



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

Laboratorio de Inmunobiología, Unidad de Investigación en Diferenciación
Celular y Cáncer

**EFFECTO INMUNOSUPRESOR DE LA VÍA CD73/ADENOSINA
GENERADA POR LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES
(CEM's) SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LINFOCITOS T
CITOTÓXICOS (LTC).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FRANCISCO PEREZ MARISCAL

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCÍA

MÉXICO, D. F. 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **PEREZ MARISCAL FRANCISCO**, con número de cuenta **098296581**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **14** del mes de **febrero** de 2012 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

VOCAL DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA

SECRETARIO DRA. JUANA MONROY MORENO

SUPLENTE BIÓL. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE M. EN C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **EFFECTO INMUNOSUPRESOR DE LA VÍA CD73/ADENOSINA GENERADA POR LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (CEM's) SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (LTC).**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABRÁ DE ESPERAR EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 19 de enero de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCION



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
DR CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
JEFE DE CARRERA

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM Proyecto IN223010 “Análisis funcional de la vía CD73 como mecanismo inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de neoplasias cervicales”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida. FIS/IMSS/PROT/G09/762. FIS/IMSS/PROT/800. CONACYT No 106591. Así como la beca para titulación para exalumnos de alto rendimiento otorgada por la UNAM.

“La actividad y el trabajo son consecuencia generalmente de la voluntad y casi siempre el trabajo va acompañado del éxito. Trabajo, voluntad y éxito llenan la vida de un hombre. La voluntad abre las puertas del éxito con brillantez y felicidad; el trabajo hace pasar a través de estas puertas y al final del viaje el éxito corona los esfuerzos realizados”.

Louis Pasteur

Solo morir permanece como la más inmutable razón, vivir es un accidente, un ejercicio de gozo y dolor...

Luis E. Aute

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”

Al laboratorio de Inmunobiología de la FES Zaragoza, UNAM

A la Dra. María de Lourdes Mora García y al Dr. Alberto Monroy García por su apoyo, consejos, paciencia que fueron muy importantes para mi trabajo y por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

Al M. en C. Jorge Hernández Montes le agradezco profundamente su ayuda brindada, su tiempo, observaciones, consejos, conocimientos, paciencia y sobre todo su amistad. Mil gracias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Selene, Arturo, Ivonne, Gilberto, Esteban, Rocío, Vianey, Carlos, Brenda, Azucena, Pamela, Edwin, Karina, Carmen y Luis por sus consejos, bromas, risas, y los momentos felices que hemos compartido en el laboratorio. Suerte a todos.

A mis sinodales Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Dra. Juana Monroy Moreno, Dra. María de Lourdes Mora García, M. en C. Edgar Ledesma Martínez, Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez por sus observaciones, sugerencias, recomendaciones, ayuda y valiosas aportaciones para enriquecer este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios mi señor por iluminar mi vida y nunca jamás soltarme de su mano.

A mis queridísimos padres por todo el amor que me han dado y la oportunidad de vivir, por todos los sacrificios que han hecho para que pudiera salir adelante, este logro también es suyo.

A mis hermanos Dany, Laurís, Leo y Naye; por quererme tanto y por estar siempre a mi lado, son el mejor regalo de la vida. Los amo.

A Selene. Gracias por tu amor, tu apoyo y los hermosos momentos que hemos vivido. Porque nuestros caminos se cruzaron en el momento justo. Te amo "luz de mi vida".

A mis amigos Pavel, Farlick, Erik y Sergio por compartir esos bellos momentos de la vida, las alegrías y las tristezas que hemos pasado juntos, gracias por su amistad y por formar parte de mi vida, gracias por existir. Los quiero.

A toda mi familia en especial a mi tío Pillo, mi tía Reina y mi tío Ramiro; en fin a todas aquellas personas que he encontrado a lo largo de la vida y durante la carrera que de alguna manera el tiempo se encargó de reunirnos. Gracias por todo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
MARCO TEÓRICO.....	7
Sistema Inmune.....	7
Inmunidad innata.....	7
Inmunidad adaptativa.....	7
Inmunidad humoral.....	8
Inmunidad celular.....	8
El cáncer cérvico uterino y mecanismos de evasión inmune.....	10
Vía adenosinérgica (CD73).....	14
La adenosina y su función en la respuesta inmune.....	16
Antagonista de la adenosina (Cafeína).....	21
Células Estromales Mesenquimales.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Células estromales mesenquimales.....	32
Obtención de adenosina generada por CEM's-CaCu mediante la vía adenosinérgica del receptor CD73 a partir de AMP.....	32
Cromatografía en capa fina.....	33
Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	33

Análisis del efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu en la proliferación de Linfocitos T.....	34
Análisis de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu sobre la activación de linfocitos T.....	35
Células T2 cargadas con péptido de citomegalovirus.....	36
Generación de linfocitos T citotóxicos específicos.....	37
Efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu sobre la actividad citotóxica de LTC.....	38
Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS.....	40
Las CEM's-CaCu generan adenosina a partir de AMP.....	40
La adenosina generada por las CEM's-CaCu inhibió la proliferación de linfocitos T	41
La adenosina generada por CEM's-CaCu no inhibe la activación temprana de linfocitos T.....	42
La adenosina generada por CEM's-CaCu no afecta la función efectora citotóxica de células T CD8 ⁺ positivas.....	45
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La célula T citotóxica se une sobre la célula blanco en forma específica, por medio del reconocimiento por los receptores del antígeno de superficie asociado con las moléculas MHC clase I.....	9
Figura 2. Liberación de los gránulos citolíticos en el sitio de contacto con la célula blanco.....	10
Figura 3. Estrategias inmunosupresoras y puestos de control inmunológico explotados por los tumores para evadir la respuesta inmune.....	11
Figura 4. Representación esquemática de los marcadores de células Treg.....	15
Figura 5. Vías de segundos mensajeros acopladas a los subtipos de receptores de adenosina.....	17
Figura 6. El efecto inhibitor de la adenosina sobre las vías de señalización de células T.....	19
Figura 7. Papel de los receptores A2a de adenosina en los efectos antitumorales de los linfocitos T.....	22
Figura 8. Diferenciación de células estromales mesenquimales de medula ósea en células de linaje mesodérmico: adipocitos, osteoblastos, condrocitos y fibroblastos estromales.....	24
Figura 9. Esquema representativo de los diferentes usos en la clínica de las células estromales mesenquimales.....	25
Figura 10. Las CEM's-CaCu generan adenosina a partir de AMP.....	40
Figura 11. Proliferación de linfocitos T por ADE-CEM's y ADE-SINT.....	41
Figura 12. El marcador de activación CD69 es expresado en linfocitos T sin ser afectado por la adenosina.....	43
Figura 13. La adenosina generada por las CEM's no afecta la activación temprana de las células T CD8+.....	43
Figura 14. La adenosina generada por las CEM's inhibe sutilmente la producción de IFN- γ en las células T CD8+.....	44
Figura 15. La adenosina inhibe sutilmente el porcentaje de linfocitos T CD8+IFN- γ	44
Figura 16. Los LTC muestran especificidad al ser retados contra células T2 pulsadas con el péptido NLVPMVATV de citomegalovirus.....	45
Figura 17. La función efectora de los linfocitos T CD8+ no se ve afectada por la adición de adenosina.....	47

Figura 18. Porcentaje de expresión de células CD8⁺CD107⁺ como índice de la actividad efectora citotóxica en la producción de degranulación.....48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos celulares acumulativos de la cafeína en relación a sus concentraciones.....21

Tabla 2. Condiciones de cultivo de los linfocitos T.....34

Tabla 3. Condiciones de cultivo para linfocitos T.....35

Tabla 4. Condiciones de cultivo de los linfocitos T CD8⁺.....38

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

ADE-CEM's.....	Adenosina generada por CEM's
ADE-SINT.....	Adenosina sintética
VPH.....	Virus de papiloma humano
CEM's.....	Células estromales mesenquimales
LTC.....	Linfocitos T citotóxicos
CaCu.....	Cáncer cérvico uterino
IL.....	Interleucina
IFN- γ	Interferón gamma
AMP.....	Monofosfato de adenosina
Treg.....	Linfocitos T reguladores
MO.....	Médula ósea
MHC.....	Complejo principal de histocompatibilidad
CD.....	Células dendríticas
CMSP.....	Células mononucleares de sangre periférica
PHA.....	Fitohemaglutinina
NK.....	Células natural killer
Th.....	Linfocitos T cooperadores o <i>helper</i>
TCR.....	Receptor de células T
CPA.....	Células presentadoras de antígeno
SAF.....	Solución amortiguadora de fosfatos
SFB.....	Suero fetal bovino
SAH.....	Suero autólogo humano

RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) en México, representa la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres, con un 14.4% del total, representando más de 4,000 muertes por año. Las células tumorales desarrollan durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores que evaden el reconocimiento inmune o suprimen los mecanismos efectores de células T antitumorales. Un mecanismo inmunosupresor, recientemente propuesto, es la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular. Este compuesto es generado a partir de nucleótidos extracelulares catalizados por ectonucleotidasas como CD39 y CD73. Por otra parte se sabe que las células estromales mesenquimales (CEM's) se caracterizan por exhibir efectos inhibidores sobre la respuesta de los linfocitos T. En estudios previos hemos encontrado que la presencia de CEM's, en cocultivos heterólogos con células mononucleares de sangre periférica favorece la inducción de poblaciones de linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CTLA-4⁺, además de inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados con IL-2 y fitohemaglutinina. Tomando en consideración que las CEM's comparten varias características con las células Treg respecto a su función inmunosupresora, el presente estudio tuvo como finalidad analizar la actividad inmunosupresora de CEM's provenientes de tejidos cervicales con CaCu, mediante la vía de la ectoenzima CD73 en la actividad funcional de los linfocitos T citotóxicos, ya que esta molécula es expresada en ambos tipos celulares y se ha caracterizado que en Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ participa en la producción de adenosina, una molécula inhibitoria de la activación de LTC.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que: a) las CEM's-CaCu son capaces de generar adenosina (agente inmunosupresor) a partir de monofosfato de adenosina (AMP); b) la proliferación de las células T fue reducida en una forma dependiente de la dosis de la adenosina generada por las CEM's-CaCu; c) la adenosina contenida en los sobrenadantes de las CEM's-CaCu no modificó la expresión del marcador de activación temprana (CD69), pero sí, disminuyó de manera sutil el número de linfocitos T CD8⁺ que produjeron IFN- γ durante la activación; y d) la capacidad efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos no fue afectada por la presencia de la adenosina generada por las CEM's-CaCu. Con estos resultados se puede concluir que el efecto inmunosupresor de las CEM's-CaCu se da por medio de la vía adenosinérgica y que principalmente afecta la proliferación de los linfocitos T más que la función efectora de éstos linfocitos.

INTRODUCCION

En la actualidad, aproximadamente 500 000 nuevos casos de cáncer cervical son diagnosticados por año en todo el mundo, con una mortalidad de aproximadamente un tercio de estos casos. El cáncer cervical es la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres (Yugawa & Kiyono, 2009). Los virus del papiloma humano (VPH) están presentes en más del 90% de todos los casos de cáncer invasor y de sus lesiones precursoras, por lo que se considera a la infección por este virus como el factor de riesgo más importante; además, causa otros carcinomas anogenitales, incluyendo el cáncer de pene (Kayes *et al.*, 2007), así como un subconjunto de cánceres de cabeza y de cuello (Psyrrri & Di Maio, 2008). El cáncer cérvico uterino (CaCu); representa la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres mexicanas, con un 14.4% del total (INEGI, 2008). El VPH ha evolucionado conjuntamente con diferentes especies de animales incluyendo aves, reptiles y mamíferos (Zur Hausen *et al.*, 1994) y por tanto, su ciclo replicativo es muy complejo, de tal forma que puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con una producción de viriones tan sutil, que genera una escasa respuesta inmune innata (Tindle *et al.*, 2002). Cuando logra establecerse, una respuesta adaptativa es más eficiente, y por eso, aunque la tasa de infección es muy alta, no todas las infecciones progresan hasta CaCu (Doorbar, 2006).

Las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores que evaden el reconocimiento inmune o suprimen los mecanismos efectores de células T antitumorales. Dichos mecanismos incluyen: defectos en la función inmunoestimuladora mediante citocinas y moléculas coestimuladoras de células dendríticas (CD) (Gabrilovich *et al.*, 2001); la expresión defectuosa y disminuida de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC del ingles *major histocompatibility complex*) y de los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP) (Evans *et al.*, 2001) y a la asociación de ciertos alelos del antígeno leucocitario humano (HLA del ingles *human leukocyte antigen*) clase I y clase II que conducen a una deficiente presentación de antígenos al linfocito T citotóxico (LTC) (Wang *et al.*, 2001). Otro mecanismo inmunosupresor propuesto, es la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular. Este compuesto es generado a partir de nucleótidos extracelulares catalizados por ectonucleotidasas como CD39 (ENTPD1 ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1) y CD73 (5'-ectonucleotidasa) expresados en linfocitos T reguladores, células dendríticas foliculares y células epiteliales entre otras

(Deaglio *et al.*, 2007; Decking *et al.*, 1997; Synnestvedt *et al.*, 2002; Kobie *et al.*, 2006; Resta *et al.*, 1998). CD39, hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP a sus respectivos nucleósidos (Robson *et al.*, 2005); y el CD73 degrada al monofosfato de adenosina (AMP) a adenosina (Resta *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha sugerido que elementos que conforman el ambiente estromal del tumor, como son: fibroblastos, vasos sanguíneos y células inmunes, responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del mismo tumor, incluyendo soporte estructural, vasculatura y matriz extracelular (Albini *et al.*, 2007). A la fecha, se desconoce el origen de los componentes estromales, sin embargo una posibilidad es que se formen a partir de las células estromales mesenquimales (CEM's). De manera interesante, se ha postulado que las CEM's participan en la generación de células T reguladoras (Treg) en los tumores, debido a que éstas se caracterizan por tener actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función de células Treg (Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008). Asimismo, son importantes en el implante tumoral, la metástasis y supresión de la respuesta inmune en tumores malignos (Yen & Yen 2008).

Nuestro grupo de investigación ha aislado y caracterizado CEM's a partir de tejidos normales (Montesinos *et al.*, 2009) y tumorales de cuello uterino (Montesinos *et al.*, 2009). Tomando en consideración que las CEM's comparten características con las células Treg respecto a su función inmunosupresora, el presente estudio tiene como finalidad analizar la actividad inmunosupresora de CEM's obtenidas de tejidos cervicales con CaCu, mediante la vía de la ectoenzima CD73, ya que esta molécula es expresada en ambos tipos celulares y se ha caracterizado que en células Treg CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ participa en la producción de adenosina, una molécula inhibitoria de la activación del LTC (Synnestvedt *et al.*, 2002; Deaglio *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio serán de gran relevancia para conocer la participación de las CEM's, en la regulación de la respuesta inmune específica, particularmente en el reconocimiento antigénico y consecuentemente en la eliminación de células tumorales.

MARCO TEORICO

Sistema Inmune

El sistema inmune tiene tres propiedades funcionales principales que permiten la defensa del cuerpo. La primera es su extrema especificidad, con la propiedad de reconocer y distinguir una diversidad de moléculas blanco diferentes para responder o no ante el agente agresor. La segunda, que efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, y la tercera es que el sistema inmune posee una memoria con la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas con un agente patógeno. Aunque se hace referencia al sistema inmunitario debe señalarse que existen dos tipos diferentes de éste, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, que colaboran para proteger al organismo (Kindt *et al.*, 2007).

Inmunidad innata

La inmunidad innata comprende, barreras físicas y anatómicas: la piel y los epitelios de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario. La integridad de estas barreras naturales impide la penetración de los patógenos en el organismo. Si la barrera impuesta por los epitelios a los microorganismos patógenos se supera, se establece en el organismo un foco infeccioso primario. A fin de hacerle frente, la inmunidad innata pone en marcha de inmediato un conjunto de mecanismos celulares y humorales. Entre los componentes celulares se destacan: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células NK (Natural Killer), células dendríticas (CD), mastocitos, células endoteliales. Los mecanismos humorales involucran: el sistema del complemento, las proteínas de fase aguda, los interferones α y β (Fainboim & Gefner, 2005).

Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune adaptativa es altamente específica para un patógeno particular; en contraste con la inmunidad innata, una mayor cantidad de mecanismos son estimulados por la exposición a los agentes infectantes e incrementa la capacidad defensiva cuando ocurre una exposición subsecuente a un microbio en particular. La respuesta inmunológica adaptativa está subdividida en dos ramas principales; inmunidad celular y humoral. (Male *et al.*, 2004).

Inmunidad humoral

La inmunidad humoral cuenta con unas moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos, producidos por unas células denominadas linfocitos B (o también células B). Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la infección de los microorganismos y los marcan como un blanco para su eliminación por diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, debido a que los anticuerpos segregados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción. Los propios anticuerpos están especializados y cada tipo diferente puede activar unos mecanismos efectores distintos. (Abbas *et al.*, 2007).

Inmunidad celular

En la inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, participan células llamadas linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, tales como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas (Janeway *et al.*, 2001).

Los linfocitos T se pueden distinguir entre sí por la función que llevan a cabo y por dos proteínas de superficie conocidas como CD4 y CD8, los linfocitos maduros expresan casi siempre una de las dos proteínas y ésta se relaciona con su función celular y con el tipo de proteína del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que reconocen. El 70% de las células T son CD4⁺, el 25% son CD8⁺ y cerca del 4% son CD4⁻ CD8⁻ y, el 1% pueden ser doble positivos (Regueiro *et al.*, 2002). Los linfocitos T cooperadores o *helper* (Th) o CD4⁺, reconocen péptidos presentados por moléculas del MHC II, este reconocimiento es el estímulo inicial para su activación, además secretan citocinas que promueven diferenciación y proliferación de otras células T y B, siendo el principal de estos factores la interleucina 2 (IL-2) (Canaday *et al.*, 2001). Dentro de las células Th pueden distinguirse dos grupos: Th1 secretan IL-2, IL-3, IFN- γ (Interferón gamma) y factor de necrosis tumoral- β (TNF- β del inglés *tumor necrosis factor-beta*) y las Th2 que secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y factor estimulador de colonias de granulocitos-mácrofagos (GM-CSF del

ingles *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Passmore *et al.*, 2002). Diferentes estudios han demostrado que las células tumorales y células infectadas con virus pueden ser destruidas por los linfocitos T citotóxicos (LTC), es decir, que tienen la capacidad de destruir células extrañas (Canaday *et al.*, 2001).

Los LTC presentan en su superficie moléculas CD8⁺ y reconocen sólo porciones o péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC I. Por medio de este reconocimiento del antígeno de superficie, la célula citotóxica entra en contacto íntimo con su célula blanco y administra el “beso de la muerte por apoptosis” (Murphy *et al.*, 2008). (Figura 1).

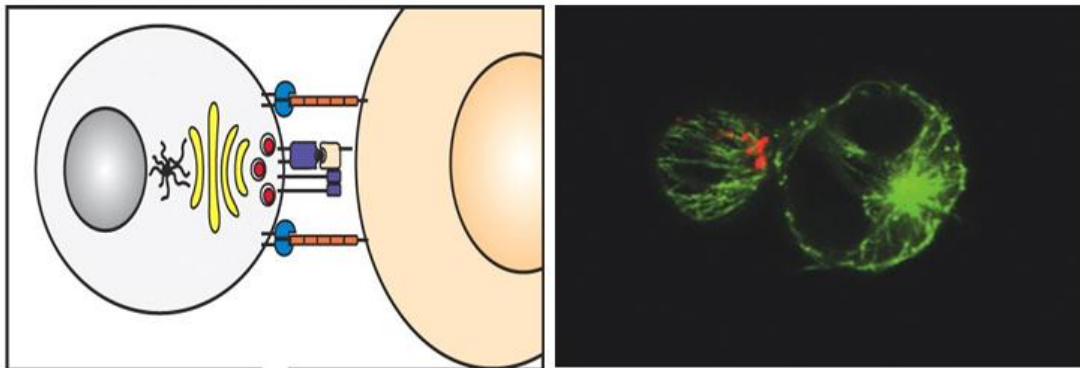


Figura 1. La célula T citotóxica se une sobre la célula blanco en forma específica, por medio del reconocimiento por los receptores del antígeno de superficie asociado con las moléculas MHC clase I. (Tomado de Murphy *et al.*, 2008).

También libera IFN- γ , que contribuye para limitar la diseminación del virus a las células adyacentes, sobre todo en los casos en que el mismo virus puede ser inductor débil de IFN- α o β . (Roitt & Delves, 2003). El LTC activado tiene un receptor en la membrana (CD69) transitoriamente expresado sobre la activación de los linfocitos, no detectado en linfocitos en calma y expresado selectivamente en infiltraciones de inflamación crónica y en los sitios de respuesta inmune activa *in vivo* (Sancho *et al.*, 2005). CD69 se expresa seguido de la activación en todas las células derivadas de la médula ósea excepto eritrocitos, la rápida y transitoria inducción de la expresión de CD69 sobre las células T sugiere que este puede incrementar la activación y/o diferenciación, como ocurre con CD40L (CD154) o CD25 (Testi *et al.*, 1994). Los LTC contienen altas concentraciones de gránulos citolíticos preformados en su citoplasma (Cooper *et al.*, 2001). Estas vesículas líticas contienen un número de proteínas citosólicas como lo son perforinas y granzimas

únicamente designadas a inducir muerte en células blanco tras su liberación (Cooper *et al.*, 2001; Burkhardt *et al.*, 1989; Tschopp & Nabholz, 1990). (Figura 2).

