



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación

Experimental Zaragoza (UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Inmunobiología

**Análisis de la participación de células estromales
mesenquimales derivadas de cérvix normal en la disminución
de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad
clase I en células tumorales**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

EVA SANTOS BUSTAMANTE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

ASESOR INTERNO:

DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA



México, D.F. Noviembre 2014



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.



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 la alumna **SANTOS BUSTAMANTE EVA**, con número de cuenta **307312857**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **4 de noviembre de 2014** a las **16:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

VOCAL Dr. JORGE HERNÁNDEZ MONTES*

SECRETARIO Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE Biól. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Análisis de la participación de células estromales mesenquimales derivadas cérvix normal en la disminución de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I en células tumorales.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F. a 22 de septiembre de 2014.

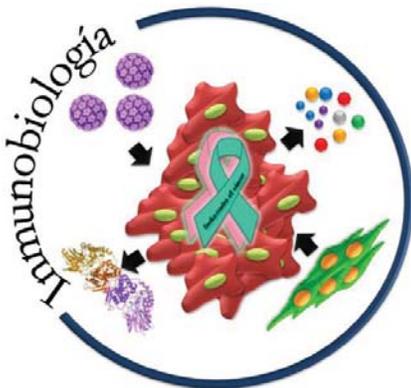
DR. VÍCTOR MANDO MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza. **Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM** clave del proyecto IN217013: “Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73”. Y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS, con el apoyo financiero de los proyectos: FIS/IMSS/PROT/762, 800, 1014 y 1258



La ciencia no es una materia que llevas en la escuela. Es la vida misma. Estamos envueltos por ella, en ella, con ella. Y el conocimiento científico que uno tiene no debería ser visto nunca como una extensión desechable de nuestra mente.

Neil Degraese Tyson

Ya que “En nuestros días no debería dejarse sin investigar nada que todavía permanezca sin explicación.”

Eric Topol. Cardiólogo.

No esperes a que todas las condiciones sean idóneas. Siempre habrá desafíos, obstáculos y condiciones que distarán de ser perfectas. ¿Qué importa? Comienza ahora. Con cada paso que des te volverás cada vez más fuerte, más experto, más seguro de ti mismo y más exitoso.

Mark Victor Hansen

DEDICADO A:

***A mis padres (ESTANISLAO y EMMA)
y hermanos (NANCY, ROCIO y DAVID).***

Gracias por su amor incondicional, trabajo y sacrificios en todos estos años, por su gran ejemplo de vida he logrado llegar hasta aquí, he sido privilegiada al ser parte de esta gran familia, que simplemente es la mejor, gracias por ser mis guías de vida cada quien a su manera, porque por ello soy lo que soy hoy en día.

LOS AMO!!

Agradecimientos

Gracias Dios por darme la vida y esta gran familia, por ayudarme a progresar en el plano profesional, familiar y social. Gracias por todas las bendiciones que me haces vivir día con día.

Gracias a mi padre que me enseñó infinidad de cosas como a siempre luchar, nunca darse por vencido aunque el panorama pite negro, a siempre sonreír, a amar, respetar a los tuyos y a ser orgullosa. Te amo gracias siempre por ser mi papito, mi amigo mi héroe, mi todo. Siempre vivirás en mi corazón.

Gracias a mi madre que con tu nobleza y tu gran corazón siempre hay paz donde estás tú, por tu fortaleza, por tu amor incondicional. Te amo mamita de mi corazón.

Gracias a Nancy que eres mi confidente, mi amiga, mi hermana, mi cómplice, mi segunda mamá. Te quiero moustra.

Gracias a Rocio que aunque quieras aparentar esa dureza tienes un gran corazón, gracias por centrarme. Te quiero moustra.

Gracias a mi moustro consentido David mi hermanito mi gemelo de travesuras, mi dolor de cabeza y mi risa constante. Te amo bobo!!

Gracias a cada gran persona que ha pasado por mi vida unas se van otras se quedan pero siempre dejan huella en mi corazón.

Mi mejor etapa la secundaria. Grandes experiencias que viví ahí, gracias amiga Mayra (Dory)!!

