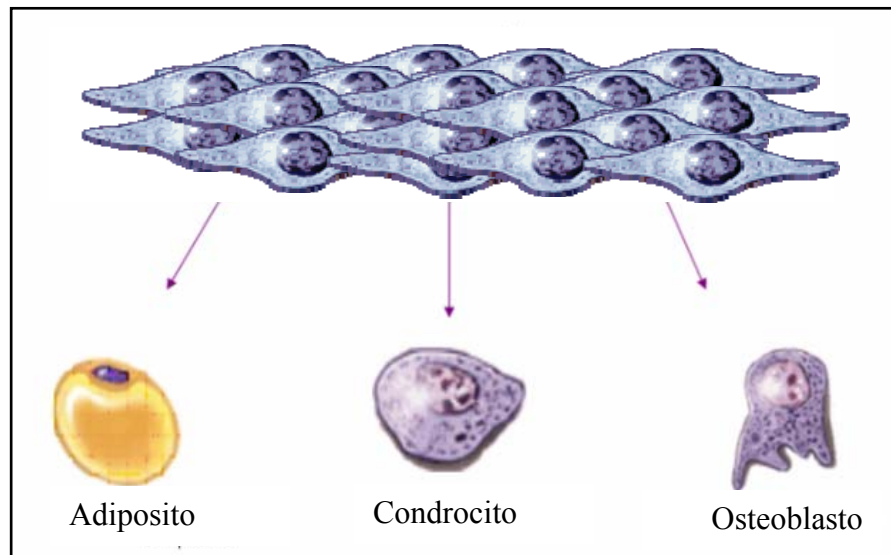
Las CEM tienen la capacidad de dar origen a diversos tipos celulares, como fibroblastos medulares o células reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado la plasticidad de estas células no hematopoyéticas como miocitos, tenocitos y células nerviosas entre otras (Prockop, 1997, Bianco & Gehron, 2000).

La médula ósea (MO) es la principal fuente de aislamiento de las CEM, aunque se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular (Wexler *et al.*, 2003, Kern *et al.*, 2006), sangre de cordón umbilical (Bieback *et al.*, 2004), tejido pulmonar (Sabatini *et al.*, 2005), pulpa dental y ligamento periodontal (Shi *et al.*, 2005). No obstante, los tejidos más empleados son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo (Kern *et al.*, 2006, Wagner *et al.*, 2005).

Las CEM expresan un gran número de moléculas de adhesión, proteínas de matriz extracelular y receptores de citocinas, asociadas con su función e interacciones celulares dentro del estroma de la MO (Devine & Hoffman, 2000). No hay un marcador antigénico exclusivo para las CEM y de hecho, diferentes grupos de investigación han establecido una variedad de combinaciones de marcadores para su detección, debido a que se han observado transformaciones espontáneas en cultivos a largo plazo respecto a su inmunofenotipo (Jackson *et al.*, 2007).

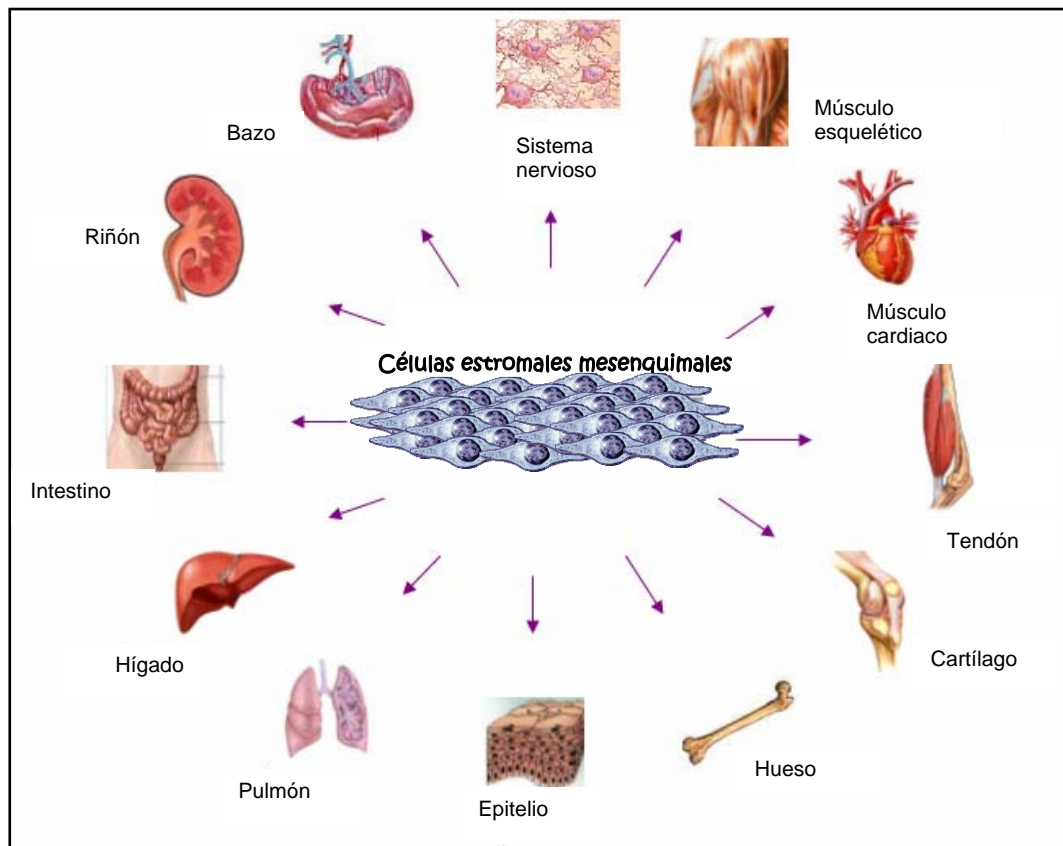
Dado que los investigadores publican estudios de CEM usando diferentes métodos para su obtención y expansión, recientemente la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés), ha propuesto a la comunidad científica adoptar medidas estándares para la

identificación de las CEM. Así, la ISCT propone tres criterios: primero, las células deben ser adherentes al plástico cuando son mantenidas en cultivo; segundo, deben ser positivas para los antígenos CD105, CD73 y CD90, adicionalmente deben ser negativas para la expresión de los antígenos hematopoyéticos tales como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 y HLA-DR; y tercero, deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Figura 7) (Dominici *et al.*, 2006).



**Figura 7. Potencial de diferenciación de las células estromales mesenquimales, hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos. (Tomado de: Fajardo-Orduña, 2008).**

En los primeros estudios sobre las CEM se creía que eran capaces de generar únicamente células de origen mesodérmico; sin embargo, recientemente esta idea ha cambiado ya que son capaces de diferenciarse a una variedad de linajes celulares incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, mioblastos, cardiomiocitos, hepatocitos, tenocitos, epitelio, células de pulmón, intestino, riñón, bazo e incluso neuronas (Figura 8). (Bobis *et al.*, 2006; Baksh *et al.*, 2004). Algunos científicos proponen que la generación de células de origen diferente al mesodérmico es debido a un proceso de reprogramación en la expresión de genes denominado plasticidad celular (Sato *et al.*, 2005; Bobis *et al.*, 2006).



**Figura 8. Esquema representativo de la multipotencialidad de las CEM.** Se presenta la capacidad de diferenciación hacia células de origen endodérmico: pulmón, hígado, intestino, riñón y bazo; mesodérmico: músculo esquelético, músculo cardíaco, tendón, cartílago, hueso; y ectodérmico: sistema nervioso. (Tomado de Fajardo-Orduña, 2008)

Las propiedades inmunosupresoras de las CEM han sido documentadas con muchos estudios que enfocan su utilidad en sus efectos en un trasplante (Brooke *et al.*, 2007, Le Blanc & Pittenger, 2005, Ringden *et al.*, 2006), debido a que las células mesenquimales obtenidas de médula ósea de humanos, mandriles y ratones han demostrado disminuir la respuesta inmune de los linfocitos en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Djouad *et al.*, 2003, Bartholomew *et al.*, 2002). Se han encontrado varios mecanismos para explicar estos posibles efectos como son la secreción de factores antiinflamatorios, citocinas (Rasmusson, 2006), modulación del desarrollo celular (Aggarwal & Pittenger, 2005, Jiang *et al.*, 2005), la supresión de linfocitos T efectores (Potian *et al.*, 2003, Rasmusson *et al.*, 2003) y el aumento de células de T reguladoras (Chang *et al.*, 2006, Bernardo *et al.*, 2007).

Recientemente se ha demostrado que las CEM aumentan la proporción de células Treg  $CD4^+$   $CD25^{\text{high}}$ ,  $CD4^+$   $CTLA-4^+$ , y  $CD4^+$   $CD25^+$   $CTLA-4^+$ , en cultivo mixto de linfocitos (Maccario



*et al.*, 2005). Aggarwal y Pittenger (2005) también demostraron que existe un aumento en la proporción de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en presencia de IL-2 en co-cultivo de células mononucleares de sangre periférica y CEM.

En otro estudio se demostró que las CEM reclutan Treg: a partir de células CD3<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> que se co-cultivaron con CEM se registró un aumento en la expresión de células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> y baja expresión de CD127. De esta manera se demostró que la capacidad supresora de los Treg era mantenida mientras se estuvieran en cultivo con las células mesenquimales, ya que en ausencia de ellas perdían esta capacidad después de 5 días (Di Ianni, *et al.*, 2008).

Por otro lado, durante el desarrollo de tumores se llegan a perder los contactos existentes entre células, lo cual puede contribuir a aumentar las capacidades migratorias y de metástasis de algunas células. Además de la expresión de citocinas como TGF- $\beta$  pueden contribuir a la interacción de células estromales y células malignas en el microambiente tumoral (Turley *et al.*, 2008). En algunos estudios se ha demostrado que las CEM provenientes de médula ósea contribuyen en el microambiente tumoral influenciando el crecimiento y la progresión del tumor (Hung *et al.*, 2005; Nakamizo *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2004). Existe evidencia experimental de que las CEM migran hacia sitios de formación del tumor y se incorporan dentro del microambiente tumoral, se ha propuesto que las propiedades inmunosupresoras de las CEM permiten la proliferación de las células del tumor y la estimulación de la formación de vasos sanguíneos (Zhu *et al.*, 2006).

Aunque la evidencia de que las CEM son participantes activas en el cáncer es simplemente una sugerencia con más preguntas que respuestas, los informes de la presencia de CEM en tumores es muy limitada y todavía se desconoce cómo éstas actúan recíprocamente con las diferentes células cancerosas, debido a que las interacciones célula-célula son muy específicas para cada tipo de cáncer en particular (Jodele *et al.*, 2006). Por ejemplo en el presente año se aislaron e identificaron exitosamente células estromales mesenquimales de tejido de cáncer cérvico-uterino. Los resultados de esta investigación demostraron que las células aisladas tenían morfología fibroblastoide y crecían en colonias, su inmunofenotipo reveló que son positivas

para CD13, CD29, CD44, CD105 y HLA-I y que además tienen la capacidad de diferenciarse a osteocitos, adipocitos y a hepatocitos (Sun *et al.*, 2010).

No obstante, todavía existen muchas dudas con respecto a la generación del cáncer y su evolución, así como las interacciones presentes en el microambiente tumoral, pero las investigaciones recientes podrían aportar nuevas ideas terapéuticas para la lucha contra esta enfermedad letal (Yen & Yen, 2008).

## JUSTIFICACIÓN.

El cáncer cérvico-uterino es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad en México. Debido a la asociación de esta enfermedad con el virus de papiloma humano (principalmente el HPV-16), se ha propuesto que las proteínas derivadas de estos virus sean candidatas idóneas para utilizarse como antígenos para estimular la respuesta inmune. Sin embargo, el uso de estas proteínas ha mostrado ser poco satisfactorio, probablemente debido entre otras cosas a la inducción de los linfocitos T reguladores. La detección de los linfocitos Treg específicos a péptidos antigénicos en tumores y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado ha sugerido que durante el desarrollo de la enfermedad se generan estas células inmunosupresoras. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cómo es que se originan estas poblaciones celulares, si existen secuencias específicas de las proteínas virales que favorecen su inducción y qué tipos celulares participan en este proceso.

Por otra parte, se ha postulado que las células estromales mesenquimales (CEM) participan en la generación de linfocitos Treg, debido a que se caracterizan por tener actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y además por su capacidad de inducir, reclutar, regular y mantener la función reguladora de los linfocitos T en condiciones de cultivo.

Al conocer las características biológicas de las CEM provenientes de lesiones cervicales, tales como su alto potencial en generar inmunosupresión al inducir poblaciones de linfocitos Treg, ayudará en las estrategias inmunoterapéuticas en la regulación de la respuesta inmune contra este tipo de tumores.

## **HIPÓTESIS.**

Se sabe que durante el desarrollo del cáncer cérvico-uterino, se acentúa la falla de la respuesta inmune específica hacia las células infectadas por virus y hacia las células tumorales, con la concomitante generación de linfocitos Treg que inmunosuprimen dicha respuesta. Por otro lado, es conocido que las células estromales mesenquimales ejercen una función reguladora de la respuesta inmune, ya sea al suprimir la proliferación de linfocitos T efectores (CD4+ y CD8+) o induciendo, regulando y reclutando poblaciones de linfocitos Treg. En consecuencia, se espera que en cultivos de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con CaCu, con péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y en presencia de CEM derivadas de lesiones cervicales, se generen linfocitos Treg con capacidad inmunosupresora.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Analizar la capacidad de las células estromales mesenquimales obtenidas de pacientes con neoplasias cervicales (NIC-CaCu) para inducir linfocitos T reguladores.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- \* Obtener estirpes de células estromales mesenquimales de donadoras sanas HPV<sup>-</sup> y de pacientes con neoplasias intraepiteliales NIC y con CaCu.
- \* Determinar la capacidad de las CEM para inducir linfocitos Treg en presencia y ausencia de péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16.
- \* Analizar la actividad supresora de los linfocitos Treg inducidos por CEM derivadas de neoplasias cervicales (NIC-CaCu).

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Muestras biológicas.**

Las muestras biológicas consistieron en biopsias cervicales de dos mujeres con neoplasias intraepiteliales (NIC), dos con cáncer cérvico-uterino (CaCu) y dos con cérvix sano, así como muestra de sangre periférica de dos pacientes con CaCu y de dos donadoras sanas tomadas bajo consentimiento informado en el Departamento de Ginecología del Hospital General de Zona No. 2-A Troncoso y en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (Tabla 3), (Ver anexo 1).

Las biopsias se tomaron mediante colposcopia y fueron trasladadas en condiciones de esterilidad en tubos conteniendo medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, BRL, New York, USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) y una mezcla de antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) para su procesamiento en el laboratorio.

Por otro lado, fueron extraídos 40 ml de sangre periférica con tubos Vacutainer conteniendo heparina (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). Se separó el paquete celular del plasma sanguíneo por centrifugación. A partir del paquete celular se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) centrifugando sobre Histopaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y lavadas con solución salina reguladora de fosfatos (PBS).

Como testigos normales, se tomaron muestras sanguíneas de donadoras sanas con Papanicolau negativo.

**Tabla 3. Antecedentes clínicos de las de las pacientes con NIC y con CaCu y de las donadoras sanas.**

Donadoras de biopsia de tejido cervical	Edad	No. de gestaciones	No. de partos	No. de abortos	No. de cesáreas	Edad de menarca	Inicio de vida sexual	No. de parejas sexuales	Habito tabáquico	Uso de anticonceptivos	Antecedentes de familiares con cáncer	Observaciones
CN 01-08												Histerectomía. Negativa para HPV. Papanicolaou, colposcopia y PCR.
CN 02-08												Histerectomía. Negativa para HPV. Papanicolaou, colposcopia y PCR.
NIC 02-09	22	0	0	0	0	11	18	1	Si	Pastillas	No	NICI
NIC 03-09	22	1	0	0	1	13	19	1	No	DIU, preservativo	Abuela y madre con CaCu	NICI HPV -11
CaCu 22-08	44	9	9	0	0	13	18	2	No	No	Hermana con cáncer de mama	CaCu IIB
CaCu 31-09	32	3	3	0	0	12	16	2	No	Pastillas por 12 meses e inyecciones por 12 meses	No	CaCu IIB
Donadoras de sangre periférica												
CaCu 07-10	54	3	3	0	0	13	17	1	Si	Pastillas	Padre con cáncer de pulmón	CaCu IIB
CaCu 09-10	62	7	7	0	0	13	18	2	No	No	No	CaCu IIB
Donadora sana	52	3	2	1	0	12	28	1	No	Pastillas	No	Negativa para Infección por HPV. Papanicolaou y colposcopia.

## **Obtención de células estromales mesenquimales de tejidos cervicales normales y de pacientes con neoplasias intraepiteliales NIC y con CaCu.**

Las muestras de tejido cervical, se colocaron en una caja de Petri y se lavaron con PBS para quitar el exceso de sangre. La muestra lavada se colocó en otra caja para fragmentarla en pedazos pequeños de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>, los cuales se colocaron en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, Inc Costar, New Cork, USA) en presencia de 8 ml de una solución con 0.05% de tripsina y 0.02% de EDTA (Gibco). El frasco se mantuvo en incubación durante 15 min en agitación constante para homogeneizar el disgregado. La suspensión celular fue colectada y vertida a un tubo y fue centrifugada durante 5 min a 1300 rpm. El botón celular fue resuspendido en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (DMEMbg) (del inglés, *Ig-Dulbecco's Modified Eagle Media*) suplementado con 15% de SFB (Gibco) y se procedió a contar el número de células viables por exclusión del colorante azul de tripano (Gibco).

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos (Corning), a una densidad de 50,000 a 300,000 células/ml, en un medio comercial específico para células mesenquimales (MesenCult™; Stem Cell Technologies [STI], Vancouver, BC, Canadá), manteniéndose en incubación a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se realizaron cambios de medio cada tercer día. Una vez que llegaron a la confluencia del 100%, las células se colectaron utilizando una solución de tripsina (0.05% EDTA 0.053mM; Gibco) incubando durante 5 minutos a 37°C, se lavaron con PBS suplementado al 2% con SFB y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. El botón celular fue resuspendido en medio DMEMbg y se resembró en botellas Falcon de 75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson) a una densidad de 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>.

La población de células mesenquimales obtenidas de esta última resiembra (2da resiembra) fue utilizada en los diferentes ensayos.



## **Inmunofenotipo de las células estromales mesenquimales.**

Para conocer el inmunofenotipo de las capas de células estromales mesenquimales, se analizó la expresión de algunos antígenos de superficie mediante la técnica de citometría de flujo en un equipo de FACS-Calibur (Becton Dickinson).

Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células, se colocaron en PBS con 2% de SFB y se incubaron durante 30 min en hielo y en obscuridad con uno de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD13-PE, anti-CD14-PE, anti-CD29-FITC, anti-CD31-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD44-PE, anti-CD54-PE, anti-CD105-PE, anti-HLA-DR-PE, anti-CD54-PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), anti-CD49b-PE, anti-CD73-PE, anti-CD166-PE y anti-HLA-ABC-FITC (Beckton Dickinson/PharMingen), anti-CD90-FITC (Immunotech, Marseille, France). Como controles se incluyeron a las células teñidas con los correspondientes testigos de isotipo dependiendo de los anticuerpos primarios utilizados: IgG2a-PE, IgG1-FITC (Caltag Laboratories). Las células teñidas se analizaron contando 10,000 eventos en el citómetro de flujo.

## **Capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.**

**Inducción osteogénica:** se cultivaron  $1 \times 10^4$  CEM en cámaras Lab-Tek II (Chamber Slide System, Nunc, Naperville, IL, USA) con medio DMEMbg suplementado con 15% de SFB o en presencia de medio de diferenciación osteogénica (Stem Cell Kit™, STI) durante 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 3 días. El medio osteogénico consistió de medio DMEMbg suplementado con dexametasona  $10^{-8}$  M, ácido ascórbico 0.2 mM,  $\beta$ -glicerol fosfato 10 mM y 15% de suplemento osteogénico. La detección de la diferenciación se realizó mediante la técnica de Von Kossa (Kern *et al*, 2006). Al terminar las 4 semanas de cultivo con el medio de diferenciación osteogénica, éste se retiró de la caja y se adicionó PBS durante 10 min. Se desechó el PBS y se colocó nitrato de plata dejando reposar durante 3 horas expuesta a la luz. La capa celular se lavó con agua destilada y se adicionó hiposulfito de sodio al 5% durante 2 min. Se lavó con agua destilada y se contrastó con azul de toluidina al 1% por 2 min. Se deshidrató con diferentes concentraciones de etanol (al 80%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico y se montaron las laminillas con resina. Los depósitos de calcio se tiñeron de color

café a negro. Se determinó el porcentaje de positividad al analizar la cámara de cultivo bajo el microscopio.

**Inducción adipogénica**, se cultivaron  $1 \times 10^4$  CTM en cámaras Lab-Tek II (Nunc) con medio DMEMbg suplementado con 10% de SFB o en presencia de medio de diferenciación adipogénica (AM, STI) durante 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 3 días. El medio adipogénico consiste de DMEMbg al 15% de suplemento adipogénico. La detección de la diferenciación adipogénica se realizó con la tinción de rojo oleoso (Sigma–Aldrich) (Kern *et al.*, 2006). Al terminar las 4 semanas de cultivo con el medio de diferenciación adipogénico, éste se desechó de la caja y se adicionó PBS durante 10 min. Se desechó el PBS y la capa celular se fijó con formalina al 10% durante 1 hora. Se adicionó isopropanol al 60% durante 5 min, y posteriormente se adicionó rojo oleoso durante 20 min. Se lavó con agua destilada y se contrastó con hematoxilina de Harris por 1 min. Las laminillas se montaron con propilénglicol. Los lípidos se tiñen de color rojo. Se determinó el porcentaje de positividad después de analizar la cámara de cultivo bajo el microscopio.

**Inducción condrogénica**: se obtuvieron  $2.5 \times 10^5$  CTM en 500  $\mu$ l de medio de diferenciación condrogénico (Cambrex Bio Science, Maryland, USA), se colocaron en un tubo de 15 ml de propileno. Las células se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm para formar una micromasa al fondo del tubo. Se cultivaron durante 4 semanas y se realizaron cambios de medio cada 3 días. El medio condrogénico que consiste en medio basal de diferenciación condrogénica suplementado con dexametasona, piruvato de sodio, prolina, suplemento ITS<sup>+</sup>, ascorbato, penicilina/estreptomicina y L-glutamina. Se cultivó por 4 semanas. Al terminar las 4 semanas de cultivo con medio de diferenciación condrogénica, se desechó el medio, se fijó la micromasa con formaldehído durante 30 min y se deshidrató en diluciones de etanol (al 80%, 90% y absoluto) y xilol grado histológico durante 30 min con dos repeticiones cada una. La micromasa se embebió en parafina y se hicieron cortes histológicos con ayuda de un micrótopo. La detección de la diferenciación condrogénica se realizó con la tinción de azul anciano (Sigma-Aldrich) para observar la positividad a mucopolisacáridos.

## **Inducción de linfocitos Treg a partir de CMSP (CMSP-iTreg) en presencia y ausencia de péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y de CEM.**

### **Cultivo y estimulación de células T.**

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recién obtenidas de las pacientes con NIC y con CaCu así como de las donadoras sanas, fueron cultivadas en placas de 24 pozos (Corning) para analizar la inducción de linfocitos Treg en presencia de CEM bajo las siguientes condiciones de cultivo y de estímulo: Se colocaron  $5 \times 10^5$  CMSP por pozo en medio de cultivo RPMI (Gibco) suplementado con 10% de SFB, 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para la estimulación con péptidos de la proteína E6 o de E7 de HPV-16 se utilizaron péptidos sintéticos de 15-25 aminoácidos, que abarcaron desde el extremo amino al carboxilo de las mismas, sobrelapados uno a otro con 11 residuos, hasta cubrir la secuencia completa de ambas proteínas. La estimulación de las CMSP también se realizó en presencia de CEM derivadas de médula ósea normal, de tejido cervical normal, de tejido con neoplasia intraepitelial cervical y de cáncer cérvico-uterino, en una proporción final de 10:1 CMSP:CEM. Para el co-estímulo de las CMSP se utilizaron perlas Dynabeads conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28 (Invitrogen), de acuerdo con el inserto, se colocó 1 perla por cada 5 CMSP. Como testigo negativo, se colocaron CMSP solo con péptidos. (Ormandi *et al.*, 2005, Visser *et al.*, 2007 y Davison *et al.*, 2007). Los tratamientos de las CMSP para analizar la inducción de Treg quedaron de la siguiente manera:

1. CMSP.
2. CMSP + péptidos de proteína E6 de HPV-16.
3. CMSP + péptidos de proteína E7 de HPV-16.
4. CMSP + *Dynabeads* anti-CD3/CD28.
5. CMSP + péptidos de proteína E6 de HPV-16 + *Dynabeads* anti-CD3/CD28.
6. CMSP + péptidos de proteína E7 de HPV-16 + *Dynabeads* anti-CD3/CD28.
7. CMSP + CEM.
8. CMSP + CEM + *Dynabeads* anti-CD3/CD28.
9. CMSP + CEM+ péptidos de proteína E6 de HPV-16.
10. CMSP + CEM+ péptidos de proteína E7 de HPV-16.
11. CMSP + CEM+ *Dynabeads* anti-CD3/CD28+ péptidos de proteína E6 de HPV-16.
12. CMSP + CEM+ *Dynabeads* anti-CD3/CD28+ péptidos de proteína E7 de HPV-16.

Las CMSP se colectaron al día 4 de cultivo (Prevosto *et al.*, 2007), se lavaron con PBS y tiñeron con los anticuerpos anti-CD4-PerCP, anti-CD25-PE, y anti-CD45RO-FITC (BD Biosciences) además de anti-FoxP3-APC (eBioscience) y sus respectivos controles de isotipo IgG1-PerCP, IgG1-PE, IgG2-FITC, IgG2-APC para caracterizar el fenotipo de los CMSP-iTreg.

El análisis del fenotipo de las poblaciones de linfocitos T obtenidos de las condiciones antes mencionadas se realizó a partir de 100, 000 eventos en el citómetro de flujo FACS-Calibur (BD Biosciences).

El análisis de los datos se realizó al comparar los porcentajes de las células Treg inducidas (CMSP-iTreg) bajo las diferentes condiciones de cultivo con respecto a un estándar normal determinado por el promedio de los valores basales de Treg encontrados en las CMSP de la donadora normal en los diferentes experimentos, más una desviación estándar obtenida a partir de estos valores. Para las condiciones de cultivo en las cuales se adicionaron las perlas *Dynabeads* conteniendo anti-CD3/CD28, el estándar normal fue obtenido de la misma manera al promediar los valores de Treg encontrados en los diferentes experimentos al estimular las CMSP con *Dynabeads* conteniendo anti-CD3/CD28, más una desviación estándar obtenida a partir de estos valores.

#### **Análisis de la actividad inmunosupresora de las poblaciones de CMSP-iTreg.**

Para determinar la actividad inmunosupresora de las CMSP-iTreg, se procedió a evaluar su capacidad de inhibir la proliferación de CMSP obtenidas de un donador sano, las cuales fueron marcadas con carboxifluorescein succinimidil éster (CFSE; Sigma-Aldrich) a una concentración de 1  $\mu$ M, durante 20 min en PBS a 37°C; posteriormente se realizaron dos lavados extensivos con PBS antes de ser co-cultivadas con las CMSP-iTreg.