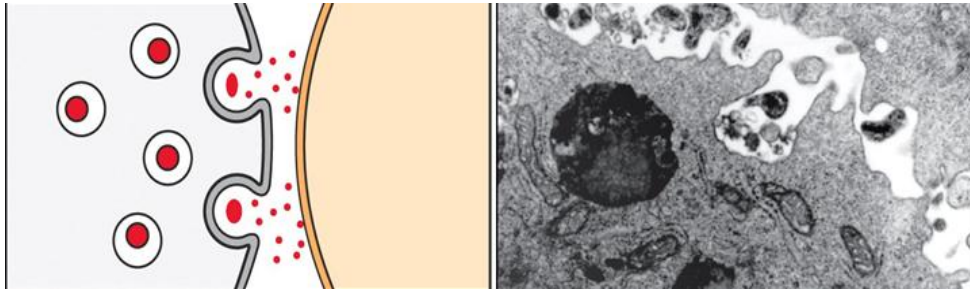


Figura 2. Liberación de los gránulos citolíticos en el sitio de contacto con la célula blanco. (Tomado de Murphy *et al.*, 2008).

Forrando la membrana de estos gránulos citolíticos está la proteína 1 asociada a membrana de lisosoma (LAMP-1 o CD107 del inglés *lysosomal-associated membrane protein-1*) (Winchester, 2001; Peters *et al.*, 1991). Recientemente, la expresión de CD107 sobre la superficie celular ha sido descrita como un marcador de degranulación de las células T citotóxicas CD8⁺ y se ha demostrado actúa como un fuerte sobrerregulador en la superficie celular siguiendo la estimulación en concordancia con la pérdida de las perforinas. (Betts *et al.*, 2003). Es por ello que los LTC o CD8⁺ han sido usados por muchos años como las mejores células efectoras contra el crecimiento de tumores y se ha sugerido el uso de epítopes antigénicos para inducir una respuesta efectiva, específica en la respuesta inmune celular (Castellanos, 2001).

El cáncer cérvico uterino y mecanismos de evasión inmune

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un problema de salud pública, en la actualidad, aproximadamente 500 000 nuevos casos de cáncer cervical son diagnosticados por año en todo el mundo, con una mortalidad de aproximadamente un tercio de estos casos. El cáncer cervico uterino sigue siendo la segunda causa más común de muerte por cáncer en las mujeres (Yugawa & Kiyono, 2009). En México, representa la segunda causa de muerte por tumores malignos, con un 14.4% del total, representando más de 4,000 muertes por año (INEGI, 2008). Los virus del papiloma humano (VPH) se han encontrado en más del 90% de todos los casos de cáncer invasor y de sus lesiones precursoras y la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más difundida (Bosch *et al.*, 2002), aunque la mayoría de estas infecciones son transitorias y no son clínicamente evidentes debido a que el 70-90% de la mujeres infectadas resuelven la

infección entre 12 y 30 meses (Ho *et al.*, 1998) y se estima que sólo de un 5 a un 8% las mujeres que la padecen desarrolla CaCu (Torroella *et al.*, 1998). No obstante la intratable naturaleza de muchos tumores sólidos a respuestas inmunes celulares ha sido atribuida a un espectro de mecanismos de evasión inmune tumoral (Figura 3), que incluye la supresión inmune asociada al tumor, la cual ha sido bien documentada tanto en animales como en humanos con cáncer (Malmberg, 2004; Tabi & Man, 2006; Whiteside, 2006).

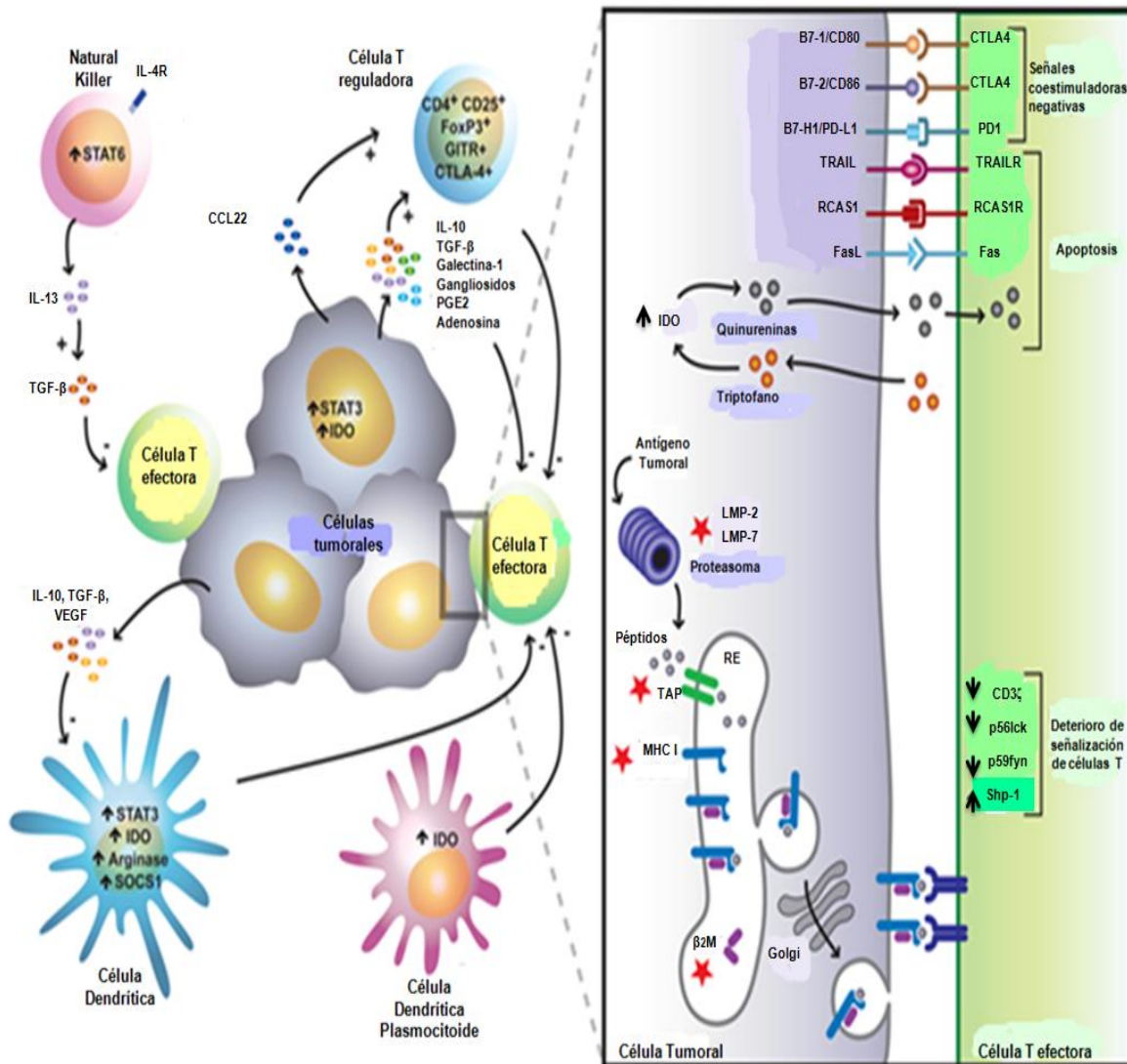


Figura 3. Estrategias inmunosupresoras y puestos de control inmunológico explotados por los tumores para evadir la respuesta inmune. Los tumores emplean una gran cantidad de mecanismos inmunosupresores, que pueden actuar en conjunto para contrarrestar la eficacia de la respuesta inmune. Estos incluyen defectos en las señales próximas al TCR, inducidas por el tumor deteriorando la presentación de antígenos y la maquinaria procesadora, la activación de señales coestimuladoras negativas en el microambiente tumoral, elaboración de factores inmunosupresores, activación de vías pro-apoptóticas, inhibición de las células NK mediada por citotoxicidad e inhibición de la diferenciación y maduración de DC. Además, de diferentes poblaciones de células reguladoras como CD4⁺ CD25⁺ células Treg (Tomado y modificado de Rabinovich *et al.*, 2007).

Recientemente, una gran atención se ha enfocado sobre la función de las células T reguladoras (Treg) y células supresoras mieloides como mediadores de la supresión inmune asociada al tumor (Wang *et al.*, 2007; Vieweg *et al.*, 2007; Serafini *et al.*, 2006).

Los linfocitos Treg se asocian con la baja expresión 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). Otros mecanismos como la pérdida de la expresión de la molécula de superficie antígeno leucocitario humano (HLA del inglés *human leukocyte antigen*) clase I que es particularmente importante, es así como son capaces las células tumorales de evadir el reconocimiento y lisis por los linfocitos T citotóxicos (Garrido *et al.*, 1997; Ruiz-Cabello *et al.*, 2002; Seliger *et al.*, 2000; 2002), que a su vez la desregulación de esta molécula puede sensibilizar el ataque de las células NK y en consecuencia mostrar mecanismos alternativos para evadir el reconocimiento por estas células (Lanier, 2005), la desregulación o cambio de la cadena del MHC I relacionada con el gen A/B (MICA o MICB del inglés MHC class I chain-related gene A/B) que pueden representar un mecanismo de escape de las células tumorales (Groh *et al.*, 2002), una presentación deficiente de los antígenos tumorales también debida a defectos en la maquinaria de procesamiento de antígenos, incluyendo las mutaciones del transportador asociado con el presentamiento de antígenos (TAP del inglés transporter associated with antigen presentation) y los componentes del inmunoproteasoma (LMP2 y LMP7) (Marincola *et al.*, 2000; Spiotto *et al.*, 2004; Rivoltini *et al.*, 2002).

Fallas potencialmente presentes en células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, macrófagos y células B, que expresan MHC y que son incapaces de presentar antígenos tumorales a células T específicas, bajo particulares condiciones en el microambiente (Steinman *et al.*, 2003; Belz *et al.*, 2002; Munn *et al.*, 2002), defectos en la señalización de el receptor de las células T (TCR del inglés T cell receptor) como resultado de la actividad inhibitoria de la fosfatasa SHP-1 (Koneru *et al.*, 2005) y una disminución en la expresión de la cadena ζ de CD3 y las cinasas de tirosina p56lck y p59fyn que juegan un rol crítico en eventos de señalización que conducen a la activación de células T (Khong & Restifo, 2002; Mizoguchi *et al.*, 1992).

No obstante las mismas células tumorales pueden suprimir respuestas inmunes celulares específicas al tumor mediante de la producción de citocinas inmunosupresivas que

incluyen el factor de crecimiento transformante β (TGF- β del inglés transforming growth factor- β) que inhibe proliferación, activación y diferenciación de células T (Li *et al.*, 2006), células NK también pueden suprimir la eficacia de las respuestas de linfocitos T citotóxicos por medio de mecanismos relacionados con la producción de IL-13 y TGF- β (Teraben *et al.*, 2000) e interleucina 10 (IL-10) que afecta la funcionalidad de CD (Gerlini *et al.*, 2004; Gastl *et al.*, 1993) y protege a las células tumorales de citotoxicidad mediada por los LTC (Kurte *et al.*, 2004), factor de necrosis tumoral, familia de ligandos como Fas ligando (O'Connell *et al.*, 1996) y pequeñas moléculas inhibitorias como Prostaglandina E2 (Akasaki *et al.*, 2004; Owen *et al.*, 1980).

Reguladores negativos como CTLA-4 disminuyen la respuesta de las células T antitumorales (Hodi *et al.*, 2008), el bloqueo de señalización de TCR (Chung *et al.*, 2000), la supresión de Th1 y la secreción de citocinas proinflamatorias (Rabinovich *et al.*, 1999), la enzima indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO del inglés indoleamine 2,3-dioxygenase) la cual cataliza la descomposición oxidativa del aminoácido esencial triptófano, por vía de las quinureninas preservando el ataque de las células T y su proliferación y bloqueando la progresión del ciclo celular por la eliminación del triptófano (Mellor & Munn 2000; Uyttenhove *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2005), interacciones entre el receptor de muerte programada-1 (PD-1 del inglés programmed death-1) y el ligando de muerte programada -1 (PD-L1 del inglés programmed death receptor ligand 1) (Blank *et al.*, 2005) inhibiendo la activación de células T (López *et al.*, 2005); la expresión de ligandos de receptores de muerte por ejemplo, Fas L, TRAIL (Siegel *et al.*, 2000) y la quimiocina RANTES (Mellado *et al.*, 2001) así como el ligando RCAS1 induciendo la detención del ciclo celular y la apoptosis de las células T activadas (Nakashima *et al.*, 1999).

Muerte de células T por medio de distintos mecanismos involucrando gangliósidos e interacciones CD70/CD27 (Chahlavi *et al.*, 2005); interacciones de proteoglicanos como la galectina-1 que tiene el potencial de inhibir las funciones de las células T efectoras mediante la inducción de apoptosis de las células T (Perillo *et al.*, 1995), regulando la expresión de glicosil transferasas durante el desarrollo y activación de las células T, creando ligandos N-acetilactosamina (Rabinovich *et al.*, 2002), la sensibilización de las células T a la muerte celular inducida por FasL (Matarrese *et al.*, 2005), otros miembros de la familia de las galectinas como son la galectina 2, 3 y 9 han mostrado afecciones negativas a la sobrevivencia y activación de las células T y la secreción de citocinas (Sturm *et al.*, 2004; Fukumori *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Demetriou *et al.*, 2001),

acumulación de células dendríticas tolerogénicas que suprimen células T (Colonna *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2003; Vermi *et al.*, 2003).

Otro mecanismo inmunosupresor recientemente estudiado es la vía adenosinérgica mediada por adenosina extracelular, la cual está presente en concentraciones inmunosupresivas dentro del microambiente de tumores sólidos y puede por lo tanto ser un factor importante en la evasión inmune por las células tumorales (Ohta *et al.*, 2006).

Vía adenosinérgica (CD73)

CD73 es conocida como una 5'-ectonucleotidasa (ecto-5'-NT, EC.3.1.3.5) que utiliza monofosfato de adenosina (AMP del inglés adenosine monophosphate) extracelular para producir adenosina y es una glicoproteína vinculada a proteínas ancladas a membrana denominadas proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI), que son expresadas abundantemente en células endoteliales y en un subconjunto de leucocitos (Jalkanen & Salmi, 2008; Yegutkin, 2008).

CD73 fue originalmente definida como un antígeno de diferenciación de los linfocitos y se considera que funciona como una molécula de coseñalización en los linfocitos y funciona como una molécula de adhesión que es importante para la unión de los linfocitos al endotelio. Recientemente se ha implicado a CD73 en el control de una variedad de respuestas fisiológicas, que incluyen transporte de fluidos epiteliales e iones, el preconditionamiento isquémico, lesión de los tejidos, función plaquetaria y fuga vascular (Resta *et al.*, 1998; Colgan *et al.*, 2006; Linden *et al.*, 2001). Estudios previos reportaron que CD73 participa en interacciones célula-célula y célula-matriz y está implicada en la promoción tumoral (Spychala, 2000). El aumento de los niveles de expresión de CD73 se asocia con neovascularización tumoral, invasión, migración, adhesión, metástasis y con menor tiempo de supervivencia en los pacientes con cáncer de mama y se ha confirmado que CD73 promueve la invasión, migración y adhesión de células de cáncer de mama en humanos (Wang *et al.*, 2008¹).

La adenosina extracelular puede ser pasiva o activamente generada dentro del microambiente tumoral. La adenosina extracelular es comúnmente producida ya sea por la difusión pasiva o el transporte activo de adenosina intracelular o por causa de la hidrólisis enzimática de adenosín trifosfato (ATP, del inglés *Adenosine TriPhosphate*)

extracelular (Sitkovsky *et al.*, 2008). Este compuesto es generado a partir de nucleótidos extracelulares catalizados por ectonucleotidasas como CD39 (EC 3.6.1.5) y CD73 expresados en linfocitos Treg (Figura 4), células dendríticas foliculares y células epiteliales entre otras (Deaglio *et al.*, 2007; Decking *et al.*, 1997; Synnestvedt *et al.*, 2002; Kobie *et al.*, 2006; Resta *et al.*, 1998). CD39 hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP a sus respectivos nucleótidos (Robson *et al.*, 2005) y CD73 hidroliza al AMP a adenosina (Resta *et al.*, 1998).

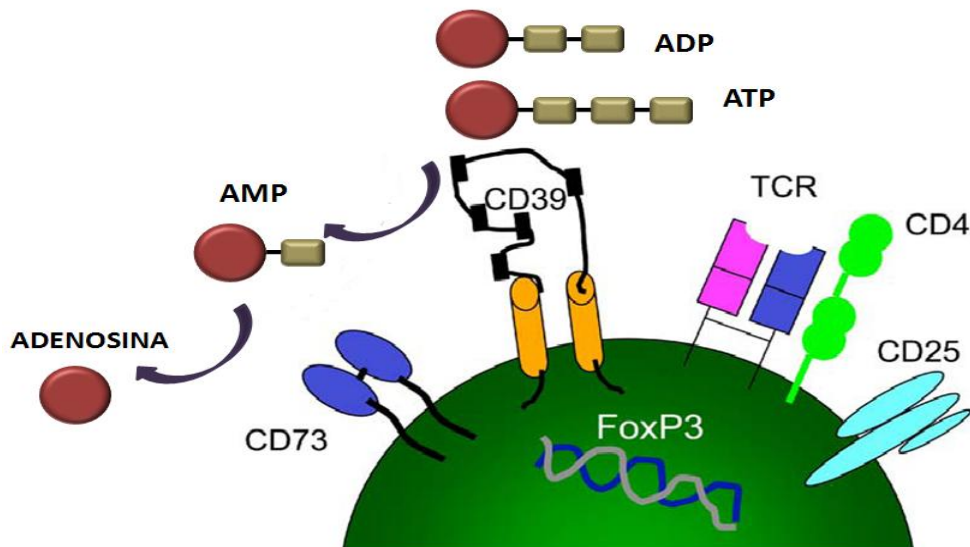


Figura 4. Representación esquemática de los marcadores de células Treg. El fenotipo celular de células T supresoras es definido por la expresión de las moléculas FoxP3⁺/CD39⁺/CD73⁺. La fosfohidrólisis de nucleótidos extracelulares por CD39 y CD73 genera adenosina, la cual ejerce un efecto inmunosupresivo. (Tomado y modificado de Dwyer *et al.*, 2007).

La adenosina está presente en mayor concentración en los tejidos hipóxicos debido al aumento de la producción de adenosina intracelular y su liberación por las células. Esto es provocado por el daño a las células endoteliales, la microcirculación, la interrupción normal de la sangre y el suministro de oxígeno (Sitkovsky & Lukashev, 2005, Eltzschig *et al.*, 2004), también se asocia con la disminución de ATP intracelular, aumento de AMP intracelular, la inhibición de adenosina cinasa, la acumulación de adenosina intracelular y el transporte posterior o difusión de adenosina intracelular (Zhang, 2010; Sitkovsky *et al.*, 2008). En el exterior de la célula, CD73 sirve principalmente como una molécula de señalización y durante condiciones de estrés celular (inflamación, lesión, isquemia e hipoxia aguda), esta molécula se acumula en el espacio extracelular (Haskó *et al.*, 2008; Eltzschig, 2009). Recientemente se ha propuesto que la protección de tumores de las células T es debido a la inmunosupresión por la vía adenosinérgica mediante la elevada

producción de adenosina extracelular la cual está presente en células cancerosas con una alta actividad enzimática de CD73 y constituye un importante mecanismo de escape inmune en tumores (Sitkovsky *et al.*, 2008; Pellegatti *et al.*, 2008).

Los transportadores de nucleótidos en la membrana son responsables de la exportación intracelular de adenosina al compartimiento extracelular (Baldwin *et al.*, 2004). El flujo de salida de adenosina se observa en lesión tisular, necrosis e isquemia, y por tanto, puede ser una fuente importante de este nucleósido extracelular en tumores sólidos (Zhang, 2010; Sitkovsky *et al.*, 2008). La hipoxia estimula la producción de adenosina en cultivos de células 3LL de carcinoma pulmonar de Lewis (Raskovalova *et al.*, 2005). Por otra parte, en microdiálisis *in situ* muestra que las concentraciones extracelulares de adenosina en ratones y en humanos en carcinomas colorrectales son de 10 a 20 veces mayores que los habituales en el entorno de tejidos normales (Blay *et al.*, 1997.). La alta concentración de adenosina extracelular en el microambiente del tumor sólido ha sido confirmada recientemente por otros laboratorios (Ohta *et al.*, 2006). Es importante señalar que los niveles de adenosina extracelular en tumores sólidos pueden ser más equilibrados o modificados por ectoenzimas que median la producción o degradación de adenosina en la superficie celular.

La adenosina y su función en la respuesta inmune

La adenosina inhibe de forma potente una amplia gama de respuestas de los linfocitos T a la estimulación antigénica, incluyendo proliferación celular (Hoskin *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 1997), síntesis de IL-2 y citocinas proinflamatorias como el interferón- γ y TNF- α (Lappas *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2003; Raskovalova *et al.*, 2005), la sobrerregulación de CD25 (cadena α del receptor de la IL-2) (Huang *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 2003), la expresión de moléculas efectoras citotóxicas como perforinas y Fas ligando (Hoskin *et al.*, 2002; Koshiba *et al.*, 1997), la adhesión de LTC a las células diana del tumor (MacKenzie *et al.*, 1994, 2002) y la exocitosis de gránulos por LTC (Koshiba *et al.*, 1997). De hecho, la adenosina inhibe algunos de los primeros pasos en la activación de las células T asociada con señales de transducción mediante los receptores de las células T y de moléculas coestimuladoras como CD28 (Ohta *et al.*, 2006). Las bajas concentraciones micromolares de adenosina, inhiben la fosforilación inducida por el receptor de las células T CD3 y CD28 de los residuos de tirosina en proteínas intracelulares de las células T de ratón, proteínas tirosina cinasas p56lck y ZAP-70, que son componentes esenciales de la vía de

transducción de señales del receptor de las células T (Mustelin & Taskén, 2003). La síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) por las células T también es suprimida en paralelo con la reducción de fosforilación de la tirosina de las proteínas intracelulares de las células T de ratón en presencia de adenosina. La adenosina interactúa con los receptores de adenosina de la superficie celular en los linfocitos T y células NK que median la respuesta inmune celular hacia células tumorales. En este momento hay cuatro subtipos de receptores de adenosina claramente definidos (A_1 , A_{2a} , A_{2b} y A_3) que se encuentran acoplados a la proteína G de la familia de siete hélices transmembrana de los receptores de la superficie celular (Fredholm *et al.*, 2000; Cobb & Clancy, 2003; Klotz, 2007). Los receptores de adenosina A_1 y A_{2a} (K_D para la adenosina, $\sim 10^{-8}$ a 10^{-7} M) presentan mayores afinidades relativas para adenosina que los receptores de adenosina A_{2b} y A_3 (K_D para la adenosina, $\sim 10^{-6}$ a 10^{-5} M) (Cobb & Clancy, 2003; Fredholm *et al.*, 1994). Como se muestra en la figura 5, los subtipos de receptores de adenosina están acoplados a diferentes miembros de la familia de la proteína G (Klotz, 2007; Merighi *et al.*, 2003; Haskó *et al.*, 2004).