La prepa 6 es cuna de crecimiento profesional y personal todo de la mano de grandes personas Iris, Mariana, Chepis y Cecilia (con Ces compartí y aprendí mucho de ti te súper quiero), a todos ustedes y más gracias por compartir grandes momentos, risas y frustraciones.

La universidad ahí viví grandes cambios, grandes despedidas personales, grandes logros profesionales, y siempre con el apoyo de personas especiales en primer semestre conocí a Itzel y Tizel grandes mujeres que guardo en mi corazón y siempre tendrán un lugar especial ahí.

En tercer semestre me hice hermana de corazón de Xenia con ella he vivido un poco de todo gracias por siempre apoyarme, te quiero mucho.

Gracias también a valiosas personas que conocí en esta etapa que con orgullo los llamo amigos Estrella, Moises, Octavio, Lisandro, Angel, David, Estephany, Fernando y muchos más que hicieron más amena esta etapa llena de risas y grandes vivencias.

Por supuesto gracias a la UNAM a la FES Zaragoza por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente, a grandes profesores que tuve durante la carrera y en la última etapa 7° y 8° que lo viví en laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ gracias por darme la oportunidad de aprender y formar parte del grupo de trabajo Dr. Alberto Monroy y Dra. Ma. Lourdes Mora.

En especial gracias al Dr. Jorge Hernandez Montes por ser mi director de tesis, por siempre apoyarme, por ilustrarme, por la paciencia que me tuvo, por los grandes consejos que me dio, lo quiero y lo respeto. Admiro su capacidad experimental, su honestidad en los resultados y su inteligencia para interpretarlos. Gracias por el tiempo y ayuda que me dio.

También agradezco a los miembros del laboratorio que de todos siempre se aprende algo, gracias por los grandes momentos gracias por ser compañeros de laboratorio pero también amigos, Vianey, Luis, Azucena, Estephany, Itzel, Victor, Estrella y Gabriela.

También agradezco a mis sinodales y revisores del trabajo ya que con sus consejos y observaciones, permitieron la culminación y enriquecimiento del proyecto. Dr. Jorge Hernández Montes, Dra. María de Lourdes Mora García, M. en C. Rosalva Rangel Corona, M en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez y al Biól. Carlos Martínez Montoya.

Por ultimo pero no menos importante quiero dar las gracias a otras personas que me apoyaron en este proceso Daniela, Naomi, Julieta, Deisy, Silvia, Diego, Abimael y otros muchos que la lista sería interminable.

ÍNDICE

Contenido -----	Página
ABREVIATURAS -----	1
RESUMEN -----	3
MARCO TEÓRICO -----	4
Cáncer-----	4
Células Estromales Mesenquimales (CEM)-----	5
Vía adenosinérgica 5'-ectonucleotidasa (CD73)-----	8
Sistema Inmune-----	11
Inmunidad Innata-----	12
Inmunidad Específica, Adquirida o Adaptativa-----	13
Inmunidad Humoral-----	14
Inmunidad Celular-----	14
Linfocitos T-----	14
Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH)-----	16
Complejo principal de histocompatibilidad Clase I (CPH-I)-----	18
Virus del Papiloma Humano (VPH) y Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu)--	19
Respuesta inmune contra el CaCu y sus mecanismos de evasión-----	24
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA -----	26
HIPÓTESIS -----	27
OBJETIVOS -----	28
MATERIAL Y MÉTODO -----	29
RESULTADOS -----	32
Células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal inducen una reducción en la expresión de moléculas del CPH clase I (H-2^b) en células tumorales TC-1 -----	32
El cultivo de células tumorales TC-1 en presencia de adenosina no afecta la expresión de moléculas clase I del CPH (H-2^b), y en presencia de AMP aumenta su expresión -----	37
Los medios condicionados de cultivos y cocultivos de células TC-1 y CEM-CN contienen bajas concentraciones de IL-10 -----	38