Los co-cultivos de CMSP con las CMSP-iTreg fueron realizados bajo las siguientes condiciones:

Cultivo heterólogo: CMSP marcadas con CFSE (CMSP-CFSE) se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos (Corning), conteniendo 250  $\mu$ l de medio I-DMEM (Invitrogen) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10% de SFB (Invitrogen). Posteriormente, en insertos con membrana de 0.45  $\mu$ M de poro (Millicel, Millipore USA) se colocaron CMSP-iTreg derivadas de las diferentes condiciones de cultivo, en proporciones 1:10 con respecto a la población de CMSP-CFSE, llevando a un volumen final de 500  $\mu$ l con medio I-DMEM (Invitrogen) suplementado. A este cultivo se le adicionó fitohemaglutinina (PHA) a una concentración final de 10 $\mu$ g/ml para estimular la proliferación de las células mononucleares.

Al término de 4 días de estímulo, se analizaron los niveles de CFSE en las CMSP-CFSE mediante citometría de flujo. El porcentaje de células proliferantes fue comparado con el obtenido en las células utilizadas como control, ya sea CMSP-CFSE marcadas en tiempo inicial y con CMSP-CFSE estimuladas con PHA durante los 4 días de cultivo.

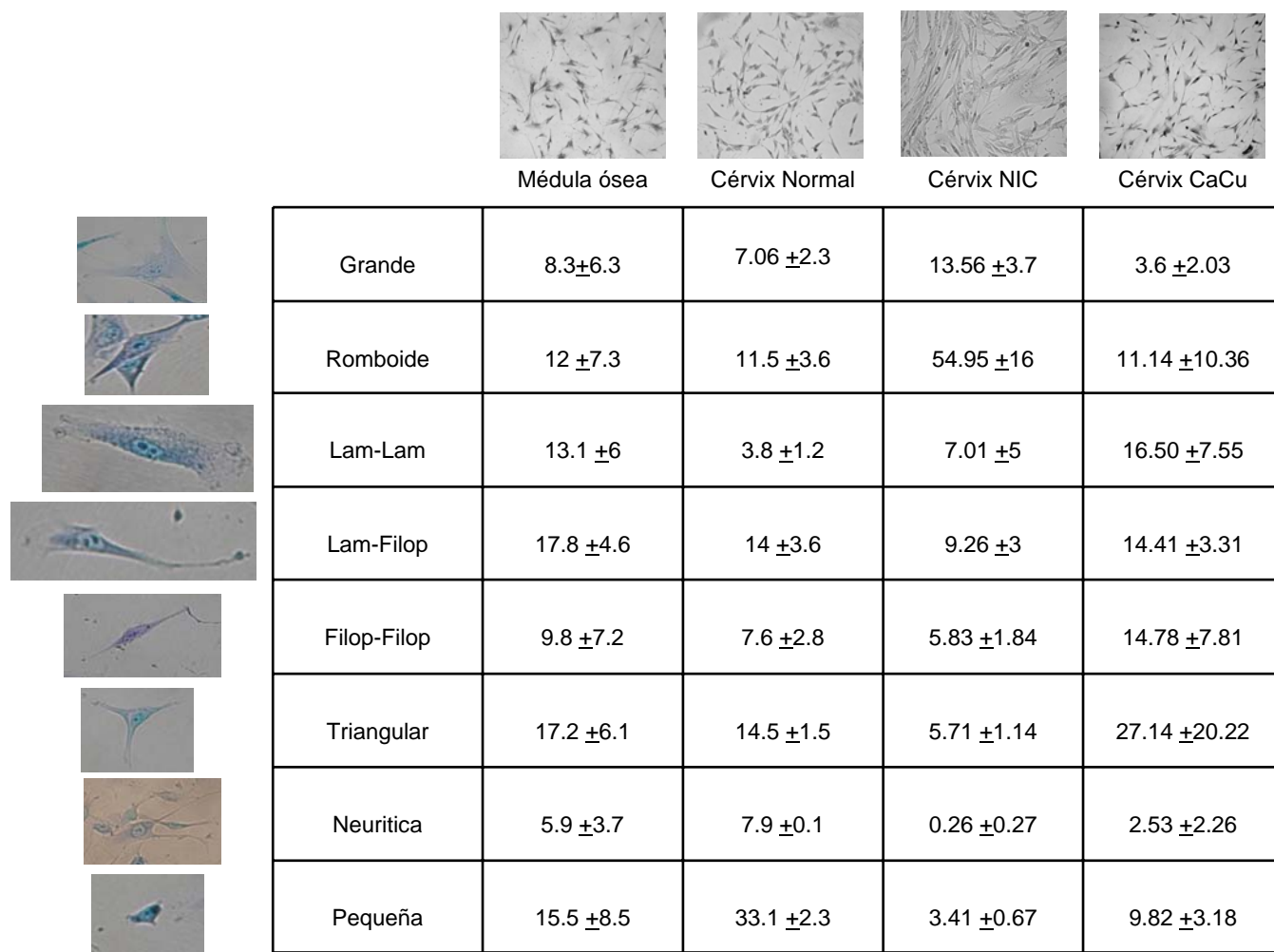
## RESULTADOS.

### **Obtención de estirpes de células estromales mesenquimales derivadas de tejido cervical normal, neoplasias intraepiteliales (NIC) y con cáncer cérvico-uterino (CaCu).**

Para la realización de este proyecto de investigación se establecieron estirpes de CEM de tejido cervical normal (CN), de cérvix con neoplasia intraepitelial (cérvix NIC) y cérvix con cáncer cérvico-uterino (cérvix CaCu). Las CEM obtenidas se nombraron de acuerdo a la fecha en que se obtuvieron los cultivos primarios. Cada una de las estirpes generadas fue caracterizada con base en los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para definir a las CEM (Dominixi *et al.*, 2006), la cual establece 3 características esenciales:

- 1.-Ser adherentes en condiciones estándar de cultivo.
- 2.-Expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecer de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79/CD19 y HLA-DR en la membrana celular.
- 3.-Tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Todas las estirpes celulares obtenidas proliferaron de manera adherente al sustrato de la caja de cultivo y su morfología fue variada, distinguiéndose esencialmente 8 diferentes tipos morfológicos: grande, romboide, lamelipodia-lamelipodia, lamelipodia-filopodia, filopodia-filopodia, triangular, neurítica y pequeña (Figura 9), los cuales fueron similares a los encontrados en una estirpe de células estromales mesenquimales derivada de médula ósea, la cual fue tomada como referencia (Montesinos *et al.*, 2009). Los porcentajes entre los tipos morfológicos fueron muy heterogéneos entre las diferentes estirpes. Cabe destacar que la morfología romboide fue muy frecuente en las estirpes de CEM de cérvix-NIC con un 54.95±16%, la morfología pequeña en las estirpes de CEM de cérvix normal con un 33.1±2.3% y la morfología triangular en las estirpes de CEM de cérvix-CaCu con 27.14±20.22 (Figura 9).



**Figura 9. Morfología característica de las CEM obtenidas de biopsias de tejido cervical normal (CN), de cérvix con neoplasia intraepitelial (Cérvix NIC), de cérvix con cáncer cérvico-uterino (cérvix CaCu) y CEM derivadas de médula ósea normal (MO) fueron utilizadas como testigo de comparación. Se observaron diferentes tipos morfológicos en los cultivos celulares de las diferentes fuentes. Cada tipo celular fue nombrado dependiendo de las características morfológicas observadas, los resultados se presentan en porcentajes de cada tipo celular y corresponde a la media de los valores a partir de experimentos por separado (n=5 CEM de cada tipo histológico).**

De acuerdo con el inmunofenotipo obtenido en las estirpes de CEM, se encontró que las estirpes de CEM derivadas de tejido cervical normal y de cáncer cervical, mostraron los marcadores típicos de CEM (CD105, CD73 y CD90) en altos porcentajes (96-100%) (Tabla 4). Otros marcadores celulares como CD13, CD44, CD166, CD29, CD49b, y HLA-ABC, comúnmente expresados por las CEM, también se encontraron aumentados en las CEM derivadas de ambas fuentes de tejido cervical (Tabla 4). Por otro lado, como se esperaba, los marcadores de células hematopoyéticas, CD34, CD14/CD11b, CD79/CD19 y HLA-DR, tuvieron baja expresión en todas las estirpes celulares generadas (Tabla 4).

**Tabla 4. Caracterización inmunofenotípica de las CEM.** Promedio del porcentaje células que expresan los marcadores de superficie de las CEM, obtenidas de tejido cervical normal, con NIC y con CaCu. Los valores muestran los porcentajes promedio y sus intervalos.

	<b>CEM Tejido normal</b>	<b>CEM NIC</b>	<b>CEM CaCu</b>
<b>Marcador</b>	<b>Promedio %* (intervalo)</b>	<b>Promedio %* (intervalo)</b>	<b>Promedio %* (intervalo)</b>
CD105	99.6925 (99.92-99.41)	71.37 (92.27-50.48)	96.29 (99.5-89.1)
CD73	99.9966667 (100-99.99)	98.80 (99.23-98.38)	99.02 (100-97.8)
CD90	99.694 (99.90-99.00)	96.07 (99.33-92.82)	96.16 (100-86.8)
CD13	99.98 (100-99.97)	99.59 (99.75-99.44)	99.85 (100-99.6)
CD44	99.39 (99.97-98.90)	93.46 (99.56-87.36)	99.60 (99.9-99.3)
CD166	99.9166667 (99.90-99.80)	0.63 (0.95-0.31)	75.69 (100-12.22)
HLA-ABC	99.692 (99.99-99.00)	87.11 (96.07-78.16)	97.81 (100-96)
CD29	99.604 (99.99-99.87)	99.07 (99.12-99.03)	97.61 (99.9-95)
CD49b	99.94 (100-99.80)	93.09 (98.77-87.42)	99.75 (100-99.5)
CD14	1.072 (1.55-0.40)	4.15 (8.28-0.02)	2.45 (4-0.13)
CD31	1.91333333 (1.77-2.59)	0.99 (1.90-0.09)	1.34 (1.9-.028)
CD34	4.0525 (7.68-0.96)	0.94 (1.86-0.03)	1.06 (2-0.25)
HLA-DR	1.686 (3.40-0.45)	0.18 (0.35-0.02)	0.87 (1.2-0.21)
CD54	87.1325 (95.17-77.50)	58.17 (60.01-56.34)	64.61 (71.77-47.72)

\*Promedio del porcentaje de células positivas al marcador.

### **Capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.**

Con la finalidad de analizar la capacidad de diferenciación de las CEM obtenidas de los diferentes tejidos, las células fueron cultivadas bajo diferentes condiciones, como se mencionó en materiales y métodos, para favorecer su diferenciación a osteocitos, adipocitos y condrocitos.



### **Capacidad de diferenciación osteogénica.**

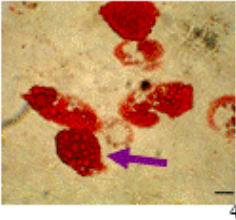
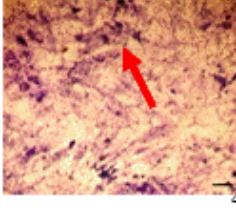
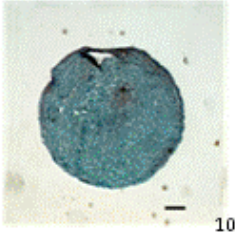
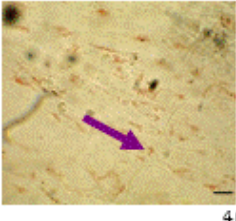
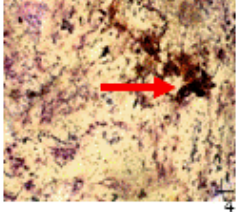
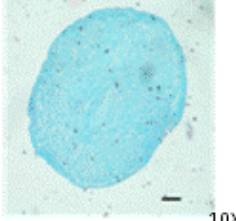
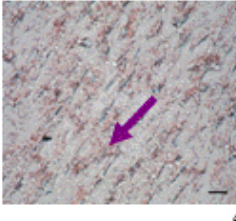
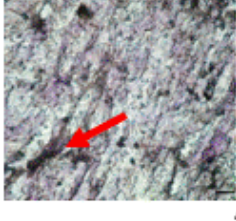
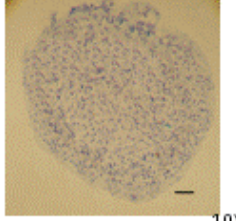
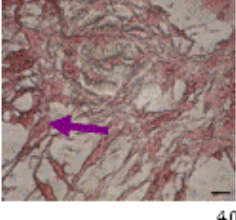

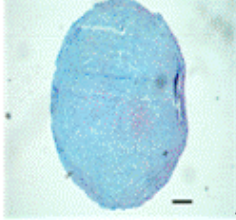
La capacidad de diferenciación osteogénica de las diferentes estirpes celulares de CEM se analizó después de haberlas cultivado con medio inductor durante 4 semanas. En las muestras de tejido de cérvix sano y de las biopsias de NIC y CaCu se observaron depósitos de calcio; esto fue revelado a través de la positividad a la tinción con Von Kossa, típico de osteocitos (figura 10), lo que confirma la capacidad de las estirpes de CEM de diferenciarse a osteocitos.

### **Capacidad de diferenciación adipogénica.**

La capacidad de diferenciación adipogénica de las CEM se determinó después de haber cultivado las diferentes estirpes de CEM con medio de diferenciación específico durante 4 semanas. La formación de adipocitos con vacuolas lipídicas reveladas mediante tinción con rojo oleoso es un rasgo característico de las células diferenciadas. Todas las estirpes de las CEM derivadas de los diferentes tejidos cervicales, mostraron pequeñas vesículas teñidas con rojo oleoso, asumiéndose entonces su diferenciación a adipocitos (Figura 10).

### **Capacidad de diferenciación condrogénica.**

Después de cultivar las CEM con medio de diferenciación de condrocitos durante 4 semanas. Las células derivadas de los diferentes tejidos cervicales mostraron tinción positiva a azul alciano para identificar mucopolisacáridos y también positiva a tricrómico de Masson para determinar la presencia de colágeno, típica de condrocitos. Comprobándose entonces, que las células obtenidas tienen la capacidad de diferenciarse hacia condrocitos (figura 10).

	Adipogénesis	Osteogénesis	Condrogénesis
Médula ósea			
Cérvix normal			
Cérvix con NIC			
Cérvix con CaCu			

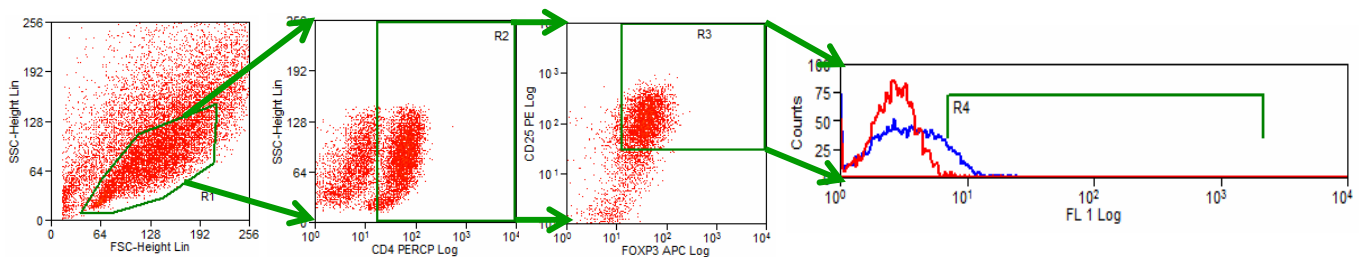
**Figura 10. Capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica de las CEM.** CEM obtenidas de tejido cervical sano, de neoplasias intraepiteliales (NIC) y de cáncer cérvico uterino CaCu, las fotografías de adipogénesis y condrogénesis muestran un aumento de 40X (barra escala=20µm) y las fotografías de condrogénesis muestra un aumento de 10X, las flechas en morado muestran las vesículas teñidas con rojo oleoso, las flechas en rojo señalan depósitos de calcio en color marrón después de la tinción con Von Kossa. (Barra escala=200µm).

## Análisis de la capacidad de las CEM para inducir linfocitos Treg en presencia y ausencia de péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16.

### A) Análisis citométrico de los linfocitos Treg en co-cultivos de CEM-CMSP.

Las poblaciones de linfocitos Treg se definieron con base a los siguientes marcadores:  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  en los linfocitos Treg de memoria de acuerdo a lo reportado por Visser *et al.*, (2007), seleccionando las regiones de la siguiente manera:

1. De acuerdo a los parámetros de tamaño y granularidad, se seleccionó la región de CMSP (R1).
2. Se tomó el grupo de células  $CD4^+$  con base en parámetros de granularidad ( $G2=R1$ ).
3. De la región  $CD4^+$  se seleccionó el grupo a las células  $CD25^{high}FoxP3^+$  ( $G3=R1+R2$ ).
4. Por último, se elaboró un histograma para  $CD45RO$  y se seleccionaron las células positivas para este marcador ( $G4=R1+R2+R3$ ) tal como se muestra en la figura 11.



**Figura 11. Esquema de la selección de regiones para el análisis de las poblaciones de linfocitos T reguladores  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  a partir de CMSP.** Ejemplo representativo de un esquema para selección del análisis de la población  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ , la línea roja en el histograma es el testigo de isotipo para  $CD45RO$  y la línea azul muestra un ejemplo de células  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ .

### B) Inducción de linfocitos T reguladores ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de CEM-CMSP.

Se sabe que los linfocitos T reguladores tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune en condiciones normales (McHugh *et al.*, 2002). No obstante en pacientes con cáncer, la presencia de estos linfocitos se acentúa, sobretodo en etapas avanzadas de la

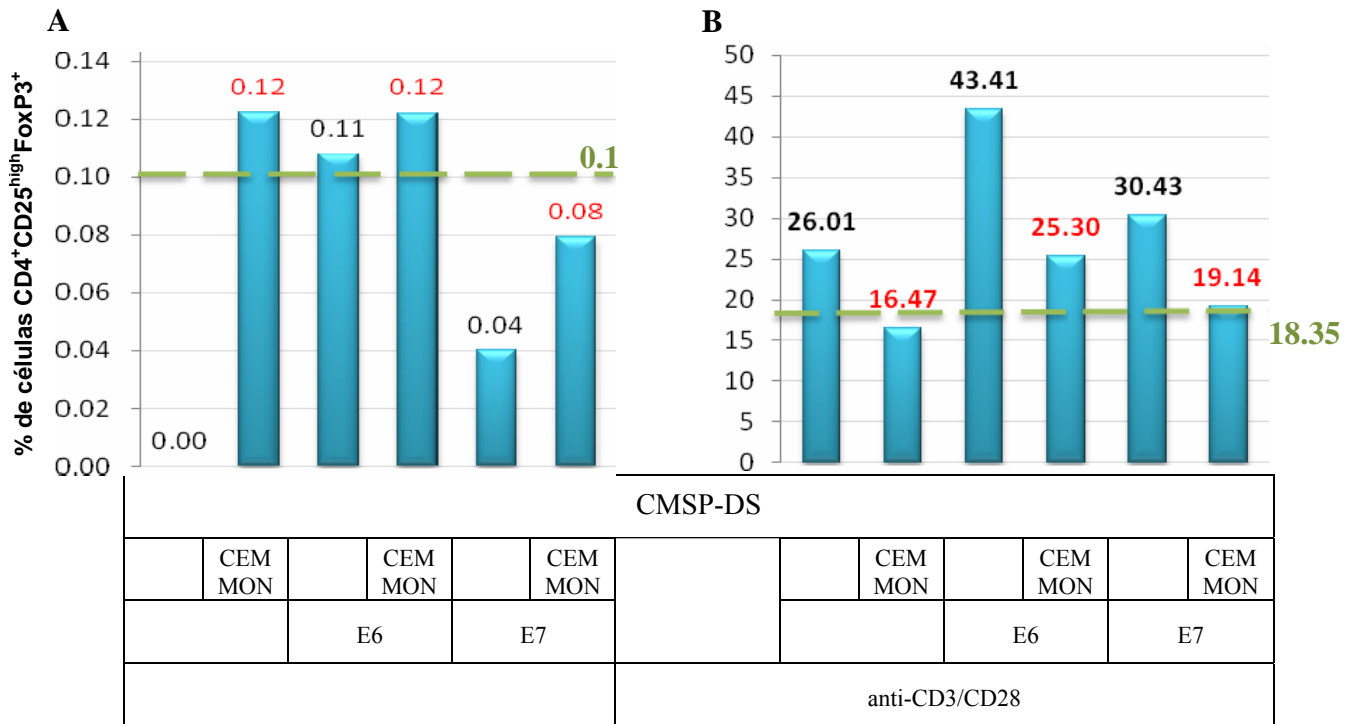
enfermedad, en donde además se asocia con supresión de la respuesta inmune (Van der Burg *et al.*, 2007). En estudios recientes se ha reportado que las CEM se encuentran presentes en diferentes tejidos y que en tumores forman parte del estroma y participan en la supresión de la respuesta inmune antitumoral (Zhao *et al.*, 2009).

En el presente estudio, se evaluaron las frecuencias de los linfocitos Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  inducidos a partir de los co-cultivos de ocho estirpes diferentes de CEM (2 CEM-MON, 2 CEM-CN, 2 CEM-NIC y 2 CEM-CaCu) con CMSP de una donadora sana y de dos pacientes con CaCu.

Como se describió previamente en la metodología, para determinar los valores de CMSP-iTreg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  se establecieron valores estándar, tanto en condiciones basales (sin estímulo) como con estímulo de las CMSP con *Dynabeads* conteniendo anti-CD3/CD28. De acuerdo a ello, los valores basales de Treg obtenidos a partir de 8 experimentos fueron 0.10 y 18.35 respectivamente. Mientras tanto, para determinar los valores de inducción de Treg con fenotipo de memoria  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ , los valores estándar encontrados en la donadora normal fueron de 0.025 en condiciones basales sin estímulo y de 0.62 para las CMSP estimuladas con *Dynabeads* conteniendo anti-CD3/CD28.

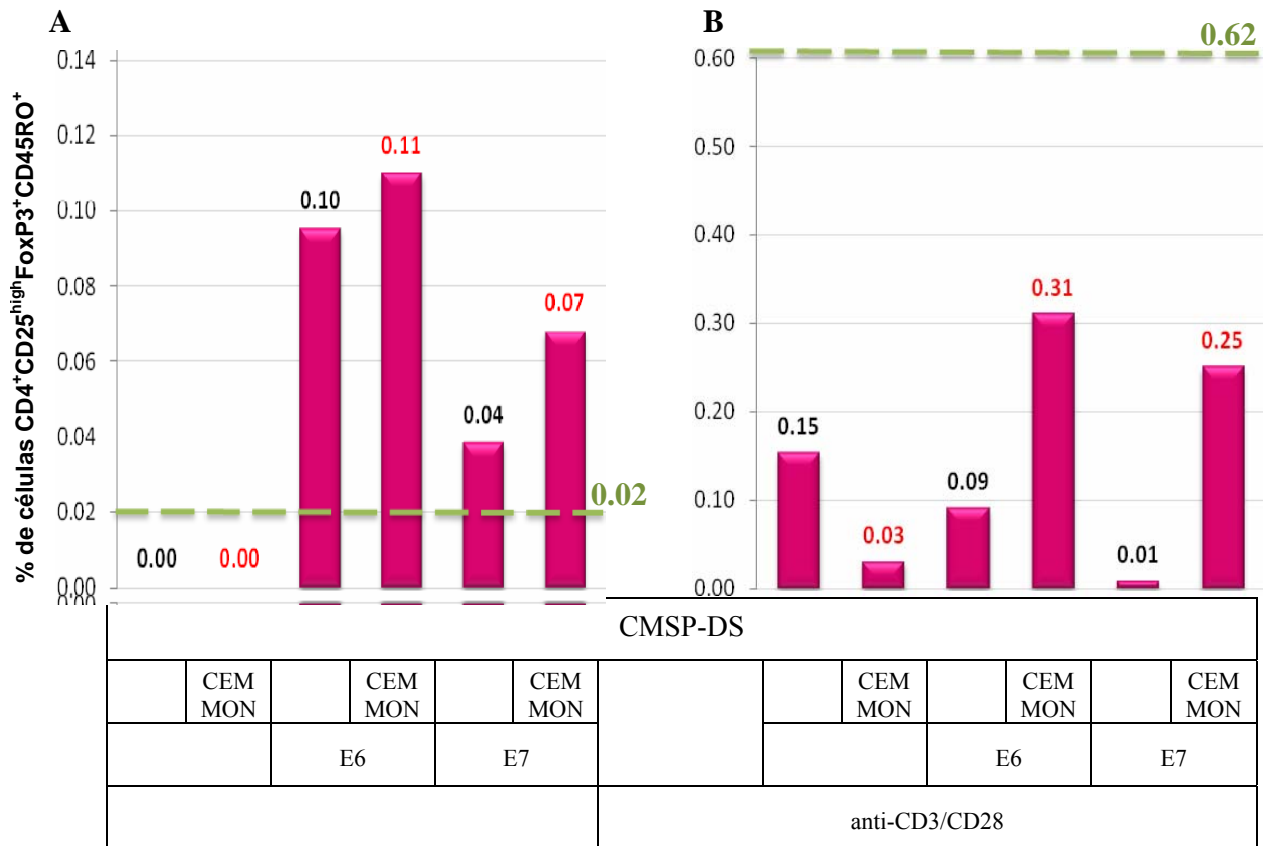
#### B.1) Inducción de linfocitos Treg con CMSP de una donadora sana en presencia de CEM-MON.

El cultivo de CMSP de una donadora normal, en presencia de la estirpe CEM-MON (04-09) indujo células Treg con un porcentaje de 0.12% y al adicionar péptidos derivados de las proteínas E6 de HPV-16, también fue capaz de inducir células T reguladoras con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  ya sea en presencia o en ausencia de las CEM (Figura 12A). Sin embargo, cuando las CMSP fueron co-cultivadas en presencia del estímulo de anti-CD3/CD28 se observó una inducción de linfocitos Treg en presencia de péptidos de las proteínas E6 (43.41%) y E7 (30.43%). No obstante, la presencia de CEM-MON en estos co-cultivos, redujo la cantidad de Treg detectadas: para el co-cultivo de CMSP con CEM-MON+anti-CD3/CD28+péptidos de E6 el valor de linfocitos Treg fue de un 25.3% y en el co-cultivo de CEM-MON+anti-CD3/CD28+péptidos de E7 el valor fue de 19.14% (Figura 12B).