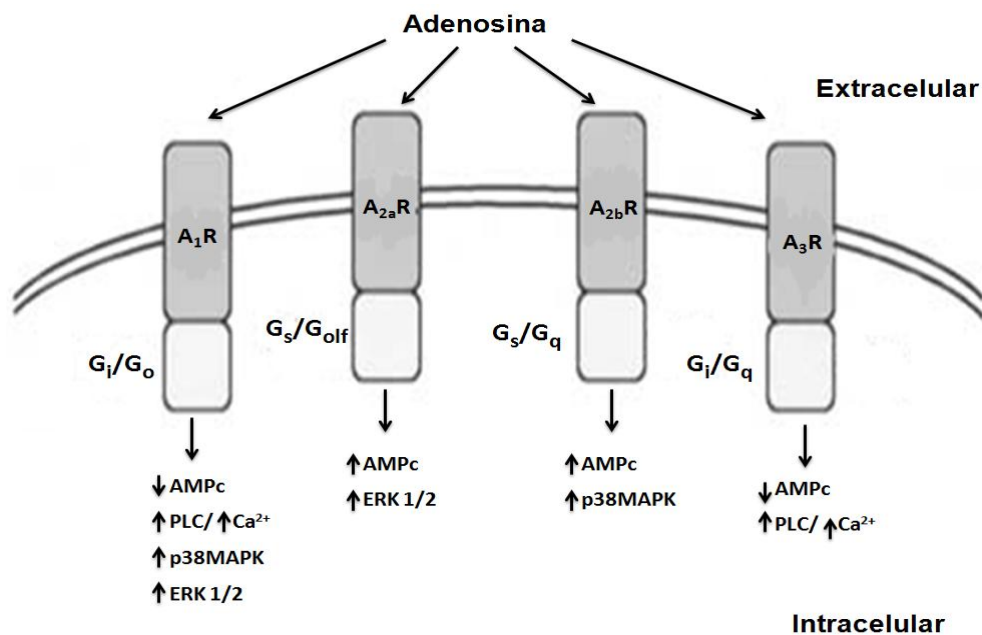


Figura 5. Vías de segundos mensajeros acopladas a los subtipos de receptores de adenosina. La adenosina extracelular se puede unir a cuatro diferentes receptores acoplados a proteínas G (R), estructuras que, o bien estimulan a ($A_{2a}R$ y $A_{2b}R$) o inhiben (A_1R y A_3R) la actividad de la adenilato ciclasa (Fredholm *et al.*, 2000; Cobb & Clancy, 2003; Klotz, 2007; Fredholm *et al.*, 1994; Merighi *et al.*, 2003; Haskó *et al.*, 2004). La estimulación de A_1R y A_3R puede también activar la fosfolipasa C (PLC) con el lanzamiento consecutivo de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Además, todos los subtipos de receptores de adenosina se acoplan a las vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo señales de vías extracelulares reguladas por cinasa (ERK) 1/2 y p38 MAPK (Merighi *et al.*, 2003; Schulte & Fredholm, 2003). (Tomado de Hoskin *et al.*, 2008).

Cabe señalar que la expresión de los subtipos de receptores de adenosina por linfocitos T puede ser modulada por señalización del receptor de la célula T. En el sistema de ratón, la expresión del ARNm del receptor A_{2a} de adenosina se eleva en linfocitos T $CD4^+$ después de su activación (Lappas *et al.*, 2005). Del mismo modo, linfocitos T activados en humano presentan elevada expresión del receptor de adenosina A_{2a} , así como A_{2b} y A_3 (Koshiba *et al.*, 1999; Mirabet *et al.*, 1999; Gessi *et al.*, 2004). Las células T activadas específicas al tumor que migran al microambiente tumoral por lo tanto pueden tener mayor sensibilidad a la supresión inmunológica mediada por la adenosina (Hoskin *et al.*, 2008).

Estos receptores ejercen efectos sobre respuestas de células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y linfocitos. Además de regular la función de los linfocitos indirectamente por medio de la estimulación de los receptores en las células inmunes innatas como las células dendríticas, la adenosina también puede afectar directamente respuestas de los linfocitos mediante la unión y la activación de estos receptores. Los receptores de adenosina A_{2a} que son dominantes en el dictado de respuestas de los linfocitos (Haskó *et al.*, 2008). Los estudios realizados en el sistema de ratón utilizando agonistas y antagonistas selectivos de los subtipos de receptores de adenosina indican que la adenosina inhibe la activación de células T y función efectora por señalización principalmente por medio de los receptores de adenosina A_{2a} y A_3 (Hoskin *et al.*, 2008) (Figura 6); sin embargo, diferentes aspectos de la activación y función efectora de las células T parecen ser afectados por la estimulación de los receptores de adenosina A_{2a} y A_3 (Hoskin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Lappas *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1997; Koshiba *et al.*, 1997; MacKenzie *et al.*, 1994).

Por ejemplo, la señalización del receptor de adenosina A_{2a} suprime CD25 y la expresión de moléculas efectoras citotóxicas (Koshiba *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997), mientras que la señalización del receptor de adenosina A_3 inhibe la proliferación de las células T en respuesta a la estimulación de los receptores de las células T (Hoskin *et al.*, 2002), así como la adhesión de las células T activadas a las células de adenocarcinoma singénico (MacKenzie *et al.*, 1994). La adenosina también actúa mediante el receptor de adenosina A_{2a} para evitar la secreción de IL-2 y de TNF- α por LTC $CD8^+$ tipo 1 y tipo 2 en ratones, manteniendo al mismo tiempo la producción de IFN- γ en niveles similares a las células de control (Erdmann *et al.*, 2005). Por medio de la inhibición de la producción de IL-2, la adenosina asociada al tumor evita la expansión clonal de las células T específicas de un antígeno activadas hacia el tumor, mientras que la inhibición de la secreción de TNF- α ,

que es una citocina proinflamatoria importante, resulta en una reducción de inflamación de protección en el sitio del tumor (Hoskin *et al.*, 2008).

Microambiente tumoral

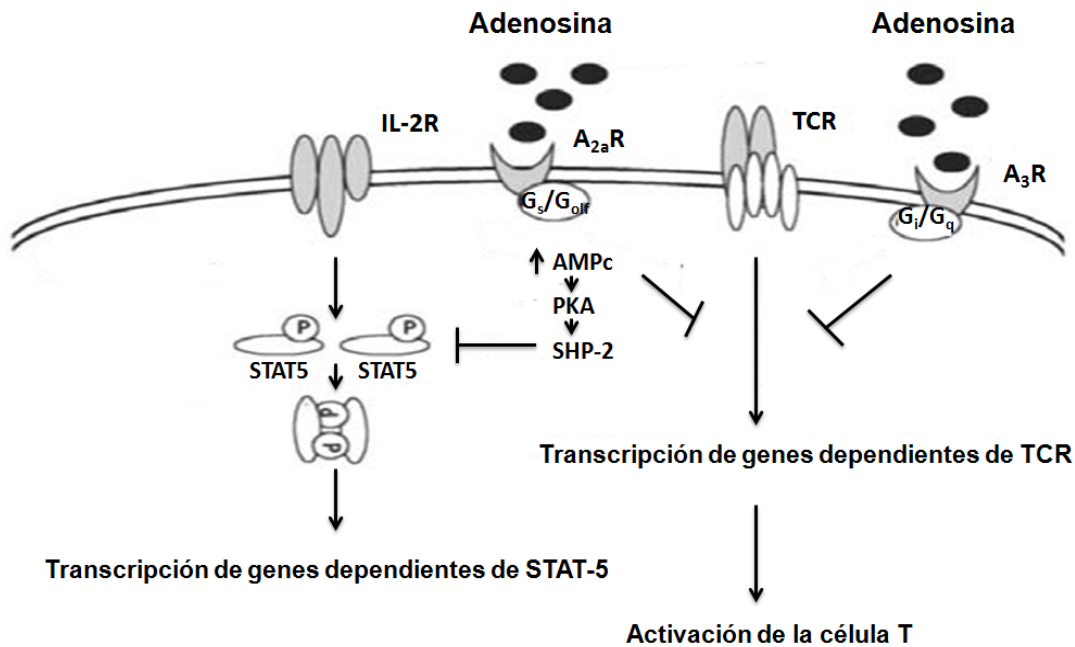


Figura 6. El efecto inhibitorio de la adenosina sobre las vías de señalización de células T. La proliferación y diferenciación de las células T se inicia por el receptor de células T, la señalización y la posterior transcripción de genes implicados en la activación de las células T, como las secuencias que codifican para c-myc, el IFN- γ , IL-2 y CD25 (Ullman *et al.*, 1990). La expansión clonal de las células T y la expresión de moléculas efectoras tales como perforinas involucran el receptor de IL-2 (IL-2R) la señalización y la posterior fosforilación de la tirosina y la activación del factor de transcripción STAT5 (Moriggl *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). La transcripción del gen dependiente del TCR es suprimida tras estimulación de los subtipos de receptores (R) de adenosina A_{2a} y A₃ (Hoskin *et al.*, 2002; Lappas *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1997; Raskovalova *et al.*, 2007; Erdmann *et al.*, 2005). La adenosina también interfiere con la IL-2 que conduce a la expansión de células T (Zhang *et al.*, 2004; Erdmann *et al.*, 2005). A_{2a}R (y A_{2b}R) induce la estimulación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y la proteína cinasa A (PKA) dependiente de la tirosina fosfatasa (SHP-2), la cual interfiere con el IL-2R por señalización de defosforilación e inactivación de STAT5 (Zhang *et al.*, 2004). (Tomado de Hoskin *et al.*, 2008).

También es importante tener en cuenta que la estimulación del receptor de adenosina A_{2a} tiene diferentes efectos sobre las células T CD8⁺ y CD4⁺ ya que, a diferencia del efecto sobre las células T CD8⁺ (Erdmann *et al.*, 2005), la señalización es mediante este receptor que bloquea la secreción de IFN- γ por linfocitos T CD4⁺ de ratón (Lappas *et al.*, 2005). Un estudio reciente sugiere que la activación de la proteína cinasa A tipo I vía el receptor de adenosina A_{2a} está también involucrado en la inhibición mediada por adenosina en la producción de citocinas y citotoxicidad por células T (Raskovalova *et al.*, 2007). La

señalización del receptor de adenosina A_{2a} , así como A_{2b} , también activa la proteína tirosin fosfatasa SHP-2, lo cual resulta en la defosforilación de STAT5 asociada al receptor de IL-2 y deteriora la señal de transducción por medio de la alta afinidad de IL-2 de los receptores de las células T (Zhang *et al.*, 2004). Por lo tanto, la elevación de adenosina extracelular en el microambiente tumoral tiene el potencial para inhibir la producción y utilización de IL-2 por parte de los linfocitos T infiltrados en el tumor (Zhang *et al.*, 2004; Butler *et al.*, 2003).

El receptor de las células T que conduce a la activación de las células T cooperadoras $CD4^+$ requiere la participación de las células presentadoras de antígeno (CPA) como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, las cuales presentan péptidos antigénicos a células T $CD4^+$ en el contexto de moléculas MHC II, y proveen una esencial fuente de coestimulación de las células T (Schneider & Sercarz, 1997; Harris & Ronchese, 1999). Es probable que la adenosina asociada al tumor indirectamente impida la activación de las células T $CD4^+$ específicas del tumor al interferir con la función de las CPA. Las células dendríticas humanas maduras expresan receptores de adenosina A_{2a} mediante los cuales la adenosina suprime la producción de IL-12 (Panther *et al.*, 2001). La adenosina también inhibe la síntesis de IL-12 por macrófagos de ratón por medio de mecanismos dependientes e independientes de receptores de adenosina A_{2a} (Haskó *et al.*, 2000). Dado que la IL-12 desempeña un papel fundamental en el desarrollo de las células Th1 (O'Garra, 1998), la disminución de la síntesis de IL-12 por las células dendríticas y macrófagos en presencia de la adenosina extracelular se prevé que interfiere con la inducción de células mediadas dependientes de Th1 por respuestas inmunes a las células tumorales. Otro medio por el cual la adenosina podría interferir con la inducción de una fuerte respuesta inmune antitumoral dirigida por Th1 es mediante la mejora de las células dendríticas en la secreción de IL-10 antiinflamatoria, que tiene un efecto negativo en el desarrollo de células Th1 (Panther *et al.*, 2003). Este efecto negativo de adenosina en la expresión de moléculas coestimuladoras de las células B es más probablemente mediado por receptores de adenosina A_{2a} desde las células B que presentan fuerte expresión del receptor de adenosina A_{2a} , pero poca o ninguna expresión de otros subtipos de receptores de adenosina (Lukashev *et al.*, 2003). La adenosina puede tener un efecto similar inhibitorio sobre la expresión de estas u otras moléculas coestimuladoras por las células dendríticas y macrófagos. Además de interferir con la coestimulación de las células T a nivel de las CPA (Hoskin *et al.*, 2008).

Es importante destacar que el antagonismo de los receptores de adenosina A_{2a} o la baja regulación de la expresión del receptor de adenosina A_{2a} mediante ácido ribonucleico de silenciamiento (ARNsi) mejora la capacidad de las células T $CD8^+$ para retardar el crecimiento tumoral (Ohta *et al.*, 2006). Por otra parte, mientras que la importancia de la señalización del receptor de adenosina A_{2a} en respuesta a la supresión de células T mediada por adenosina ha sido confirmada por medio de ratones deficientes en el receptor de adenosina A_{2a} (Lukashev *et al.*, 2003), similares estudios confirmatorios aún no se han realizado con ratones deficientes del receptor de adenosina A_3 . Lo cual sugiere el uso de antagonistas del receptor A_{2a} como la cafeína, que permite la reactivación de la actividad funcional de linfocitos T efectores y así la disminución del tamaño tumoral (Ohta *et al.*, 2006).

Antagonista de la adenosina (Cafeína)

La adenosina es un autocoide, lo que significa que es una sustancia que se encuentra en todas las células del cuerpo y ejerce efectos (diversos) en todas las células del cuerpo humano. Como ya se ha comentado, estos efectos están mediados por los receptores de adenosina. La cafeína es capaz de modificar diversos procesos celulares que podrían explicar sus efectos biológicos (Tabla 1), puede por tanto bloquear de forma dependiente de la dosis los efectos de la adenosina, incluidos los que se producen en las células cancerosas que también tienen receptores de adenosina.

Concentración de cafeína	Efecto celular
1-30 μM	Bloqueo de los receptores de adenosina A_1 , A_{2a} y A_{2b}
20-300 μM	Bloqueo de los receptores A_3 e inhibición de la fosfodiesterasa de AMPc
40-700 μM	Bloqueo de los receptores GABA _A
100-3000 μM	Liberación de calcio del retículo endoplásmico.

Tabla 1. Efectos celulares acumulativos de la cafeína en relación a sus concentraciones. (Tomado y modificado de Fredholm *et al.*, 1999).

Por el momento los receptores de adenosina de las células cancerosas no se han considerado un blanco para el desarrollo de fármacos anticancerosos. Sin embargo, hay evidencias de que los receptores de adenosina de las células del sistema inmunitario

pueden ser un buen blanco terapéutico al menos en ciertos tipos de cáncer (Franco, 2008). (Figura 7).

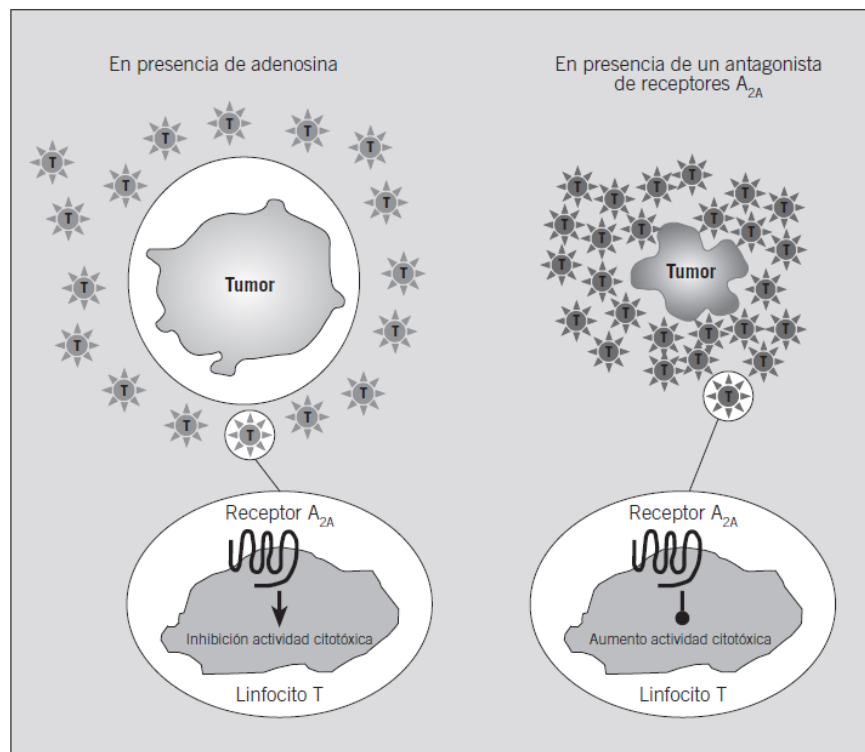


Figura 7. Papel de los receptores A_{2a} de adenosina en los efectos antitumorales de los linfocitos T. A partir de los estudios de Ohta *et al.*, 2006 se sospecha que, una vez que el tumor se ha desarrollado, la adenosina producida *in situ* activa los receptores A_{2a} de adenosina en linfocitos, lo cual implica una inhibición de su actividad antitumoral (izquierda). Si se bloquean los receptores A_{2a} con cafeína, o con un antagonista más potente y selectivo, los linfocitos T tendrían más capacidad antitumoral (derecha). (Tomado de Franco, 2008)

Sobre la base de estos antecedentes se han realizado estudios de desarrollo de tumores en modelos animales transgénicos. En ratones transgénicos que no expresan el receptor A_{2a} de adenosina pueden implantarse células de linfoma o de melanoma. En estos ratones se consigue un rechazo del 60% de los tumores, mientras que esto no ocurre en los ratones control que sí expresan el receptor de adenosina A_{2a} (Ohta *et al.*, 2006). Los antagonistas de los receptores de adenosina, incluida la cafeína, mejoran la inhibición del crecimiento tumoral por los linfocitos T, permiten una reducción de las metástasis y previenen la angiogenia tumoral (Figura 7). Todos los datos indican que los efectos que se producen al eliminar los receptores A_{2a} (en el animal transgénico) o al bloquear dichos receptores (con antagonistas como la cafeína) están mediados por los linfocitos T encargados de la respuesta antitumoral. Sobre la base de estos datos, Ohta *et al.*, 2006 proponen una estrategia de inmunoterapia del cáncer para prevenir la inhibición de los

linfocitos T antitumorales en el entorno del cáncer primario y de las metástasis. La base de este tratamiento sería el bloqueo selectivo de los receptores A_{2a} de los linfocitos T, lo que se puede conseguir mediante varias estrategias, la más inmediata de las cuales sería el uso de antagonistas. La cafeína es un antagonista de los receptores A_{2a} que tiene una potencia relativa, por lo que se plantea el desarrollo de análogos de la cafeína que sean más potentes. El antagonismo de receptores de adenosina por análogos de la cafeína se está proponiendo para el tratamiento no sólo del cáncer, sino también de una variedad de enfermedades. Varios de estos compuestos, desarrollados por 3 compañías farmacéuticas, se están ensayando ya en pacientes con enfermedad de Parkinson, con resultados sumamente prometedores. Es muy probable que en un par de años salgan al mercado farmacéutico los primeros bloqueadores de los receptores de adenosina. Mientras tanto los 3 antagonistas naturales de los receptores de la adenosina son la cafeína, la teofilina y la teobromina, que se encuentran en el café, el té y/o el cacao (Franco, 2008). Por otro lado el bloqueo específico de la señalización por medio de receptores de adenosina A_{2a} produce un aumento en la proliferación de linfocitos T y muestran que bajo estímulos inflamatorios, como los vistos por la activación de los linfocitos T las células estromales mesenquimales (CEM's) modulan los niveles de adenosina aunque no ha sido bien establecida la participación de los componentes relacionados para la señalización de la adenosina al promover la inmunomodulación por las CEM's, un mayor porcentaje de CEM's expresan CD39 y CD73 lo que resulta en un aumento de la producción de adenosina y confirma el papel inmunosupresor de la adenosina que deriva de CEM's (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011).

Células Estromales Mesenquimales

Las CEM's fueron inicialmente caracterizadas entre las décadas de los años 1960 y 1970 con los trabajos realizados por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea (MO) y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico hacia osteocitos, condrocitos y adipocitos (Beyer & Da Silva 2006; Gregory *et al.*, 2005). (Figura 8).

La médula ósea es la principal fuente de aislamiento de las CEM's 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).