El cocultivo de células TC-1 con células estromales mesenquimales de tejido cérvix normal (CEM-CN) no afecta la proliferación de las células tumorales.-----	39
La adenosina no influye en la proliferación de las células TC-1.----	41
Las células TC-1 disminuyen su proliferación cuando son cultivadas con altas concentraciones de AMP.-----	42
DISCUSIÓN-----	43
CONCLUSIONES-----	50
LITERATURA CONSULTADA-----	51



ABREVIATURAS

ADN -----	Ácido Desoxirribonucleico
Ado -----	Adenosina
ADP -----	Adenosina 5' difosfato
AF -----	Autofluorescencia
AMP -----	Adenosina 5'-monofosfato
APCP -----	Adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato
AR -----	Receptores de Adenosina (<i>Adenosin Receptor</i>)
ATP -----	Adenosina 3'-monofosfato
CTL -----	Linfocitos T Citotóxicos (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CaCu -----	Cáncer Cérvico-Uterino
CD -----	Grupo de diferenciación (<i>cluster of differentiation</i>)
CD39 -----	Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1
CD4 -----	Células T colaboradoras
CD73 -----	5'-ectonucleotidasa
CD8 -----	Células T citotóxicas
CFSE -----	Éster de succinimidil carboxifluoresceína (<i>Carboxyfluorescein-succinimidyl- ester</i>)
CEM -----	Células Estromales Mesenquimales
CPA -----	Célula presentadora de antígeno
CPH -----	Complejo Principal de Histocompatibilidad
DC -----	Célula Dendrítica
HLA -----	Antígeno Leucocitario Humano



HGF -----	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)
INFγ -----	Interferón gamma
IL-10 -----	Interleucina-10
IMF -----	Intensidad Media de Fluorescencia
NK -----	Células asesinas naturales (<i>natural killer</i>)
PBS -----	Solución buffer salina de fosfatos (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
RLC -----	Región Larga de Control
RE -----	Retículo Endoplasmático
SFB -----	Suero Fetal de Bovino
TC-1 -----	Células tumorales (<i>tissue culture number one</i>)
TCR -----	Receptor de célula T (<i>T cell receptor</i>)
TNF-α -----	Factor de Necrosis Tumoral alfa.
TGF -----	Factor de crecimiento transformante (<i>transforming growth factor</i>)
TNF -----	Factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
Treg -----	Linfocitos T reguladores
VPH -----	Virus de Papiloma Humano



RESUMEN

Las células estromales mesenquimales (CEM) asociadas al microambiente tumoral inducen una supresión sobre diversos tipos de células de la respuesta inmune la cual se debe, entre otros factores, a la producción de adenosina. Asimismo, se han presentado evidencias experimentales no concluyentes que asignan a las CEM tanto un papel estimulador como inhibidor del crecimiento tumoral.

En este trabajo evaluamos el efecto de CEM de Cérvix Normal (CEM-CN) sobre la proliferación y la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase-I (CPH-I) sobre células tumorales de ratón TC-1, que expresan antígenos del virus de papiloma humano tipo 16, estas células fueron cultivadas *in vitro*, en presencia de CEM-CN humanas, así como de adenosina y AMP purificados.

Observamos que con el cocultivo entre CEM-CN y TC-1 induce una reducción de la expresión de moléculas del CPH-I de aproximadamente un 50% en las células tumorales, y esta disminución permanece hasta 24 días posteriores a la conclusión del cocultivo. Sin embargo, no observamos una disminución de la expresión de moléculas del CPH-I al cultivar a las células TC-1 en presencia de adenosina purificada (Ado). Igualmente, la proliferación de las TC-1 no se vio afectada en presencia de CEM-CN ni de Ado, y sólo disminuyó en presencia de AMP purificado. Además, por medio de ELISA no detectamos una producción significativa de IL-10 en los medios condicionados por los cocultivos.

El cocultivo de células TC-1 con CEM-CN induce una disminución en la expresión de las moléculas del CPH-I sobre las células tumorales, mediante un mecanismo diferente a la producción de adenosina por la molécula CD73 y de IL-10. La consideración de esta propiedad de las CEM es relevante para el estudio biológico del microambiente tumoral y el desarrollo de estrategias antitumorales basadas en el empleo de CEM.