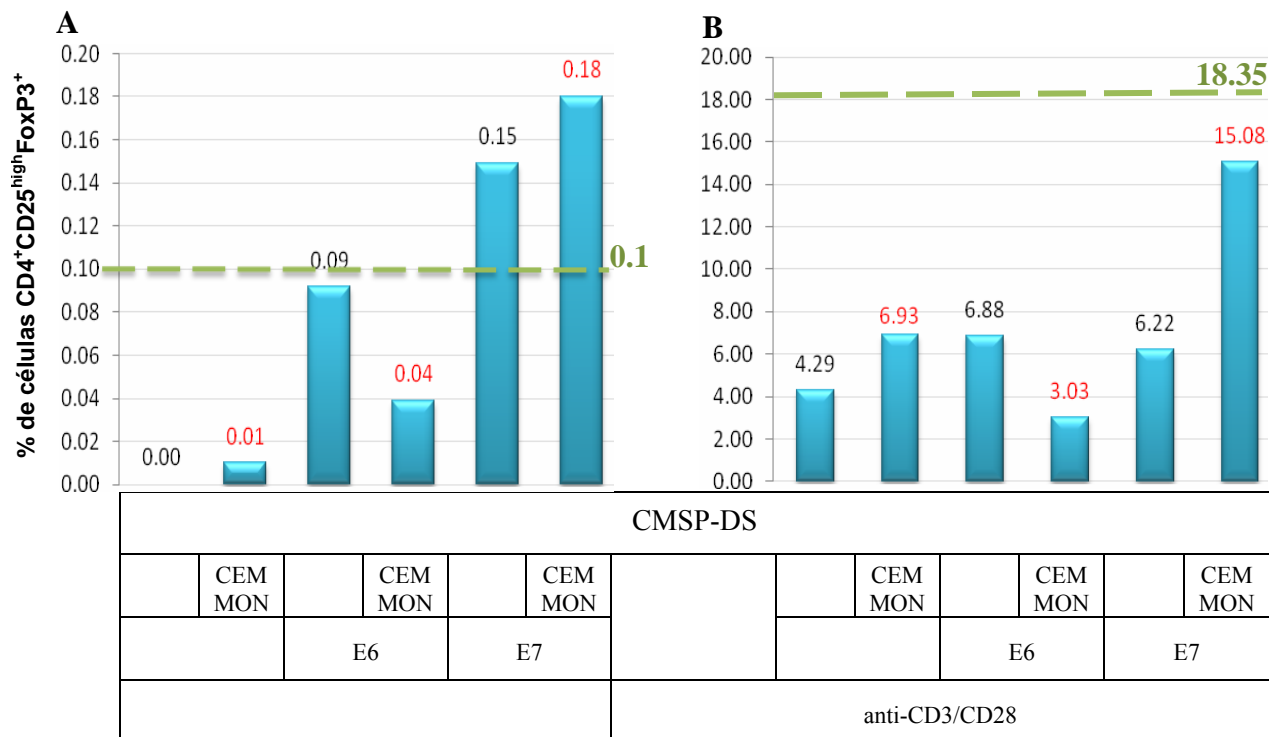
**Figura 12. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (04-10) (CEM-MON).** A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.

Al evaluar la población de las células Treg con fenotipo de memoria, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, se encontró que en los cultivos de CMSP+E6 y de CMSP+E7 en ausencia y presencia de CEM-MON mostraron aumentos de células Treg de memoria con valores cercanos a 0.1% (Figura 13A). Mientras que, en los cultivos de CMSP con CEM-MON en presencia de los péptidos de E6 ó E7 y del estímulo con anti-CD3/CD28 los valores de Treg con fenotipo de memoria no incrementó con respecto al valor del estándar normal para este caso (Figura 13B).



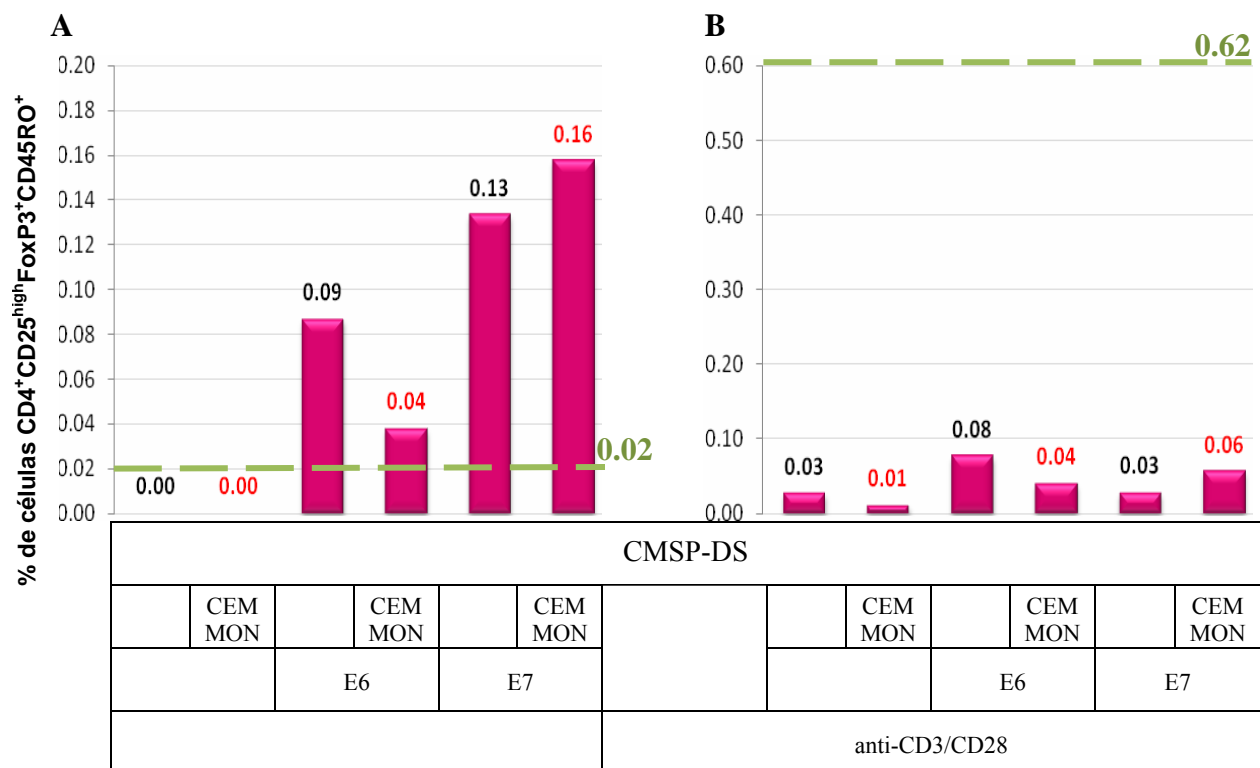
**Figura 13. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (04-09) (CEM-MON). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

En un segundo ensayo de inducción de células Treg con otra estirpe de CEM-MON (01-10) y utilizando las CMSP de la misma donadora normal que en el experimento anterior, se observó que las CMSP cultivadas en presencia o ausencia de CEM-MON y de los péptidos de E7 mostraron un aumento en la cantidad de linfocitos Treg  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  con respecto al valor del estándar normal con un valor de 0.15% y de 0.18% respectivamente (Figura 14A). De la misma manera, la adición de anti-CD3/CD28 en estos cultivos, no indujo un incremento en el porcentaje de células Treg en ninguna de las condiciones de cultivo con respecto al valor del estándar normal (Figura 14B).



**Figura 14. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

En este experimento, al analizar la población de las células Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ), el mayor número de células Treg detectable con este fenotipo se encontró en el co-cultivo de CMSP+CEM-MON+péptido de E7 con un 0.16% (Figura 15A), pero también se observó un incremento de células Treg en ausencia de CEM-MON con un valor de 0.13%, también se observó este aumento en las frecuencias de linfocitos Treg en presencia de los péptidos de E6 y en presencia o ausencia de CEM-MON (Figura 15A). Mientras que no se observaron incrementos en los valores de estos linfocitos reguladores bajo el estímulo con anti-CD3/CD28 en ninguno de los casos con respecto al valor estándar normal (Figura 15B).



**Figura 15. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON).** A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.

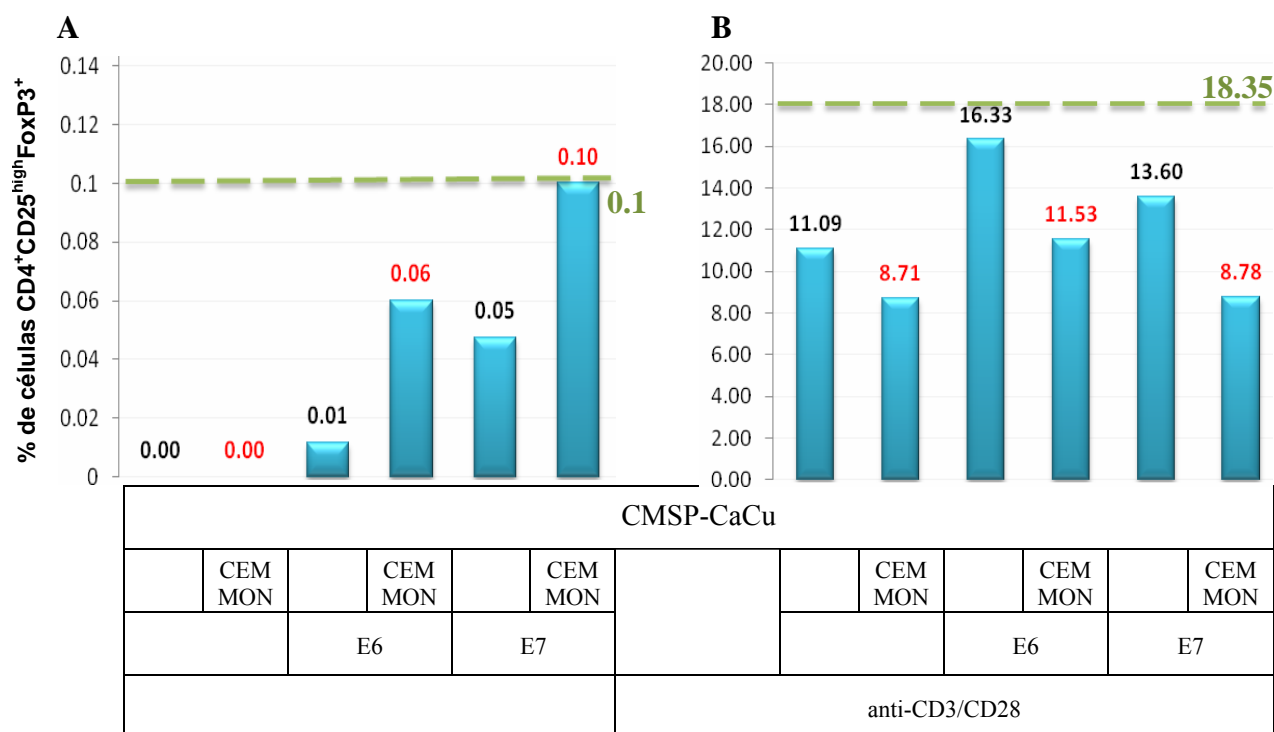
**B. 2) Inducción de Treg a partir de CMSP de una paciente con CaCu en presencia de CEM-MON.**

Tomando en consideración que la frecuencia de linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> es potencialmente mayor en pacientes con cáncer (Van der Burg *et al.*, 2007), se co-cultivaron CMSP de una paciente con CaCu (09-10) con CEM-MON (01-10) bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores y se procedió a analizar la población de Treg inducidas.

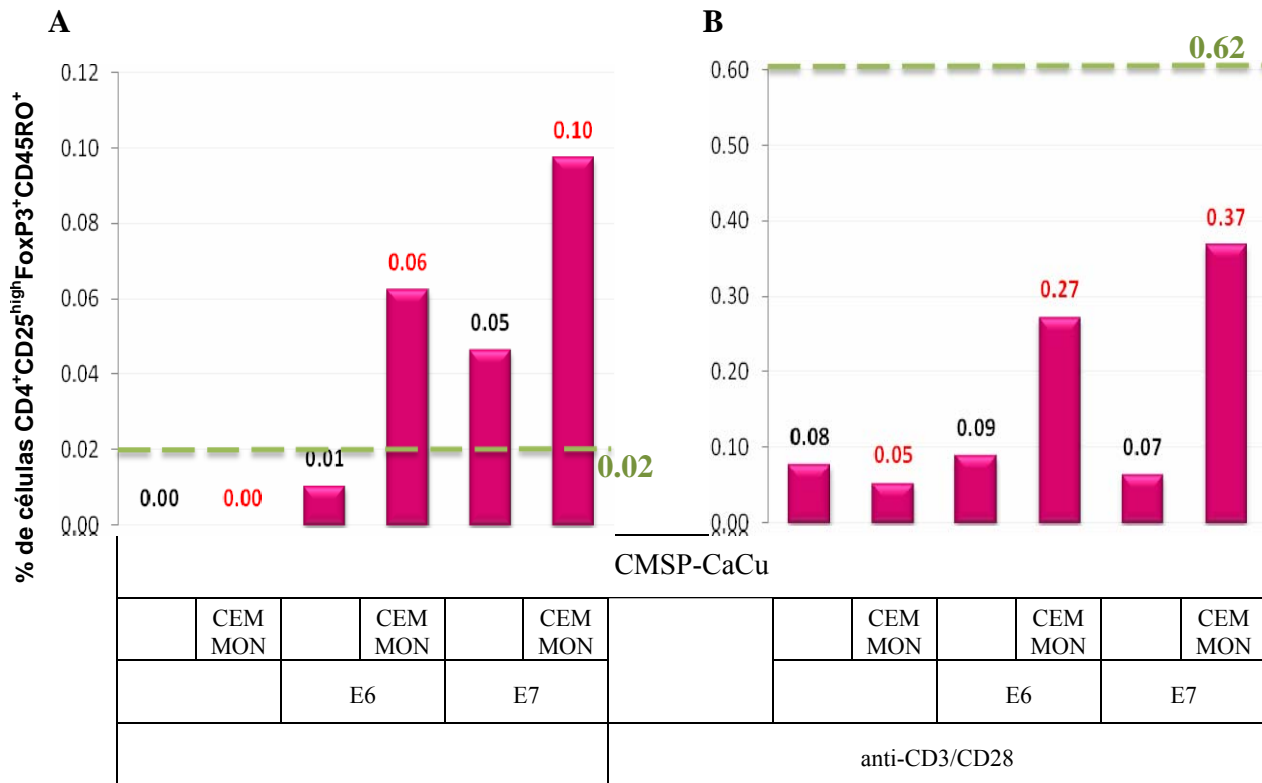
Como en los casos anteriores, los cultivos de CMSP de esta paciente mantuvieron los porcentajes de Treg < 0.1%, similares a los encontrados con CMSP de la donadora normal al ser cultivadas en ausencia del estímulo con anti-CD3/CD28 (Figura 16A). Un comportamiento similar al del caso anterior se observa para los co-cultivos a los que se adicionó anti-



CD3/CD28, ya que no se observó un incremento en la población de células con fenotipo regulador tanto en ausencia como en presencia de los péptidos antigénicos con respecto al valor estándar normal. Al igual que en los co-cultivos de CMSP derivados de la donadora normal, la presencia de CEM-MON (01-10) no indujeron linfocitos Treg en presencia de anti-CD3/CD28 (Figura 16B). Sin embargo, el porcentaje de los linfocitos Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ , en presencia de CEM-MON si aumentó la frecuencia de estas células pero en presencia de las CEM-MON y de los péptidos de E6 ó E7, obteniéndose los valores de 0.06% y de 0.1% respectivamente (Figura 17A), sugiriendo entonces, la participación de las CEM-MON en la inducción de linfocitos Treg de memoria en estos co-cultivos. Sin embargo no se indujeron linfocitos Treg de memoria con respecto al valor del estándar normal con el estímulo de anti-CD3/CD28 (Figura 17B).



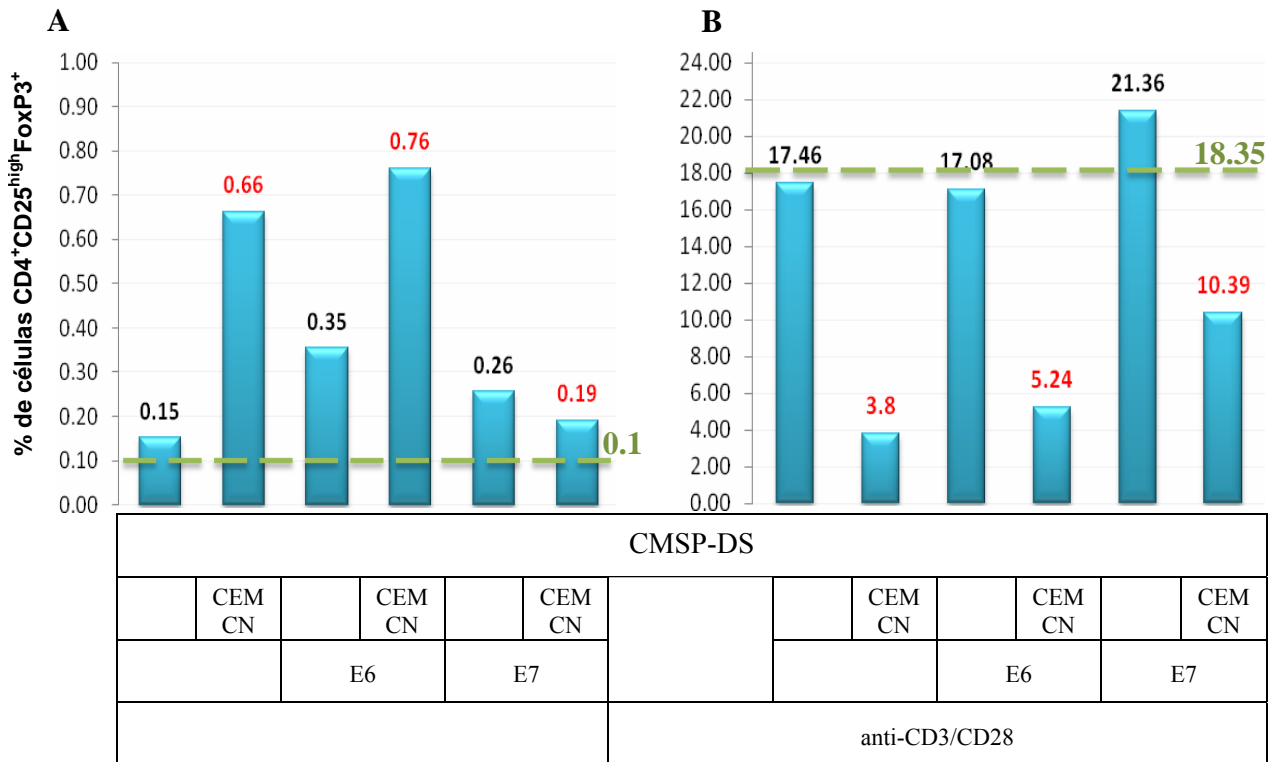
**Figura 16. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con CaCu con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**



**Figura 17. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con CaCu con células estromales mesenquimales de médula ósea normal (01-10) (CEM-MON).**  
 A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.

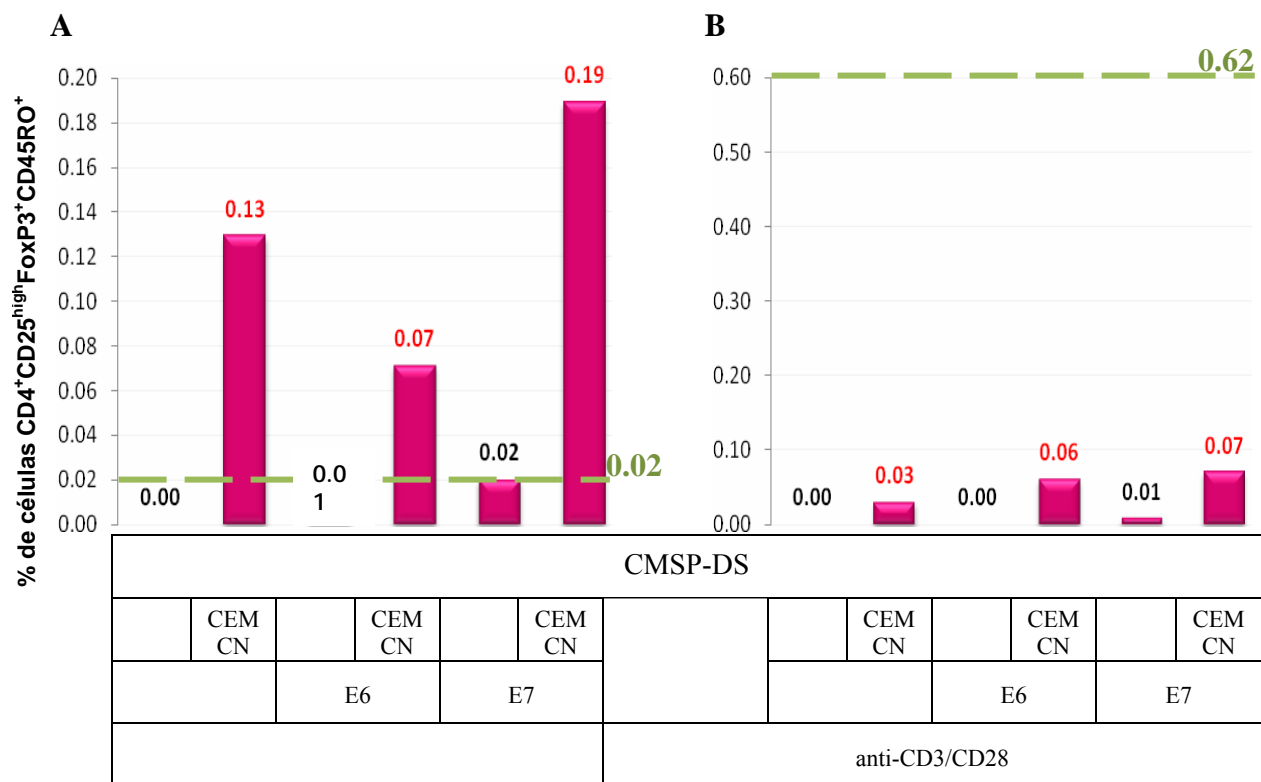
**B. 3) Inducción de Treg a partir de CMSP de una donadora normal en presencia de CEM CEM-CN.**

Al utilizar CEM obtenidas de cérvix sano (01-08) y de la misma donadora normal de CMSP con las que se realizaron los experimentos anteriores, se observó que el porcentaje de las células Treg obtenidas de los cultivos de CMSP+CEM-CN, CMSP+CEM-CN+péptidos de E6 ó E7 fueron inferiores al 1%; sin embargo, en todos los cultivos se obtuvo un incremento en el porcentaje de células Treg,  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  con respecto al valor del estándar normal (Figura 18A), cuando se les agregó el estímulo de anti-CD3/CD28, solo se vio incrementado la frecuencia de células Treg cuando se co-cultivaron CMSP+anti-CD3/CD28+péptidos de E7 obteniéndose un valor de 21.36%, superando al valor del estándar normal (Figura 18B).



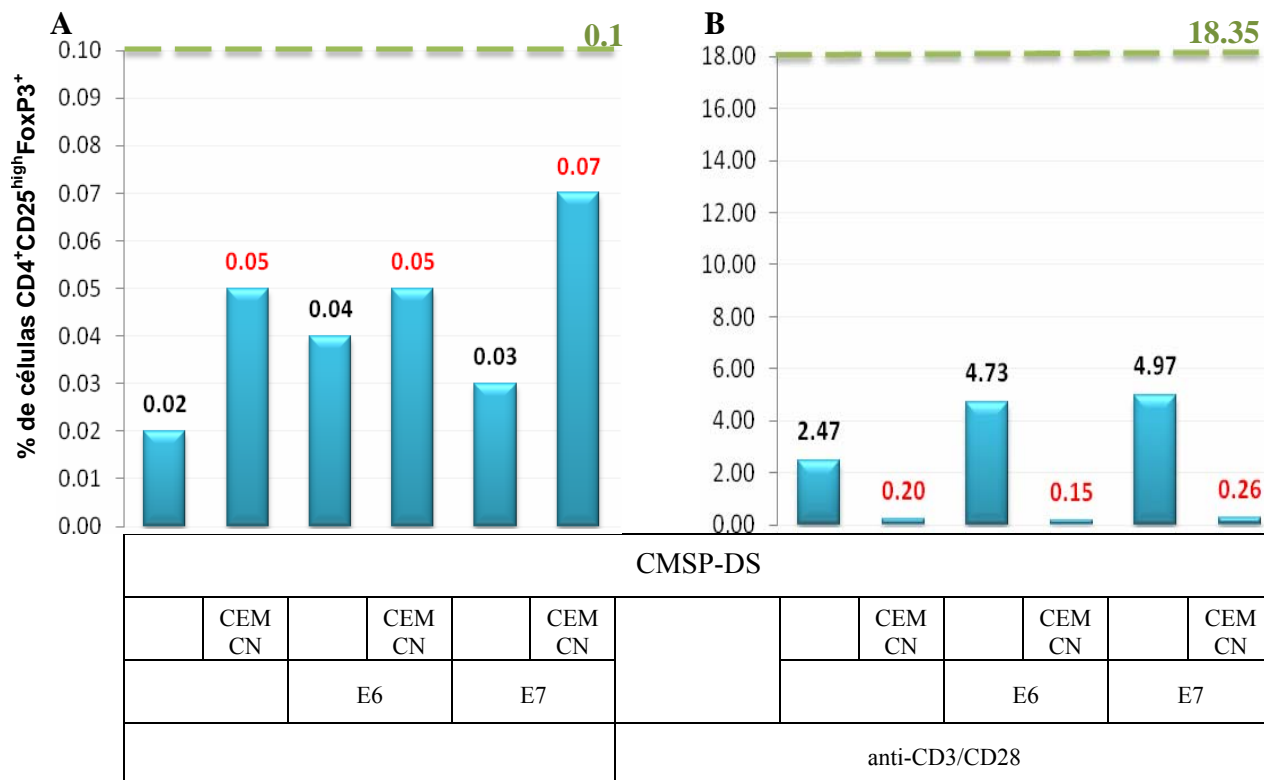
**Figura 18. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (01-08) (CEM-CN). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

Al analizar la población de células Treg de memoria, en la combinación CMSP+CEM-CN y CMSP+CEM-CN+péptidos de E6 ó E7 se detectaron porcentajes más elevados de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> con respecto al valor estándar normal con valores de 0.13% para el co-cultivo de CMSP+CEM-CN, de 0.07% para el co-cultivo de CMSP-CEM-CN+péptidos de E6 y de 0.19% para el co-cultivo de CMSP-CEM-CN+péptidos de E7 (Figura 19A). Mientras que para condiciones en donde se adicionó al cultivo el estímulo de anti-CD3/CD28 los porcentajes obtenidos de células con fenotipo de memoria fueron inferiores al valor estándar normal (Figura 19B).