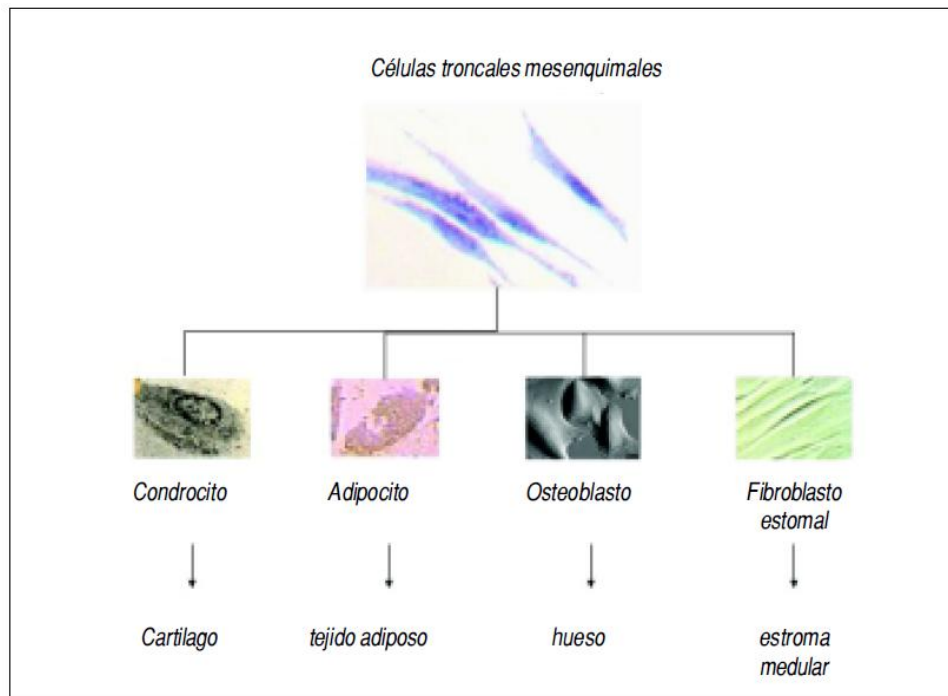


Figura 8. Diferenciación de células estromales mesenquimales de médula ósea en células de linaje mesodérmico: adipocitos, osteoblastos, condrocitos y fibroblastos estromales. (Tomado de Flores-Figueroa *et al.*, 2006).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células troncales mesenquimales; primero, adherencia en cultivo; segundo, expresión de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, capacidad de diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Páez *et al.*, 2007). Las CEM's expresan MHC I pero no expresan moléculas MHC II, B7-1, B7-2, CD40, o CD40L. Además, estas células secretan citocinas y moléculas reguladoras que juegan un papel importante en la proliferación y maduración de células troncales hematopoyéticas (Locatelli *et al.*, 2007; Aggarwal, Pittinger 2005).

Desde el punto de vista funcional, las CEM's se caracterizan por tener actividad inmunosupresora sobre células de la respuesta inmune, por lo cual son considerados como supresores universales (Uccelli *et al.*, 2007), debido a ello, actualmente son utilizadas en el trasplante alogénico de médula ósea para evitar el rechazo de injerto

contra huésped (Le Blanc *et al.*, 2006). Su uso clínico, presente y futuro, abarca enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros. (Flores-Figueroa *et al.*, 2006). (Figura 9).

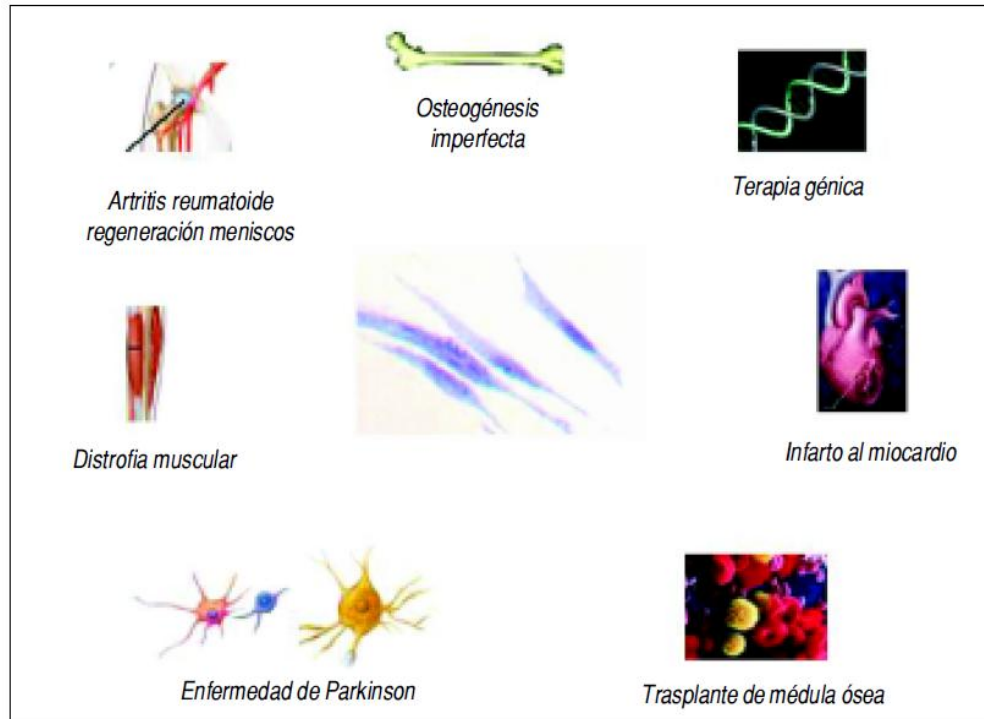


Figura 9. Esquema representativo de los diferentes usos en la clínica de las células estromales mesenquimales. (Tomado de Flores-Figueroa *et al.*, 2006).

Las CEM's son capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos T, aún bajo condiciones de estímulo ya sea en presencia de mitógenos, aloantígenos o anticuerpos tales como antiCD3 y antiCD28 (Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008). El efecto inmunosupresor mediado por las CEM's, se ha atribuido a factores como: la secreción de factores solubles antiproliferativos tal como el factor de crecimiento de hepatocitos, prostaglandina E2, factor de crecimiento transformante beta-1, indoleamina 2,3-dioxigenasa, óxido nítrico e interleucina-10 (Uccelli *et al.*, 2007, Aggarwal & Pittinger, 2005; Le Blanc *et al.*, 2006).

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- β pueden contribuir a la interacción de células estromales y células malignas en el microambiente tumoral (Turley *et al.*, 2008). También, se ha sugerido que elementos que conforman el ambiente estromal del tumor, como son: fibroblastos, vasos sanguíneos y células

inmunes, responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del mismo tumor, incluyendo soporte estructural, vasculatura y matriz extracelular (Albini *et al.*, 2007). A la fecha, no se sabe cuál es el origen de los componentes estromales, sin embargo una posibilidad es que se formen a partir de las CEM's. En algunos estudios se ha demostrado que las CEM's 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's migran hacia sitios de formación del tumor y se incorporan dentro del microambiente tumoral, se ha propuesto que las propiedades inmunosupresoras de las CEM's permiten la proliferación de las células del tumor y la estimulación de la formación de vasos sanguíneos (Zhu *et al.*, 2006). En un estudio reciente evaluaron los efectos de las CEM's de ratón sobre la supresión de la proliferación de células T, demostrando por primera vez que la generación de adenosina extracelular de ATP/ADP es un importante mecanismo implicado en la supresión de la proliferación de células T (Sattler *et al.*, 2011). Este efecto es mediado por el nuevo marcador de superficie CD39 de CEM's, el cual cataliza la producción de adenosina en conjunto con CD73 (Eltzschig *et al.*, 2003).

En CEM's con A_{2a} eliminado reduce significativamente CD73, la coordinada regulación de CD73 y $A_{2a}R$ sugiere que la compensación mediante esta vía requiere estas proteínas de superficie celular para incrementar la capacidad de generar una fuente de adenosina extracelular (Napieralski *et al.*, 2003). En otro estudio se demostró que CEM's de médula ósea en grandes números son reclutadas para la cicatrización de heridas en animales tratados con agonistas de $A_{2a}R$ (Montesinos *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006). La interacción y establecimiento de CEM's en tumores malignos ha sido mostrada inicialmente por Studeny *et al.*, 2002 en un modelo *in vivo* de ratones, al inyectar CEM's humanas marcadas con proteína verde fluorescente y mostrar su migración hacia tumores de melanoma implantados. Asimismo, Djouad *et al.*, 2003, mostró en un modelo de ratón alogénico, que el cotrasplante de CEM's con células de melanoma, favorece el implante y crecimiento del tumor. Otros autores como Karnoub *et al.*, 2007, han mostrado en un modelo de xenotrasplante, que cuando CEM's de médula ósea humana son mezcladas con células tumorales, se incrementa el potencial metastático de varias líneas celulares de cáncer de mama cuando son insertadas subcutáneamente en ratones. Estos fenómenos se han atribuido a las características inherentes de estas células estromales: a

sus propiedades inmunosupresoras y a su habilidad para migrar al sitio de la lesión vía secreción de quimiocinas por ejemplo CCL5/RANTES (Karnoub *et al.*, 2007). De manera interesante, se ha postulado que las CEM's participan en la generación de linfocitos T reguladores en los tumores, debido a que éstas se caracterizan por tener actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función de linfocitos Treg (Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008; Mandapathil *et al.*, 2010). Asimismo son importantes en el implante tumoral, la metástasis y supresión de la respuesta inmune en tumores malignos (Yen & Yen, 2008). 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).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La infección con VPH de alto riesgo, es el factor etiológico más importante en el desarrollo de cáncer cervical, anualmente 500,000 mujeres son diagnosticadas con infección por VPH y 300,000 mueren a causa de este cáncer siendo la segunda causa de mortalidad por cánceres en mujeres a nivel mundial (Dias *et al.*, 2005). La presencia del VPH en este tipo de cáncer genital, también se ha asociado con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por LTC; debido a la presencia de linfocitos Treg específicos de antígeno y su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007). Estas evidencias han sugerido que durante el desarrollo de la enfermedad se genera tolerancia inmunológica hacia el tumor, con la concomitante aparición de células inmunosupresoras. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos mediante los cuales éstas regulan e inhiben el reconocimiento inmune mediado por LTC.

Por otra parte se ha demostrado que las células neoplásicas se localizan inmersas en un microambiente celular denominado estroma tumoral, el cual está compuesto de fibroblastos, vasos sanguíneos y también de las células inmunes. Estos elementos estromales responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del tumor, incluyendo soporte estructural, vasculatura y matriz extracelular (Albini *et al.*, 2007). A la fecha, no se sabe cuál es el origen de los componentes estromales, sin embargo una posibilidad es que se formen a partir de las CEM's. De manera interesante, se ha postulado que las CEM's participan en la generación de Treg en los tumores, debido a que éstas se caracterizan por tener actividad inmunosupresora de la respuesta inmune y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función de Treg (Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008). Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar CEM's de tejidos normales (Montesinos *et al.*, 2009) de cuello uterino y de tumores avanzados de CaCu (Montesinos *et al.*, 2009). En estudios previos hemos encontrado que la presencia de CEM's, en cocultivos heterólogos con células mononucleares de sangre periférica favorece la inducción de poblaciones de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CTLA-4⁺, además de inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados con IL-2 y fitohemaglutinina (García, 2011). Tomando en consideración que las CEM's comparten varias características con las células T reguladoras respecto a su función inmunosupresora, el presente estudio tiene como finalidad analizar la actividad inmunosupresora de CEM's provenientes de tejidos

cervicales con CaCu, mediante la vía de la ectoenzima CD73, ya que esta molécula es expresada en ambos tipos celulares y se ha caracterizado que en Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ participa en la producción de adenosina, una molécula inhibitoria de la activación de LTC (Synnestvedt *et al.*, 2002; Deaglio *et al.*, 2007).

Los resultados de este estudio serán de gran importancia en conocimiento de la participación de las CEM's, en la regulación de la respuesta inmune específica, particularmente en el reconocimiento antigénico y consecuentemente en la eliminación de células blanco que expresen antígenos específicos. Lo cual será de gran relevancia para establecer estrategias inmunoterapéuticas que permitan revertir el estado de inmunosupresión que caracteriza al desarrollo del cáncer.

HIPÓTESIS

Durante el desarrollo del CaCu, disminuye la respuesta inmune celular hacia células infectadas por virus y células tumorales, con la consecuente aparición de poblaciones celulares inmunosupresoras tales como linfocitos Treg. Evidencias recientes muestran que un mecanismo de inmunosupresión ejercido por los linfocitos Treg es la vía adenosinérgica comprendida por las ectoenzimas CD39 y CD73 que degradan nucleótidos extracelulares a AMP y finalmente a adenosina, cuya función preponderante es la de inhibir la activación y función efectora de Linfocitos T citotóxicos (LTC). Asimismo se sabe que las células estromales mesenquimales (CEM's) que se encuentran distribuidas en varios tejidos, ejercen una función reguladora de la respuesta inmune, al suprimir la proliferación de LTC. Además una característica fenotípica de las CEM's es la de presentar la ectoenzima CD73 en su membrana celular. En consecuencia, se espera que las CEM's por medio de la vía CD73/adenosina, tengan una función inmunosupresora.

OBJETIVOS

Objetivo general

Análisis de la vía CD73/adenosina de células estromales mesenquimales derivadas de cáncer cérvico uterino (CEM's-CaCu) en la inhibición de la activación y de la función efectora de los linfocitos T citotóxicos.

Objetivos particulares

- 1.- Comprobar la actividad funcional de CD73 en las CEM's-CaCu mediante la conversión de AMP a Adenosina
- 2.- Analizar el efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu en la proliferación de Linfocitos T.
- 3.- Analizar el efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu en la activación de Linfocitos T.
- 4.- Evaluar el efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu en la función efectora de Linfocitos T citotóxicos.

MATERIALES Y METODOS

Células Estromales Mesenquimales

Se utilizaron Células Estromales Mesenquimales (CEM's) obtenidas de cáncer cérvico-uterino (CEM's-CaCu) establecida por nuestro grupo de trabajo. Tomando los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para definir a las células estromales mesenquimales multipotentes (Dominici *et al.*, 2006), las células presentaron las siguientes características: adherentes en condiciones estándar de cultivo; expresan los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecen de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79 α /CD19 y HLA-DR en la membrana celular; y finalmente han sido caracterizadas por su capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (García, 2011).

Las células fueron cultivadas en medio DMEM bajo en glucosa (DMEMbg) (del inglés, Ig-Dulbecco's Modified Eagle Media) suplementado con 15% de SFB (Gibco, USA) L-glutamina y una mezcla de antibióticos (Penicilina 100U/mL y Estreptomicina 100 μ g/mL).

Obtención de adenosina generada por CEM's-CaCu mediante la vía adenosinérgica del receptor CD73 a partir de AMP

Con la finalidad de evaluar la capacidad de las moléculas CD73, expresadas en CEM's de CaCu (CEM's-CaCu) para convertir monofosfato de adenosina (AMP) (Sigma Life science, USA) a adenosina (ADE-CEM's), $1 \cdot 10^6$ células viables de CEM's-CaCu, contadas con ayuda de un hemocitómetro y azul de tripano, fueron depositadas en una placa de 96 pozos de fondo U estériles (Corning costar, USA) en medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de sustituto de suero (Invitrogen USA), con una concentración final de 5mg/ml AMP en un volumen final de 200 μ l. Después de la adición del sustrato, las células fueron resuspendidas e inmediatamente se tomo una alícuota de 1 μ l (Tiempo cero) y las células fueron incubadas a 37°C, humedad saturante y 5% de CO₂. A partir de ese momento y en cada hora de incubación fueron tomadas muestras de 1 μ l de la suspensión celular. Todos los sobrenadantes de los cultivos fueron almacenados en tubos cónicos de plástico de 650 μ l (Corning costar, USA) a -20°C para ser usados en los siguientes experimentos.

Cromatografía en capa fina

La conversión de AMP a adenosina en el cultivo celular, fue identificada por la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) utilizando laminillas fluorescentes de poliéster conteniendo sílica gel (Sigma USA). Como estándares de cada una de las cromatografías de capa fina fueron empleadas soluciones de 5 mg de AMP (Sigma Life science, USA) y de adenosina 99% (ADE-SINT) (Sigma Life science, USA) las cuales fueron disueltas en 1 ml de DMEM con 10% de sustituto de suero y posteriormente filtradas. 1µl de cada uno de los estándares, así como de las alícuotas tomadas en los diferentes tiempos, fueron colocadas en las laminillas (3x8cm) de CCF y después de 30 minutos, las laminillas fueron colocadas verticalmente en una cámara de elución conteniendo 2ml de (fase móvil) compuesta por: isobutanol:alcohol isoamílico:etoxietanol:amoníaco:agua (9:6:18:9:15) por 1h y posteriormente las laminillas fueron secadas a temperatura ambiente. Los compuestos AMP y adenosina se visualizaron en un transiluminador con cámara con luz UV (UVP, USA).

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de voluntarios sanos colectadas en tubos vacutainer de 6 ml con anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa), (Becton Dickinson, USA) y centrifugadas a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El plasma sanguíneo (fase superior) fue colectado e inactivado a 56°C por 30 minutos y almacenado a -4°C, hasta su uso; el paquete celular fue resuspendido en SAF (solución amortiguadora de fosfatos) y llevado a un volumen total de 35ml. La mezcla de sangre y SAF fue depositada sobre 10ml de Histopaque (Sigma, USA) centrifugada durante 20 minutos a 1000rpm y 5 minutos más a 2000rpm. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) colectadas de la interfase, fueron lavadas dos veces con SAF, resuspendidas en medio de cultivo ISCOVE'S (IMDM, Sigma, USA) suplementado con 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomina, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 10mM de Hepes (pH 7.2), 50µM de β-mercaptoetanol y 10% de suero autólogo humano (SAH), se contaron las células para realizar los ensayos correspondientes.

Análisis del efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu en la proliferación de linfocitos T

Para analizar la actividad supresora de la adenosina derivada de CEM's-CaCu sobre la proliferación de Linfocitos T, se realizaron cultivos de CMSP con fitohemaglutinina (PHA) (Microlab, Mex.) (2.5 µg/ml) para inducir su proliferación, y diferentes concentraciones de sobrenadante del cultivo de CEM's con AMP (ADE-CEM's) y Adenosina sintética (ADE-SINT) a diferentes concentraciones. Por otro lado, con la finalidad de evaluar de manera simultánea el bloqueo del efecto inmunosupresor de la adenosina sobre la proliferación de linfocitos T, se adicionó cafeína (J.K. Baker, USA), un agente bloqueador de los receptores para adenosina en los linfocitos T. Se incluyeron cultivos de CMSP sin fitohemaglutinina como control negativo (Tabla 2).

	Condiciones	Concentración en µg/mL
1*10 ⁵ CMSP + PHA+	ADE-CEM's	100
		50
		25
		12.5
	ADE-SINT	100
		50
		25
		12.5
	ADE-CEM's + cafeína	100 + 100
		50 + 50
25 + 25		
12.5+12.5		
ADE-SINT + cafeína	100 + 100	
	50 + 50	
	25 + 25	
	12.5+12.5	
1*10 ⁵ CMSP	-PHA	

Tabla 2. Condiciones de cultivo de los linfocitos T.

Los cultivos se realizaron por triplicado conteniendo 100µl de medio de cultivo IMDM suplementado con 10% SAH en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning costar, USA), los cuales se mantuvieron en cultivo durante 96h.

Al término de 72h de cultivo, se agrego timidina tritiada (³H-T) (Dupont, USA) en proporción 1µCi en 20µl de medio IMDM suplementado con 10% de SAH por pozo durante 24h. La placa de 96 pozos fue almacenada a -70°C para detener la proliferación de los linfocitos. Las células fueron cosechadas con la ayuda de una cosechadora de células (marca Brandel modelo MH-12 USA) realizándose 10 lavados con agua destilada

para eliminar el exceso de timidina. Los núcleos celulares cosechados en papel filtro de fibra de vidrio (BRANDEL, USA) se dejaron secar a temperatura ambiente antes de adicionarlos a viales Mini poly-Q (Beckman, USA) que contenían 2 ml de líquido de centelleo (Beckman Counter, USA). Cada uno de los viales fue analizado en un contador automático (Beckman modelo LS 6,500 USA).

Análisis de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu sobre la activación de linfocitos T

Para analizar la influencia de la adenosina sobre la activación de los linfocitos T, se obtuvieron CMSP y se cultivaron en una placa de 24 pozos (Corning costar, USA) con 1ml de medio de cultivo IMDM + 10% de SAH y se estimularon con perlas conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28 (Invitrogen, USA) en proporción 1:10 (perlas:Linfocitos T), éstos fueron incubados a 37°C, en humedad saturante y 5% de CO₂ durante 72h bajo las condiciones indicadas en la Tabla 3:

	Condiciones	Concentración en µg/mL
1*10 ⁶ CMSP + CD3/CD28+	ADE-CEM's	50
	ADE-CEM's + cafeína	50 + 50
	Cafeína	50
	ADE-SINT	50
	ADE-SINT + cafeína	50 + 50
	1*10 ⁶ CMSP	-CD3/CD28

Tabla 3. Condiciones de cultivo para linfocitos T

Después de este tiempo se recuperaron de la placa de cultivo las células con el medio de cultivo de cada condición y se dividieron en 2 placas de 96 pozos fondo U (Corning costar, USA).

En la primera placa, en un volumen de 100 µl por pozo de cada una de las muestras, se agregaron 20 µl de brefeldin A (Sigma, USA) y se dejó incubar 4h a 37°C. Posteriormente se realizó un lavado con SAF + 2% SFB, se agregaron 100 µl de citofix citoperm (Beckton

Dickinson, USA) y se dejó reposando 20min en hielo y en oscuridad. Se realizó un lavado con 100 µl de perm wash (Beckton Dickinson, USA) y acto seguido se agregó 50 µl de perm wash mas 1 µl de anticuerpo contra CD8+ APC y 1 µl de anticuerpo contra IFN-γ (R&D Systems, MN) que es producido intracelularmente en las células T activadas, fue agregado a cada pozo, se dejaron reposar durante 30 min en oscuridad en hielo. Después de este tiempo, se realizó un lavado con 100 µl de perm wash y otro lavado con 100 µl de SAF + 2% SFB, se centrifugó y agregó 200 µl de SAF + 2% SFB y 200 µl de paraformaldehído al 4%, para finalmente analizarlo por citometría de flujo.