MARCO TEÓRICO

Cáncer

El término cáncer se usa para enfermedades en las que las células normales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos; las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo o linfático (ICN, 2014). La mayoría de los tipos de cáncer son causados por anomalías en el material genético de las células transformadas. Estas alteraciones pueden deberse a los efectos de sustancias cancerígenas como el benceno y otros químicos, el consumo excesivo de alcohol, fumar, exposición excesiva a la luz solar o toxinas ambientales, radiación, virus, agentes infecciosos, obesidad, mala alimentación, falta de ejercicio etc. (Thun, 2007). Otro tipo de promotor de cáncer y las anomalías genéticas puede adjudicarse a los errores al azar en la replicación del ADN, que son heredadas y por tanto, están presentes en todas las células desde el nacimiento. La heredabilidad del cáncer es por lo general afectada por complejas interacciones entre los agentes carcinógenos y el genoma del huésped (Moscow y Cowan, 2007). Una vez establecida la transformación celular, el establecimiento y desarrollo de un tumor se ve favorecido por múltiples factores, cuya activación conduce a la proliferación celular, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y la supresión de la respuesta inmune. Estos factores pueden ser intrínsecos, como las propias mutaciones, y extrínsecos, como lo es la asistencia de tipos celulares cuya función normal se ve subvertida. Aunque los mecanismos involucrados aún son motivo de investigación, las células estromales mesenquimales se cuentan entre estos tipos celulares que bajo condiciones alteradas pueden favorecer el desarrollo tumoral.



Células Estromales Mesenquimales (CEM)

Las células estromales mesenquimales (CEM) son una población de células troncales no hematopoyéticas localizadas esencialmente alrededor de la vasculatura y trabécula de la médula ósea, aunque también se encuentran en muchos otros tejidos y debido a su gran capacidad de migrar, su presencia se ve incrementada en sitios de inflamación, heridas y ciertas patologías como el cáncer (Chapel *et al.*, 2003). En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso tres criterios para definir las células madre 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* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Paez *et al.*, 2007). Las CEM expresan Complejo Principal de Histocompatibilidad clase 1 (CPH-I) pero no expresan moléculas CPH-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 madre hematopoyéticas (Locatelli *et al.*, 2007; Aggarwal y Pittenger 2005). Debido a las características que presentan las CEM, como son: su plasticidad, la secreción de citocinas y su baja inmunogenicidad, las hacen candidatas para terapia celular e ingeniería celular (Cárcamo, Trigueros 2008). Las CEM fueron usadas para la reparación de tejidos y recientemente han sido usadas para tratar infartos al miocardio (Cao *et al.*, 2009). Sin embargo, además de su potencial terapéutico, estudios demuestran que las CEM favorecen el crecimiento tumoral *in vivo* (Djouad *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006). También se ha reportado que CEM o células parecidas a éstas, pueden ser aisladas de varios tumores, como linfomas y sarcomas de médula ósea (Cao *et al.*, 2009) y CaCu (Montesinos *et al.*, 2008). La capacidad de las CEM para favorecer el desarrollo tumoral se debe en gran medida al potente efecto supresor que ejercen sobre células del sistema inmunológico.