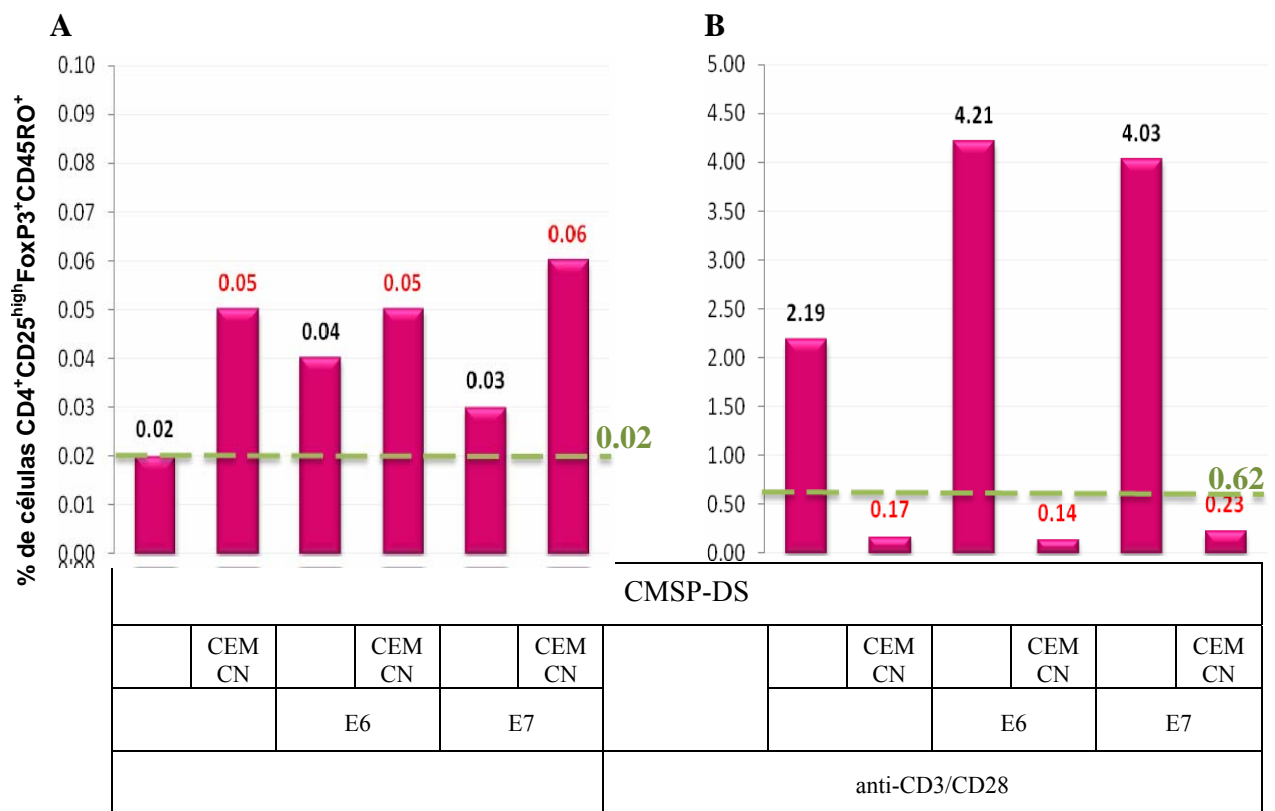
**Figura 19. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con células estromales mesenquimales de cérvix normal (01-08) (CEM-CN). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

En otro experimento utilizando las CMSP de la misma donadora normal con las estirpe celular de las CEM-CN (02-08), se encontró que el porcentaje de células Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>, en los cultivos de CMSP+CEM-CN, CMSP+péptidos de E6 ó E7 y CMSP+CEM-CN+péptidos de E6 ó E7, no fueron superiores al valor del estándar normal (Figura 20A), también se observó que en los cultivos a los que se les agregó el estímulo de anti-CD3/CD28, tampoco se observó incremento en los valores de células Treg con respecto al valor del estándar normal (Figura 20B).



**Figura 20. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (02-08) (CEM-CN). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

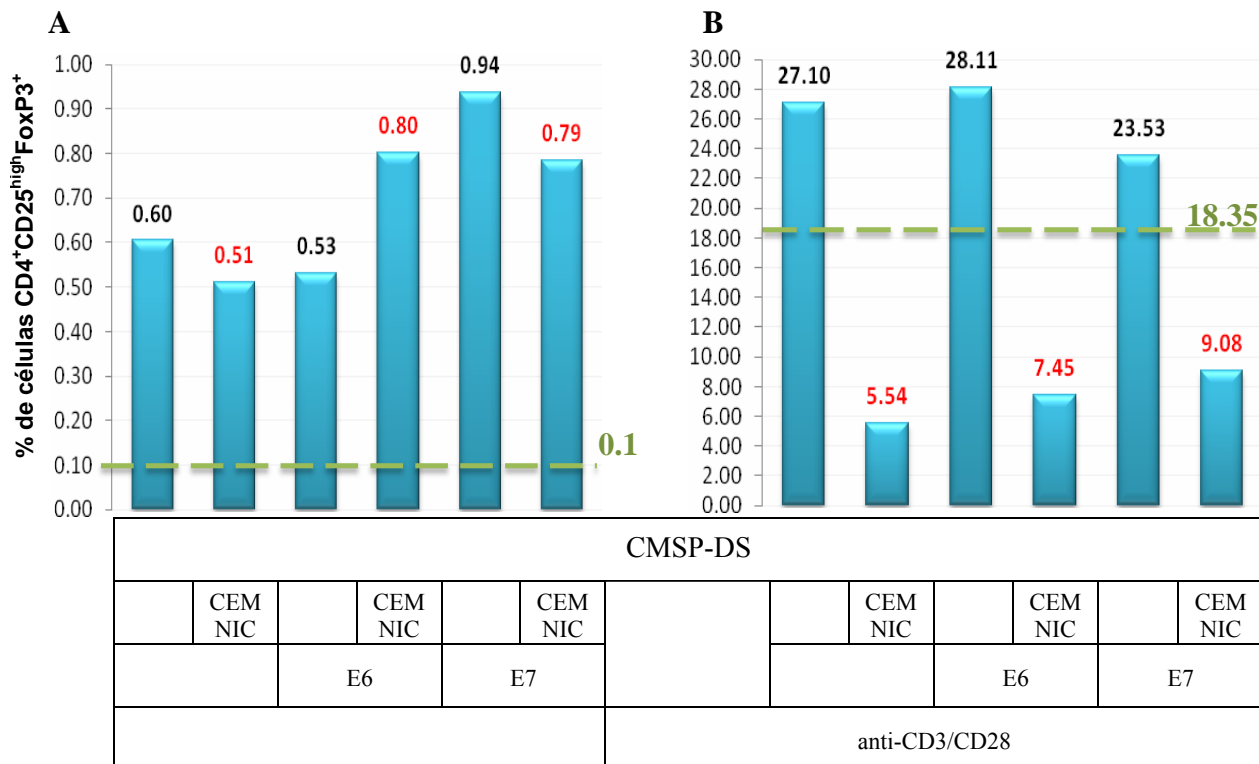
Al realizar el análisis de las células Treg de memoria en este experimento, se observó que en los co-cultivos de CMSP+CEM-CN, CMSP+péptidos de E6 ó E7 y CMSP+CEM-CN+péptidos de E6 ó E7 en ausencia del estímulo de anti-CD3/CD28, el porcentaje de Treg en todos ellos fue superior al valor del estándar normal (Figura 21A). Sin embargo, cuando estuvo presente el estímulo de anti-CD3/CD28, los valores de linfocitos Treg con fenotipo de memoria,  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ , correspondieron casi al total de los linfocitos Treg  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  previamente detectados (Figura 20B), encontrándose el valor de 4.03% en el co-cultivo de CMSP+péptidos de E7+anti-CD3/CD28 y el mayor número de células se obtuvo en el co-cultivo de CMSP+péptidos de E6+anti-CD3/CD28 con un 4.21%, en ambos casos superando el valor del estándar normal (Figura 21B).



**Figura 21. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cérvix normal (02-08) (CEM-CN). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

**B. 4) Inducción de Treg a partir de CMSP de una donadora normal en presencia de CEM-NIC.**

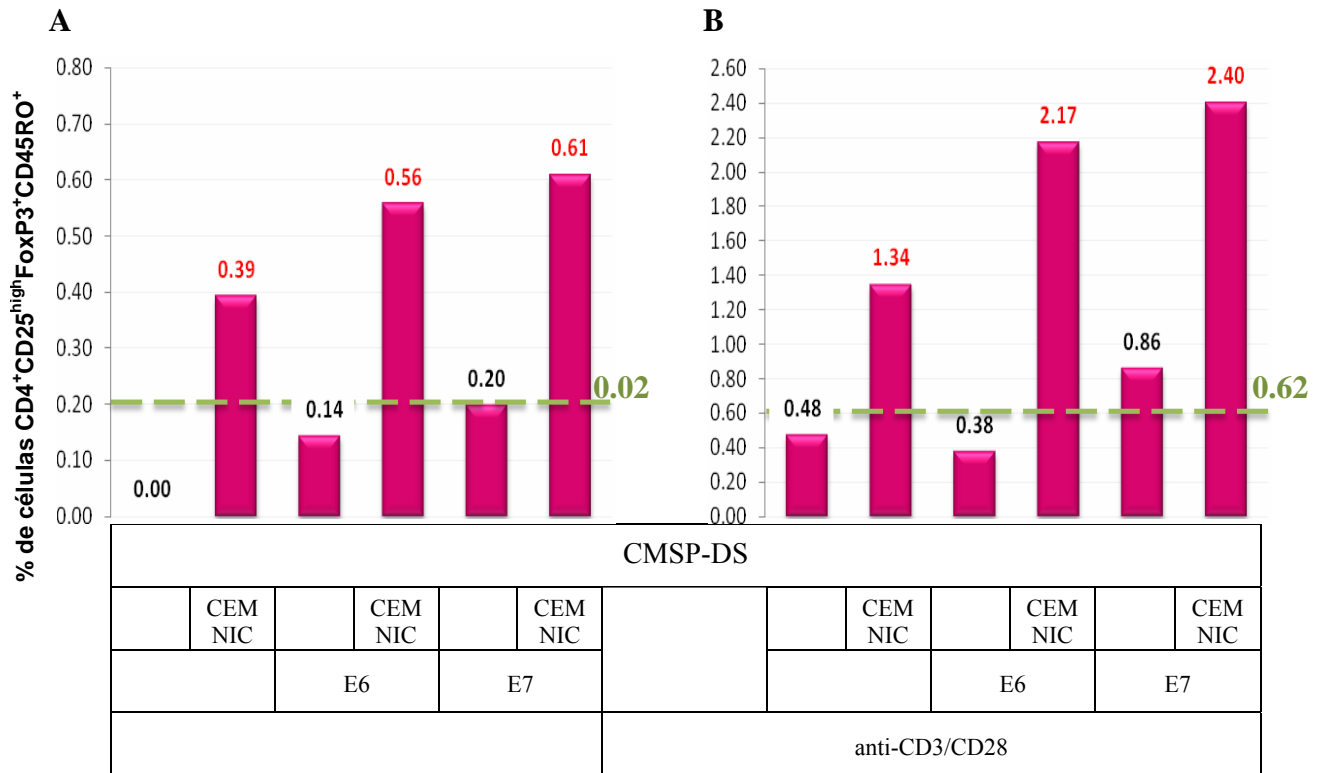
Las CMSP obtenidas de la donadora normal, utilizada como control en todos los experimentos, fueron cultivadas con CEM de NIC-I (02-09). La cantidad de células Treg detectada en los cultivos de CMSP+CEM-NIC, CMSP+péptidos de E6 ó E7 y CMSP+CEM-NIC+péptidos de E6 ó E7 se mantuvo por debajo del 1% en todos los casos, sin embargo los porcentajes son superiores al valor del estándar normal (Figura 22A). Mientras que en los co-cultivos a los cuales se les adicionó el estímulo de anti-CD3/CD28, el porcentaje de células Treg no en todos los casos fue superior al del estándar normal, solo este se vio incrementado en el co-cultivo de CMSP+péptidos de E6 con un porcentaje de 28.11 y en el co-cultivo de CMSP+péptidos de E7 con un porcentaje de 23.53 (Figura 22A).



**Figura 22. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de NIC-I (02-09) (CEM-NIC). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

Al analizar el inmunofenotipo de las células Treg de memoria en este experimento, en la mayoría de las condiciones de cultivo en las cuales se adicionaron o no CEM-NIC, ya sea en presencia o ausencia del estímulo de anti-CD3/CD28, se detectaron mayores cantidades de células con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  con respecto al valor estándar normal, solo para el co-cultivo con CMSP+anti-CD3/CD28+péptidos de E6 el porcentaje de Treg de memoria fue de 0.38 el cual es un valor inferior al del estándar normal (Figura 23). En los co-cultivos de CMSP+CEM-NIC, CMSP+CEM-NIC+péptidos de E6 y CMSP+CEM-NIC+péptidos de E7 fueron 0.39%, 0.56% y un 0.61%, respectivamente y para los co-cultivos de CMSP+péptidos de E6 y CMSP+péptidos de E7 fueron de 0.14% y 0.2%, respectivamente (Figura 23A). Por otro lado, al adicionar anti-CD3/CD28, los co-cultivos de CMSP+CEM-NIC, en CMSP+CEM-NIC+péptidos de E6+, CMSP+péptidos de E7 y CMSP+CEM-NIC+péptidos

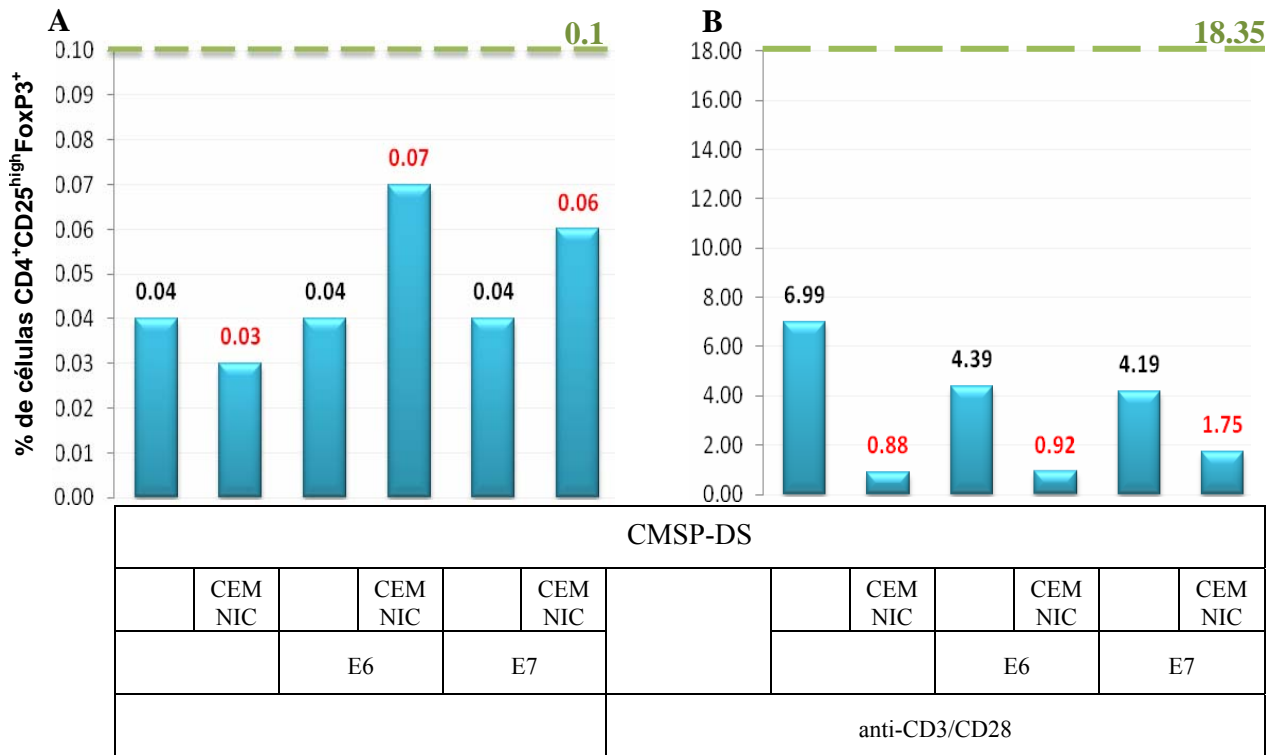
de E7 se encontraron los valores de 1.34%, 2.17%, 0.86% y de 2.40%, respectivamente (Figura 23B).



**Figura 23. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de NIC-I (02-09) (CEM-NIC). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

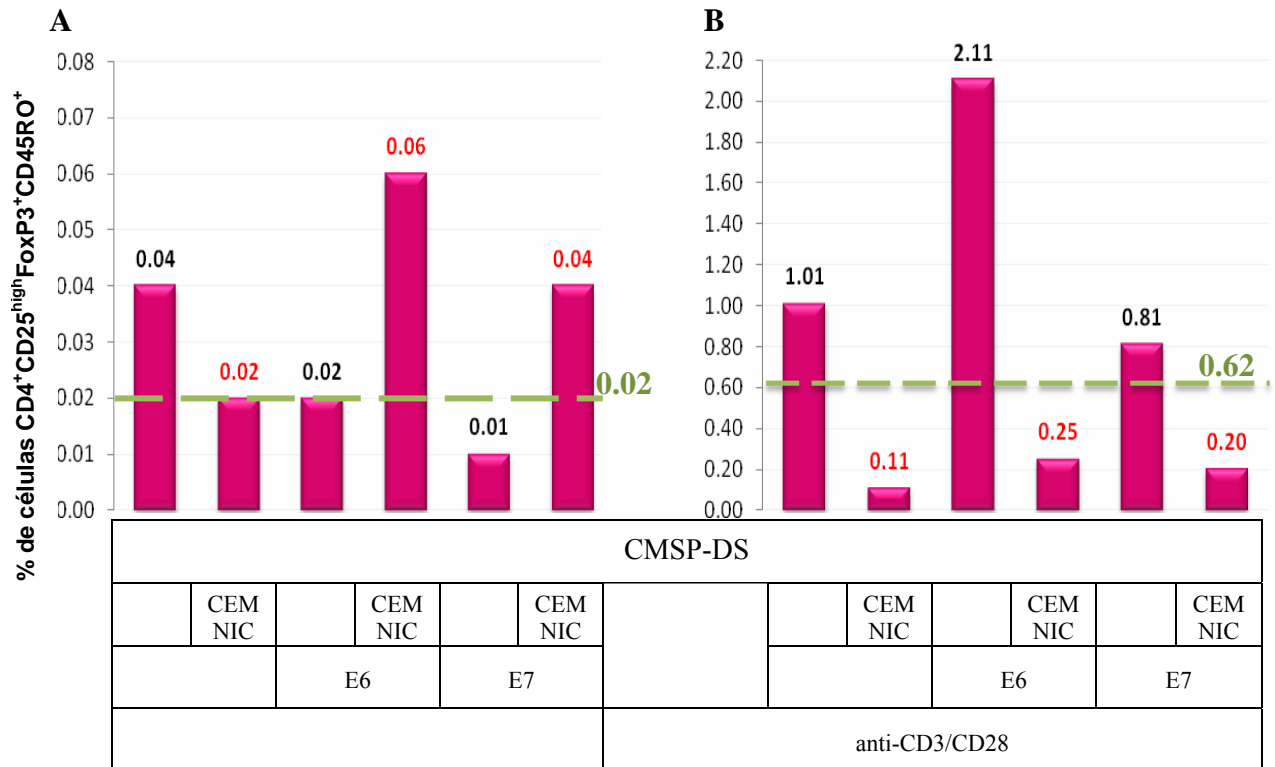
La inducción de células Treg en cultivos de CMSP de la donadora normal control con CEM-NIC-I (03-09) derivadas de una paciente con infección por HPV tipo 11, mostró que el porcentaje de células con fenotipo de Treg en cultivos de CMSP+CEM-NIC y CEMP+CEM-NIC+péptidos de E6 ó E7 fueron menores que el valor del estándar normal (Figura 24A). Así mismo, al adicionar anti-CD3/CD28, el porcentaje de células Treg tampoco se vio incrementado en ninguno de los casos con respecto al valor del estándar normal (Figura 24B).





**Figura 24. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de NIC-I (03-09) (CEM-NIC). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

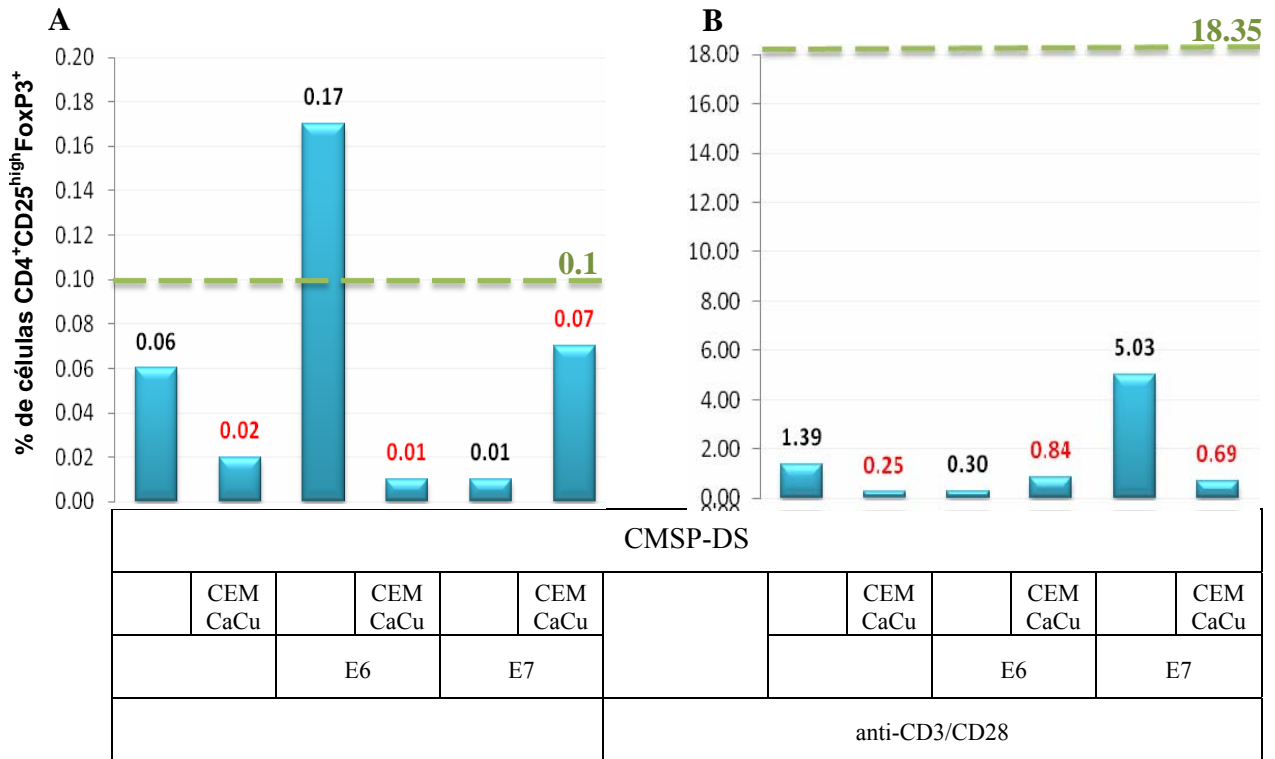
El análisis de las células obtenidas de los cultivos de CMSP+CEM-NIC, CMSP+péptidos de E6 ó E7 y CMSP+CEM-NIC+péptidos de E6 ó E7 mostró que los valores encontrados de Treg de memoria fueron superiores a los valores del estándar normal con valores del 0.06% y 0.04% respectivamente (Figura 25A). Sin embargo, cuando se adicionó el estímulo de anti-CD3/CD28, se encontró un incremento en el número de células con este fenotipo, en los cultivos en los cuales no fueron adicionadas CEM-NIC, encontrándose los valores de 2.11% y 0.81% para los co-cultivos de CMSP+péptidos de E6 ó E7 respectivamente, contra 0.25% y 0.2% en los cuales se adicionaron CEM-NIC (Figura 25B).



**Figura 25. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de NIC-I (03-09) (CEM-NIC). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

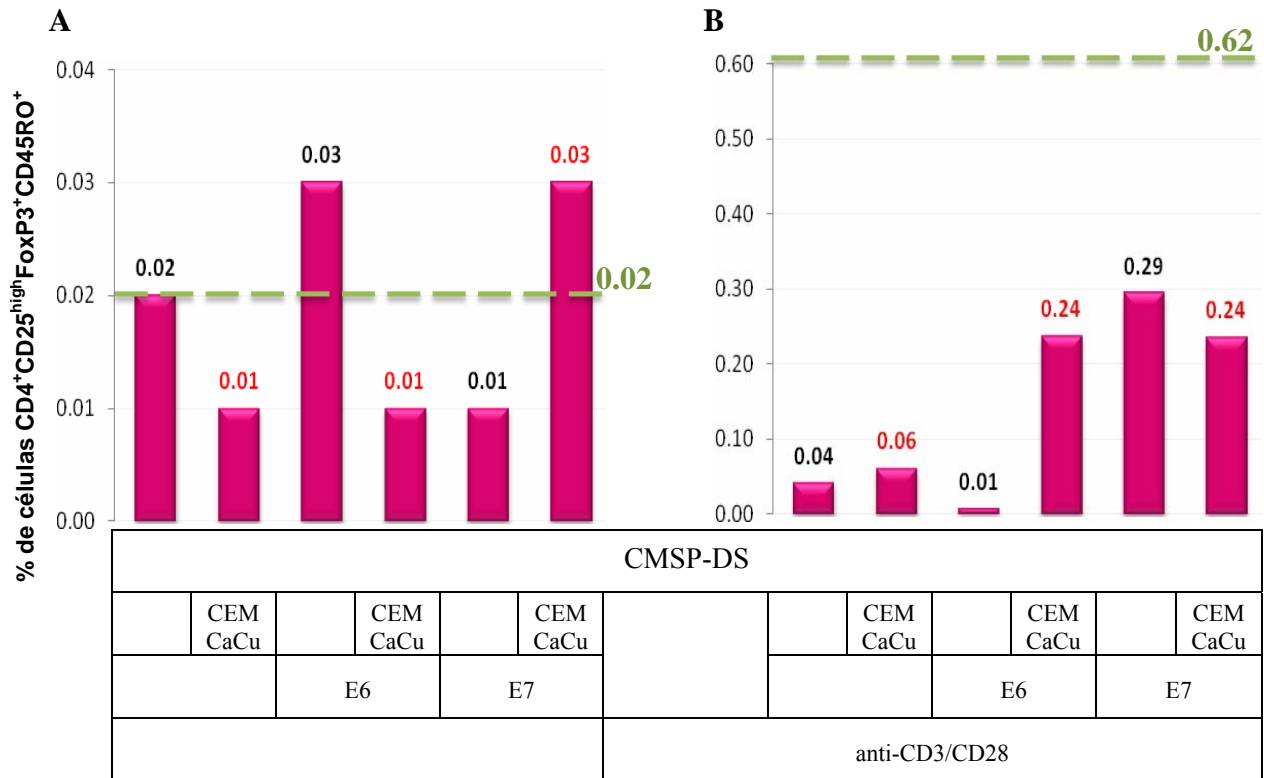
**B. 5) Inducción de Treg a partir de CMSP de una donadora normal en presencia de CEM-CaCu.**

También se llevaron a cabo experimentos utilizando CEM provenientes de tejido tumoral utilizando CMSP de la donadora normal control. Para ello, se utilizaron células de la estirpe CEM-CaCu (22-08). En este caso, las células Treg detectadas en los cultivos de CMSP+CEM-CaCu, CMSP+péptidos de E7 y CMSP+CEM-CaCu+péptidos de E6 ó E7 no incrementaron el valor de células Treg con respecto al valor del estándar normal, pero en el co-cultivo de CMSP+péptidos de E6 si aumentó la frecuencia de células Treg con respecto al valor del estándar normal con un valor de 0.17% (Figura 26A). En los co-cultivos en los cuales se adicionó el estímulo de anti-CD3/CD28, se observó que las población de células Treg, no aumentó en ninguno de los casos. (Figura 26B).