En la segunda placa de 96 pozos de fondo U conteniendo el mismo volumen de medio y células que la primera placa, se realizó un lavado con 100 µl SAF + 2% SFB, en seguida se agregó 50 µl SAF+SFB 2% más 1 µl de anticuerpo contra CD8+ APC (R&D Systems, MN) y CD69+ FITC (Isotiocianato de Fluoresceína Conjugado), (Invitrogen, USA) que reconoce el antígeno CD69 humano que es expresado de forma transitoria en los leucocitos activados, incluyendo las células T, timocitos, células B, células NK, neutrófilos y eosinófilos. Se emplearon 3 muestras control y a cada pozo se agregó 1µl de anticuerpo contra CD8+ FITC ya que este reconoce el antígeno CD8 presente en las células T citotóxicas (CD3+CD8+), CD8+ APC respectivamente y la última las células solas como control de autofluorescencia. Se dejó reposar durante 20 min en oscuridad en hielo, se realizaron 2 lavados con SAF + 2% SFB y se agregaron 200 µl de SAF+ 2% SFB, se fijaron las células con 200 µl de paraformaldehído al 4% y se analizaron por citometría de flujo.

Células T2 cargadas con péptido de citomegalovirus

Como célula blanco presentadora de antígeno, se utilizó la línea linfoblástica denominada T2 (Hosken & Bevan, 1990), la cual expresa moléculas vacías HLA-A*0201 en membrana celular, y fue restablecida con el péptido antigénico NLVPMVATV derivado de la proteína PP65 de citomegalovirus humano específico a la molécula HLA-A*0201 (Proimmune, U.K). Brevemente, por cada millón de células T2, se adicionó una concentración de 20 µg/ml de péptido NLVPMVATV de citomegalovirus en un volumen de 100 µl de RPMI-1640 suplementado con 2mM de glutamina, 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Invitrogen, USA), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato de sodio, 20 MM de Hepes, 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, USA) y 15% de SAH, se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Después de

transcurrido el tiempo se agregó 1 ml de glutaraldehído (Sigma, USA) al 0.1% y se dejó incubar 30 minutos protegido de la luz y finalmente se realizaron cuatro lavados.

Generación de linfocitos T citotóxicos específicos

Se obtuvieron CMSP como se mencionó anteriormente, después se sembraron en una caja Petri de 5ml (Corning costar, USA) con medio de cultivo IMDM + 10% de SAH, e incubadas a 37°C, humedad saturante y 5% de CO₂ durante 1h, pasado este tiempo fueron retiradas las células no adherentes y se realizaron tres lavados con SAF. A las células adheridas se les adicionó 2ml de IMDM + 10% de SAH, 20ng/ml de IL-4 (R&D Systems, MN) y 30ng de GM-CSF (R&D Systems, MN) con la finalidad de generar células dendríticas (CD). A los 5 días de cultivo de las CD se adicionó 10µg de péptido (NLVPMVATV) de citomegalovirus (CMV) por cada ml de medio y 1h después se agregó 20µg/ml de poli I:C (Sigma, USA). Dos días después se realizó un cocultivo de las CD pulsadas con el péptido CMV y CMSP, para ello se añadió 5 veces más péptido de CMV, 20ng/ml de IL-2 (R&D Systems, MN) y 15ng/ml de IL-7 (R&D Systems, MN) para expandir la población de linfocitos T específicas al péptido CMV. Siete días después se procedió a separar la población de LT CD8⁺; para lo cual se colectaron todos los linfocitos y se contaron, enseguida se añadió 1ml de SAF por cada 5*10⁷ de linfocitos T en un tubo estéril de poliestireno de 5ml (Becton Dickinson, USA). Posteriormente se agregó 50µl/ml del cocktail para enriquecimiento de células T CD8⁺ por selección negativa Easysep (StemCell Technologies, USA), se resuspendieron y se incubaron durante 10min a temperatura ambiente. En seguida se agregó 50µl/ml de nano partículas magnéticas Easysep (StemCell Technologies, USA), se resuspendieron e incubaron nuevamente 10min a temperatura ambiente. A continuación se adicionó 1500 µl de SAF y se resuspendió 3 veces ligeramente, después se colocó el tubo sin tapa dentro del magneto (StemCell Technologies, USA) por 5min y pasado este tiempo se vació el contenido en un tubo nuevo de 15ml (Corning costar, USA), se centrifugaron y contaron para finalmente evaluar su especificidad en el reconocimiento de su péptido blanco.

La evaluación de la especificidad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ hacia el péptido antigénico de CMV, se realizó mediante un reto contra células blanco T2 previamente pulsadas con el péptido de citomegalovirus en una proporción 20:1 y después de 4h de cocultivo se determinó su especificidad por medio del marcaje celular con los anticuerpos antiCD107 (LAMP-1) el cual es un marcador de degranulación de las células T citotóxicas

CD8⁺ y CD8 APC(Aloficocianina) (R&D Systems, MN), después fue analizado por citometría de flujo en el equipo FACS ARIA (BD-USA).

Efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu sobre la actividad citotóxica de LTC

Las células T CD8⁺ obtenidas anteriormente se cultivaron durante 24h en medio IMDM + 10% SAH en placas de 6 pozos (Corning costar, USA) de acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla No. 4.

	Condiciones	Concentración en $\mu\text{g/mL}$
2.5*10 ⁶ LTC +	ADE-CEM's	50
	ADE-CEM's + cafeína	50 + 50
	Cafeína	50
	ADE-SINT	50
	ADE-SINT + cafeína	50 + 50
	2.5*10 ⁶ LTC	

Tabla 4. Condiciones de cultivo de los linfocitos T CD8⁺.

Después de las 24h de cultivo los linfocitos T citotóxicos, fueron colectados y utilizados como células efectoras y su actividad citotóxica fue evaluada contra células blanco consistentes de células T2 (HLA-A*0201+) pulsadas como anteriormente se mencionó, con 20 $\mu\text{g/ml}$ del péptido antigénico NLVPMVATV (citomegalovirus) y los péptidos irrelevantes GILGFVFTL (Influenza) (Invitrogen, USA) e YMLDLQPETT (VPH) (Invitrogen, USA), que restablecen las moléculas vacías HLA-A*0201 en esta línea celular. La citotoxicidad fue evaluada en cocultivos de células efectoras: células blanco en las proporciones de 20:1 en una placa de 96 pozos con 200 μl de medio IMDM + 10% de SAH. Enseguida fueron adicionados directamente 10 μl de anticuerpo CD107 (LAMP-1) el cual es un marcador de degranulación de las células T citotóxicas CD8⁺ (R&D Systems, MN). Las células fueron incubadas por 1h a 37°C, en humedad saturante y 5% de CO₂, después de este tiempo fue añadido 25 μl /pozo de monensina (GolgiStop) (BD

biosciences, USA) la cual estimula a las células linfoides a detener su proceso de transporte de proteínas intracelulares e incubadas 3h más a 37°C en humedad saturante y 5% de CO₂.

Después de este tiempo se realizaron 2 lavados con 100 µL SAF + SFB 2%, en seguida se agregaron 50 µl SAF+SFB 2% mas 1 µl de anticuerpo contra CD8+ APC (Alofocianina) (R&D Systems, MN). Se emplearon 3 muestras control en donde a cada pozo se agrego 1µl de anticuerpo contra CD8+ FITC, CD8+ APC respectivamente y la ultima las células solas. Se dejó reposar durante 20 min en oscuridad en hielo y después se realizaron 2 lavados con SAF + 2% SFB. Se agregaron 200µl de SAF + 2% SFB, se fijaron las células con 200 µl de paraformaldehído al 4% y se analizó por citometría de flujo.

Análisis estadístico

La prueba de rango múltiple de Dunnett fue empleada para hacer la comparación entre los datos del efecto de la vía CD73/adenosina de CEM's-CaCu en la proliferación de linfocitos T entre las distintas condiciones de cultivo y el grupo control. La significancia fue determinada como $P < 0.05$.

RESULTADOS

Las CEM's-CaCu generan adenosina a partir de AMP

Con el propósito de evaluar la capacidad de las moléculas CD73 expresadas en CEM's-CaCu para convertir monofosfato de adenosina (AMP) a adenosina (ADE-CEM's), $1 \cdot 10^6$ CEM's-CaCu fueron cultivadas con 5 mg/ml de AMP y posteriormente la actividad enzimática fue analizada por la técnica de cromatografía en capa fina y revelada mediante luz UV. Observamos que las CEM's-CaCu mostraron actividad enzimática inmediatamente después de adicionar el sustrato (AMP) ya que al tomar la muestra al tiempo cero (T_0) se detectó la presencia de adenosina generada por estas células (ADE-CEM's) (Figura 10-A), y después de 1h de cultivo las CEM's-CaCu hidrolizaron completamente el AMP (Figura 10-B). Además de observar una banda que eluyó a la altura de la adenosina sintética se observó un subproducto que corrió en la parte inferior de la ADE-CEM's.

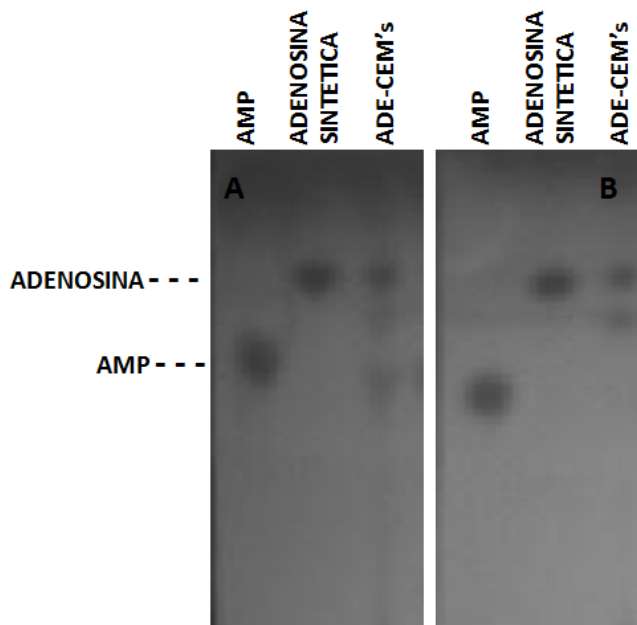


Figura 10. Las CEM's-CaCu generan adenosina a partir de AMP. $1 \cdot 10^6$ CEM's-CaCu fueron cultivadas con una concentración de 5mg/ml de AMP, al tiempo 0 el sobrenadante de las CEM's (ADE-CEM's) mostró la producción de adenosina de una manera parcial ya que aún se puede observar la presencia del AMP(A), después de 1h el ADE-CEM's presentó la producción de adenosina completamente (B).

La adenosina generada por las CEM's-CaCu inhibió la proliferación de Linfocitos T

Una vez que se comprobó que los cultivos primarios de las CEM's-CaCu hidrolizaron AMP para convertirlo a adenosina, el sobrenadante de estos cultivos fue utilizado en los siguientes experimentos para evaluar su efecto sobre la proliferación de los linfocitos T. Para ello se procedió a cultivar CMSP con el mitógeno fitohemaglutinina en presencia de diferentes diluciones del sobrenadante ADE-CEM's (1:10, 1:20, 1:40 y 1:80) equivalente a 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de adenosina sintética respectivamente; además de 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de adenosina sintética. Asimismo, en los cultivos se adicionó cafeína (100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$), un antagonista de los receptores de adenosina. Los resultados muestran que la ADE-CEM's inhibió el estímulo de la fitohemaglutinina en la proliferación de los linfocitos T de una manera dependiente de la dosis (Figura 11). La mayor inhibición de la proliferación de los linfocitos T se observó cuando las células fueron cultivadas con la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ del sobrenadante ADE-CEM's y con la concentración de 100 μg de adenosina sintética; el sobrenadante de ADE-CEM's disminuyó a 16,086cpm (cuentas por minuto) (49%) mientras que la ADE-SINT disminuyó a 12,587cpm (61%) la proliferación de linfocitos T. Cuando se adicionó cafeína en estos cultivos se observó un ligero restablecimiento de la proliferación de linfocitos T en presencia de la adenosina en bajas concentraciones y provenía de ADE-CEM's (Figura 11).

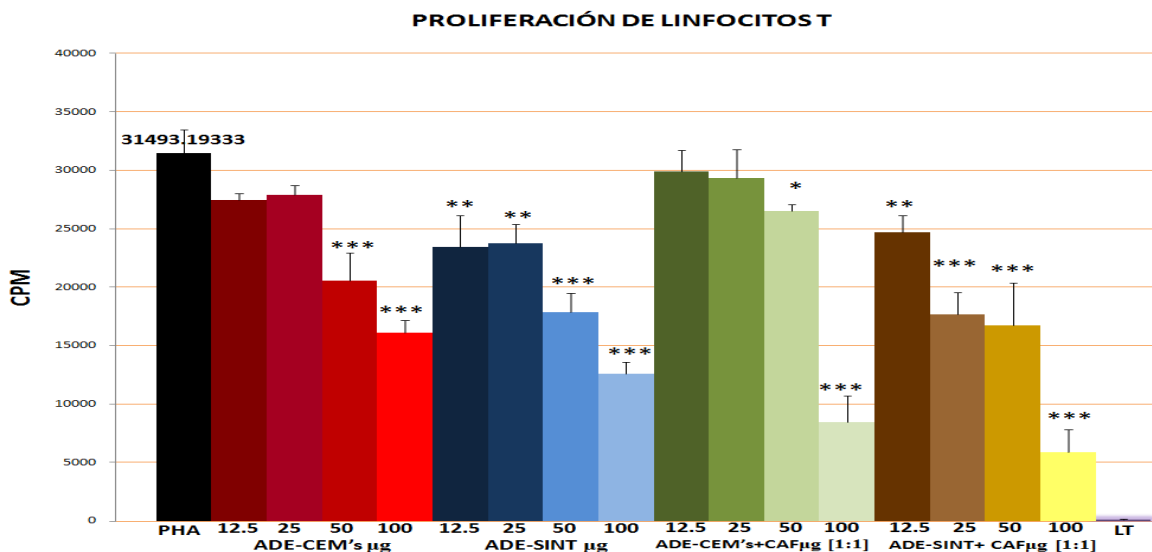


Figura 11. Proliferación de linfocitos T por ADE-CEM's y ADE-SINT. $1 \cdot 10^5$ linfocitos T fueron cultivados durante 96h con PHA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante ADE-CEM's (100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$) y de diferentes concentraciones de adenosina sintética (100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$) en ausencia y presencia de cafeína (100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$). La proliferación de los linfocitos T fue evaluada por la incorporación de timidina tritjada $^3\text{H-T}$. Diferencia significativa (*** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$).

La adenosina generada por CEM's-CaCu no inhibe la activación temprana de linfocitos T

La estimulación antigénica o mitogénica de los linfocitos T rápidamente induce la regulación positiva de marcadores de activación como CD69 y la síntesis de algunas proteínas como el IFN- γ (Sancho *et al.*, 2005; Schreiber *et al.*, 1992). Para analizar los efectos inmunosupresores de la adenosina generada por las CEM's-CaCu sobre la activación temprana de los linfocitos T, se cultivaron CMSP estimuladas con perlas conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28 en presencia de 50 μ g adenosina sintética y una concentración de 50 μ g de ADE-CEM's en presencia y ausencia de cafeína (50 μ g). Se tomo la concentración de 50 μ g de ADE-CEM's para evaluar los siguientes ensayos ya que en esta concentración además de inhibir la proliferación, su antagonista la cafeína no elimina a las células T, ya que en pruebas de viabilidad con azul tripano la cafeína en una concentración de 100 μ g o mayor a ésta disminuye la viabilidad de las células T hasta en un 80% (datos no mostrados). El porcentaje de células CD8⁺CD69⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺ fue evaluado mediante citometría de flujo a las 72h (Figuras 12, 14).

El porcentaje encontrado de las células positivas para CD8⁺CD69⁺ fue muy similar entre los linfocitos T estimulados con las perlas anti-CD3/CD28 con respecto a aquellos en los cuales se adicionó ADE-CEM's (50 μ g/ml) y ADE-SINT (50 μ g/ml), 26.20%, 25.74%, 25.66% respectivamente (Figura 12). En estos cultivos, la adición de cafeína no modificó el porcentaje de células positivas para CD8⁺CD69⁺, en los cultivos con ADE-CEM's y ADE-SINT, encontrándose los valores de 24.65% y 22.74% respectivamente (Figura 12). En la (Figura 13) se muestra de una manera comparativa los porcentajes de las células T CD8⁺CD69⁺.

Por otra parte, al evaluar el efecto de ADE-CEM's y ADE-SINT en la generación de IFN- γ por los linfocitos T CD8⁺ estimulados con anti-CD3/CD28 (CD8⁺IFN- γ ⁺), se encontró que la adición de ADE-CEM's (50 μ g/ml) disminuyó en un 11% la cantidad de células CD8⁺IFN- γ ⁺ respecto al control positivo, mientras que la adición de ADE-SINT (50 μ g/ml) disminuyó en un 30% la población de linfocitos CD8⁺IFN- γ ⁺ (Figura 15). Por otro lado, la adición de cafeína en los cultivos con ADE-CEM's y ADE-SINT, no incremento el porcentaje de células positivas para CD8⁺IFN- γ ⁺, encontrándose incluso una mayor disminución en el porcentaje de las mismas (20 y 33% respectivamente) (Figura 15). En consecuencia, los

mecanismos inhibitorios de la adenosina generada por CEM's pueden afectar la activación de linfocitos T en la generación de IFN- γ .

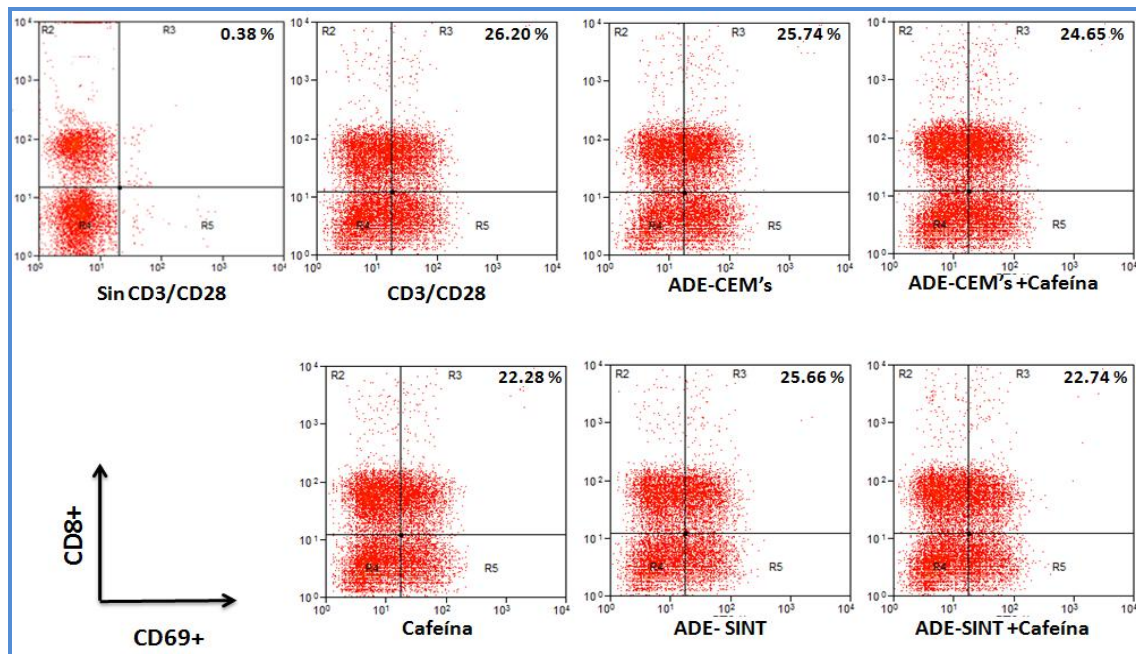


Figura 12. El marcador de activación CD69 es expresado en linfocitos T sin ser afectado por la adenosina. 2×10^5 células T fueron estimuladas con CD3/CD28 e incubadas con ADE-CEM's (50 $\mu\text{g/ml}$) y ADE-SINT (50 $\mu\text{g/ml}$) y en presencia y ausencia de cafeína (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 72h. Es un resultado representativo de tres diferentes experimentos.

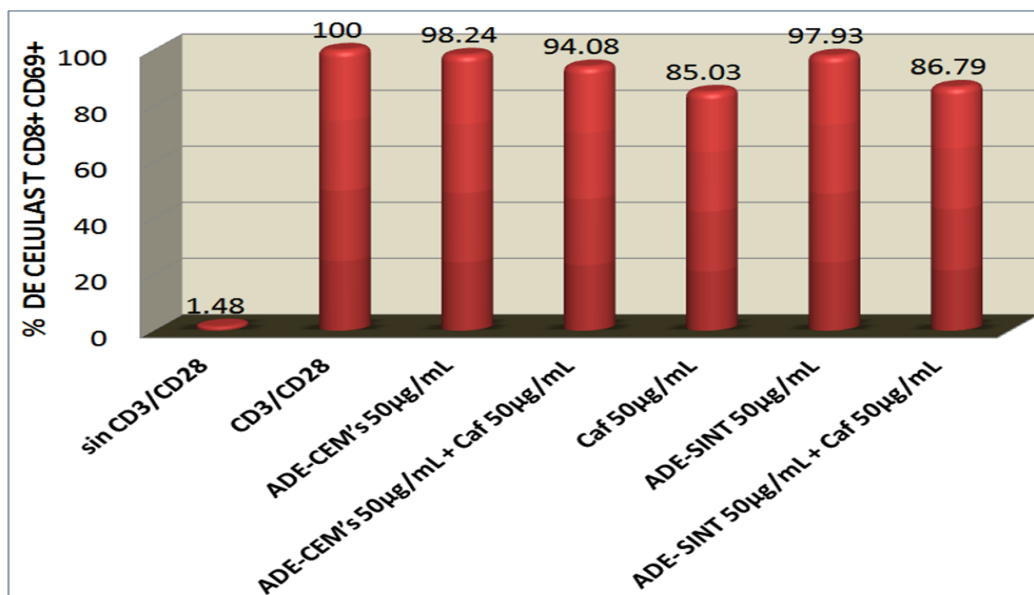


Figura 13. La adenosina generada por las CEM's no afecta la activación temprana de las células T CD8 $^+$. La adenosina generada por las CEM's y la adenosina sintética fue adicionada a las células T durante 72h, la expresión en los niveles de la superficie celular de CD69 $^+$ no se vieron modificados.