Las CEM suprimen la proliferación de células T *in vitro*, aún bajo condiciones de estímulo, ya sea en presencia de mitógenos, aloantígenos o anticuerpos tales como antiCD3 y antiCD28 (Rasmusson *et al.*, 2003; Prevosto *et al.*, 2007 y Di Ianni *et al.*, 2008), y se ha visto que la proliferación de linfocitos T citotóxicos puede ser suprimida de manera independiente del CPH. La supresión de la proliferación de las células T estimuladas por linfocitos alogénicos, células dendríticas y mitógenos, como concavalina A o fitohemaglutinina ha sido bien documentada (Barry, Murphy 2004). Tanto la vía contacto célula-célula (Beyth *et al.*, 2005) como la actividad de factores solubles también mostraron estar involucrados en este proceso (Tse *et al.*, 2003; Di Nicola *et al.*, 2002). Como se describe en la figura 1 por otra parte han sido reportados datos que sugieren que la actividad inmunosupresora de las CEM no está asociada con la secreción de HGF (Hepatocyte Growth Factor) o TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) (Beyth *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2003) y que la supresión inmune al menos en parte, se debe a la generación de células Tregs CD8+ (Djouad *et al.*, 2003, Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007 y Di Ianni *et al.*, 2008). Más recientemente, ha sido reportado que las CEM alteran el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, con un incremento en la secreción de Interleucina-10 (IL-10) e IL-4 y un decremento en la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e Interferón- γ (IFN- γ) (Aggarwal, Pittenger 2005). Finalmente ha sido postulado que las CEM actúan suprimiendo la diferenciación de monocitos en células dendríticas maduras perjudicando la estimulación de células T (Beyth *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005).

El potencial inmunosupresor de las CEM se combina con su perfil de migración asociado con inflamación. Se sabe que bajo circunstancias normales las CEM trasplantadas migran a la médula ósea, pero en caso de algún daño las CEM pueden preferencialmente movilizarse a los sitios de inflamación (Yen y Yen 2008). Lo anterior ha sido comprobado por varios autores inicialmente por Stüdy *et al.*, en el 2002 en un modelo *in vivo* de ratones, al inyectar CEM



humanas marcadas con proteína verde fluorescente y mostrar su migración hacia tumores de melanoma implantados. Posteriormente Djouad *et al.*, en el 2003 encontró que el cotrasplante de CEM con células de melanoma en ratones favorece el establecimiento y rápido crecimiento del tumor, resultado que persiste aun cuando éstas son trasplantadas a un sitio distante del tumor; investigaciones del mismo equipo de trabajo, muestran que la presencia de las CEM facilita el crecimiento del tumor pero no tiene efecto en la metástasis, mientras que Karnoub *et al.*, 2007 encontró que cuando se administran CEM y células tumorales se incrementa el potencial metastásico.

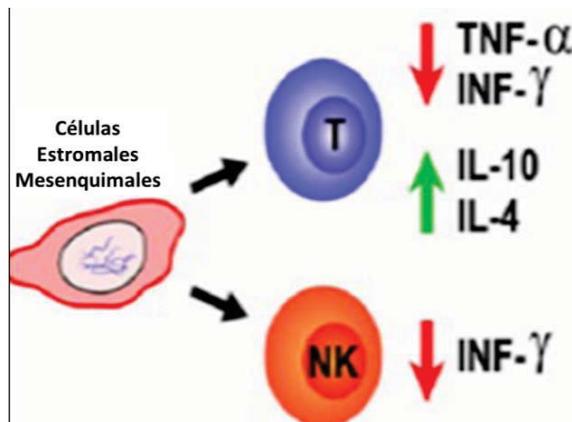
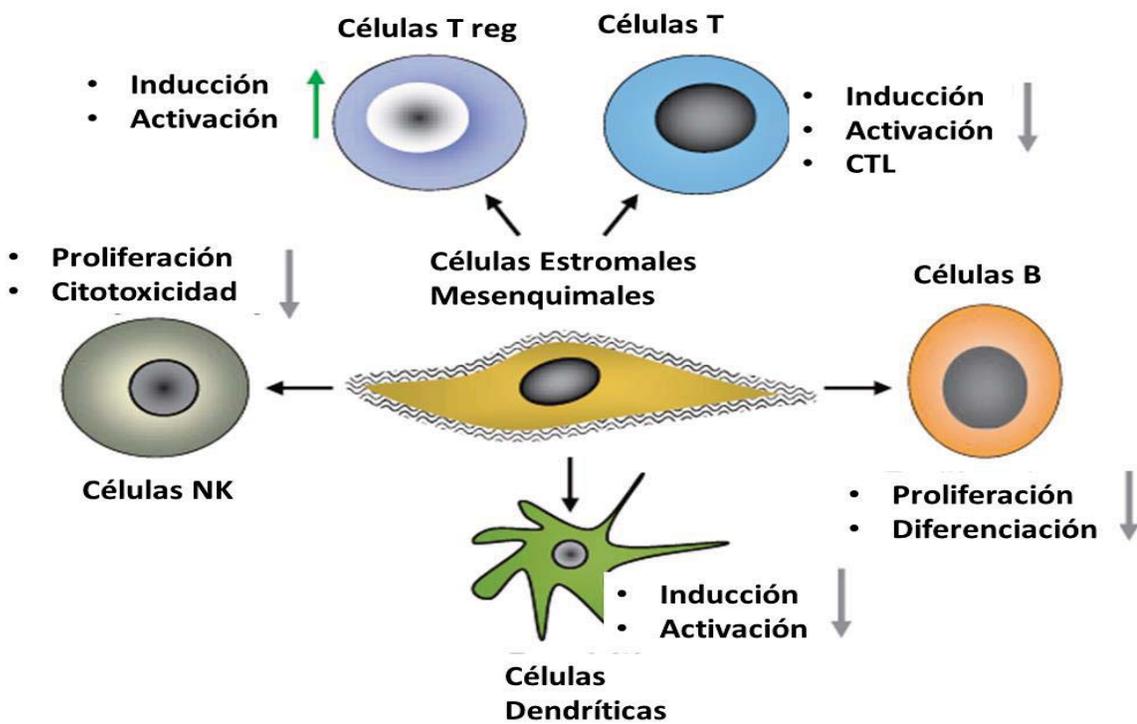