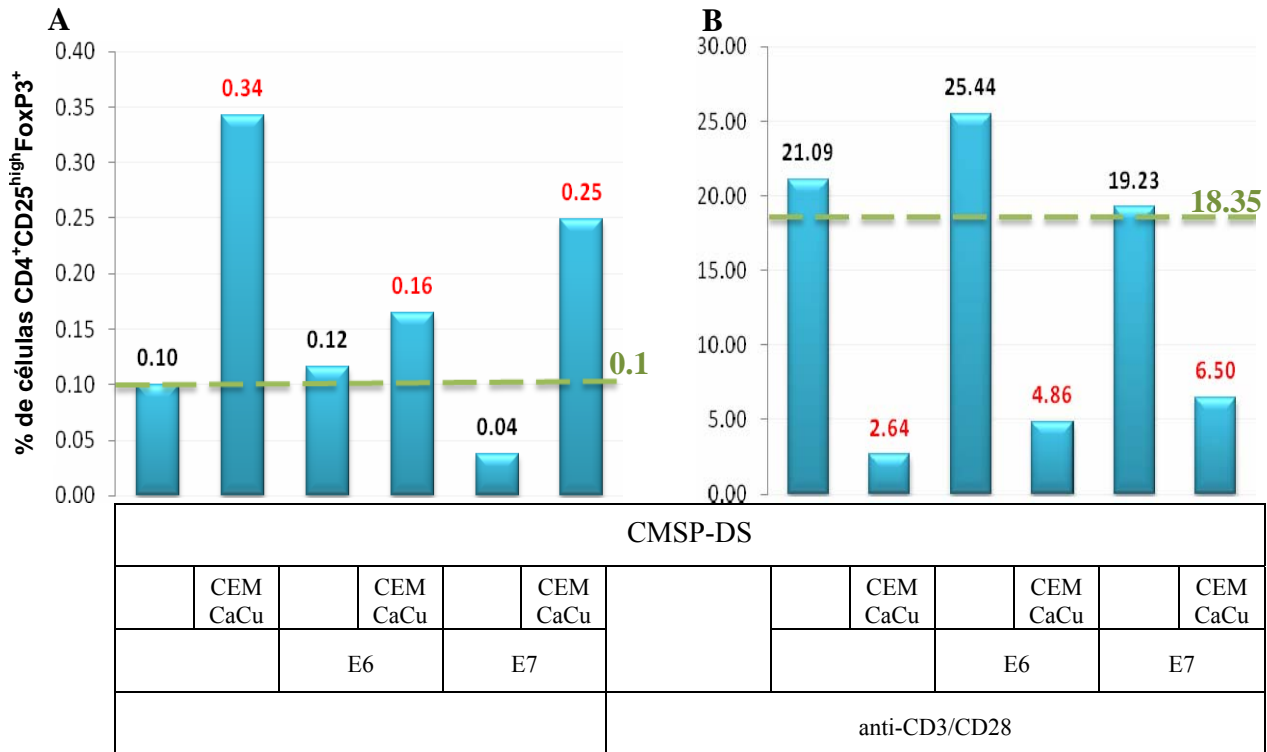
**Figura 26. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (22-08) (CEM-CaCu). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

Al analizar las población de células Treg de memoria, se observó en los co-cultivos de CMSP+E6 y de CMSP+CEM-CaCu+péptidos de E7 que los porcentajes de células Treg obtenidas de estas fueron de 0.03% para ambos casos el cual es un valor mayor al del estándar normal (Figura 27A). Sin embargo al adicionar a los co-cultivos el estímulo con anti-CD3/CD28 el porcentaje de células Treg con fenotipo de memoria fue no aumentó con respecto al valor del estándar normal (Figura 27B).



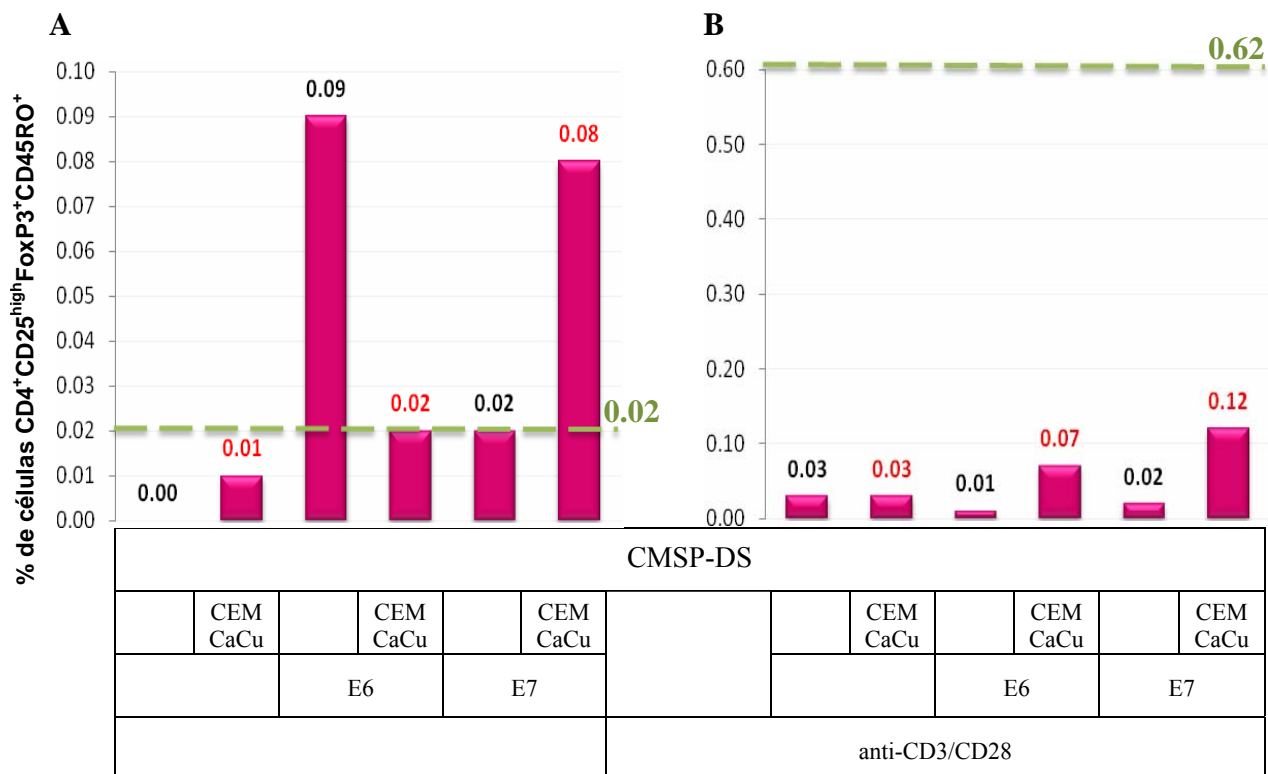
**Figura 27. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (22-08) (CEM-CaCu). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

En otro experimento realizado con una estirpe diferente de CEM-CaCu (31-09) y utilizando CMSP de la misma donadora normal, se indujeron células Treg cuando las condiciones de los cultivos fueron CMSP+CEM, CMSP+péptidos de E6 y CMSP+CEM+péptidos de E6 ó E7 (Figura 28A). Sin embargo, al agregar el estímulo de anti-CD3/CD28, el porcentaje de células Treg incrementaron en ausencia de CEM-CaCu, obteniéndose los valores de 25.44% y 19.23% para los cultivos con CMSP+péptidos de E6 y CMSP+péptidos de E7, respectivamente. En este caso, la presencia de CEM-CaCu en los co-cultivos disminuyó el porcentaje de células Treg, obteniéndose los valores de 4.86% y 6.5%, respectivamente (Figura 28B).



**Figura 28. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora normal con células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (31-09) (CEM-CaCu). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

Al determinar las células Treg de memoria, se encontró que la condición de cultivo de CMSP+E6 y de CMSP+CEM-CaCu+péptidos de E7 aumentaron las frecuencias de estas células con valores de 0.09% y de 0.08% respectivamente (Figura 28A). Al adicionar a los diferentes co-cultivos el estímulo de anti-CD3/CD28 no aumentaron los valores de células Treg de memoria con respecto al valor del estándar normal (Figura 29B).

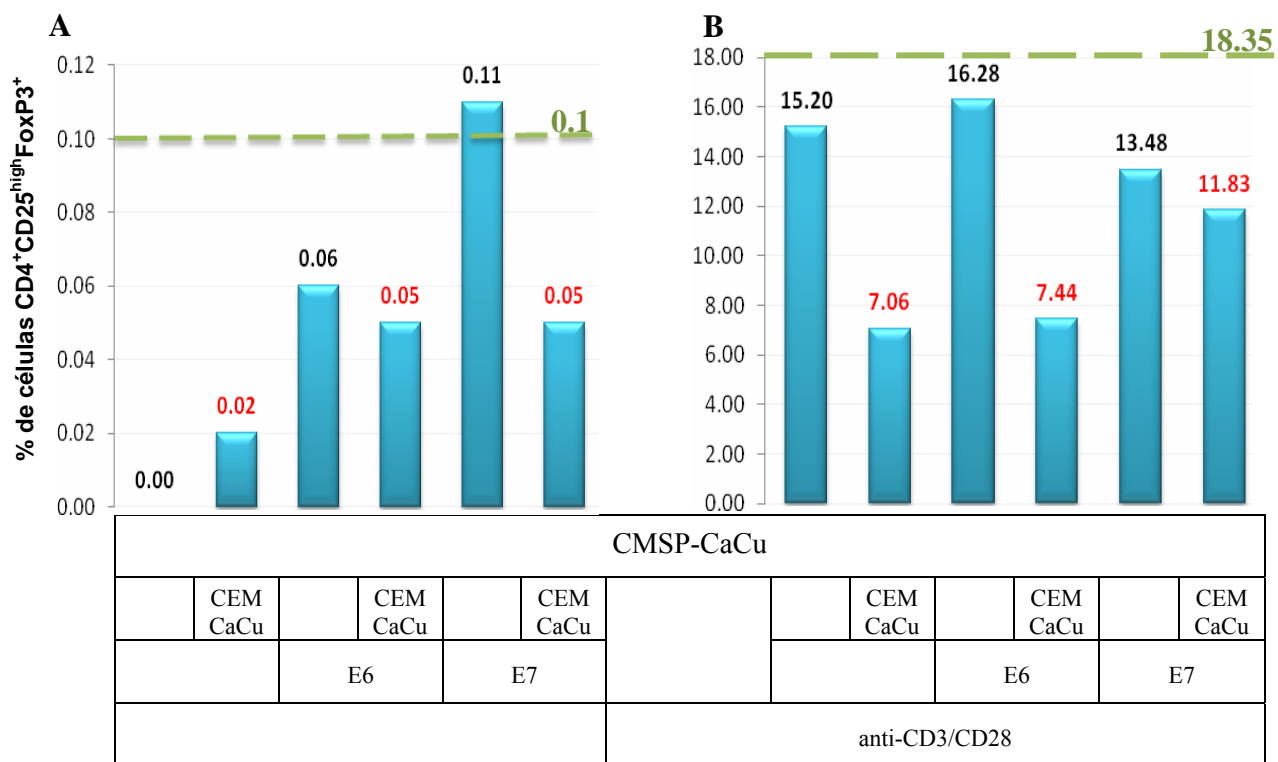


**Figura 29. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una donadora sana con células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (31-09) (CEM-CaCu).** A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.

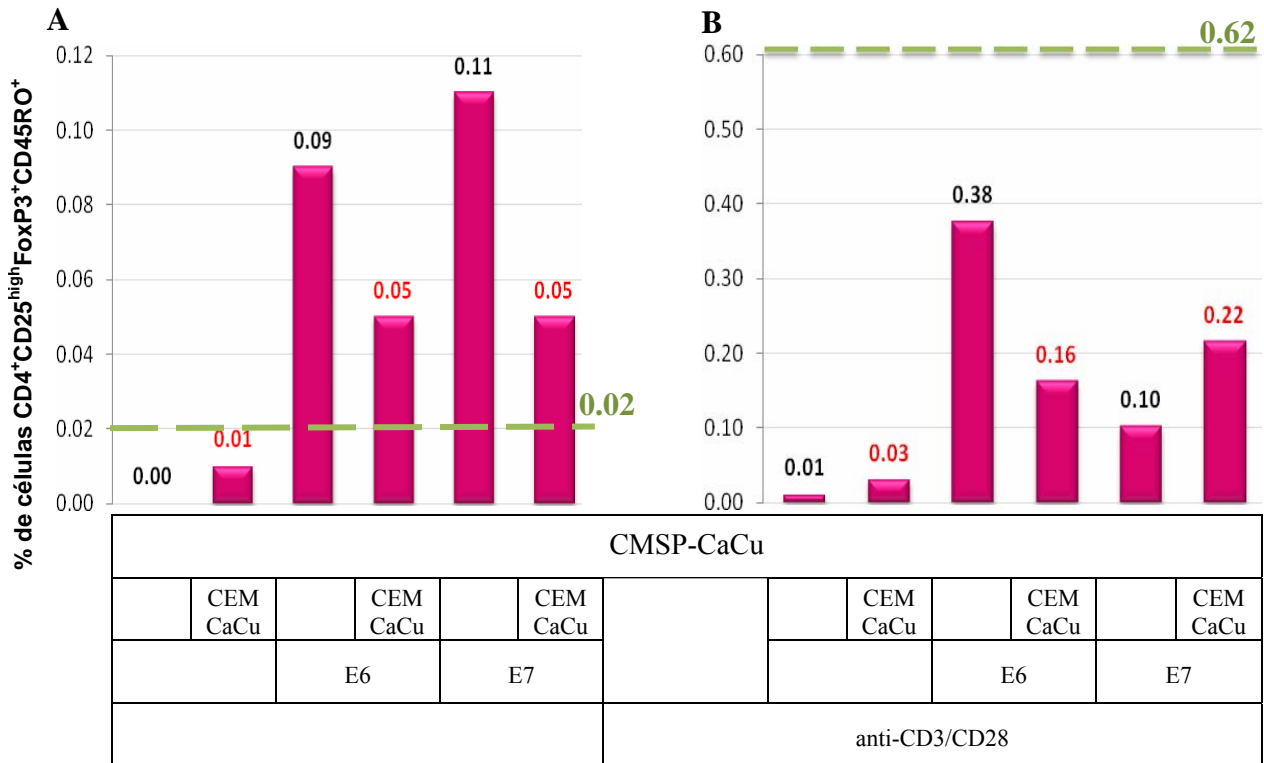
**B. 6) Inducción de Treg a partir de CMSP de una paciente con CaCu en presencia de CEM-CaCu.**

En un último ensayo realizado con CEM-CaCu (31-09) y con CMSP de una paciente con CaCu (07-10), se encontró que para las condiciones de cultivo de CMSP+péptidos de E7 aumentó el número de células T con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> con respecto al valor del estándar normal fue de un 0.11% (Figura 30A). Sin embargo al adicionar el estímulo con anticuerpos anti-CD3/CD28, los porcentajes de las células Treg no incrementaron en ninguno de los co-cultivos(Figura 30B). Por su parte el porcentaje de inducción de Treg de memoria se vieron incrementadas en los co-cultivos de CMSP+E6, CMSP+CEM-CaCu+péptidos de E6 y CMSP+péptidos de E7 con porcentajes de 0.09, 0.05 y 0.11 respectivamente (Figura 31A). En

los diferentes co-cultivos con anti-CD3/CD28 los porcentajes de los linfocitos Treg de memoria fueron inferiores al valor del estándar normal (Figura 31B).



**Figura 30. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con CaCu con células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (31-09) (CEM-CaCu). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**



**Figura 31. Evaluación de la capacidad inductora de linfocitos Treg de memoria ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ ) en co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con CaCu con células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (31-09) (CEM-CaCu). A. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B. CMSP de una donadora normal se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de CEM en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de Treg en ausencia (negro) o presencia (rojo) de CEM con respecto a las CMSP. La línea punteada en verde indica el valor estándar normal.**

### **Evaluación de la actividad supresora de linfocitos T reguladores inducidos.**

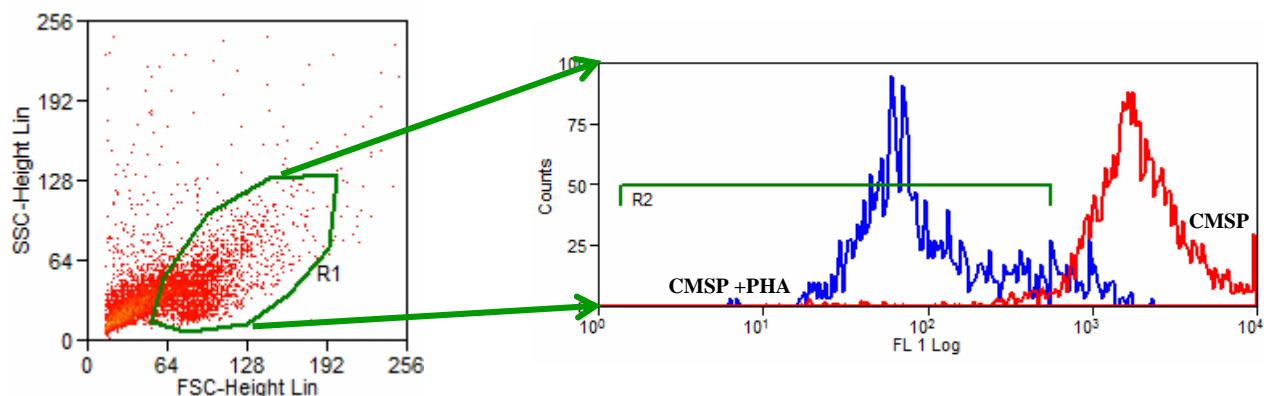
La actividad supresora de las CMSP-iTreg generadas en los diferentes co-cultivos fue determinada mediante la capacidad de inhibir la proliferación de CMSP de una donadora sana.

#### **A) Análisis de inhibición de la proliferación.**

Al término de 4 días de estímulo, se analizaron los niveles de CFSE en los linfocitos proliferantes mediante citometría de flujo de la siguiente manera:



Se escogió la región de CMSP con los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC), región 1 (R1). A partir R1 se realizó un histograma para CFSE y se analizaron las CMSP que se cultivaron durante 4 días sin estímulo (línea roja) y se hizo la región R2, la cual proporciona el porcentaje de CMSP que proliferaron durante 4 días con estímulo de PHA marcadas con CFSE (línea azul) tal y como se muestra en la figura 32.



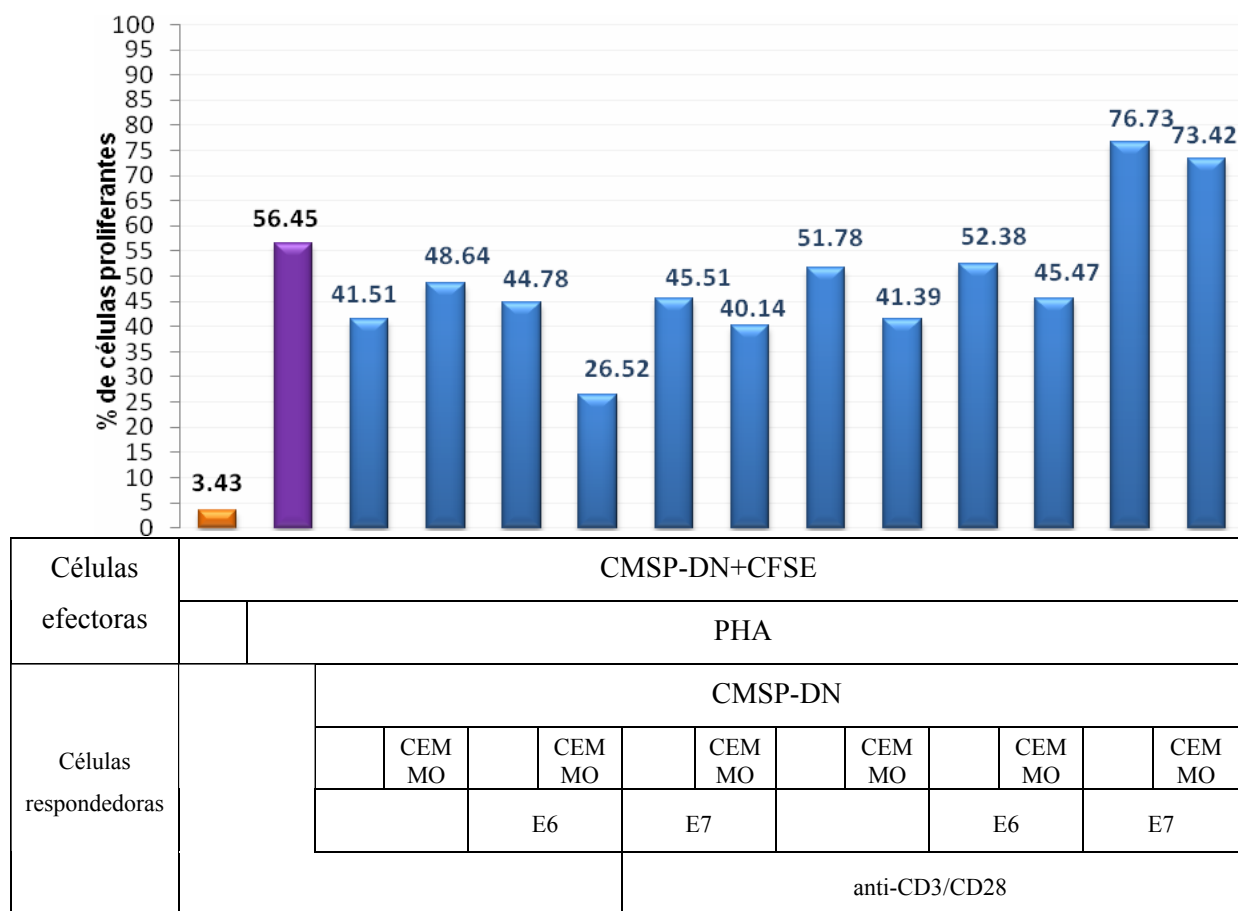
**Figura 32. Esquematación de selección de regiones para el análisis del porcentaje de células proliferantes en el cultivo.**

La inhibición de la proliferación se analizó en las CMSP de una donadora normal (tomada como testigo) y de 2 pacientes con CaCu marcadas con CFSE y estimuladas con PHA (linfocitos respondedores), mediante la adición de CMSP-iTreg obtenidos de los co-cultivos de las ocho estirpes diferentes de CEM (2 CEM-MON, 2 CEM-CN, 2 CEM-NIC y 2 CEM-CaCu) con CMSP de una donadora normal y de 2 pacientes con CaCu como se mencionó previamente.

A. 1) *Capacidad inmunosupresora de las CMSP-iTreg derivadas de cultivos en presencia de CEM-MON.*

Para determinar el efecto inmunosupresor de las CMSP-iTreg obtenidas de los cultivos con CEM-MON (04-09), sobre la proliferación de CMSP de una donadora normal, inicialmente se evaluó el porcentaje de CMSP-CFSE proliferantes bajo el estímulo únicamente con PHA, el valor obtenido fue de 56.45% y fue tomado como valor de referencia. Al evaluar el porcentaje de CMSP-CFSE proliferantes (linfocitos respondedores) en presencia de los iTreg, se encontró una ligera disminución en el número de células proliferantes, encontrándose valores entre 40-53% en varios de los casos. El mayor efecto inhibitorio se observó cuando se adicionaron CMSP-iTreg derivadas del co-cultivo de CMSP+CEM-MON+péptidos de E6, el número de

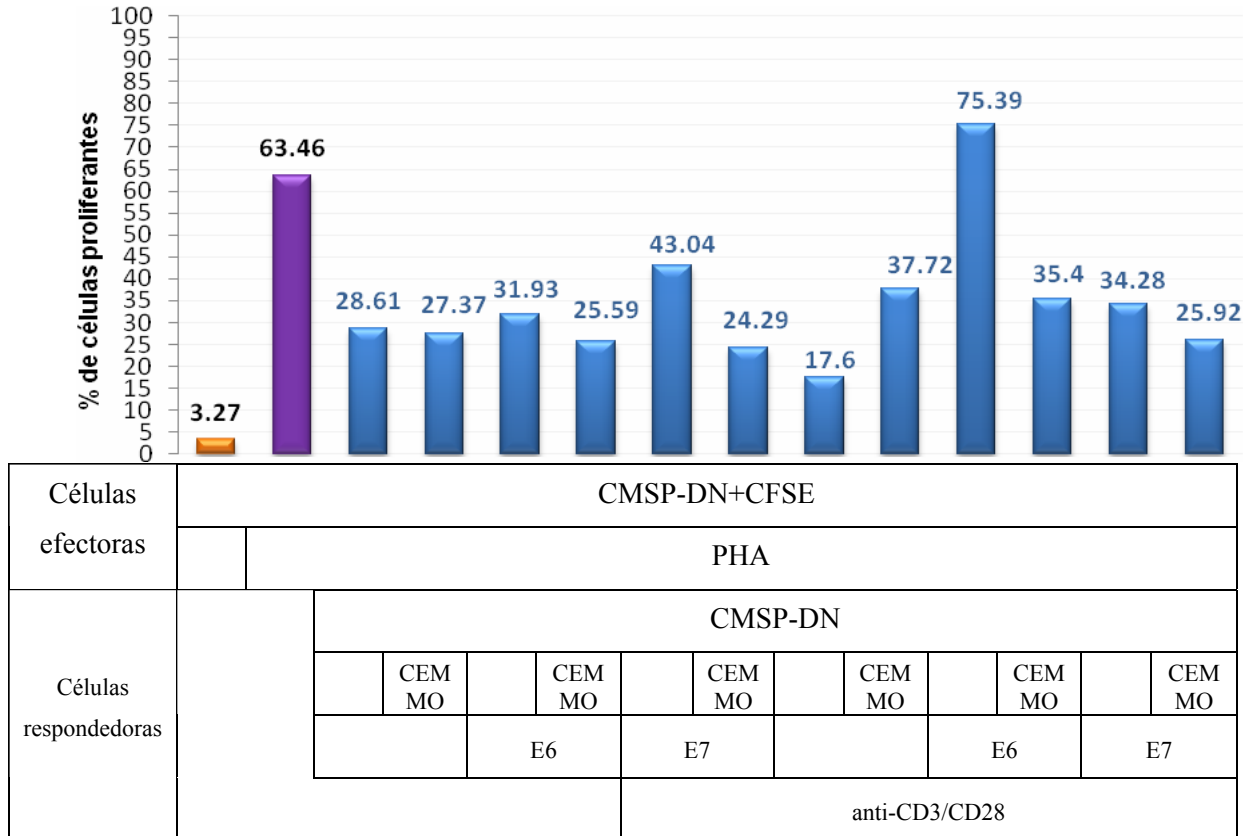
células proliferantes disminuyó a 26.52 % (Figura 33). Por otro lado cuando se cultivaron CMSP-CFSE con CMSP-iTreg de co-cultivos con péptidos E7, en presencia y ausencia de CEM-MON y anti-CD3/CD28, se observó un ligero incremento en la proliferación de los linfocitos respondedores (Figura 33).