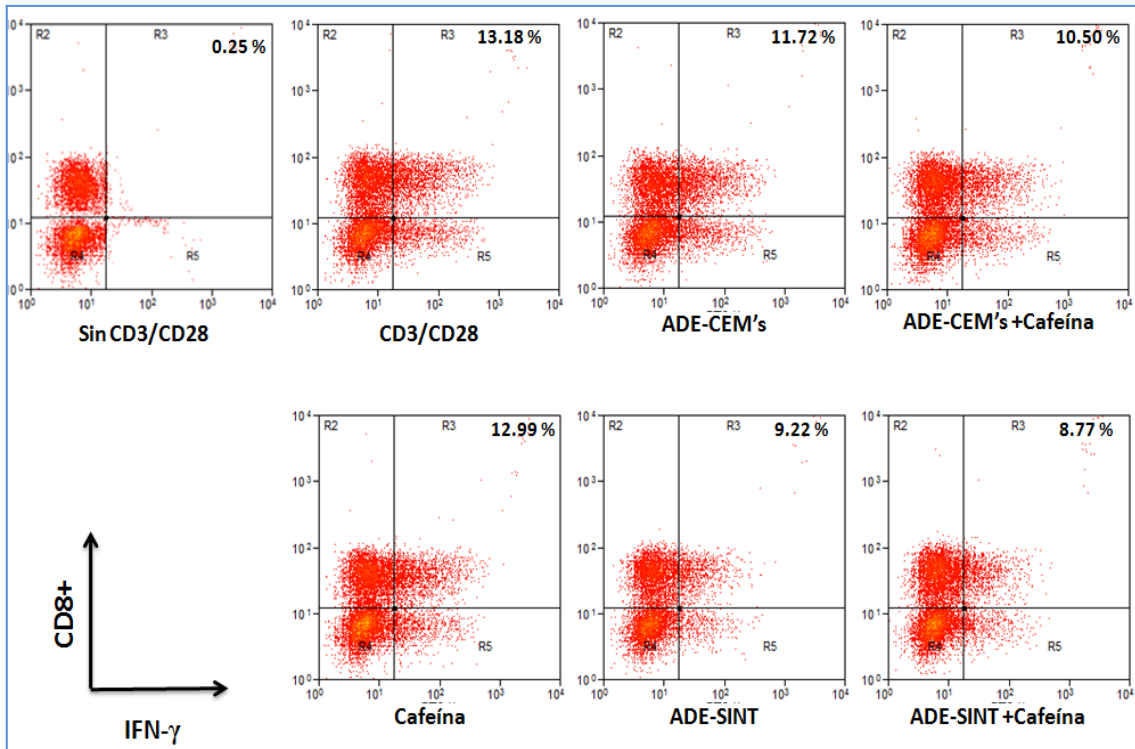


Figura 14. La adenosina generada por las CEM's inhibe sutilmente la producción de IFN- γ en las células T CD8⁺. 2.5×10^5 células T fueron estimuladas con CD3/CD28 e incubadas con ADE-CEM's (50 μ g/ml) y ADE-SINT (50 μ g/ml) y en presencia y ausencia de cafeína (50 μ g/ml) durante 72hrs. Es un resultado representativo de tres diferentes experimentos.

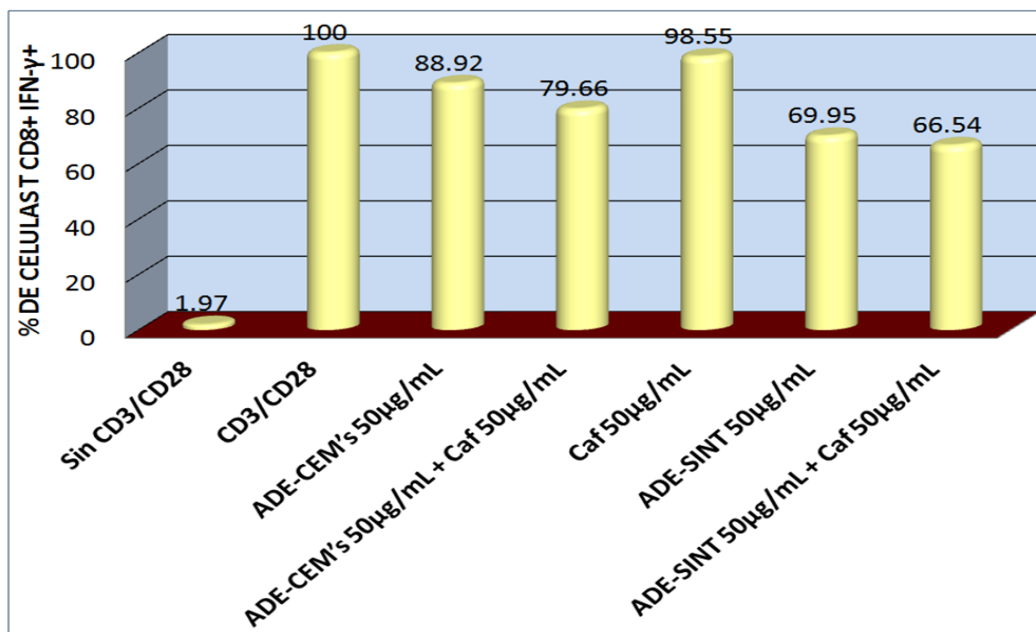


Figura 15. La adenosina inhibe sutilmente el porcentaje de linfocitos T CD8⁺IFN- γ . 2.5×10^5 células T fueron estimuladas con CD3/CD28 e incubadas con ADE-CEM's (50 μ g/ml) y ADE-SINT (50 μ g/ml) y en presencia y ausencia de cafeína (50 μ g/ml) durante 72h. Es un resultado representativo de tres diferentes experimentos.

La adenosina generada por CEM's-CaCu no afecta la función efectora citotóxica de células T CD8⁺ positivas

Para evaluar el efecto de la ADE-CEM's sobre la citotoxicidad de los linfocitos T, primero fue necesario generar linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos y evaluar su especificidad mediante un ensayo de actividad citotóxica para la eliminación de células blanco (Figura 16). Como se puede apreciar los linfocitos T CD8⁺ específicos al péptido de NLVPMVATV de CMV lisaron a las células T2 cargadas con el péptido NLVPMVATV.

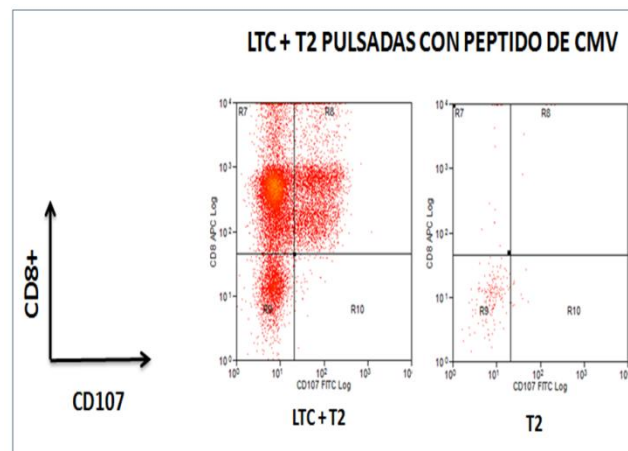


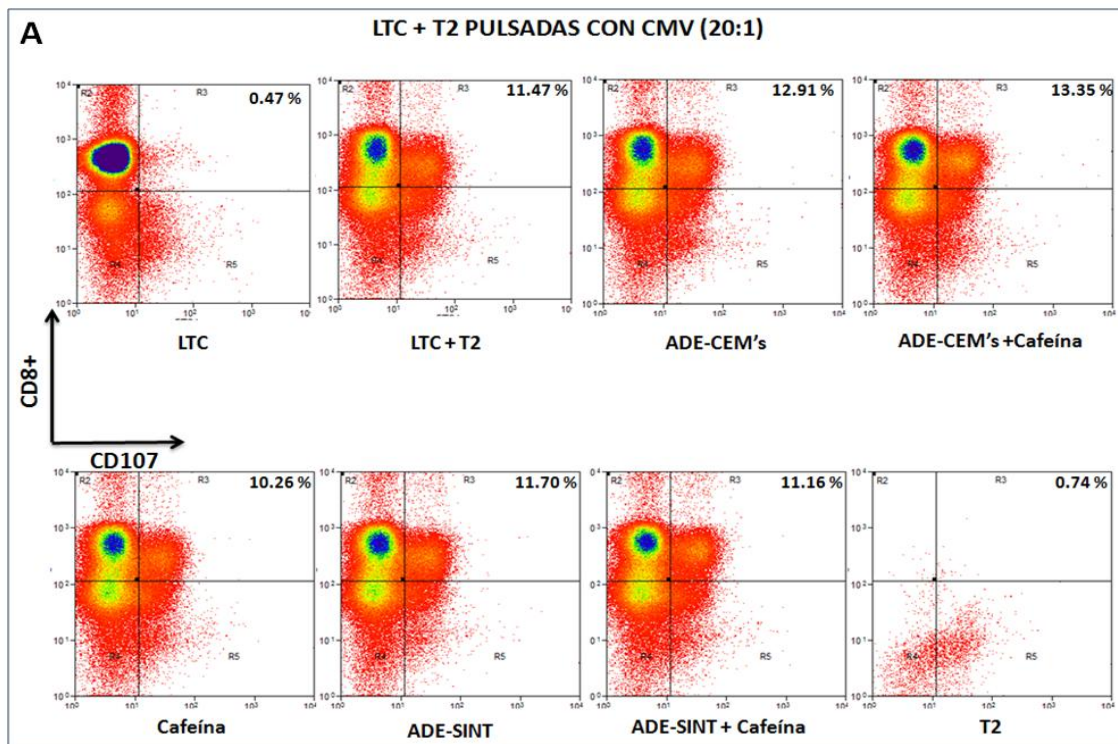
Figura 16. Los LTC muestran especificidad al ser retados contra células T2 pulsadas con el péptido NLVPMVATV de citomegalovirus. 2.5×10^5 LTC positivos para el péptido de CMV fueron co-cultivados durante cuatro horas con células T2 pulsadas con péptido antigénico de CMV en una proporción de 20:1. Los plots de densidad de citometría de flujo muestran la tinción para las células dobles positivas a CD107 FITC cuando fueron retadas con las células blanco T2 pulsadas con citomegalovirus. Este es un resultado representativo de tres diferentes experimentos.

Las células T específicas al péptido antigénico NLVPMVATV (citomegalovirus) (CMV) fueron expandidas en presencia de tres rondas de células presentadoras de antígeno con CMV, posteriormente fueron cultivadas con ADE-CEM's, ADE-SINT y en presencia y ausencia de cafeína.

Para los ensayos de citotoxicidad, fueron pulsadas células T2 con péptido de citomegalovirus, influenza y virus de papiloma humano respectivamente y se utilizaron como células blanco. Las células T específicas al péptido de CMV (células efectoras) con los diferentes tratamientos y las células T2 pulsadas con cada uno de los diferentes péptidos antes mencionados (células blanco) fueron mezcladas en proporción de 20:1. Los resultados muestran que la citotoxicidad de las células T específicas al péptido antigénico de CMV para lisar sus células blanco (T2) pulsadas con CMV no se vieron

afectadas por la presencia de ADE-CEM's y ADE-SINT (Figura 17A). Como se puede observar el porcentaje de células positivas para $CD8^+CD107^+$ fue muy similar entre los linfocitos T citotóxicos específicos al péptido de CMV sin ningún tratamiento y los linfocitos T citotóxicos que fueron cultivados con ADE-CEM's y ADE-SINT con un 11.47%, 12.91% y 11.70% respectivamente. Igualmente la adición de cafeína no modificó el porcentaje de células positivas para $CD8^+CD107^+$, en los cultivos con ADE-CEM's y ADE-SINT, encontrándose los valores de 13.35% y 11.16% respectivamente (Figura 17A).

Por otro lado al retar los LTC $CD8^+$ en cocultivo con las células T2 pulsadas con el péptido de influenza y VPH, prácticamente no hubo citotoxicidad o degranulación: 0.55-0.86% y 0.55-0.97% respectivamente (Figura 17B y 17C), por consiguiente, estos resultados también demuestran el reconocimiento específico de los linfocitos T $CD8^+$ al péptido antigénico de CMV (Figura 18).



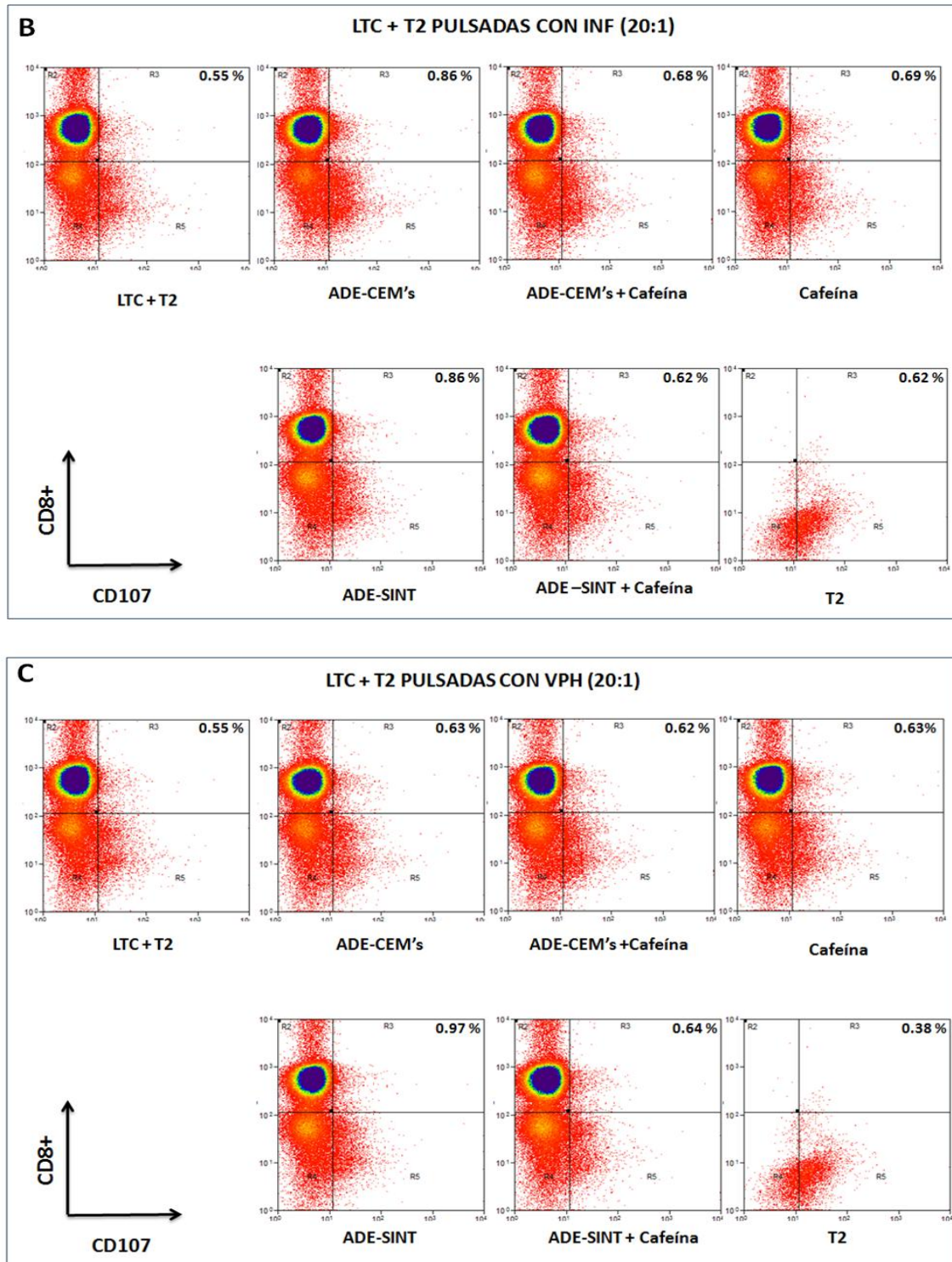


Figura 17. La función efectora de los linfocitos T $CD8^+$ no se ve afectada por la adición de adenosina. ($2.5 \cdot 10^5$) LTC después de la estimulación de tres rondas con CPA y su péptido antigénico de CMV fueron cultivadas con ADE-CEM's y ADE-SINT y posteriormente marcadas con anticuerpos CD107 FITC, CD8 APC y retadas contra células T2 ($1.25 \cdot 10^4$) pulsadas con el péptido de citomegalovirus (A), influenza (B) y VPH (C). Correlación entre la expresión de CD107 y la actividad citotóxica. CD107 es expresado por células T $CD8^+$ específicas aun antigénico.

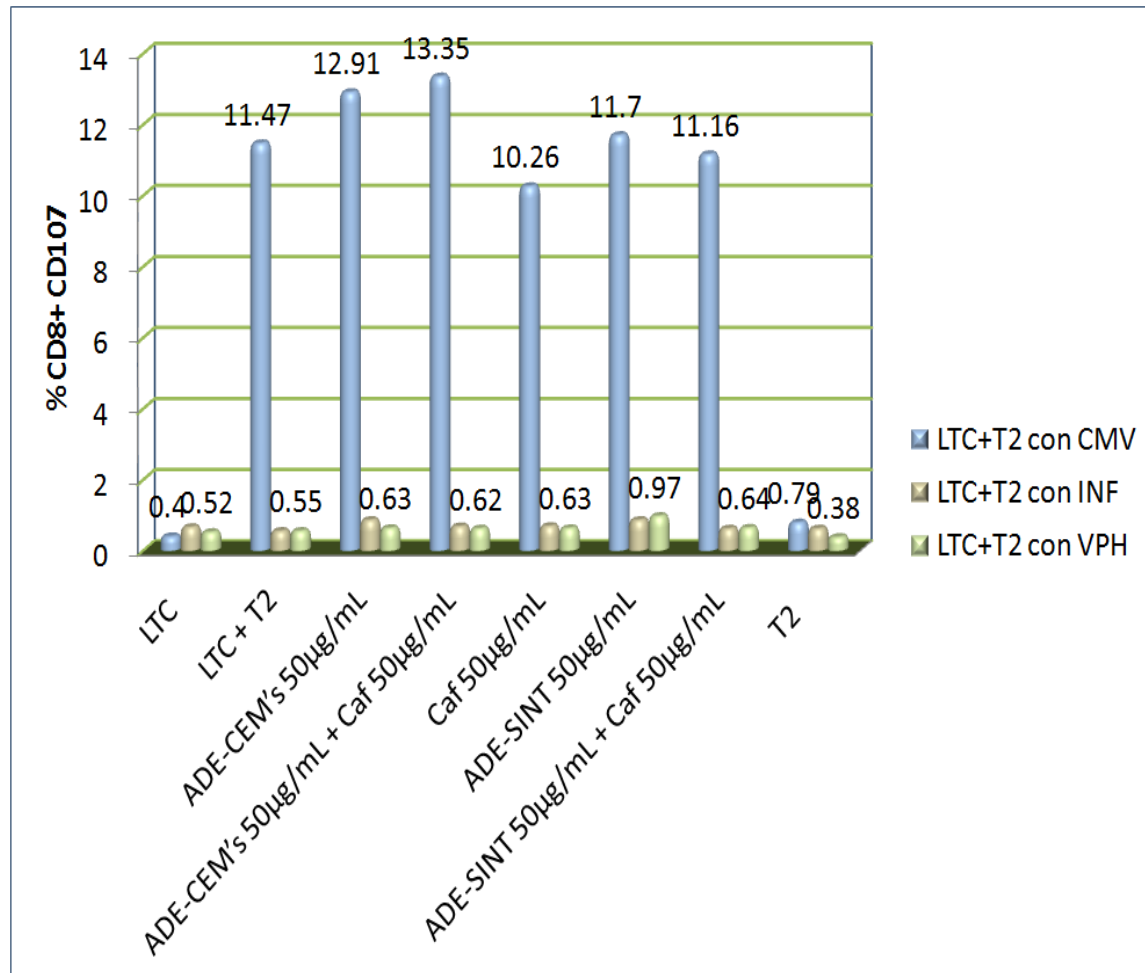


Figura 18. Porcentaje de expresión de células $CD8^+CD107^+$ como índice de la actividad efectora citotóxica en la producción de degranulación. (2.5×10^5) LTC después de la estimulación de tres rondas con CPA y su péptido antigénico de CMV fueron cultivadas con ADE-CEM's y ADE-SINT y posteriormente marcadas con anticuerpos CD107 FITC, CD8 APC y retadas contra células T2 (1.25×10^4) pulsadas con el péptido de CMV, INF y VPH.

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En los últimos años se han descrito varias funciones biológicas de las células estromales mesenquimales (CEM's), destacando su papel relevante en el restablecimiento y regeneración de tejidos además de su papel en la modulación de la respuesta inmune durante el trasplante de órganos (Hass *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2010; Bang *et al.*, 2005; Karussis *et al.*, 2008; Timper *et al.*, 2008; Zuk, 2010; García-Olmo *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2007; Lendeckel *et al.*, 2004; Gates *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010).

No obstante, se ha encontrado que estas células tienen varios efectos adversos, especialmente en el contexto de su participación directa e indirecta en el desarrollo del cáncer (Li *et al.*, 2011; Ramasamy *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2010; Lazennec & Jorgensen, 2008; Karnoub *et al.*, 2007; Le Blanc *et al.*, 2005; Shinagawa *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2006; Takeuchi *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2008, Rodriguez *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006, Tolar *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2008; Spaeth *et al.*, 2009; Reiser *et al.*, 2005).

Esto ha conducido a un constante debate del papel de las CEM's en la modulación tumoral; algunos estudios han propuesto que las CEM's pueden suprimir el crecimiento tumoral (Ohlsson *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010), mientras que otros proponen que las CEM's pueden contribuir al crecimiento tumoral, favoreciendo: la angiogénesis, metástasis, resistencia a las drogas por las células tumorales y la supresión de la respuesta inmune antitumoral (Ramasamy *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2010; Konopleva *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Kucerova *et al.*, 2010; Karnoub *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2006; Kurtova *et al.*, 2009; Vianello *et al.*, 2010).