Figura 1. Características inmunológicas de las células estromales mesenquimales, (Stagg, 2008)



Vía adenosinérgica 5' -ectonucleotidasa (CD73)

La glicoproteína CD73, de 70 kDa, es expresada de manera importante por las células estromales mesenquimales, y es conocida como una 5'-ectonucleotidasa; está anclada a membrana, vinculada a glicosilfosfatidilinositol, y es encontrada en otros varios tejidos (Colgan *et al.*, 2006). Fue originalmente definida como un antígeno de diferenciación de los linfocitos y se expresa en muchos tipos de células incluyendo los subgrupos de linfocitos, las células endoteliales y las células epiteliales (Resta *et al.*, 1998). Esta molécula suprime las respuestas proinflamatorias en células endoteliales humanas (Grünewald y Ridley, 2010), se expresa ampliamente en muchas líneas celulares tumorales y está regulada en diversos carcinomas, incluidos los de colon, pulmón, páncreas y ovario (Spychala, 2000); y el aumento de los niveles de expresión se asocia con neovascularización tumoral, invasión, migración, adhesión y metástasis, y con menor tiempo de supervivencia en los pacientes con cáncer de mama (Wang *et al.*, 2008). Se cree que las acciones biológicas de CD73 son una consecuencia de la actividad enzimática fosfohidrolítica regulada de nucleótidos extracelulares, hidrolizando nucleótidos monofosfatos hacia nucleósidos bioactivos intermedios. CD73 unido a superficie metaboliza adenosina 5'-monofosfato (AMP) a adenosina (Colgan *et al.*, 2006; Zhang, 2010).

Se ha propuesto que la protección de tumores de las células T antitumorales es debido a la inmunosupresión mediada por la producción de adenosina extracelular por la vía adenosinérgica, la cual está presente en células cancerosas y constituye un importante mecanismo de escape inmune en tumores (Sitkovsky *et al.*, 2008; Pellegatti *et al.*, 2008). En esta vía, por efecto de la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1 (CD39) y la 5' ectonucleotidasa (CD73) la hidrólisis enzimática de ATP extracelular conduce a la generación de adenosina extracelular (Kobie *et al.* 2006). La generación de adenosina a través de este proceso ha sido reportado en células T reguladoras, células dendríticas foliculares y células epiteliales entre otras (Decking *et al.*,