**Figura 33. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-MON (04-09).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

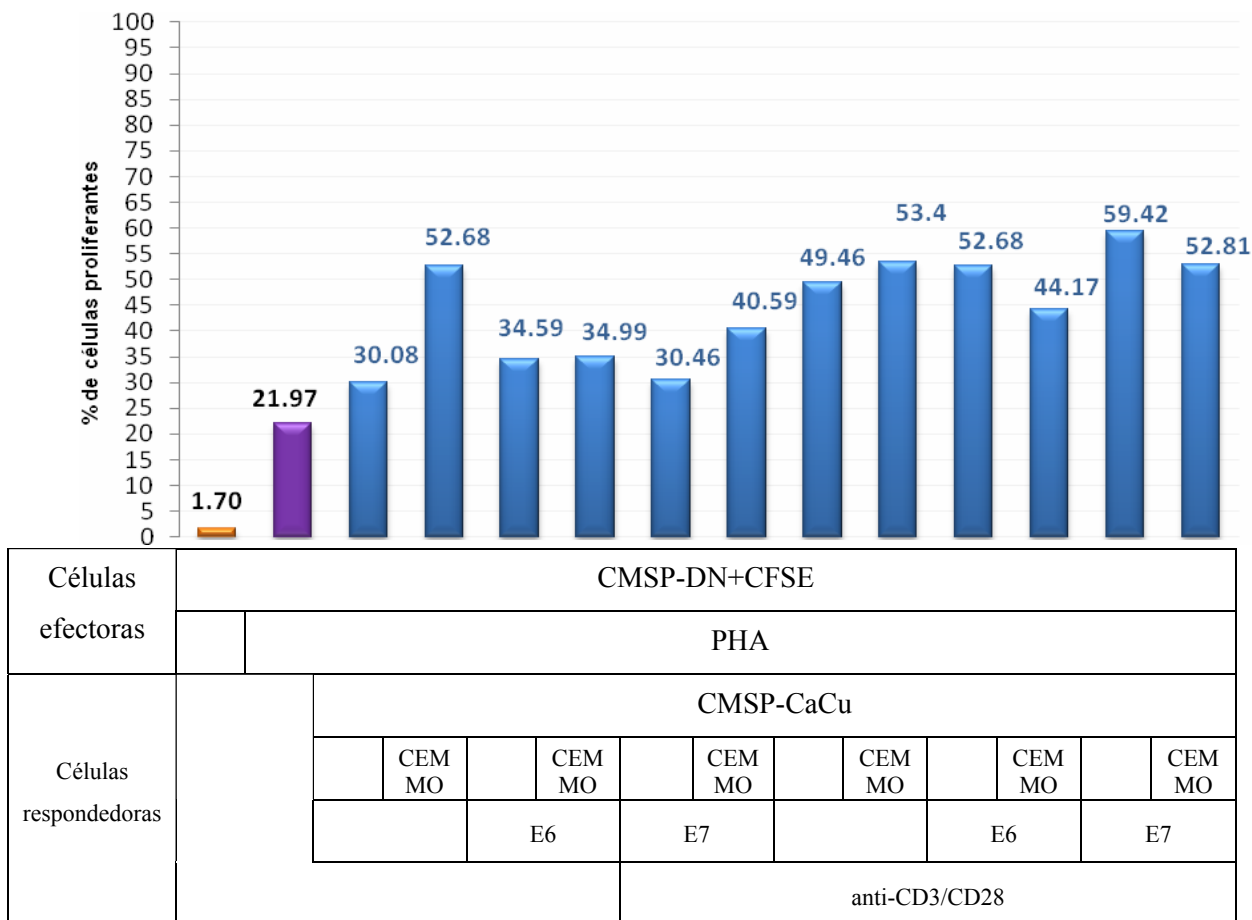
En otro experimento realizado con CMSP-iTreg derivados del co-cultivo de CMSP de una donadora normal con CEM-MON (01-10), se observó que en la mayoría de los casos, los CMSP-iTreg produjeron disminución en el número de células proliferantes respecto al cultivo de referencia (63.46%), en siete de los casos hubo inhibición de la proliferación en más del 50%, encontrándose valores de 17-32% de células proliferantes. Sólo en el caso de las células

Treg derivadas del cultivo de CMSP con péptidos E6 y anti-CD3/CD28 se observó incremento en el número de células proliferantes respecto al valor de referencia con un 75.39% (Figura 34).



**Figura 34. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-MON (01-10).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

En otro cultivo de linfocitos respondedores de una paciente con CaCu (09-10) con las CMSP-iTreg provenientes del co-cultivo con CEM-MON (01-10) se encontró que la adición de CMSP-iTreg obtenidas de las diferentes condiciones de co-cultivo, indujeron un mayor porcentaje de células proliferantes respecto al valor de referencia (21.97%) (Figura 35).

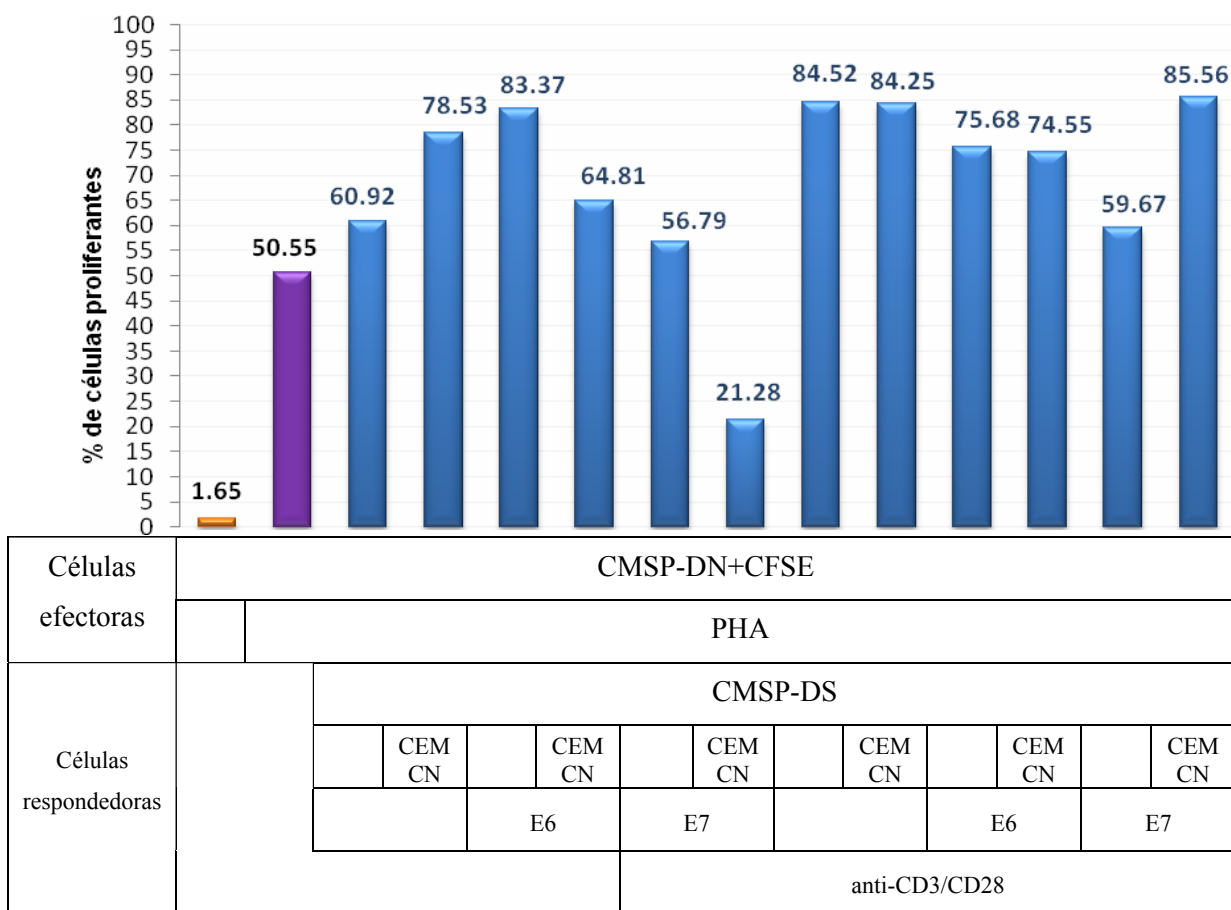


**Figura 35. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una paciente con CaCu (09-10) con CEM-MON (01-10).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

A. 2) *Capacidad inmunosupresora de las CMSP-iTreg derivadas de cultivos en presencia de CEM-CN.*

En el cultivo de linfocitos respondedores de la donadora control con CMSP-iTreg provenientes de los co-cultivos con CEM-CN (01-08), se observó que la cantidad de células proliferantes encontradas en cultivo de referencia de los linfocitos respondedores fue de 50.55%. Sólo las células CMSP-iTreg derivadas del co-cultivo de CMSP+péptidos de E7+CEM-CN redujeron el número de células proliferantes a más de la mitad del valor de referencia, dando un valor de

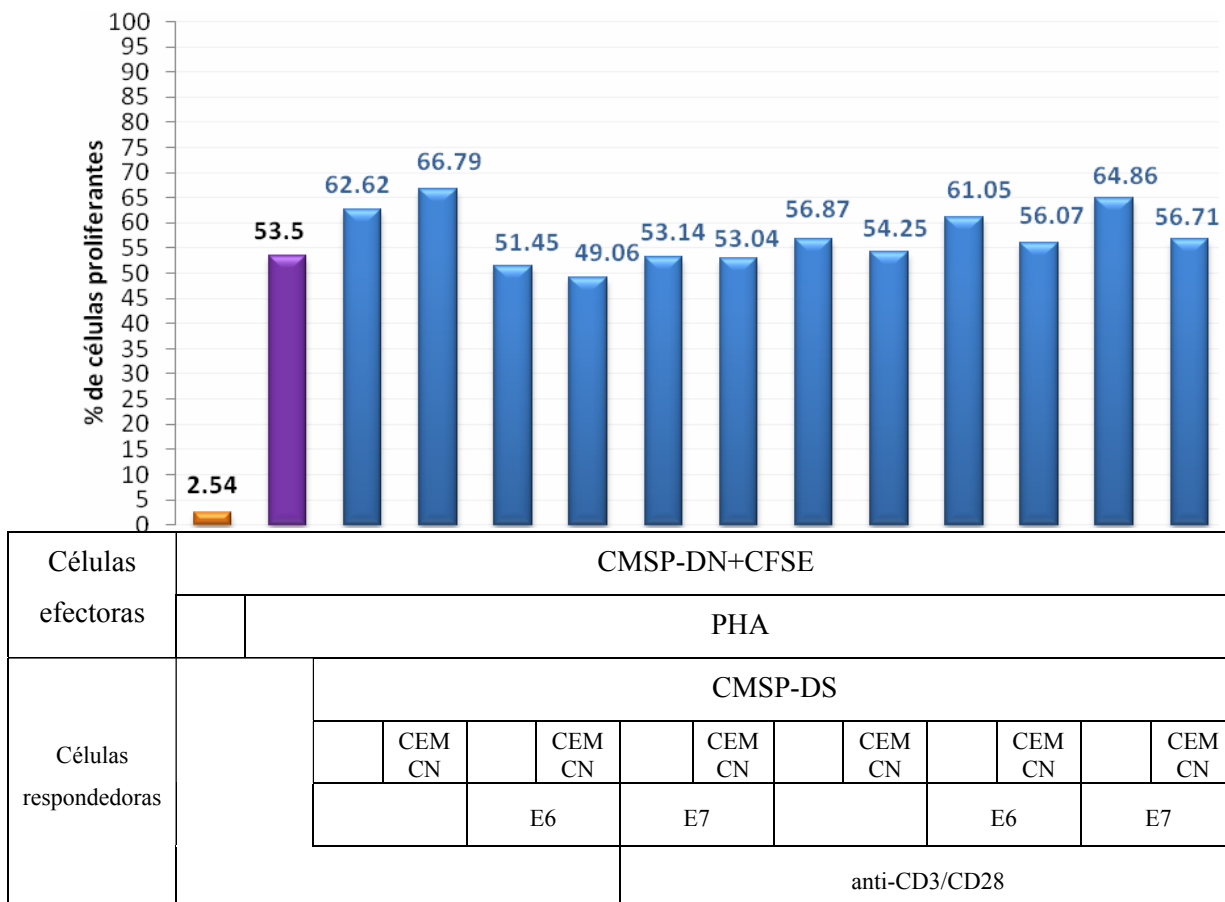
21.28%. Mientras que en todos los demás casos, las CMSP-iTreg incrementaron la proliferación de los linfocitos respondedores entre un 56-91.35% (Figura 36).



**Figura 36. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CN (01-08).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

En el co-cultivo heterólogo de linfocitos respondedores de la donadora control con las CMSP-iTreg derivadas de los co-cultivos de CMSP de una donadora sana con CEM-CN (02-08), se observó un ligero efecto inhibitorio sobre la proliferación de los linfocitos respondedores al utilizar CMSP-iTreg derivados del cultivo de CMSP con péptidos E6 y E7 en presencia y ausencia de CEM-CN respecto al valor de referencia de 53.5%, encontrándose los valores entre 49.06% y 53.14%; mientras que en los demás casos, la adición de CMSP-iTreg, derivados de

las condiciones restantes, incrementó ligeramente la proliferación de los linfocitos respondedores, obteniéndose valores entre 54-67% (Figura 37).

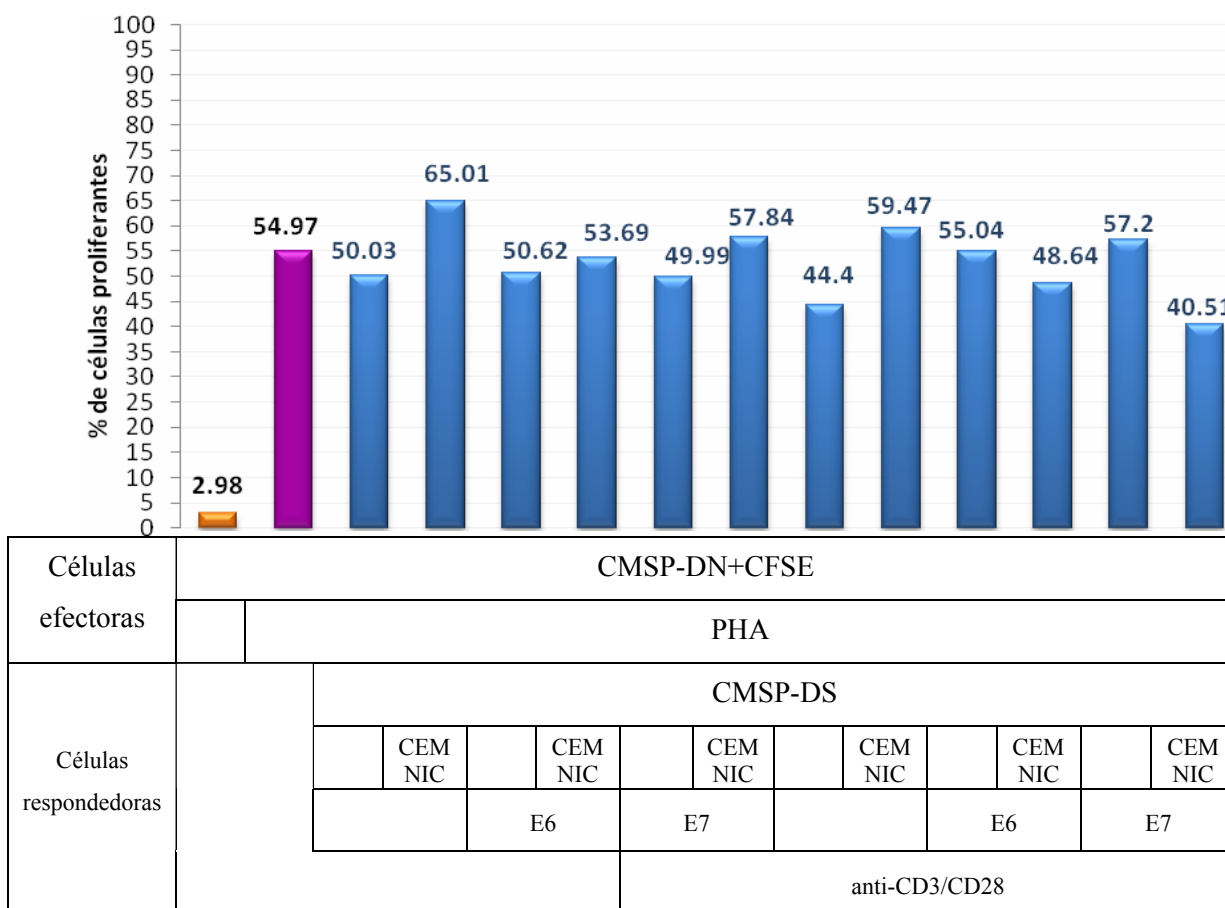


**Figura 37. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CN (02-08).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

A. 3) *Capacidad inmunosupresora de las células CMSP-iTreg derivadas de cultivos en presencia de CEM-NIC.*

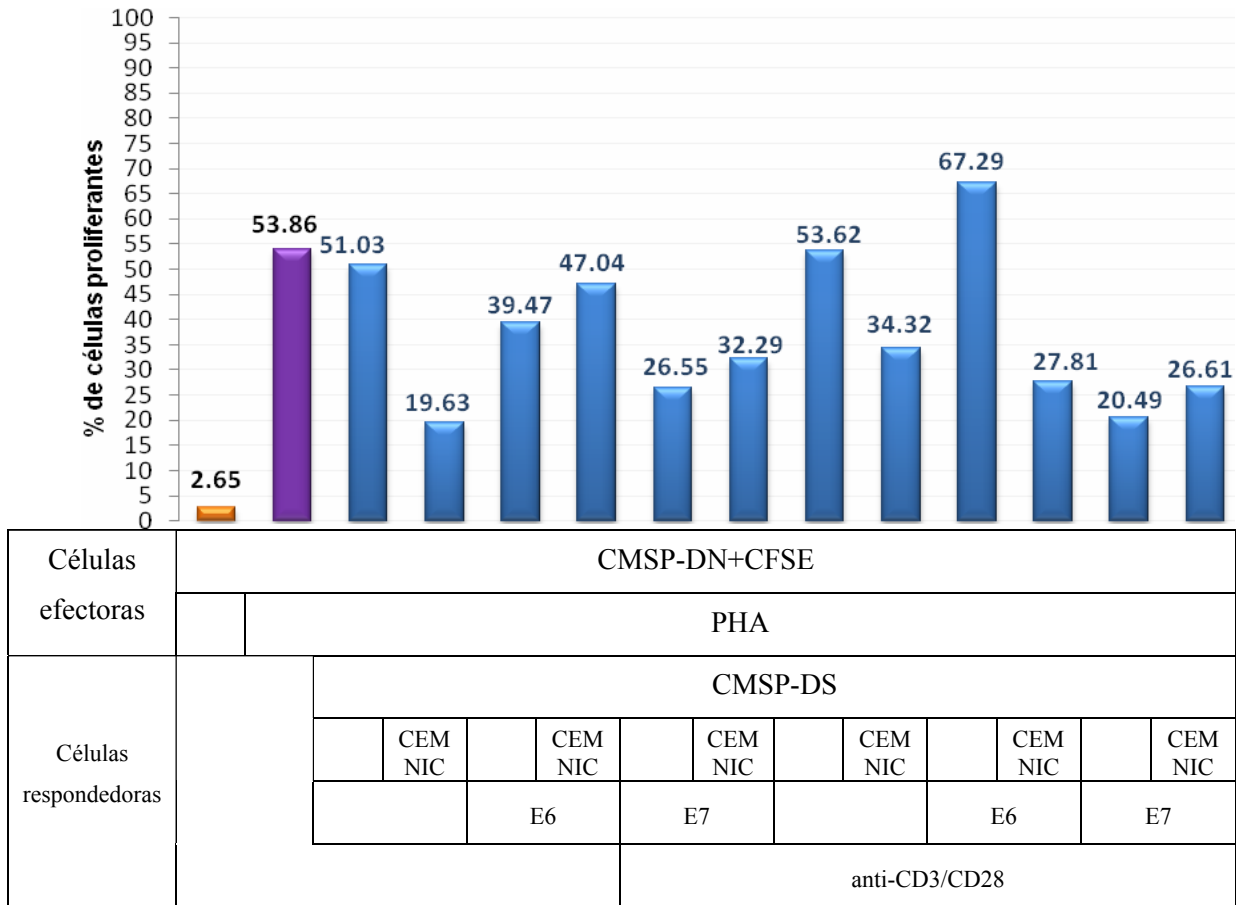
En el cultivo de linfocitos respondedores de la donadora normal control con las CMSP-iTreg obtenidas de los co-cultivos de CMSP con CEM-NIC (02-09), se encontró disminución en el número de células proliferantes respecto al valor de referencia (54.97%) en 7 de las condiciones empleadas, encontrándose valores de 40.51-53.69%. Las CMSP-iTreg derivados del co-cultivo de CMSP+CEM-NIC+péptidos de E7 y anti-CD3/CD28 fueron los que

produjeron la mayor supresión de la proliferación, obteniéndose el valor de 40.51%. Por otro lado, en cinco casos se encontró mayor proliferación respecto al control (55-65%) (Figura 38).



**Figura 38. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-NIC (02-09).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

En otro experimento con linfocitos respondedores de la donadora control y CMSP-iTreg obtenidos de los co-cultivos con CEM-NIC (03-09), se observó una reducción importante en el número de células proliferantes, respecto al control positivo (53.86%), cuando se adicionaron CMSP-iTreg derivadas de cultivos en los cuales las CEM-NIC estaban presentes; en estos casos se encontraron valores entre 19.63-39.47%. En el caso de las CMSP-iTreg derivadas del cultivo de CMSP+péptidos de E6 y anti-CD3/CD28 se encontró un incremento en el número de células proliferantes (Figura 39).



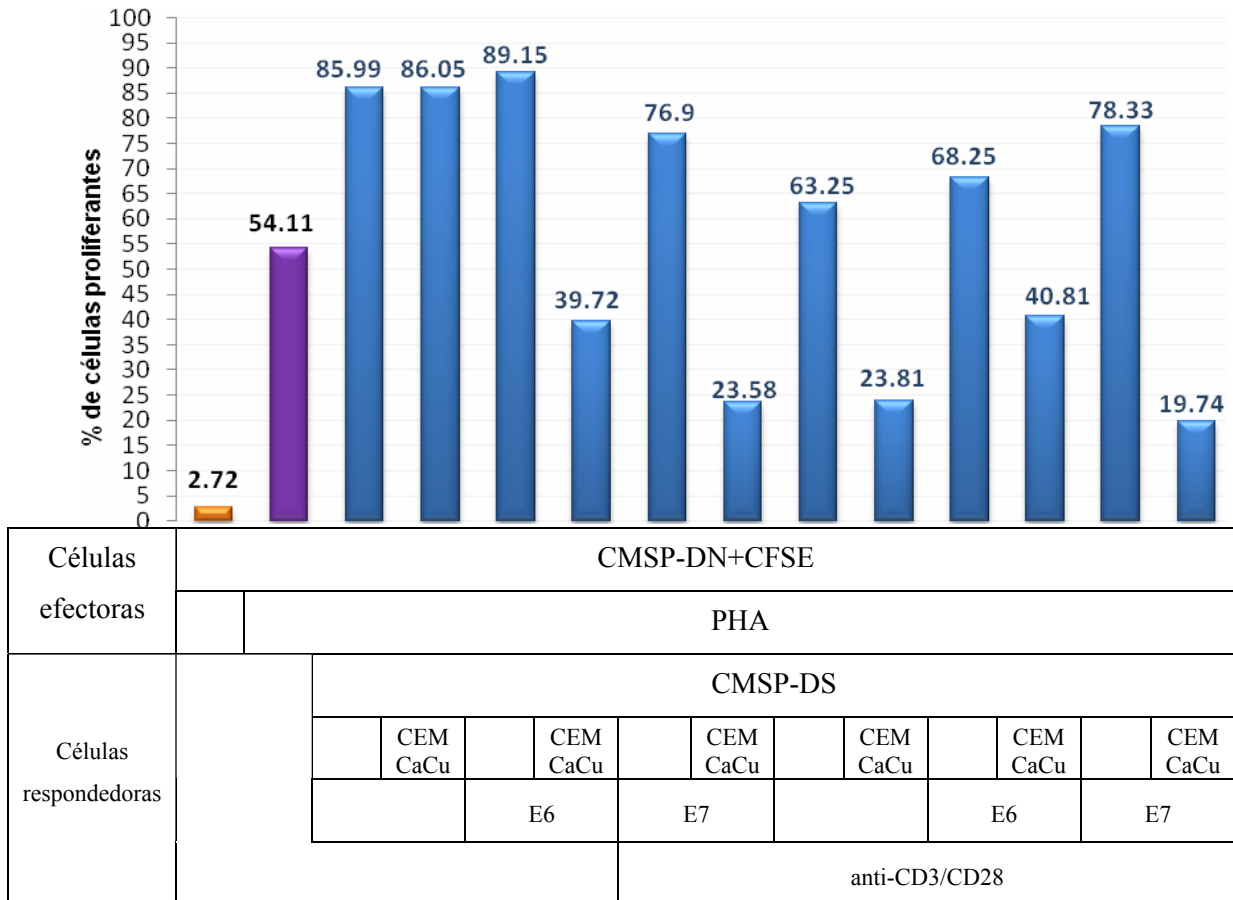
**Figura 39. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-NIC (03-09).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP- iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

A. 4) *Capacidad inmunosupresora de las células CMSP-iTreg derivadas de cultivos con CEM-CaCu.*

En el cultivo de linfocitos respondedores de la donadora sana con CMSP-iTreg de un co-cultivo de CMSP de esta donadora con CEM-CaCu (22-08), se encontró que las CMSP-iTreg derivadas de co-cultivos de CMSP con péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 y CEM-CaCu, inhibieron la proliferación de los linfocitos respondedores respecto al valor de referencia (54.11%), encontrándose valores entre 19.74-40.81%. En los demás casos, los valores de

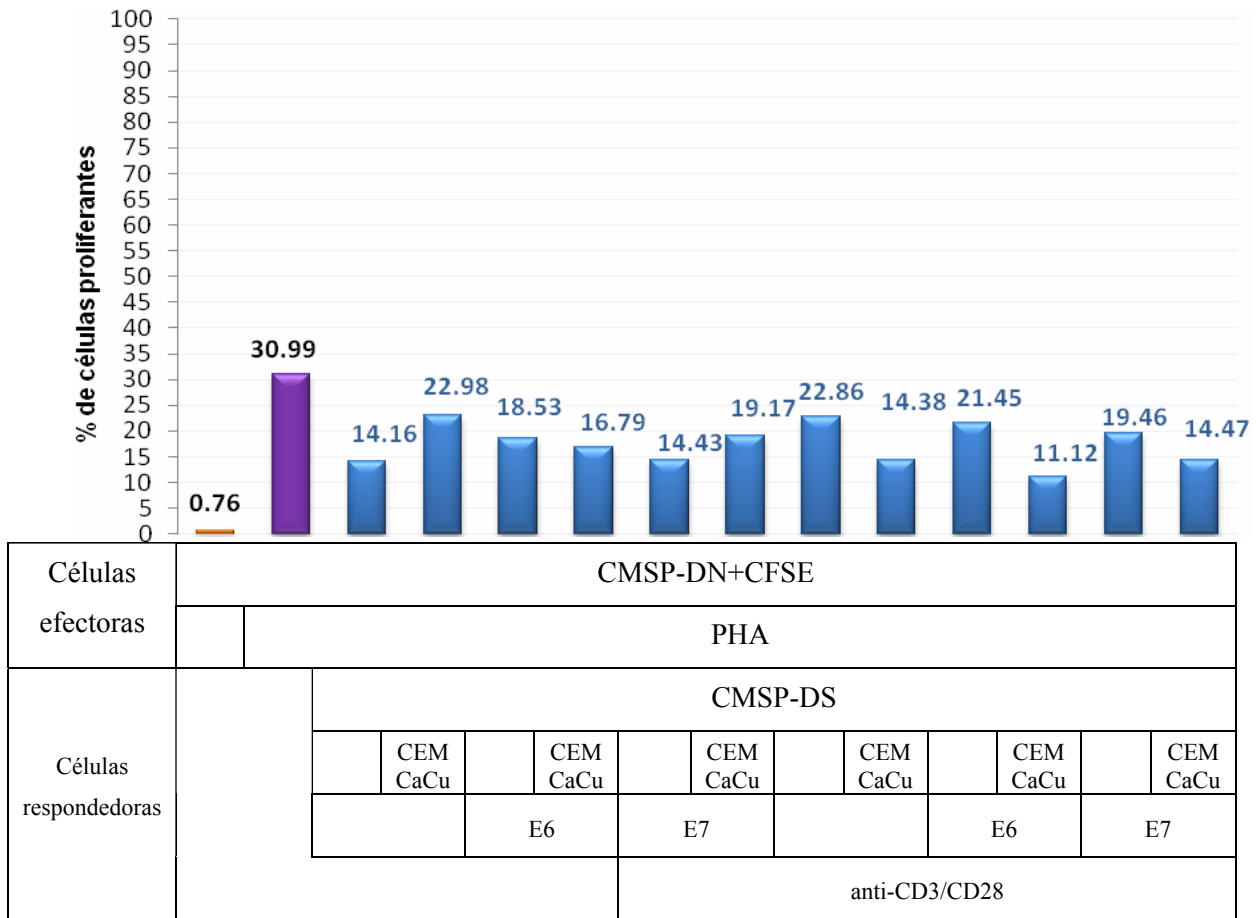


linfocitos proliferantes fueron superiores al testigo positivo, encontrándose valores entre 63.25-89.15% de células proliferantes (Figura 40).