La inmunosupresión mediada por las CEM's requiere su activación previa por células inmunes en particular, la secreción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ con TNF, IL-1 α o IL-1 β (Groh *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2008). Aunque las interacciones célula-célula pueden ser importantes, la inducción de la inmunosupresión mediada por las CEM's ha sido mostrada en gran medida por moléculas solubles comoIDO (Spaggiari *et al.*, 2008; Noël *et al.*, 2007; Gieseke, *et al.*, 2007), óxido nítrico (NO del inglés *nitric oxide*) (Sato *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008), PGE2 (Djouad *et al.*, 2007; Jarvinen *et al.*, 2008) TGF- β 1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF del inglés

hepatocyte growth factor), hemo oxigenasa-1 (HO-1 del inglés heme oxygenase 1), IL-6, factor inhibidor de leucemia (LIF del inglés leukemia inhibitory factor), HLA-G5 (Djouad *et al.*, 2007; Rasmusson, 2006; Chabannes *et al.*, 2007; Nasef *et al.*, 2008; Selmani *et al.*, 2008) y adenosina extracelular regulada por la 5'-ectonucleotidasa (CD73) que limita la inmunidad antitumoral de las células T al promover el crecimiento tumoral por medio de su actividad enzimática en conjunto con CD39 (ecto-ATPasa) (Zhang *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010; Sattler *et al.*, 2011; Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

En el presente estudio se utilizaron CEM's obtenidas de tejido tumoral de cáncer cérvico-uterino (CEM's-CaCu) y se evaluó su actividad inmunosupresora sobre linfocitos T citotóxicos mediante la vía adenosinérgica. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que: a) las CEM's-CaCu son capaces de generar adenosina (agente inmunosupresor) a partir de monofosfato de adenosina (AMP); b) la proliferación de las células T fue reducida en una manera dependiente de la dosis de la adenosina generada por las CEM's-CaCu; c) la adenosina generada por las CEM's no modificó la expresión del marcador de activación temprana (CD69), pero sí, disminuyó de manera sutil el número de linfocitos T CD8⁺ que produjeron IFN- γ durante la activación; y d) la capacidad efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos no fue afectada por la presencia de la adenosina generada por las CEM's-CaCu.

Existe evidencia experimental de que las CEM's migran hacia sitios de formación del tumor y se incorporan dentro del microambiente tumoral, se ha propuesto que las propiedades inmunosupresoras de las CEM's inducen la proliferación de células tumorales y la estimulación de la formación de vasos sanguíneos (Zhu *et al.*, 2006). Se ha reportado que la expresión de la molécula CD73 es mayor en la membrana de las células tumorales y además acompañada de una alta actividad funcional y consecuentemente una mayor producción de adenosina extracelular (Zhang, 2010). Tanto la expresión como la actividad funcional de CD73 ha sido evaluada en diferentes tipos tumorales como el: cáncer de mama (Spychala *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008¹), de esófago (Fukuda *et al.*, 2004), de próstata (Hastie *et al.*, 2005), de ovario (Cho *et al.*, 2006), de tiroides (Kondo *et al.*, 2006), de vejiga (Stella *et al.*, 2010), melanoma (Sadej *et al.*, 2006), leucemia (Mikhailov *et al.*, 2008) y glioma (Bavaresco *et al.*, 2008). En trabajos realizados por nuestro grupo de investigación se ha observado que células tumorales de CaCu también expresan la molécula CD73 y son capaces de generar adenosina a partir de AMP (Ávila, 2011). En el caso particular de nuestro estudio, las células mesenquimales derivadas de

cáncer cérvico uterino mostraron la capacidad de convertir AMP a adenosina. Anteriormente, nuestro grupo de trabajo caracterizó a éstas células mesenquimales (CEM's-CaCu) las cuales mostraron el fenotipo característico de las CEM's, así como la expresión de CD73 (Montesinos *et al.*, 2011).

Por otra parte, los linfocitos T son el componente clave del sistema inmunológico y juegan un papel importante en la inmunidad adaptativa. La respuesta de las células T consiste en una secuencia de activación celular, proliferación y función efectora (Ramasamy *et al.*, 2008). Existen evidencias que indican que las CEM's ejercen un efecto inmunosupresor sobre la actividad de los linfocitos T (Di Nicola *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2003). Tomando en consideración esta premisa, el presente trabajo se realizó con la finalidad de analizar si la adenosina generada por CEM's de cáncer cérvico uterino influye en las fases de la respuesta de linfocitos T como la proliferación, activación y función efectora por medio de la vía adenosinérgica (CD73/adenosina).

De acuerdo a lo que obtuvimos en este trabajo, la adenosina generada por la CEM's-CaCu inhibió la proliferación de los linfocitos T estimulados por mitógenos de forma dependiente de la dosis. Este resultado al igual que el observado por Yang *et al.*, 2009, permite sugerir que las CEM's no requieren el contacto célula-célula para suprimir la proliferación de las células T, debido a que ésta puede ser causada por factores solubles como lo es la adenosina. En otro reporte, la adenosina producida por CEM's de ratón que coexpresan CD39/CD73 indujeron la inhibición de la proliferación de células T (Sattler *et al.*, 2011). Por lo que podemos concluir que las CEM's obtenidas de tumores de cuello uterino inhiben la proliferación de linfocitos T mediante la generación de adenosina por la vía adenosinérgica. Por otro lado, se ha demostrado que la actividad supresora de la adenosina puede ser bloqueada por el empleo de antagonistas específicos para sus receptores, eliminando la supresión de la proliferación de células T inducida por adenosina (Otha *et al.*, 2006). La cafeína es un antagonista del receptor A_{2a}, la cual se ha empleado para reactivar la actividad funcional de linfocitos T efectores y la disminución del tamaño tumoral (Franco *et al.*, 2008). En nuestro estudio la actividad supresora de la adenosina generada por las CEM's-CaCu fue revertida por la cafeína cuando la adenosina se adicionó en bajas concentraciones en los cultivos de linfocitos T.

Por otro lado, durante la fase de activación de los linfocitos T, como respuesta al estímulo del receptor de la célula T, estas células expresan CD25 (receptor de la cadena α de la IL-

2) y CD69 y la síntesis de algunas proteínas como el IFN- γ (Sancho et al. 2005). La expresión de CD69 mejora la activación y sirve como una molécula coestimuladora. En algunos estudios se ha reportado que en cultivos de CEM's derivadas de médula ósea con células mononucleares de sangre periférica no provocan efectos inmunosupresivos en la activación de células T estimuladas con CD3/CD28 (Ramasamy et al., 2008); mientras que en otros estudios, se reportó que las CEM's bloquean la expresión de CD25, CD38 y CD69 en linfocitos T (Le Blanc et al., 2004; Groh et al., 2005). En nuestro trabajo, los resultados indican que la adenosina generada por las CEM's no altera la expresión del marcador de activación temprana CD69 a las 72hrs. El hecho de no haber observado un efecto inhibitorio de la adenosina generada por las CEM's-CaCu sobre la activación de linfocitos T, probablemente se debe a que una vez que el linfocito manda las señales de activación, el proceso ya no es reversible (Cosulich et al., 1987, Swat et al., 1993).

Por otra parte, observamos que la adición de la adenosina generada por las CEM's-CaCu durante la activación de los linfocitos T con anti-CD3/CD28, resultó en una disminución de (11%) en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺IFN- γ ⁺, probablemente como consecuencia de la reducción de la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, tal como lo reportó Ramasamy et al., 2008. Estos resultados contrastan con lo mostrado por Lappas et al., 2005, quienes en un modelo de ratón mostraron que la adenosina bloquea la secreción de IFN- γ en los linfocitos T CD4⁺.

Al evaluar la capacidad lítica de linfocitos T citotóxicos específicos a citomegalovirus (CMV) para lisar las células blanco T2 pulsadas con el péptido NLVPMVATV de HCMV, también encontramos que ésta no fue afectada por la adición de la adenosina generada por las CEM's-CaCu al cultivo de los linfocitos efectores. Estos datos son consistentes con los resultados de Rasmuson et al., 2003 quienes mostraron que la lisis de las células blanco por las células T no fue inhibida cuando fueron adicionadas CEM's. En otro reporte, se señala que los efectos inmunosupresivos de las CEM's derivadas de médula ósea de humano tienen como blanco la proliferación de las células T pero no su función efectora (Ramasamy et al., 2008). De igual manera Karlsson et al., 2008, proponen que las CEM's suprimen la proliferación de LTC más que directamente la inhibición de la actividad citolítica. Sin embargo, en trabajos se ha reportado que las CEM's inhiben la función efectora de los LTC, por ejemplo el grupo de Sattler et al., 2011 mostró que las CEM's aisladas de la médula ósea de ratones Balb/c expresan las ectonucleotidasas

CD39 y CD73, apoyando la generación de adenosina y por tanto promocionando una fuerte inmunosupresión de las células T efectoras probablemente debido a que la adenosina inhibe de forma potente la expresión de moléculas efectoras citotóxicas como perforinas y Fas ligando (Hoskin *et al.*, 2002; Koshiba *et al.*, 1997). Nuestros resultados apoyan el hecho de que el efecto inhibitor de la adenosina generada por las CEM's sobre la respuesta de las células T se limita a la proliferación celular y no a su función efectora (citotóxica), debido a que los linfocitos T citotóxicos fueron estimulados de manera específica de un antígeno con el péptido NLVPMVATV de citomegalovirus humano durante 3 rondas de activación (3 semanas) y en este caso los linfocitos citotóxicos específicos ya habrían sintetizado los gránulos citolíticos, de tal forma que el cultivo en presencia de adenosina, ésta no afectó la síntesis de gránulos, por tanto al retar los linfocitos citotóxicos específicos con las células blanco éstos degranularon y como producto de ello fue posible detectar la molécula LAMP-1 (CD107) en las vesículas secretorias expuestas en la membrana celular.

En el caso particular de infecciones por VPH, las células T CD8⁺ juegan un papel importante en la limpieza satisfactoria de células infectadas por virus y/o células tumorales (Delgado *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008²). Sin embargo, la disminución en la proliferación de estas células, causada por la presencia de la adenosina derivada de las CEM's de CaCu en el sitio de la infección o de la lesión tumoral, podría contribuir a la evasión de la respuesta inmune y por tanto en el desarrollo de un tumor. De hecho, es ahora evidente que la actividad inmunosupresora de la adenosina elaborada por los tumores podría constituir un obstáculo significativo para el éxito de las estrategias de inmunoterapia que buscan obtener respuestas curativas e inmunológicas celulares antitumorales ya sea por la estimulación de respuestas de células T específicas al tumor o transferencias adoptivas de células asesinas reactivas al tumor. Por tanto el bloqueo de la vía adenosinérgica en tumores surge como un estrategia inmunológica contra el cáncer.

CONCLUSIONES

1. Las CEM's de tejido cervical con cáncer cérvico uterino mostraron actividad funcional de la vía adenosinérgica por medio de la actividad de CD73 al hidrolizar AMP y producir adenosina.
2. Las CEM's obtenidas de tumores de cuello uterino inhibieron la proliferación de linfocitos T mediante la generación de adenosina por la vía adenosinérgica.
3. El producto de la hidrólisis de AMP-adenosina contenido en los sobrenadantes de las CEM's-CaCu disminuyó sutilmente la activación de los linfocitos T.
4. La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ no fue afectada por la adenosina generada por las CEM's CaCu.

PERSPECTIVAS

Es necesario corroborar el efecto inmunosupresor de las CEM's mediante la vía adenosinérgica mediada por CD73, inhibiendo la expresión de CD73 empleando ARN de interferencia o de silenciamiento en las CEM's-CaCu.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas. A, Lichtman A, Pillai. S. 2007. Cellular and Molecular Immunology. 6th Saund. Elsev; Philadelphia, USA, pp 7.
- Aggarwal S, Pittinger M. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate alloantigen immune cell responses. *Blood*. 105 (4): 1815-1822.
- Akasaki Y, Liu G, Chung N, Ehtesham M, Black K, Yu J. 2004. Induction of a CD4+T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J. Immunol.*173: 4352–4359.
- Albini A, Sporn M. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 7, 139-147.
- Avila L. 2011. Analisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza UNAM.
- Baldwin S, Beal P, Yao S, King A, Cass C, Young J. 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447 (5): 735-743.
- Bang O, Lee J, Lee P, Lee G. 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*. 57 (6): 874-882.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari A, Rockenbach L, Farias P, Wink M, Delgado-Cañedo A, Battastiniet A. 2008. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem*. 319 (1-2): 61–68.
- Belz G, Behrens G, Smith C, Miller J, Jones C, Lejon K, Fathman C, Mueller S, Shortman K, Carbone F, Heath W. 2002. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med*. 196 (8):1099–1104.
- Betts M, Brenchley J, Price D, De Rosa S, Douek D, Roederer M, Koup R. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods*. 281 (1-2): 65-78.
- Beyer N, Da Silva L. 2006. Mesenchymal stem cells: Isolation in vitro expansión and caracterizacion. *Handb Exp Pharmacol*. 174: 249-282.
- 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 (4): 625-634.
- Blank C, Gajewski T, Mackensen A. 2005. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 54 (4):307–314.
- Blay J, White T, Hoskin D. 1997. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*. 57 (13): 2602-2605.
- Bosch F, Lorincz A, Munoz N, Meijer C, Shah K. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol*. 55 (4): 244–265.
- Burkhardt J, Hester S, Argon Y. 1989. Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 86 (18): 7128-7132.
- Butler J, Mader J, Watson C, Zhang H, Blay J, Hoskin D. 2003. Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways. *J Cell Biochem*. 89 (5): 975-991.
- Canaday D, Wilkinson, Li Q, Harding C, Silver R, Boom W. 2001. CD4+ AND CD8+ Cells Kill Intracellular Mycobacterium tuberculosis by a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism. *J Immunol*, 167 (5): 2734-2742.
- Carr L, Steele D, Steele S. 2008. 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 19 (6): 881– 883.
- Castellanos M, Hayes R, Maiman M. 2001. Synthetic Peptides Induce a Cytotoxic Response Against Human Papillomavirus Type 18. *Gyn Oncol*. 82 (1): 77-83.

- Chabannes, D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soullou J, Anegon I, Cuturi M. 2007. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*. 110 (10): 3691–3694.
- Chahlavi A, Rayman P, Richmond A, Biswas K and Zhang R. 2005. Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res*. 65 (12): 5428–5438.
- Chan E, Fernandez P, Merchant A, Montesinos M, Trzaska S, Desai A, Tung C, Khoa D, Pillinger M, Reiss A, Tomic-Canic M, Chen J, Schwarzschild M, Cronstein B. 2006. Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma. *Arthritis Rheum*. 54 (8): 2632–2642.
- Chin S, Poey A, Wong C, Chang S, Teh W, Mohr T, Cheong S. 2010. Cryopreserved mesenchymal stromal cell treatment is safe and feasible for severe dilated ischemic cardiomyopathy. *Cytotherapy*. 12 (1): 31-37.
- Cho S, Polster J, Engles J, Hilton J, Abraham E, Wahl R. 2006. In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism. *J Nucl Med*. 47 (5): 837–845.
- Chung C, Patel V, Moran M, Lewis L, Miceli M. 2000. Galectin-1 induces partial TCR ζ -chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol*. 165 (7): 3722–3729.
- Cobb B, Clancy J. 2003. Molecular and cell biology of adenosine receptors. *Current Topics in Membranes*. Schwiebert EM (ed). Academic Press, New York, pp 151-181.
- Colgan S, Eltzschig H, Eckle T, Thompson L. 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling*. 2 (2): 351–360.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu Y. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 5 (12): 1219–1226.
- Cooper M, Fehniger T, Caligiuri M. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 22 (11): 633-640-
- Cosulich M, Rubartelli A, Risso A, Cozzolino F, Bargellesi A. 1987. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T- cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (12): 4205-4209.
- Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enyoloji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V, Strom T, Robson S. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 204 (6): 1257–1265.
- Decking U, Schlieper G, Knoll K, Schrader J. 1997. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res*. 81 (2): 154-164.
- Delgado F, Martinez E, Cespedes M, Bravo M, Navas M, Combita A. 2009. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. *J Immunol*. 126 (4): 523-534.
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis J. 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*; 409 (6821): 733–739.
- Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos M, Chu C, Cronstein B. 2005. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Mol. Pharmacol*. 67 (5): 1406–1413.
- Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini Z, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*. 36 (3): 309-318.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni P, Matteucci P, Grisanti S, Gianni A. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood*. 99 (10): 3838–3843.
- Dias D, Van Doren J, Schlottman S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, Boerckel P, Kessler J, Antonello J, Green T, Brown M, Smith J, Chirmule N, Barr E, Jansen K, Esser M. 2005. Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clin Diag Lab Immunol*. 12 (8): 959-969.

- Djouad, F, Charbonnier L, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 25 (8): 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 (10): 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 (4):315-317.
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 110 (5): 525-541.
- Dwyer K, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom T, Robson S. 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 3 (1-2):171–180.
- Eltzschig H, Ibla J, Furuta G, Leonard M, Jacobson K, Enyoji K, Robson S, Colgan S. 2003. Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med*. 198 (5): 783-796.
- Eltzschig H, Thompson L, Karhausen J. 2004. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood*. 104 (13): 3986-3992.
- Eltzschig H. 2009. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. *Anesthesiology*. 111 (4): 904–915.
- Erdmann A, Gao Z, Jung U, Foley J, Borenstein T, Jacobson K, Fowler D. 2005. Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood*. 105 (12): 4707-4714.
- Evans M, Borysiewicz L, Evans A, Rowe M, Jones M, Gileadi U, Cerundolo V, Man S. 2001. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J. Immunol*. 167 (9): 5420–5428.
- Fainboim L, Geffner J. 2005. Introducción a la inmunología humana, 5ª ed., Editorial Medica Panamericana, Argentina, pp 484.
- Fang B, Song Y, Lin Q, Zhang Y, Cao Y, Zhao R, Ma Y. 2007. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of 8 *Journal of Biomedicine and Biotechnology* severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. *Pediatr Transplant*. 11 (7): 814-817.
- Fang B, Song Y, Zhao R, Han Q, Lin Q. 2007. Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. *Transplant Proceedings*. 39 (5): 1710–1713.
- Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. 2006. Celulas toncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin*. 58 (5): 498-511.
- Franco R. Café y cáncer. 2008. *Med Clin (Barc)*. 131(16):633-635.
- Fredholm B, Abbracchio M, Burnstock G, Daly J, Harden T, Jacobson K, Leff P, Williams M. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*. 46 (2): 143-156.
- Fredholm B, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. 2000. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 362 (4-5): 364-374.
- Fredholm B, Battig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau E. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*. 51 (1): 83-133.
- Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, Nakase Y, Hagiwara A, S Mitsufuji S, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. 2004. Differential gene expression profiles of radioresistantoesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer*. 91 (8):1543–1550.

- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim H, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. 2003. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 63 (23): 8302–8311.
- Gabrilovich D, Velders M, Sotomayor E, Kast W. 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol.* 166 (9): 5398–5406.
- García-Olmo D, D. Herreros D, Pascual I. 2009. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 52 (1): 79–86.
- García R. 2011. Análisis de la capacidad de las células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de neoplasias cervicales (NIC y CaCu) para inducir linfocitos T reguladores. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Programa de Inmunología.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar J, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern P. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 18 (2): 89–95.
- Gastl G, Abrams J, Nanus D, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, Chen M, Albino A, Bander N. 1993. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer.* 55 (1): 96-101.
- Gates C, Karthikeyan T, Fu F, Huard J. 2008. Regenerative medicine for the musculoskeletal system based on muscle-derived stem cells. *J Am Acad Orthop Surg.* 16 (2): 68–76.
- Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N, Nestle F. 2004. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am. J. Pathol.* 165 (6):1853–1863.
- Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gavioli R, Fortini C, Leung E, Mac Lennan S, Borea P. 2004. Expression of A3 adenosine receptors in human lymphocytes: upregulation in T cell activation. *Mol Pharmacol.* 65 (3): 711-719.
- Gieseke F, Schütt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, Müller I. 2007. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of iFN γ signaling and iDO expression. *Blood.* 110 (6): 2197–2200.
- Góngora-Alfaro J, Moo-Puc R, Villanueva J, Arankowsky-Sandoval G, Álvarez-Cervera F, Pineda-Cortés, Heredia-López F, Bata-García J. 2005. La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed;* 16: 99-111.
- Gregory C, Prockop D, Spess J. 2005. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res.* 306 (2): 330-335.
- Groh M, Maitra B, szekely E, Koc O. 2005. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp. Hematol.* 33 (8): 928-934.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. 2002. Tumor-derived soluble MICs ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 419 (6908): 734-738.
- Gupta E, Nayyer N, Chin S, Cheok C, Cheong S. 2010. Clinical safety and efficacy of autologous bone marrow mesenchymal stem cell injection for the treatment of severe osteoarthritis. *Int J Rheum Dis.* 13 (1): 40–43.
- Harris N, Ronchese F. 1999. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol.* 77 (4): 304-311.
- Hartigan-O'Connor D, Poon C, Sinclair E, McCune J. 2007. Human CD4⁺ 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 (1-2): 41-52.
- Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S, Hartmann G. 2003. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 63 (19): 6478–6487.
- Haskó G, Cronstein B. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25 (1): 33-39.