1997; Synnestvedt *et al.*, 2002; Kobie *et al.*, 2006; Deaglio *et al.*, 2007 y Resta *et al.*, 1998). También se ha demostrado que células epiteliales tumorales de ratones expresan CD39 y CD73 y que algunas células tumorales, por ejemplo, de melanoma pueden producir adenosina. Es importante resaltar que CD73 es significativamente aumentada en los tejidos cancerosos acompañada de una alta actividad enzimática, lo que puede mediar en la producción de adenosina extracelular (Zhang, 2010; Szychala, 2000). Por lo tanto las células tumorales contribuyen a los elevados niveles de la adenosina en el microambiente tumoral a través de la actividad enzimática de CD73 y sus altos niveles de expresión en el tumor probablemente sean inducidos en el microambiente tumoral local (Giaccia *et al.*, 2003; Semenza, 2003).

Las funciones específicas inmunosupresoras de la adenosina incluyen la inhibición potencial de una serie de respuestas de células T como: regulación de CD25, secreción de IL-2 y citocinas proinflamatorias como el interferón- γ y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), inducción de moléculas efectoras citolíticas como perforinas y el ligando Fas, adhesión de los linfocitos asesinos a las células tumorales, exocitosis de gránulos por los linfocitos T citotóxicos, además puede suprimir células NK, e inhibe la proliferación de células T (Hoskin *et al.*, 2008).

La adenosina extracelular induce sus potentes efectos inmunosupresores vía 4 receptores (AR), específicos bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3 (Fredholm *et al.*, 2001; Linden *et al.*, 2001). Los AR 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 mediante la estimulación de ARs 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. ARA2A es un receptor de adenosina dominante en el dictado de respuestas de los linfocitos (Haskó *et al.*, 2008). Los receptores A2A y A2B, se encuentran dispuestos predominantemente en la membrana de linfocitos T citotóxicos CD8+, y son los responsables para ejercer un efecto regulador



sobre estas células efectoras (Lappas *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1997; Koshiba *et al.*, 1997). El receptor A2A de alta afinidad a adenosina, tiene un papel crítico en la protección del tejido normal contra la inflamación (Linden 2001; Jacobson, Gao, 2006). Sin embargo, se ha propuesto que el receptor A2A dispuesto en la membrana de los linfocitos T, protege a los tumores de la actividad antitumoral por estas células efectoras en un microambiente rico en adenosina (Ohta *et al.*, 2006). En un estudio reciente se ha demostrado que la vía adenosinérgica (CD73-Adenosina) a través de la producción de adenosina y su interacción con receptores A2B de adenosina incrementa la producción de IL-10 en célula de microglia (Koscsó *et al.*, 2012).

Dadas las fuertes propiedades inmunosupresoras de la adenosina y su concentración alta en los tumores sólidos, es razonable inferir que la adenosina puede constituir una parte importante de la llamada "barrera inmunológica" que conduce a un fracaso en la respuesta inmune antitumoral. Recientemente se han ideado algunos sistemas para contrarrestar el efecto inmunosupresor de adenosina en tumores, por ejemplo como se describe en la figura 3 la actividad de la 5'-nucleotidasa puede ser inhibida por una variedad de análogos de nucleótidos di-y tri-fosfatos. Los análogos del nucleótido ADP son más potentes que los de ATP. El análogo de ADP, adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) es un inhibidor relativamente selectivo de la enzima 5'-ectonucleotidasa (Sowa *et al.*, 2010; Zimmermann, 1992) y ha sido probado con éxito en modelos de tumores (Zhang, 2010). Por otro lado, se ha empleado el uso de antagonistas del receptor A2A como la cafeína, lo que ha permitido la reactivación de la actividad funcional de linfocitos T efectoras y la disminución del tamaño tumoral (Ohta *et al.*, 2006).