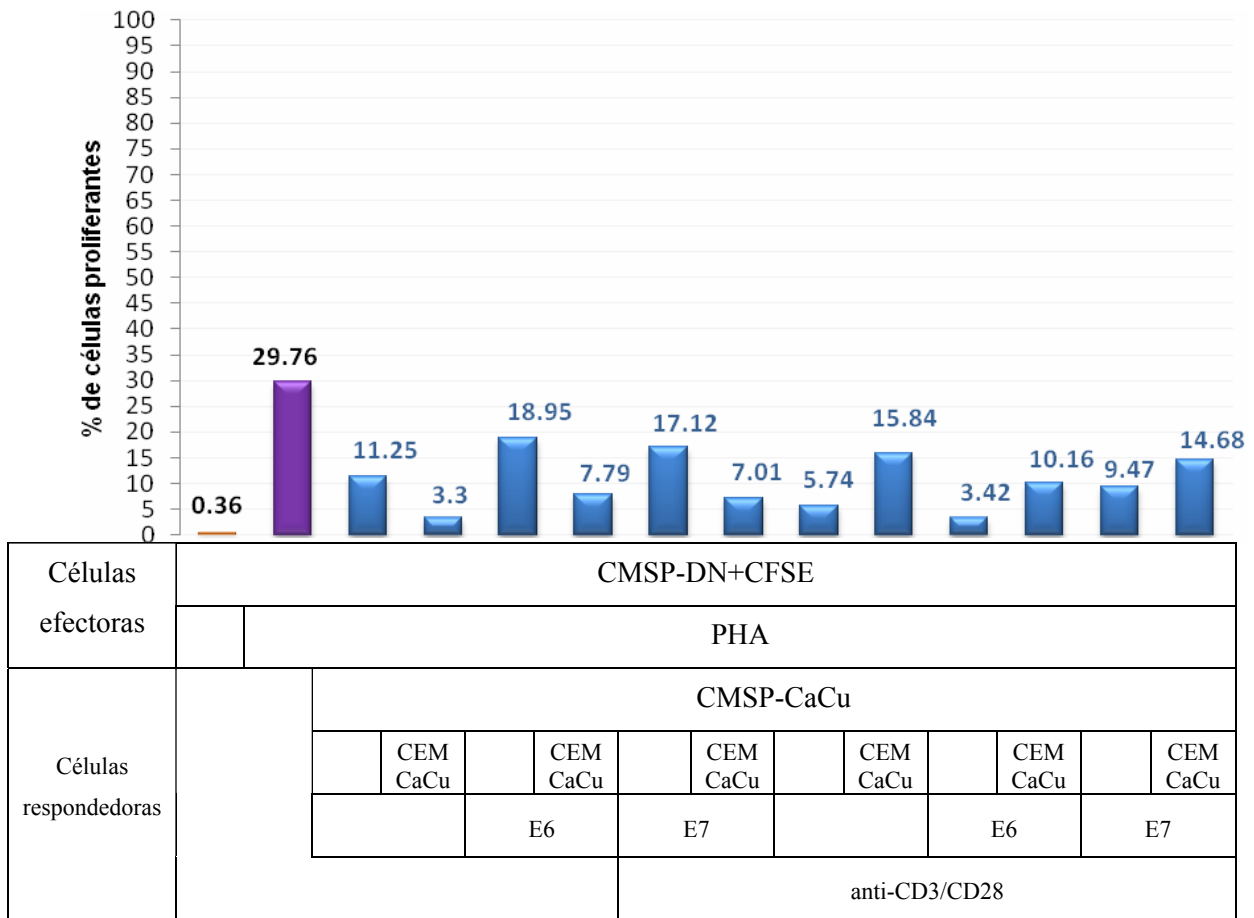
**Figura 40. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CaCu (22-08).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

En otro cultivo de linfocitos respondedores de la donadora sana testigo con CMSP-iTreg provenientes de un co-cultivo de CMSP+CEM-CaCu (31-09), se observó que en todos los casos las CMSP-iTreg disminuyeron la proliferación encontrada en los linfocitos respondedores de referencia (30.99%), encontrándose valores de proliferación entre 11.12-24.18% (Figura 41).



**Figura 41. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una donadora sana con CEM-CaCu (31-09).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

Por último, en el experimento de linfocitos respondedores de una paciente con CaCu en presencia de las CMSP-iTreg que estuvieron en co-cultivo con CEM-CaCu (31-09), se encontró que en todos los casos las CMSP-iTreg disminuyeron la proliferación detectada en el cultivo de referencia (29.76%), encontrándose valores de 3.3-21.17%, siendo que en varios de los casos, las CMSP-iTreg derivadas de los co-cultivos donde estuvieron presentes las CEM-CaCu, se observó una mayor disminución (Figura 42).



**Figura 42. Capacidad inmunosupresora de las células iTreg derivadas del cultivo de CMSP de una paciente con CaCu (07-10) con CEM-CaCu (31-09).** CMSP de una donadora normal se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de células proliferantes (indicado sobre las barras). La proliferación de CMSP en ausencia (amarillo) o en presencia de PHA (morado, valor de referencia) representan los testigos (-) y (+) respectivamente. Los valores sobre las barras indican los porcentajes de células proliferantes con respecto a las CMSP.

Las tablas 5 y 6 resumen los porcentajes de linfocitos Treg inducidos (CMSP-iTreg) con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Figuras 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30) y con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (Figuras 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31) respectivamente, al co-cultivar las diferentes estirpes de CEM de tejido normal (cérvix normal (2) y médula ósea(2)) y de neoplasias de cuello uterino (NIC (2) y CaCu (2)) con CMSP de una donadora normal (tomada como control ) y de dos pacientes con CaCu.

**Tabla 5. Porcentaje de linfocitos Treg inducidos con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>, obtenidos a partir de co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con diferentes estirpes de células estromales mesenquimales (CEM). CMSP de una donadora sana (CMSP-DN) o de pacientes con CaCu se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de diferentes estirpes CEM (médula ósea normal (MON), cérvix normal (CN), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer cérvico-uterino (CaCu)) en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16; o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los números en rojo muestran los porcentajes de Treg iguales o mayores a los reportados por Visser *et al.*, 2007 bajo las mismas condiciones.**

Condición de Cultivo del origen de Treg	Estirpes celulares de CEM y fuente de CMSP empleadas para la inducción de linfocitos T reguladores									
	CEM-MON (04-09) CMSP-DN	CEM-MON (01-10) CMSP-DN	CEM-MON (01-10) Pac. CaCu (09-10)	CEM-CN (01-08) CMSP-DN	CEM-CN (02-08) CMSP-DN	CEM-NIC (02-09) CMSP-DN	CEM-NIC (03-09) CMSP-DN	CEM-CaCu (22-08) CMSP-DN	CEM-CaCu (31-09) CMSP-DN	CEM-CaCu (31-09) CMSP Pac. CaCu (07-09)
CMSP	0	0	0	<b>0.15</b>	0.02	<b>0.60</b>	0.04	0.06	<b>0.10</b>	0
CMSP+CEM	<b>0.12</b>	0.01	0	<b>0.66</b>	0.05	<b>0.51</b>	0.03	0.02	<b>0.34</b>	0.02
CMSP+E6	<b>0.11</b>	0.09	0.01	<b>0.35</b>	0.04	<b>0.53</b>	0.04	<b>0.17</b>	<b>0.12</b>	0.06
CMSP+CEM+E6	<b>0.12</b>	0.04	0.06	<b>0.76</b>	0.05	<b>0.80</b>	0.07	0.01	<b>0.16</b>	0.05
CMSP+E7	0.04	<b>0.15</b>	0.05	<b>0.26</b>	0.03	<b>0.94</b>	0.04	0.01	0.04	<b>0.11</b>
CMSP+CEM+E7	0.08	<b>0.18</b>	0.10	<b>0.19</b>	0.07	<b>0.79</b>	0.06	0.07	<b>0.25</b>	0.05
CMSP+anti-CD3/CD28	<b>26.01</b>	4.29	11.09	17.46	2.47	<b>27.10</b>	6.99	1.39	<b>21.09</b>	15.20
CMSP+CEM+anti-CD3/CD28	16.47	6.93	8.71	3.80	0.20	5.54	0.88	0.25	2.64	7.06
CMSP+E6 + anti-CD3/CD28	<b>43.41</b>	6.88	16.33	17.08	4.73	<b>28.11</b>	4.39	0.30	<b>25.44</b>	16.28
CMSP+CEM+E6 +anti-CD3/CD28	<b>25.3</b>	3.03	11.53	5.24	0.15	7.45	0.92	0.84	4.86	7.44
CMSP+E7+ anti-CD3/CD28	<b>30.43</b>	6.22	13.60	<b>21.36</b>	4.97	<b>23.53</b>	4.19	5.03	<b>19.23</b>	13.48
CMSP+CEM+E7 +anti-CD3/CD28	<b>19.14</b>	15.08	8.78	10.39	0.26	9.08	1.75	0.69	6.50	11.83

**Tabla 6. Porcentaje de linfocitos Treg de memoria inducidos con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, obtenidos de co-cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con diferentes estirpes de células estromales mesenquimales (CEM). CMSP de una donadora sana (CMSP-DN) o de pacientes con CaCu se cultivaron en presencia o ausencia, ya sea de diferentes estirpes CEM ( médula ósea normal (MON), cérvix normal (CN), neoplasia Intraepitelial cervical (NIC) y cáncer cérvico-uterino (CaCu) en proporción 10:1; de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16; o de perlas conteniendo anti-CD3-CD28 como se indica. Los números en rojo muestran los porcentajes de Treg de memoria iguales o mayores a los detectados en el estándar de referencia en ausencia de estímulo (0.025) o en presencia del estímulo con Dynabeads conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28 (0.62). Los números en rojo muestran las condiciones de cultivo en donde la presencia de CEM indujo un mayor porcentaje de Treg.**

Condición de Cultivo del origen de Treg	Estirpes celulares de CEM y fuente de CMSP empleadas para la inducción de linfocitos T reguladores de memoria									
	CEM-MON (04-09) CMSP-DN	CEM-MON (01-10) CMSP-DN	CEM-MON (01-10) Pac. CaCu	CEM-CN (01-08) CMSP-DN	CEM-CN (02-08) CMSP-DN	CEM-NIC (02-09) CMSP DS	CEM-NIC (03-09) CMSP-DN	CEM-CaCu (22-08) CMSP-DN	CEM-CaCu (31-09) CMSP-DN	CEM-CaCu (31-09) CMSP Pac. CaCu
CMSP	0	0	0.00	0.00	0.02	0.00	<b>0.04</b>	0.02	0.00	0.00
CMSP+CEM	0	0	0.00	<b>0.13</b>	<b>0.05</b>	<b>0.39</b>	0.02	0.01	0.01	0.01
CMSP+E6	<b>0.1</b>	<b>0.09</b>	0.01	0.01	<b>0.04</b>	<b>0.14</b>	0.02	<b>0.03</b>	<b>0.09</b>	<b>0.09</b>
CMSP+CEM+E6	<b>0.11</b>	<b>0.04</b>	<b>0.06</b>	<b>0.07</b>	<b>0.05</b>	<b>0.56</b>	<b>0.06</b>	0.01	0.02	<b>0.05</b>
CMSP+E7	<b>0.04</b>	<b>0.13</b>	<b>0.05</b>	0.02	<b>0.03</b>	<b>0.20</b>	0.01	0.01	0.02	<b>0.11</b>
CMSP+CEM+E7	<b>0.07</b>	<b>0.16</b>	<b>0.10</b>	<b>0.19</b>	<b>0.06</b>	<b>0.61</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.08</b>	<b>0.05</b>
CMSP+anti-CD3/CD28	0.15	0.03	0.08	0.00	<b>2.19</b>	0.48	1.01	0.04	0.03	0.01
CMSP+CEM+anti-CD3/CD28	0.03	0.01	0.05	0.03	0.17	<b>1.34</b>	0.11	0.06	0.03	0.03
CMSP+E6+anti-CD3/CD28	0.09	0.08	0.09	0.00	<b>4.21</b>	0.38	<b>2.11</b>	0.01	0.01	0.38
CMSP+CEM+E6+anti-CD3/CD28	0.31	0.04	0.27	0.06	0.14	<b>2.17</b>	0.25	0.24	0.07	0.16
CMSP+E7+anti-CD3/CD28	0.01	0.03	0.07	0.01	<b>4.03</b>	<b>0.86</b>	<b>0.81</b>	0.29	0.02	0.10
CMSP+CEM+E7+anti-CD3/CD28	0.25	0.06	0.37	0.07	0.23	<b>2.40</b>	0.20	0.24	0.12	0.22

La actividad inhibitoria de los Treg inducidos (iTreg) en los diferentes co-cultivos de CMSP con las diferentes estirpes de CEM (Figuras 33-42) es mostrada en la Tabla 7. En esta tabla se aprecia de manera relevante que las poblaciones de iTreg que inhibieron en mayor grado la proliferación de CMSP de la donadora normal control fueron las que derivaron de los cultivos en presencia de CEM-CaCu (31-09), NIC (03-09) y MON (01-10); mientras que los iTreg derivados de los cultivos de CEM-CaCu (31-09) fueron quienes inhibieron en mayor grado la proliferación de CMSP derivadas de una paciente con CaCu.

**Tabla 7. Capacidad inmunosupresora de linfocitos iTreg contenidos en las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (CMSP-iTreg) cultivadas en presencia de diferentes estirpes de células estromales mesenquimales.** CMSP de una donadora sana o de una paciente con CaCu se marcaron con CFSE (linfocitos respondedores) y se co-cultivaron en proporción 10:1 con CMSP-iTreg obtenidos de diferentes condiciones de cultivo como se indica. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 días en presencia de 10µg/ml de PHA y posteriormente se determinó el porcentaje de linfocitos respondedores proliferantes mediante citometría de flujo. Control +, representa el porcentaje de linfocitos respondedores proliferantes en ausencia de CMSP-iTreg. Los valores en rojo muestran la inhibición de la proliferación >30% respecto al control + de referencia.

Condición de Cultivo del origen de Treg	Estirpes celulares de CEM empleadas para la inducción de linfocitos T reguladores									
	CEM-MON (0409) CMSP DN	CEM-MON (01-10) CMSP DN	CEM-MON (01-10) CMSP-Pac. CaCu (09-10)	CEM-CN (01-08) CMSP DN	CEM-CN (02-08) CMSP DN	CEM-NIC (02-09) CMSP DN	CEM-NIC (03-09) CMSP DN	CEM-CaCu (22-08) CMSP DN	CEM-CaCu (31-09) CMSP DN	CEM-CaCu (31-09) CMSP Pac. CaCu (07-09)
CONTROL (+)	56.45	63.46	21.97	50.55	53.5	54.97	53.86	54.11	30.99	29.76
CMSP	41.51	<b>28.61</b>	30.08	60.92	62.62	50.03	51.03	85.99	<b>14.16</b>	<b>11.25</b>
CMSP+CEM	48.64	<b>27.37</b>	52.68	78.53	66.79	65.01	<b>19.63</b>	86.05	22.98	<b>3.3</b>
CMSP+E6	44.78	<b>31.93</b>	34.59	83.37	51.45	50.62	39.47	89.15	<b>18.53</b>	<b>18.95</b>
CMSP+CEM+E6	<b>26.52</b>	<b>25.59</b>	34.99	64.81	49.06	53.69	47.04	39.72	<b>16.79</b>	<b>7.79</b>
CMSP+E7	45.51	43.04	30.46	56.79	53.14	49.99	<b>26.55</b>	76.9	<b>14.43</b>	<b>17.12</b>
CMSP+CEM+E7	40.14	<b>24.29</b>	40.59	<b>21.28</b>	53.04	57.84	<b>32.29</b>	<b>23.58</b>	<b>19.17</b>	<b>7.01</b>
CMSP+anti-CD3/CD28	51.78	<b>17.6</b>	49.46	84.52	56.87	44.4	53.62	63.25	22.86	<b>5.74</b>
CMSP+CEM+anti-CD3/CD28	41.39	<b>37.72</b>	53.4	84.25	54.25	59.47	<b>34.32</b>	<b>23.81</b>	<b>14.38</b>	<b>15.84</b>
CMSP+E6+anti-CD3/CD28	52.38	75.39	52.68	75.68	61.05	55.04	67.29	68.25	21.45	<b>3.42</b>
CMSP+CEM+E6+anti-CD3/CD28	45.47	<b>35.4</b>	44.17	74.55	56.07	48.64	<b>27.81</b>	40.81	<b>11.12</b>	<b>10.16</b>
CMSP+E7+anti-CD3/CD28	76.73	<b>34.28</b>	59.42	59.67	64.86	57.2	<b>20.49</b>	78.33	<b>19.46</b>	<b>9.47</b>
CMSP+CEM+E7+anti-CD3/CD28	73.42	<b>25.92</b>	52.81	85.56	56.71	40.51	<b>26.61</b>	<b>19.74</b>	<b>14.47</b>	<b>14.68</b>

## DISCUSIÓN.

A pesar de los avances importantes en la comprensión de los mecanismos que conducen a la inmunidad tumoral aún existen una serie de obstáculos que dificultan el éxito de una inmunoterapia eficaz. Estos obstáculos incluyen la capacidad de los tumores para promover un microambiente tolerante y la activación de mecanismos inmunosupresores que actúan para contrarrestar la respuesta en contra de ellos. Los diferentes mecanismos utilizados por los tumores para neutralizar dicha respuesta incluyen la deficiencia en la presentación de antígenos, la activación de señales co-estimuladoras que inhiben la respuesta inmune y la síntesis de moléculas inmunosupresoras, entre otras (Rabinovich *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha descrito la influencia de poblaciones de células reguladoras que pueden contribuir a la inmunosupresión, entre las cuales se encuentran las células T reguladoras, las células NK, subconjuntos de células dendríticas inmaduras tales como las células dendríticas plasmacitoides, los macrófagos asociados a tumores (Rabinovich *et al.*, 2007), fibroblastos y células estromales mesenquimales (CEM) (English *et al.*, 2008). Durante la última década, se ha confirmado la hipótesis de que los tumores pueden alterar la inmunidad antitumoral promoviendo la expansión, el reclutamiento y la activación de distintas poblaciones de linfocitos Treg (Sakaguchi, 2004, Zou, 2005). De hecho, se ha evidenciado un incremento en el número de células Treg en sangre periférica de pacientes con diferentes tipos de cáncer conforme avanza la enfermedad (Wolf *et al.*, 2003).

Por otra parte, se sabe que el cáncer cérvico-uterino (CaCu) puede surgir como el resultado de una infección persistente con tipos de alto riesgo de HPV, en particular de los tipos 16 y 18 (Bosch *et al.*, 1995). Las proteínas E6 y E7 del HPV juegan un papel muy importante en la carcinogénesis y en las lesiones pre-malignas del cuello uterino (Zur, 2000). Debido a que las proteínas del HPV son extrañas al organismo, se esperaría que el sistema inmune respondiera en contra de estos antígenos cuando son expresados en el cuello uterino, pero en los pacientes con lesiones genitales por HPV muestran un perfil de citocinas no inflamatorias lo que indica que el desarrollo del CaCu está asociado a un fracaso de la respuesta de las células T en contra de la infección por HPV (van der Burg *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que la inducción de linfocitos Treg antígeno-específicos y su influjo en el tumor y ganglios linfáticos de pacientes con CaCu avanzado puede ser uno de los factores relevantes en la supresión de la respuesta

antígeno específica en este tipo de tumor (Visser *et al.*, 2007 y Molling *et al.*, 2007). De hecho se ha propuesto que las mismas células malignas del cuello uterino, al producir grandes cantidades de TGF- $\beta$ , sean las principales inductoras de células Treg (Sheu *et al.*, 2001 y Rao *et al.*, 2005). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que la eliminación de tumores de cuello uterino por quimio y radioterapia, reduce de manera modesta las frecuencias de células con fenotipo regulador CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Visser *et al.*, 2007), lo que sugiere que existen otros mecanismos que pueden participar de manera importante en la inducción de células Treg en este tipo de tumor.

Por otra parte, se ha postulado que las CEM participan en la generación de linfocitos Treg 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 y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función reguladora de linfocitos Treg (Dominici *et al.* 2006; Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008). De acuerdo con esta última aseveración, en el presente estudio se analizó la capacidad de CEM obtenidas de neoplasias de cuello uterino (NIC y CaCu) así como de tejido normal (cérvix y médula ósea) para inducir linfocitos Treg. Para probar esta hipótesis, se establecieron co-cultivos de CMSP de donadoras sanas y de pacientes con CaCu con las diferentes CEM. Asimismo, tomando en consideración que en sangre periférica de pacientes con CaCu se ha reportado la presencia de linfocitos T reguladores con especificidad al estímulo con péptidos antigénicos derivados de proteínas oncogénicas de HPV-16 (Welters *et al.*, 2008), también se evaluó si bajo las condiciones de co-cultivo de CEM-CMSP, la presencia de péptidos derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 favorecía la inducción de linfocitos Treg de memoria. Adicionalmente, se evaluó si el estímulo con los anticuerpos anti-CD3/CD28 favorecían la inducción de las poblaciones de linfocitos Treg.

Tomando en consideración que el potencial biológico inmunosupresor de las CEM se ha asociado con las características intrínsecas de estos tipos celulares, como son el tamaño celular, el fenotipo y su capacidad de diferenciación a otros tipos celulares como son los adipocitos, condoblastos y osteoblastos, las poblaciones de CEM obtenidas de los tejidos cervicales fueron inicialmente caracterizadas. Para determinar la morfología y tamaño de las CEM generadas para nuestro estudio, utilizamos una nomenclatura de 8 diferentes formas y tamaños reportada



previamente para CEM de médula ósea (Montesinos *et al.*, 2009). En nuestro estudio encontramos una gran heterogeneidad en las formas y tamaños de las estirpes celulares de CEM derivadas de tejido cervical normal, de NIC y CaCu, en donde las formas pequeñas, romboides y triangulares predominaron con porcentajes desde 27-55%. Cabe mencionar que estos tipos morfológicos en estirpes celulares de CEM obtenidas de diversas fuentes han sido descritos como los más proliferativos y con mayor capacidad de renovación (Colter *et al.*, 2000; Colter *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Marcov *et al.*, 2007), lo cual es acorde con lo observado en nuestros cultivos celulares de CEM. Además de ello, todas las estirpes de CEM obtenidas expresaron, en altos porcentajes, los marcadores CD90, CD73 y CD105 al igual que las estirpes de CEM derivadas de médula ósea que fueron utilizadas como testigos en los ensayos funcionales. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular, estos marcadores celulares constituyen el fenotipo principal de las CEM (Dominici *et al.*, 2006). En el caso particular de CEM de médula ósea, los marcadores predominantes fueron CD73 y CD90 mientras que en aquellas derivadas de los tejidos cervicales, se encontró que CD73 es el principal antígeno de superficie que se presenta, lo cual pudiera tener una implicación importante en otro mecanismo de supresión de la proliferación linfocítica a través de la generación de adenosina, un potente inhibidor de la proliferación de linfocitos T, producido por células tumorales y linfocitos Treg (Jin *et al.*, 2010, Sitkovsky *et al.*, 2008). La expresión de CD13 y CD44 también fue encontrada en un alto porcentaje de las CEM obtenidas de los tejidos cervicales; la expresión de estos marcadores también ha sido reportada para estirpes de CEM obtenidas de médula ósea y sangre de cordón umbilical (Fajardo-Orduña GR 2008) así como en CEM de diferentes fuentes celulares (Lee *et al.*, 2004, Marcov *et al.*, 2007); lo que podrían constituir nuevos marcadores para la caracterización de las CEM.

Además de la forma y fenotipo que caracterizan a las células mesenquimales, la capacidad de diferenciación de las CEM hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico fue determinada en las CEM obtenidas de los tejidos cervicales. En nuestro estudio se emplearon métodos de tinción, previamente utilizados para caracterizar CEM de tejido cervical (Sun *et al.*, 2010) para detectar características propias de las células diferenciadas. La diferenciación de las CEM-CN, CEM-NIC y CM-CaCu a osteoblastos fue determinada mediante la tinción con Von Kossa la cual fue evidenciada por la presencia de depósitos de calcio encontrados en forma de estrías o pequeñas motas en todas las estirpes celulares analizadas que fueron cultivadas con

medio de inducción específico. En el caso particular de CEM-CN fue notoria la presencia de una mayor cantidad de depósitos de calcio, sugiriendo mayor potencial de diferenciación de estas estirpes celulares hacia este linaje.