- Haskó G, Kuhel D, Chen J, Schwarzschild M, Deitch E, Mabley J, Marton A, Szabó C. 2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 14 (13): 2065-2074.
- Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. 2008. Adenosine receptors: Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 7(9): 759–770.
- Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 9: 12.
- Hastie C, Saxton M, Akpan A, Cramer R, Masters J, Soren Naaby-Hansen S. 2005. Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells. *Oncogene*. 24 (38): 5905–5913.
- Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chang C, Burk R. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 338 (7): 423-428.
- Hodi F, Butler M, Oble D, et al. 2008. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105 (8): 3005-3010.
- Hosken A, Bevan M. 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class-I molecules. *Science*, 248 (4956): 367-370.
- Hoskin D, Butler J, Drapeau D, Haeryfar S, Blay J. 2002. Adenosine acts through an A3 receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int J Cancer* 99 (3): 386-395.
- Hoskin D, Mader J, Furlong S, Conrad D, Blay J. 2008. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells. *Int J Oncol*. 32 (3): 527-535.
- Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. 1997. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosinemediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90 (4): 1600-1610.
- Hung S, Deng W, Yang W, Liu R, Lee C, Su T, Lin R, Yang D, Chang C, Chen W, Wei H, Gelovani J. 2005. Mesenchymal stem cells targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*. 11 (21): 7749-7756.
- INEGI. 2008. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx
- Jalkanen S, Salmi M. 2008. VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28 (1): 18-26.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5^a ed, Garland Publishing, New York, pp 258.
- Jarvinen, L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T†, Standiford T, Toews G, Pinsky D†, Peters-Golden M, Lama V. 2008. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J. Immunol*. 181 (6): 4389-4396.
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson L, Liu A, Daniel B, Shin T, Curiel T, Zhang B. 2010. CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *Cancer*. 70 (6): 2245-2255.
- Ju S, Teng G, Lu H, in J, Zhang Y, Zhang A, Ni Y. 2010. In vivo differentiation of magnetically labeled mesenchymal stem cells into hepatocytes for cell therapy to repair damaged liver. *Invest Radiol* 45 (10): 625–633.
- Karlsson H, Samarasinghe S, Ball L, Sundberg B, Lankester A, Dazzi F, Uzunel M, Rao K, Veys P, Le Blanc K, Ringdén O, Amrolia P. 2008. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood* 112 (3): 532–541.
- Karnoub A, Dash A, Vo A, Sullivan A, Brooks M, Bell G, Richardson A, Polyak K, Tubo R, Weinberg R. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 449 (7162): 557-563.
- Karussis D, Kassis I, Kurkalli B, Slavin S. 2008. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/ neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 265, (1-2): 131–135.

- Kayes O, Ahmed H, Arya M, Minhas S. 2007. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncol*; 8 (5): 420–429.
- 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 (5): 1294-1301.
- Khong H, Restifo N. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol*. 3 (11): 999–1005.
- Kindt T, Goldsby R, Osborne B. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6ª ed. Editorial McGrawHill. México. pp 574.
- Klotz K. 2007. Adenosine receptor pharmacology. In: *Adenosine Receptors. Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases*. Haskó G, Cronstein BN and Szabó C (eds). CRC Press- Taylor & Francis Group, Boca Raton. 1-14.
- Kobie J, Shah P, Yang L, Rebhahn J, Fowell D, Mosmann T. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine. *J Immunol*. 177 (10): 6780–6786.
- Kondo T, Nakazawa T, Murata S and Katoh R. 2006. Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. *Histopathology*. 48 (5): 612–614.
- Koneru M, Schaer D, Monu N, Ayala A, Frey A. 2005. Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J. Immunol*. 174 (4):1830–1840.
- Koshiba M, Kojima H, Huang S, Apasov S, Sitkovsky M. 1997. Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells. *J Biol Chem* 272 (41): 25881-25889.
- Koshiba M, Rosin D, Hayashi N, Linden J, Sitkovsky M. 1999. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells: flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol* 55 (3): 614-624.
- 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 (9): 3722–3729.
- Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner C. 2010. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer*. 9: 129.
- Kurte M, Lopez M, Aguirre A, Escobar A, Aguillon J. 2004. A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and transporter associated with antigen processing 1/2 in human melanoma cells. *J. Immunol*. 173 (3): 1731–1737.
- Kurtova A, Balakrishnan K, Chen R. 2009. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 114 (20): 4441–4450.
- Lanier L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 23:225–274.
- Lappas C, Rieger J, Linden J. 2005. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 174 (2): 1073-1080.
- Lazennec, Jorgensen G. 2008. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit?. *Stem Cells*. 26 (6): 1387–1394.
- Le Blanc K, Gotherstrom C, Rasmusson I, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringdén O. 2004. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (IL-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol*. 60 (3): 307–315.
- Le Blanc K, Ringden O. 2005. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 11 (5): 321–334.
- Le Blanc K, Ringden O. 2006. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 18 (5):586-591.

- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth S, Ringden O. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 57 (1): 11–20.
- Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P. 2004. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 32 (6): 370–373.
- Li L, Tian H, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. 2011. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 226 (7): 1860–1867.
- Li M, Wan Y, Sanjabi S, Robertson A, Flavell R. 2006. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 99–146.
- Lin Y, Zhang G, Leng Z. 2006. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin Medi J.* 119 (11): 905–910.
- Linden J. 2001. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 775–787.
- Liu C, Chen Z, Chen H, Zhang Z, Lu Y. 2006. Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. *Neoplasia.* 8 (9): 716–724.
- Liu W, Putnam A, Xu-Yu Z, Lee M, Zhu S, Gottlieb P, Kapranov P, Gingeras T, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper D, Ziegler S, Bluestone J. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.* 203 (7): 1701-1711.
- Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?. *Hematol.* 92 (7): 872-877.
- López M, Adris S, Bravo A, Chernajovsky Y, Podhajcer O. 2005. IL-12 and IL-10 expression synergize to induce the immune-mediated eradication of established colon and mammary tumors and lung metastasis. *J. Immunol.* 175 (9): 5885–5894.
- Lukashev D, Smith P, Caldwell C, Ohta A, Apasov S, Sitkovsky M. 2003. Analysis of A2A receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2B, A1 and A3 adenosine receptors in lymphoid organs. *Biochem Pharmacol.* 65 (12): 2081-2090.
- MacKenzie W, Hoskin D, Blay J. 1994. Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cells through an A3 receptor. *Cancer Res* 54 (13): 3521-3526.
- MacKenzie W, Hoskin D, Blay J. 2002. Adenosine suppresses $\alpha 4\beta 7$ integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to colon adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res.* 276 (1): 90-100.
- Male D, Brostoff J, Roitt I. 2004. *Immunology* 7^a ed, Mosby, USA, 65-85.
- Malmberg K. 2004. Effective immunotherapy against cancer. A question of overcoming immune suppression and immune escape? *Cancer Immunol Immunother* 53 (10): 879-892.
- Mandapathil B, Hilldorfer M, Szczepanski M, Czystowska M, Szajnik J, Ren S, Lang E, Jackson E, Gorelik E, Whiteside T. 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 285 (10): 7176–7186.
- Marincola F, Jaffee E, Hicklin D, Ferrone S. 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* 74:181–273.
- Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco G, Toscano M, Ascione B, Rabinovich G, Malorni W. 2005. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding and fission. *J. Biol. Chem.* 280 (8): 6969–6985.
- Mellado M, de Ana A, Moreno M, Martinez C, Rodríguez-Frade J. 2001. A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death. *Curr Biol*;11 (9): 691–696.
- Mellor A, Munn D. 2000. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T-cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol.* 18: 367–391.

- Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi P, Tabrizi M, Borea P. 2003. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 100 (1): 31-48.
- Mikhailov A, Sokolovskaya A†, Yegutkin G‡, Amdahl H, West A, Yagita H, Lahesmaa R, Thompson L, Jalkanen S‡, Blokhin D†, Eriksson J. 2008. CD73 participates in cellular multidrug resistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol*. 181 (1): 464–475.
- Mirabet M, Herrera C, Cordero O, Mallol J, Lluís C, Franco R. 1999. Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J Cell Sci*. 112 (Pt 4): 491-502.
- Mishra P, Mishra J, Humeniuk R. 2008. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*. 68 (11): 4331– 4339.
- Miura M, Miura Y, Padilla-Nash H. 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 24 (4): 1095–1103.
- Mizoguchi H, O'Shea J, Longo D, Loeffler C, McVicar D, Ochoa A. 1992. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*. 258 (5089): 1795–1798.
- Montesinos J, Flores E, Castillo S, Flores P, Hernández E, Fajardo 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(2):163-176.
- Montesinos J, Mora M, Flores E, Mayani H, Hernández J, Weiss B, García R, Hernández E, Fajardo G, Hernández H, Apresa T, Monroy A. 2009. Human mesenchymal stromal cells derived from cervical tumor down-regulate the expression and HLA-Class I molecules and the antigen presentation on cervical cancer cells. Enviado.
- Montesinos J, Mora M, Flores E, Mayani H, Hernández J, Weiss B, García R, Hernández E, Fajardo G, Hernández D, Apresa T, Monroy A. 2011. Human mesenchymal stromal cells derived from cervical tumor down-regulate the expression and HLA-Class I molecules and the antigen presentation on cervical cancer cells. Manuscrito en preparación.
- Montesinos M, Shaw J, Yee H, Shamamian P, Cronstein B. 2004. Adenosine A (2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am. J. Pathol*. 164 (6): 1887–1892.
- Moriggl R, Topham D, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster M, Bunting K, Grosveld G, Ihle J. 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 10 (2): 249-259.
- Muller A, Duhadaway J, Donover P, Sutanto-Ward E, Prendergast G. 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med*. 11 (3): 312–319.
- Munn D, Sharma M, Lee J, Jhaver K, Johnson T, Keskin D, Marshall B, Chandler P, Antonia S, Burgess R, Slingluff C Jr, Mellor A. 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*; 297 (5588): 1867–1870.
- Murphy K, Tranvers P, Walport M. 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7^a ed. Garland Science. New York, pp 81.
- Mustelin T, Taskén K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J*. 371 (Pt): 15-27.
- Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 65 (8): 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 (14): 1155-1164.
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 2007. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing

- regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 98 (6): 874-881
- Nakashima M, Sonoda K and Watanabe T. 1999. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med.* 5 (8): 938–942.
 - Napieralski R., Kempkes B, Gutensohn W. 2003. Evidence for coordinated induction and repression of ecto-5-nucleotidase (CD73) and the A2a adenosine receptor in a human B cell line. *Biol. Chem.* 384 (3): 483–487.
 - Nasef, A, Mazuriera C, Boucheta S, François S, Chapela A, Thierry D, Gorina N, Fouillard L. 2008. Leukemia inhibitory factor: role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol.* 253 (1-2): 16–22
 - Noël D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala, D, Jorgensen C. 2007. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma* 48 (7): 1283–1289.
 - O'Connell J, O'Sullivan G, Collins J, Shanahan F. 1996. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184 (3): 1075-1082.
 - O'Garra A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8 (3): 275-283.
 - Ohta A, Gorelik E, Prasad S, Ronchese F, Lukashev D, Wong M, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen J, Jackson E, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (35): 13132-13137.
 - Ohlsson L, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. 2003. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol.* 75 (3): 248–255.
 - Owen K, Gomolka D, Droller M. 1980. Production of prostaglandin E2 by tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 40 (9): 3167-3171.
 - Páez D, Arévalo J, Rodríguez Y. 2007. Evaluación de características morfológicas e inmunotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 5 (8): 101-212.
 - Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, La Sala A, Girolomoni G, Norgauer J. 2003. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood.* 101 (10): 3985-3990.
 - Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter P, Mrowietz U, Dichmann S, Norgauer J: 2001. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* 15 (11): 1963-1970.
 - Passmore S, Burch V, Shephard E, Marais D, Allan B, Kay P, Rose R, Williamson A. 2002. Single-cell Cytokine Analysis Allows Detection of Cervical T-Cell Responses Against Human Papillomavirus Type 16 L1 in women Infected With Genital HPV. *J Med. Virol.* 67 (2): 234-240.
 - Pellegatti P, Raffaghello Z, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One.* 3(7): e2599.
 - Perillo N, Pace K, Seilhamer J, Baum L. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature.* 378 (6558): 736–739.
 - Peters P, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot J, Geuze H. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 173 (5): 1099–1109.
 - Piersma S, Jordanova E, van Poelgeest M, Kwappenberg K, van der Hulst M, Drijfhout J, Melief C, Kenter G, Fleuren G, Offringa R, van der Burg S. 2007. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer Res.* 67 (1): 354-61.

- Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi M, Poggi A. 2007. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92 (7): 881-888.
- Psyrrri A, Di Maio D. 2008. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 5 (1): 24–31.
- Rabinovich G, Baum L, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu F, Iacobelli S. 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*. 23 (6): 313–320.
- Rabinovich G, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera C. 1999. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 190 (3): 385–398.
- Rabinovich G, Gabrilovich D, Sotomayor E. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 25: 267–296.
- Ramasamy R, Kong C, Fong H, Vidyadaran S, Dazzi F. 2008. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol*. 251 (2): 131–136.
- Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia L, Jackson E, Gorelik E. 2005. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J Immunol*. 175 (7): 4383-4391.
- Raskovalova T, Lokshin A, Huang X, Su Y, Mandic M, Zarour H, Jackson E, Gorelik E. 2007. Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res* 67 (12): 5949-5956.
- Rasmusson, I. 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res*. 312 (12): 2169–2179.
- Rasmusson I, Ringdén 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 (8): 1208-1213.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. 2005. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res*. 305 (1): 33-41.
- Regueiro J, López C, González S, Martínez E. 2002. *Inmunología Biología y Patología del Sistema Inmune*. Editorial Médica Panamericana. 3a edición. España. pp 202.
- Reiser J, Zhang X, Hemenway C, Mondal D, Pradhan L, La Russa V. 2005. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 5 (12): 1571– 1584.
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts A, Zhao R, Shi Y. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2 (2): 141–150.
- Resta R, Yamashita Y, Thompson L. 1998. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161: 95–109.
- Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G. 2002. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte–tumor cell interaction. *Immunol Rev*. 188: 97–113.
- Robson S, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. 2005. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* 31 (2): 217–233.
- Rodriguez R, Rubio R, Masip M, Catalina P, Nieto A, de la Cueva T, Arriero M, San Martín N, de la Cueva E, Balomenos D, Menendez P, García J. 2009. Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia*. 11 (4): 397–407.
- Roitt I, Delves P. 2003. *Inmunología fundamentos*. 10 ed. Ed. Medica Panamericana. Argentina, pp 35.
- Rubio D, García J, Martín M. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*. 65 (8): 3035–3039.

- Rubio D, García S, Paz M. 2008. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE*. 3 (1): e1398.
- Ruiz F, Cabrera T, Lopez M, Garrido F. 2002. Impaired surface antigen presentation in tumours: implications for T cell-based immunotherapy. *Semin Cancer Biol*. 12 (1):15–24.
- Sabatini F; Petecchia I, Taviani M, Jodon V, Rossi G, Brouty-Boye D. 2005. Human bronchial fibroblast exhibit a mesenchymal stem cells phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 85 (8): 962-971.
- Sadej R, Spychala J, Skladanowski A. 2006. Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25 (9-11): 1119–1123.
- Saldanha F, Ferreira F, Palma P, Araujo A, Queiroz R, Covas D, Zago M, Panepucci R. 2011. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res*. 7 (1): 66–74.
- Sancho D, Gómez M, Sánchez F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26 (3): 136-140.
- Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109 (1): 228–234.
- Sattler C, Steinsdoerfer M, Offers M, Fischer E, Schierl R, Heseler K, Aubener W, Seissler J. 2011. Inhibition of T cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39/CD73 coexpression and adenosine generation. *Cell Transplant*. 20 (8): 1221-1230.
- Schreiber R, Farrar M, Hershey G, Fernandez J. 1992. The structure and function of interferon- γ receptors. *Int. J. Immunopharmacol*. 14 (3): 413–419.
- Schulte G, Fredholm B. 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal*. 15 (9): 813-827.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander S, 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*. 203 (7): 1693-1700.
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. 2002. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol*. 12 (1): 3–13.
- Seliger B, Maeurer M, Ferrone S. 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumour growth. *Immunol Today*. 21 (9):455–464.
- Selmani, Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella E, Deschaseaux F. 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 26 (1): 212–222.
- Serafini P, Borrello I, Bronte V. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol*. 16 (1): 53-65.
- Shi S, Bartold P, Miura M, Seo B, Robey P, Gronthos S. 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to generate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 8 (3): 191-199.
- Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K 2010. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*. 127 (10): 2323–2333.
- Siegel R, Chan F, Chun H, Lenardo M, 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*. 1 (6): 469–474.
- Sitkovsky M, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. 2008. Hypoxia-Adenosinergic Immunosuppression: Tumor Protection by T Regulatory Cells and Cancerous Tissue Hypoxia. *Clin Cancer Res*. 14 (19): 5947-5952.

- Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson S, Ohta A. 2008. Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol.* 153 (1): S457-464.
- Sitkovsky M, Lukashev D. 2005. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1a and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol.* 5 (9):712-721.
- Sotiropoulou P, Perez S, Gritzapis A, Baxevas C, Papamichail M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 24 (1): 74–85.
- Spaeth E, Dembinski J, Sasser A. 2009. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE.* 4 (4): e4992.
- Spaggiari G, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari M, Moretta L. 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin e2. *Blood* 111 (3): 1327–1333.
- Spiotto M, Rowley D, Schreiber H. 2004. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat Med.* 10 (3): 294–298.
- Szychala J. 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 87 (2-3): 161–173.
- Szychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue L, Jin A, Mitchell B. 2004. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10 (2): 708–717.
- Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 21: 685–711.
- Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Fernandes P, Wink M, Azambuja A, Barrios C, Bueno F, Oliveira A. 2010. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol.* 28 (3): 260-267.
- Studeny M, Marini F, Champlin R, Zompetta C, Fidler I, Andreeff M. 2002. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 62 (13): 3603-3608.
- Sturm A, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass A, Gabius H. 2004. Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol.* 173 (6): 3825–3837.
- Sun Y, Chen L, Hou X. 2007. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J.* 120 (9): 771–776.
- Swat W, Dessing M, Von Boehmer H, Kisielow P. 1993. CD69 expression during selection and maturation of CD4⁺ 8⁺ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 23 (3): 739-746.
- Synnestvedt K, Furuta G, Comerford K, Louis N, Karhausen J, Eltzschig H, Hansen K, Thompson L, Colgan S. 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 110 (7): 993–1002.
- Tabi Z, Man S. 2006. Challenges for cancer vaccine development. *Adv Drug Deliv Rev* 58 (8): 902-915.
- Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H. 2007. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43 (3-4): 129–138.
- Teraben M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky J. 2000. NK T cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* 1 (6): 515–520.
- Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today.* 15 (10): 479-483.
- Tian K, Yang S, Ren Q, Han Z, Lu S, Ma F, Zhang L, Han Z. 2010. p38 MAPK contributes to the growth inhibition of leukaemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cellular Physiol Biochem.* 26 (6): 799–808.

- Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ M, Keller U, Müller B, Zulewski H. 2006. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 341 (4): 1135–1140.
- Tindle R. 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2 (1): 1-7.
- Tolar J, Nauta A, Osborn M, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M. 2007. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 25 (2): 371–379.
- Torroella M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Ghaffari A, Solorza G, Shah K. 1998. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncol.* 70 (1): 115-120.
- Tschopp J, Nabholz M. 1990. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 8: 279-302.
- Turley E, Veisoh M, Radisky D, Bissel M. 2008. Mechanisms of disease: epithelial mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol.* 5 (5): 280-290.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 28 (5): 219-226.
- Ullman K, Northrop J, Verweij C, Crabtree G. 1990. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8: 421-452.
- Uyttenhove C, Pilote L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde B. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 9 (10): 1269–1274.
- Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol.* 200 (2): 255–268.
- Vieweg J, Su Z, Dahm P, Kusmartsev S. 2007. Reversal of tumor-mediated immune suppression. *Clin Cancer Res.* 13 (2 Pt 2): S727-S732.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho A. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 33 (11): 1402-1416.
- Wang H, Wang R. 2007. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 19 (2): 217-223.
- Wang L, Fan J, Thompson L, Zhang Y, Shin T, Curiel T, Zhang B. 2011. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest.* 121 (6): 2371–2382.
- Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P¹. 2008. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134 (3): 365–372.
- Wang S, Wheeler C, Hildesheim A, Schiffman M, Herrero R, Bratti M, Sherman M, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Lorincz A, Burk R, Carrington M, Erlich H, Apple R. 2001. Human leucocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Dis* 184 (10): 1310–1314.
- Wang X, Moscicki A, Tsang L, Brokman A, Nakagawa M². 2008. Memory T cells specific for novel human papillomavirus type 16 (HPV 16) E6 epitopes in women whose HPV 16 infection has become undetectable. *Clin Vaccine Immunol.* 15 (6): 937-945.
- Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, Lu S, Liu B, Zhang L, Zhao H. 2009. Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 28: 141.

- Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows J. 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 (2): 368-374.
- Whiteside T. 2006. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16 (1): 3-15.
- Winchester B. 2001. Lysosomal membrane proteins. *Eur. J. Paediatr Neurol.* 5 (1): 11-19.
- Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y. 2010. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: report of two initial cases. *Inte J Urol.* 17 (1): 75–82.
- Yang S, Park M, Yoon I, Kim S, Hong S, Shin J, Nam H, Kim Y, Kim B, Chung-Gyu Park C. 2009. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med.* 41(5): 315-324.
- Yegutkin G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.* 1783 (5): 673-694.
- Yen B, Yen M. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer- for better or for worse. *Journal of cancer molecules* 4: 5-9.
- Yugawa T, Kiyono T. 2009. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 19 (2): 97-113
- Zhang B. 2010. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70 (16): 6407–6411.
- Zhang H, Conrad D, Butler J, Zhao C, Blay J, Hoskin D. 2004. Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases. *J Immunol.* 173 (2): 932-944.
- Zhang J, Scordi I, Smyth M, Lichtenheld M. 1999. Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers. *J Exp Med.* 190 (9): 1297-1308.
- Zhu C, Anderson A, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury S, Zheng X, Strom T, Kuchroo V. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type-1 immunity. *Nat Immunol.* 6 (12): 1245–1252.
- 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 (3): 267-274.
- Zhu Y, Sun Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C, Zhao R. 2009. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia.* 23 (5): 925–933.
- Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselín I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel D, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel T. 2001. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med.* 7 (12):1339–1346.
- Zuk P. 2010. The Adipose tissue-derived cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell.* 21 (11): 1783–1787.
- Zur Hausen H, de Villiers E. 1994. Human Papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 48: 427-447.