Por otra parte, para determinar la capacidad de diferenciación adipogénica, las CEM fueron teñidas con rojo oleoso. En el caso particular de las CEM-MO, éstas formaron adipocitos con vacuolas lipídicas bien definidas, sin embargo las CEM provenientes de los tejidos cervicales únicamente mostraron pequeñas motas positivas a la tinción con el colorante. Este mismo patrón de tinción fue encontrado por Sun *et al.*, 2010 en CEM provenientes de tejido de CaCu. Otros grupos han relacionado la capacidad de diferenciación adipocítica con características inmunofenotípicas de las células, como lo es la expresión del marcador CD90 y la capacidad de formar adipocitos (Chang *et al.*, 2006), no obstante en un estudio previo, al igual que lo encontrado por nosotros, CEM derivadas de sangre de cordón umbilical fueron positivas a CD90 pero no fueron capaces de formar vesículas lipídicas como en aquellas provenientes de médula ósea (Fajardo-Orduña GR 2008). Sugiriendo diferentes capacidades de las CEM para diferenciarse a adipocitos, lo cual puede estar asociado al tejido de origen.

La capacidad de diferenciación hacia condrocitos también fue evidenciada en todas las estirpes celulares de CEM, debido a que las células cultivadas con el medio de diferenciación específico favoreció su crecimiento en micromasa y la tinción específica con azul anciano de cortes histológicos de estas micromasas fueron positivas en todos los casos, lo cual es típico de los tejidos cartilagosos. De hecho la propiedad de CEM de varias fuentes celulares para diferenciarse a cartílago ha sido considerada para su uso en el reemplazo de tejidos dañados (Montesinos *et al.*, 2009) y en tejido genital pudiera estar asociado con la formación de estroma de soporte para el desarrollo tumoral (Sun *et al.*, 2010).

En nuestro estudio además de corroborar el potencial de diferenciación de las CEM obtenidas de tejido cervical normal y con lesiones de NIC y CaCu, también estudiamos la capacidad de estas células para inducir *in vitro* poblaciones de Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+ CD45RO^+$  a partir de CMSP en presencia de péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. Los porcentajes de Treg inducidos en los cultivos celulares, fueron comparados con un valor estándar establecido por el porcentaje basal de Treg

encontrados en las CMSP de una donadora normal. El porcentaje basal encontrado en la donadora normal fue de 0.1% para el fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y de 0.025 para el fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  respecto a la población total de CMSP. Estos valores contrastan con valores de referencia en donadoras normales reportados por Visser *et al.*, (2007), quien encontró un promedio de 0.6% (0.2-1.2%) de la población Treg con fenotipo  $CD4/CD25^{high}$  respecto a la población total de CMSP. En otro estudio realizado por English *et al.*, (2009), reportó que a partir de poblaciones purificadas de  $CD4^+$ , la inducción de células Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}$  fue de 1.46% en los co-cultivos de  $CD4^+$  con las CEM durante 3 días. En nuestro estudio, la caracterización del fenotipo fue más selectiva, ya que incluyó de manera adicional a los marcadores FoxP3 y CD45RO. Tomando en cuenta los valores estándar de referencia, se observó que las estirpes de CEM-MON (04-09); CEM-CN (01-08); CEM-NIC (02-09) y CEM-CaCu (31-09), Figuras 12, 18, 22 y 28 respectivamente y Tabla 5, indujeron los porcentajes más altos de Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  a partir de los co-cultivos con CMSP de la donadora normal y de una paciente con CaCu. De manera interesante, se encontró que la adición de las diferentes estirpes de CEM y de los péptidos antigénicos E6 y E7 HPV-16 en los co-cultivos celulares, se indujo un incremento en la población de los linfocitos Treg con fenotipo de memoria  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$  (Tabla 6) comparado con los porcentajes encontrados en los cultivos de CMSP donde sólo se adicionaron las CEM o los péptidos de manera independiente. Sugiriendo entonces que la aparición de la población Treg de memoria no solo requiere del efecto inductor de Treg por las CEM a través de factores solubles, sino también de la presencia del antígeno específico. Al respecto, Djouad *et al.*, (2007) y Prevosto *et al.*, (2007) han reportado que las CEM producen una variedad de factores que pueden promover la inducción de Treg como lo es TGF- $\beta$  e IL-10, no obstante la producción de altos niveles de IL-6 por las CEM puede modificar la inducción de Treg y favorecer la presencia de células Th17 (Yang *et al.*, 2008). De acuerdo a ello, resulta interesante evaluar en estudios posteriores si los patrones de citocinas producidos por las diferentes estirpes de CEM y los generados durante el tiempo del co-cultivo con las CMSP pueden modificar el fenotipo y frecuencia de las Treg inducidas, lo que podría explicar las diferencias encontradas en las frecuencias de Treg y Treg de memoria entre las diferentes condiciones de cultivo manejadas en este estudio. Por otra parte, se ha reportado que la persistencia de la infección por HPV-16 correlaciona con la frecuencia de linfocitos Treg  $CD4^+CD25^+$  encontrados en sangre periférica de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical

(Molling et al 2007) y en pacientes con cáncer avanzado (Visser et al 2007). Asimismo, a pacientes con cáncer cervical, a quienes se les había extirpado el tumor y posteriormente se les vacunó con péptidos de 25-35 aminoácidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16, desarrollaron inmunidad antígeno específica efectora y eventualmente la aparición de linfocitos Treg antígeno específicos con fenotipo  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  (Welters *et al.*, 2008). En otro estudio, se encontró que linfocitos T  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  extraídos de nódulos linfáticos de pacientes con cáncer cervical, ejercen su efecto inmunosupresor dependiente de la activación con péptidos E6 y E7 de HPV-16 (van der Burg *et al.*, 2007). Estas evidencias y lo reportado por varios autores respecto a la inducción de Treg *in vitro* cuando se cultivan CEM con CMSP en cultivos a corto plazo (Prevosto et al 2007, Di Ianni *et al.*, 2008, English *et al.*, 2009) apoyan la hipótesis de que la conjunción de CEM con CMSP en presencia de péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 en el sistema de cultivo empleado en este estudio, es esencial para la inducción de poblaciones de Treg a partir de CMSP (CMSP-iTreg).

Este fenómeno puede extrapolarse hacia las condiciones *in vivo* e *in situ*, donde infecciones persistentes en epitelio del cuello uterino producidas por HPV de alto riesgo, junto a la presencia de poblaciones de CEM, pueden participar fuertemente en la inducción de diferentes poblaciones de Treg, dependiendo de la persistencia de la infección, como ocurre de manera natural durante el desarrollo de la neoplasia cervical.

Por otra parte, la inducción de linfocitos Treg bajo la presencia del estímulo con Dynabeads conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28, incremento el porcentaje de las células Treg de los fenotipos  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ , teniendo valores estándar de 18.35% y de 0.62% respectivamente en CMSP de la donadora normal. Estos valores incrementados de Treg pueden deberse a la activación inespecífica dada por los anticuerpos anti-CD3/CD28 como reportado por Abraham *et al.*, (2008). Además, bajo estas condiciones de activación en los cultivos celulares, no pudo vislumbrarse el efecto antígeno específico dado por la adición de los péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16, puesto que no se encontraron diferencias respecto a las condiciones de cultivo donde se adicionaron CEM o péptidos de manera independiente (tablas 5 y 6).

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que el efecto inmunoregulator de las CEM puede llevarse a cabo a través del contacto directo con las células blanco y mediante la secreción de diversos factores solubles (Bath *et al.*, 2005; Di Ianni *et al.*, 2008). Asimismo, en estudios hechos en modelos *in vivo* se ha demostrado que las CEM favorecen el desarrollo de una respuesta inmune anti-inflamatoria, además de disminuir la proliferación de los linfocitos y afectar su diferenciación y función efectora (Sakaguchi, 2005; von Boehmer, 2005). A través de cultivos con CEM, se ha reportado que las CEM inhiben la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Krampera *et al.*, 2006) y que la activación de linfocitos vírgenes CD45RA<sup>+</sup> con PHA en presencia de CEM resulta en la inhibición de la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las células tipo Th1 (Aggarwal & Pittenger 2005; Bacigalupo *et al.*, 2005). En adición, Prevosto *et al.*, (2007) demostró que células Treg inducidas en cultivos de CEM con CMSP fueron capaces de inhibir a manera de dosis dependiente, la proliferación de linfocitos activados con PHA o anti-CD3. En este estudio, se analizó la capacidad inmunosupresora de los linfocitos Treg inducidos (CMSP-iTreg) en los cultivos de CEM con CMSP tanto en presencia como en ausencia de péptidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16, sobre la proliferación de CMSP de la donadora normal inducida con HA en proporción 1:10. Las CMSP-iTreg obtenidas de los cultivos en presencia de CEM-CaCu (31-09), NIC (03-09) y MON (01-10) fueron quienes inhibieron en mayor grado la proliferación de CMSP derivadas de la donadora normal y de una paciente con CaCu (Tabla 7).

El hecho de no haber encontrado mayor actividad inhibitoria de las CMSP-iTreg obtenidas de los cultivos celulares con las otras estirpes celulares de CEM-MON, CEM-CN y CEM-NIC puede deberse a la diferente capacidad de producción y secreción de citocinas o factores solubles supresores como IDO, adenosina; así como del contacto directo de Treg con las células blanco Prevosto *et al.*, (2007). En nuestro estudio sólo se evaluó el efecto supresor de las CMSP-iTreg a través de insertos con membrana.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente estudio dan una evidencia importante de la inducción de linfocitos Treg a partir de co-cultivos de CMSP con CEM derivados de tejidos normales (médula ósea y cérvix) y de tejido cervical tumoral (NIC y CaCu), además de su potencial inmunosupresor. En este modelo de estudio, la presencia de péptidos derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 también fue importante en la inducción de Treg, principalmente

en los de fenotipo de memoria. Lo que nos sugiere fuertemente que ambos factores pueden ser de gran relevancia para la inducción de estas poblaciones celulares. En condiciones naturales, la presencia de infecciones persistentes producidas por HPV de alto riesgo en el epitelio del cuello uterino, junto a la presencia de poblaciones de células estromales mesenquimales, pueden participar en la inducción de diferentes poblaciones de Treg. Tomando en consideración que las células T reguladoras ejercen su función supresora mediante diversos mecanismos tales como el contacto célula-célula, liberación de factores solubles, (Shevach 2002; Sakaguchi, 2005), así como la producción de citocinas inhibitorias, citolisis, disrupción metabólica, liberación de adenosina, supresión por células dendríticas (Vignali *et al.*, 2008) entre otras; resultaría interesante conocer si uno o varios de los diferentes mecanismos descritos son producidos por las poblaciones de Treg inducidas bajo las condiciones de cultivo llevadas a cabo en el presente trabajo, lo cual explicaría las diferencias encontradas tanto en los porcentajes detectados de Treg como en la capacidad inhibitoria de la proliferación de los linfocitos estimulados con PHA, de acuerdo con las estirpes de CEM empleadas en los cultivos.

## CONCLUSIONES.

Las estirpes CEM provenientes de neoplasias cervicales (NIC y CaCu) y las de tejido sano (médula ósea y cérvix normal) utilizadas en este estudio, cumplieron de manera satisfactoria con las características morfológicas, fenotípicas y de diferenciación de las células estromales mesenquimales establecidas por la Sociedad Internacional de Terapia Celular.

Las diferentes estirpes de CEM fueron capaces de inducir células Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  y  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD45RO^+$ .

La presencia de péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 en los cultivos celulares de CEM con CMSP favorecieron la inducción de células Treg con fenotipo de memoria  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+ CD45RO^+$ .

El estímulo de anti-CD3/CD28 en los cultivos celulares de CMSP con las CEM indujo mayores porcentajes de células Treg en todos los casos independientemente de la presencia de los péptidos antigénicos de las proteínas de E6 y E7 de HPV-16.

Las CEM-MON (01-10), CEM-NIC (03-09) y CEM-CaCu (3109) indujeron mayores porcentajes de Treg (CMSP-iTreg) en los cultivos celulares y su actividad supresora correlacionó con la inhibición de la proliferación de CMSP estimuladas con PHA.

## **PERSPECTIVAS.**

Quedan muchas preguntas por contestar, entre ellas:

- Saber si los niveles de expresión de citocinas secretadas por las CEM, como lo es el TGF- $\beta$  el cual se sabe que es un factor importante en la inducción de células Treg, es uno de los responsables de dicha inducción en este modelo experimental.
- Identificar cuáles son las secuencias de las proteínas oncogénicas E6 o E7 de HPV-16 responsables de la inducción de Treg.
- Evaluar los mecanismos responsables de la supresión de los linfocitos Treg inducidos en este modelo experimental.
- Finalmente, también se observó que las Treg inducidas por las CEM son capaces de inhibir la proliferación de CMSP con un estímulo policlonal, lo cual sería interesante saber si estas células Treg son capaces de inhibir una población de linfocitos que responden a un antígeno específico.



## BIBLIOGRAFÍA.

- Aggarwal S., Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105: 1815-1822.
- Abraham M, Karni A, Dembinsky A, Miller A, Gandhi R, Anderson D, Weiner HL. 2008. *In vitro* induction of regulatory T cells by anti-CD3 antibody in humans. *J Autoimmun*. 30: 21-28.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA 2001. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 167: 1245-1253.
- Baksh D, Song L, Tuan R. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 8: 301-316.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol*. 30: 42-48.
- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 67: 9142-9149.
- Barzon L, Giorgi C, Buonaguro FM, Palù G. 2008. Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. *Infect Agent Cancer*. 16: 3-14.
- Beyer N, Da Silva L. 2006. Mesenchymal stem cells: Isolation *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 174: 249-282.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galum E, Rachmilewitz J. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105: 2214-2219.
- Bianco P, Gehron RO. 2000. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 105: 1663-1668.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 22: 625-634.
- Bobis S, Jarocho D, Makja M. 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 44: 215-230.

- Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 204: 1303-1310.
- Bosch FX., Munoz N. 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 89: 183–189.
- Bosch FX, Lorinc ZA, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 55: 244-265.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 87: 796-802.
- Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K. 2007. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 18: 846-858.
- Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan A. 1998 Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized *in vivo*. *J Exp. Med.* 187: 177–183.
- Bacigalupo A, Valle M, Podesta M, Pitto A, Zocchi E De Flora A, Pozzi S, Luchetti S Frassoni F, Van Lint MT, Piaggio G. 2005. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp. Hematol.* 33: 819-827.
- Burd E. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 16: 1-17.
- Burnet, FM. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 13: 1-27.
- Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 178: 179-185.
- Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, Yen BL. 2006. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon gamma. *Stem Cells.* 24: 2466-2477.
- Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM. 2006. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells.* 24: 679-685.

- Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, Van Doorn LJ, Porras C, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Herrero R. 2011. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *J Infect Dis.* 2011. 203: 910-920.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. 1995. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science.* 269: 529-531.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 450 (7169): 566-569.
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM Prockop DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 3213-3218.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop. D. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cell in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 7841-7845.
- Coppleson M, Dalrymple Jc, Atkinson KH. 1993. Diferenciación colposcópica de anomalías que surgen en los métodos para detección de cáncer cervicouterino. En: *Clínicas de Ginecología y Obstetricia. Temas actuales. Colposcopia.* México: McGraw Hill-Interamericana. pp 83-103.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Morttram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-García JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Krutson KL, Chen L, Zou W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10: 942-949.
- Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A. 1999. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess.* 3: 201-204.
- Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. 2007. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 1; 178: 4022-4026.
- de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJ, Scheper RJ. 1998.

Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res.* 15: 1700-1706.

▪Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 204: 1257-1265.

▪Depriest PD, Van Nagell JR, Powell DE. 1990. Microinvasive cervical cancer. *Clin Obstet Gynecol.* 33: 846-851.

▪Devine S & Hoffman R. 2000. Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Op Hematol.* 7: 358-363

▪Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 36: 309-318

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

▪DiMaio D, Petti L, Hwang ES. 1994. The E5 transforming proteins of the papillomaviruses. *Sem Virol.* 5: 369-379.

▪Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis PP, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen CH, Noël D. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an IL-6-dependent mechanism. *Stem Cells.* 25: 2025-2032.

▪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 D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy.* 8: 315-317.

▪Douglas R, Schiller L, Schiller J. 2006 Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 16: 1167-1173.

- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3: 991–998.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22: 329-360.
- English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. 2009. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25High forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 156: 149-160.
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. 1995. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J infect Dis;* 171:1026–1030.
- Fajardo-Orduña GR. 2008. Análisis comparativo de la morfología inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales provenientes de medula ósea y de sangre de cordón umbilical. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol;* 4(12): 1206-1212.
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 445: 771-775.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Janis Kuby. 2003. *Immunology.* 5<sup>th</sup> edition, Freeman and editors, USA; 665.
- Gregory C, Prockop D, Spees J. 2005. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res.* 306: 330-335.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 21: 589–601.
- Hadzic B, Hadzic M, Curcin N. 1999. Histologic classification and terminology of precancerous lesions of the cervix. *Med Pregl.* 52: 151-155.
- Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. 2007. Human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods.* 319: 41-52.

- Hebner CM & Laimins LA. 2006. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 16: 83-97.
- Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 12: 5423-5434
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Engl J Med,* 338: 423–428.
- Horwitz D, Zheng S, Wang J, Gray D. 2008. The real role of TGF- $\beta$  in regulatory T cells physiology. *Eur J Immunol.* 36: 912-915.
- Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21: 503-513.
- Huibregtse JM, Scheffber M, Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J.* 10: 4129-4135.
- Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, Lin RJ, Yang DM, Chang CW, Chen WH, Wei HJ, Gelovani JG 2005. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive *in vivo* positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res.* 11: 7749-77560.
- INEGI. 2008. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- Jackson L, Jones D, Scotting P, Sottile V. 2007. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med.* 53: 121-126
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 105: 4120-4126.
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, Shin T, Curiel TJ, Zhang B. 2010. CD73 on tumor cells impairs antitumor T cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.* 70: 2245-2255.
- Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. 2006. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 35-43.
- Jonuleit H, Schmitt E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 171: 6323-6327.

- Kanda T, Kukimoto I. 2006. Human papillomavirus and cervical cancer. *Uirusu*. 56: 219-230.
- Kang X, Zang W, Bao L, Li D, Xu X, Yu X. 2006. Differentiating characterization of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Cell Biol Int*. 30: 569-575.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 24: 1294-1301.
- Kiviat N. 1996. Natural history of cervical neoplasia: overview and update. *Am J Obstet Gynecol*. 175: 1099-1104.
- Körbling M. & Estrov Z. 2003 Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 349: 570-582.
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol*. 177: 6780-6786.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24: 386-398.
- 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.
- Lacruz PC. 2003. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001) *Rev Esp Patol*. 1: 5-10.
- Le Blanc K. 2003 Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 5: 485-489.
- Le Blanc K, Pittenger M. 2005. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*. 7: 36-45.
- Lee O, Kuo T, Chen W, Lee K, Hsieh S, Chen T. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 103: 1669-1675.

- Lee R, Hsu Sh, Munoz J, Jung J, Lee R, Pochampally R, Prockop D. 2006. A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice. *Blood*. 107: 2153-2161.
- Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, Ithnin H, Abdullah M, Davis WC, and Seow HF. 2006. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett*. 102: 229-236.
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGFbeta. *J Immunol*. 178: 2883-2892.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med*. 203: 1701–1711.
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 169: 2756–2761.
- Long E, Wood KJ. 2007. Understanding FOXP3: progress toward achieving transplantation tolerance. *Transplantation*. 84: 459-461.
- López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 1: 31-55.
- Lowy DR, Schiller JT. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 116: 1167-1173
- Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatucci A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 90: 516–525.
- MacDonald TT. 1998. T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol*. 10: 620-627.
- Marcov V, Kusumi K, Tadesse M, William D, Hall D, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen R, Rappaport E, Saitta B. 2007. Identification of cord blood-derived mesenchymal



stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials and gene expression profiles. *Stem Cells Dev.* 16: 53-73.

▪McHugh RS, Shevach EM, 2002. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 110: 693-702.

▪McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, Mcance DJ. 2001. Biology of human papillomaviruses. *Intl J Exp Pathol.* 82: 15-33.

▪Mellor AL, Munn DH. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762–774.

▪Molling JW, de Gruiji TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blomberg ME, Bontkes HJ. 2007. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 121: 1749-1755.

▪Monroy García A, Hernández Montes J, Mora García ML. Identification of epitopes from L1, E6, and E7 proteins of the HPV-16 and 18 types and its implication for diagnosis and treatment of cervical carcinoma. 2007. En: *Advances in cancer research at UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México)*. Ed: Mas Oliva, Ninomiyan Alarcón J, García Carrancá J. *El Manual Moderno, UNAM y PUIS.* pp: 1-32. ISBN 970-32-4283-9.

▪Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, Orozco S, Mayani H. 2009. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy.* 11: 163-176.

▪Munger K, Scheffner M, Huibregste JM, Howley PM. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene product. *Cancer Surv.* 12: 197-217.

▪Muñoz N, Castellsague C, de González AB, Lutz Gissmann L, 2006. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 24S3, S3/1-S3/10.

▪Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65: 3307-3318.

▪Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11: 1155-1164.

- Nishikawa H, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S. 2005. CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood*. 106: 1008-1011.
- Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 14: 1269-1273.
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 65: 2457-2464.
- Orozco E, Gariglio P. 2000. *Genética y biomedicina molecular*. IPN. Ed. Limusa. pp 181-198.
- Parkin DM, Pisan P, Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *Cancer J Clin*. 49: 33-64.
- Ponten J, Guo Z. 1998. Precancer of the human cervix. *Cancer Surv*. 32: 201-29.
- Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. 2003. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens, *J Immunol*. 171: 3426-3434.
- Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. 2007. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 92: 881-888.
- Prockop D. 1997. Marrow stromal cells as stem cell for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276: 71-74.
- Qin FX. 2009. Dynamic behavior and function of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell Mol Immunol*. 1: 3-13.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 25: 267-296.
- 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. *Transplantation* 76: 1208-1213.
- Rasmusson I. 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312: 2169-217.

- Read S, Malmström V, Powrie F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 192: 295-302.
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Le Blanc K. 2006. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81: 1390-1397.
- Rodríguez V. 2005. Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum.*10: 5-14.
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 212: 28-50.
- Roncarolo MG, Battaglia M. 2007. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self-antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol.* 7: 585-598.
- Sabatini F, Petecchia I, Tavian M, Jodon V, Rossi G, Brouty-Boye D. 2005. Human bronchial fibroblast exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 85: 962-971.
- Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 22: 531-562.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25.CD4. regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol:* 6, 345–352.
- Salio M, Shepherd D, Dunbar PR, Palmowski M, Murphy K, Wu L. 2001. Mature dendritic cells prime functionally superior melan-A-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes as compared with nonprofessional APC. *J Immunol.* 167: 1188-1897.
- San Segundo D, Benito MJ, Fernández-Fresnedo G, Marín MJ, Arias M, López-Hoyos M. 2007. Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: Efecto de la inmunosupresión farmacológica. *Inmunología.* 3: 157-168.
- Sato N, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. 2005. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 106: 756-763
- Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Meter ME. 1999. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Op Immunol.* 11: 277-285.

- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 7: 1693-1700.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410: 1107–1111.
- Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. 2001. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol.* 167: 2972-2978.
- Shevach EM. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2: 389-400.
- Shi S, Bartold P, Miura M, Seo B, Robey P, Gronthos S. 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 8: 191-199.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. 2008 Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: Tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res* 14:5947–5952.
- Smith J, Pochampally R Perry A, Hsu Sh, Prockop D. 2004. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells.* 22: 823-831.
- Starnes CO. 1992. Coley's toxins in perspective. *Nature.* 357: 11-12.
- Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ. 2004. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J. Exp. Med.* 199: 879–884.
- Sun X, Cai H, Qian H, Zhu W, Yan Y, Xu H, Xu W. 2010. Mesenchymal stem cells isolated from human uterine cervix cancer tissues. *Cell Biol Int. Short Communication.* 35: 1-4.
- Syrjänen SM, Syrjänen JK. 1999. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med.* 31: 175-187.
- Szilvassy S. 2003. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 34: 446-60.

- Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Monk BJ. 2000. Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograft model. *Gynecol Oncol.* 77: 137-148.
- Torroella KM, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Ghaffari AM, Solorza G, Shah, KV. 1998. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncol.* 70: 115-120.
- Turley EA, Veiseh M, Radisky DC, Bissell MJ. 2008. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol.* 5: 280-290.
- van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, van der Huist JM, Kwappenberg KM, van den Hende M, Welters MJP, Van Rood JJ, Fleuren GJ, Melief CJM, Kenter GG, Offringa R. 2007. Association of cervical cancer with the presence of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 104: 12087-12092.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 8:523-532.
- Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. 2007. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol,* 150: 199-209.
- von Boehmer H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6: 338-344.
- Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN. 2006. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations *in vivo*. *J Clin Invest.* 116: 2423-2433.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 33: 1402-1416.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189: 12-19.

- Walboomers JM, Snijders FJP, Steenbergen MRD, Meijer MC. 1997. Role of human papillomaviruses in cancer of the respiratory and upper digestive tract. *Clin Dermatol.* 15: 415-425.
- Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Löwik MJ, Berends-van der Meer DM, Drijfhout JW, Valentijn AR, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, Offringa R, Melief CJ, van der Burg SH. 2008. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res.* 14: 178-187.
- Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 121: 368-374.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. 2001. Regulatory CD4+ CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 61: 4766-4772.
- Workman CJ, Vignali DA 2005. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol.* 174: 688-695.
- Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Ching Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. 2008. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 29: 44-56.
- Yen BL, Yen M-L. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer — for better or for worse? *Cancer Mol.* 4: 5-9.
- Zhao HF, Chen J, Xu ZS, Zhang KQ. 2009. Distribution and differentiation of mesenchymal stem cells in tumor tissue *Chin Med J (Engl).* 122: 712-715.
- Zou W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 5: 263-74.
- Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol.* 80: 267-274.
- Zur HH. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst.* 92: 690-696.
- Zur HH. 2008 Papillomaviruses--to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc).* 73: 498-503.

## Anexo 1.

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLINICA

México, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

**Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:  
ANÁLISIS DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (CEM) DERIVADAS DE  
NEOPLASIAS CERVICALES (NIC Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO).**

**Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:** \_\_\_\_\_ 34HO08

**El objetivo del estudio es:** Conocer la participación de células estromales mesenquimales (de los tumores cervicales) en la supresión de la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

**Se me ha explicado que mi participación consistirá en:** **Autorizar que done una biopsia de tejido cervical, raspado bucal y de cérvix, así como una muestra de sangre venosa (aproximadamente 40 mililitros), para fines del estudio** antes mencionado como son: determinar el tipo de virus de papiloma humano (VPH) e identificar anticuerpos específicos contra VPH en secreciones bucal y cervical, así como en suero de sangre periférica. Las células obtenidas a partir de las muestras se estudiarán para determinar su participación en el establecimiento de la respuesta inmune inducida por infección por VPH.

**Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:**

**\* Ninguno adicional a la prueba de diagnóstico histopatológico y análisis de rutina.**

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

**Nombre y firma del paciente:** \_\_\_\_\_

**Nombre, firma y matrícula del Investigador  
Responsable:**

\_\_\_\_\_

**Dr. Alberto Monroy García (99092191)**

**Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas  
relacionadas con el estudio:**

24 54 65 38 **Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología,  
CMN S. XXI, IMSS.**

56 23 07 90 **Laboratorio de Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación  
Experimental Zaragoza, FES Zaragoza, UNAM.**

**Nombre y  
firma de los  
testigos:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Este formato constituye sólo un modelo que deberá completarse de acuerdo con las características  
propias de cada protocolo de investigación y sin omitir información relevante del estudio.**