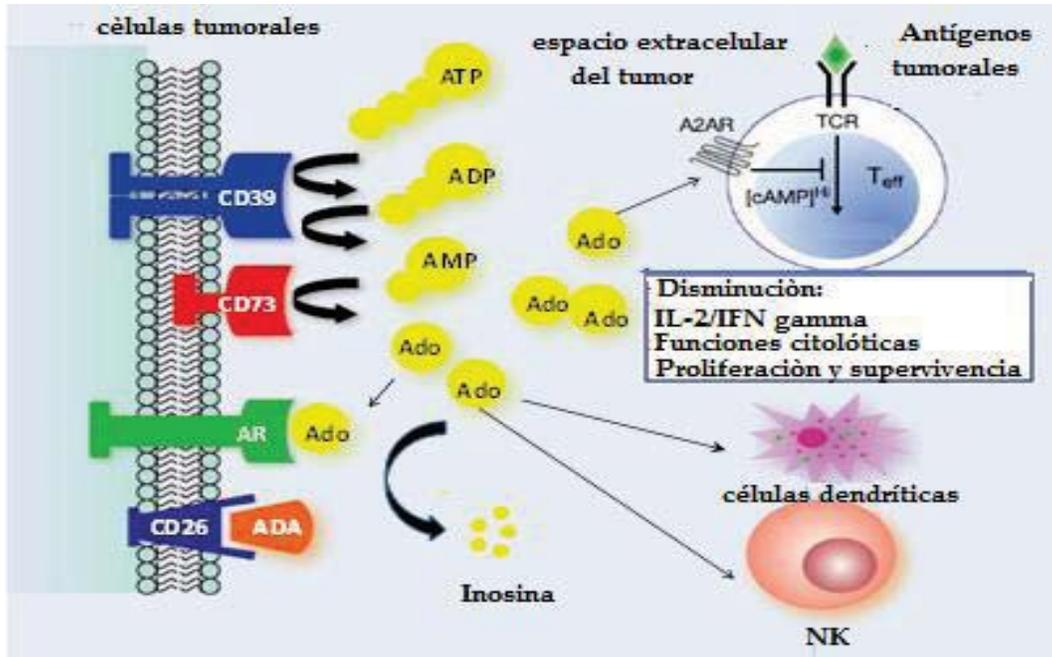


Figura 2. Vía adenosinérgica. Esquema del metabolismo de la adenosina extracelular inducida por el tumor en la supresión inmune, (Zhang *et al.*, 2010).

Sistema Inmune

El término inmunidad deriva de la palabra latina *immunitas*, las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta global coordinada a la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. Los mecanismos que normalmente protegen a los individuos de las infecciones y eliminan las sustancias extrañas son capaces, en ciertas circunstancias, de producir por si mismos lesiones y enfermedades tisulares. Por lo tanto, una definición de inmunidad es una reacción a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos así como macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, cualesquiera que sean las repercusiones fisiológicas o patológicas de esta reacción (Abbas *et al.*, 2006). La inmunidad es mediada por una variedad de diferentes células y moléculas, que son responsables de dos diferentes, pero relacionados sistemas, la Inmunidad Natural o Innata y la Inmunidad Específica, Adquirida o Adaptativa (Parham





2003). En la figura 3 las células y las moléculas de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo identifican y eliminan los microorganismos que han superado las barreras físicas y químicas y han logrado entrar en los tejidos blandos. Para responder a la infección el sistema inmunitario usa mecanismos innatos que son rápidos pero limitados y mecanismos adaptativos que se inician con lentitud pero que finalmente son poderosos y de memoria rápida. Además los vertebrados han desarrollado la defensa adicional de las respuestas inmunitarias adaptativas, que incluyen la participación de linfocitos T y B.

Inmunidad innata

La inmunidad innata comprende, en primer lugar, 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, mastocitos, células endoteliales. Los mecanismos humorales involucran: el sistema del complemento, las proteínas de fase aguda, los interferones α y β (Fainboim, Gefner 2005).

La gran mayoría de los microorganismos infecciosos son eliminados en horas por las células y moléculas del sistema inmune innato, las cuales reconocen constituyentes comunes de muchos microorganismos y son activadas inmediatamente al contacto con los agentes invasores. Estas células y moléculas poseen la habilidad para distinguir lo infeccioso (o infectado) de lo no infeccioso (o no infectado), a través de receptores capaces de reconocer constituyentes comunes de microorganismos y activar su destrucción, o a



través de mecanismos para reconocer constituyentes comunes de las células sanguíneas e inhibir su destrucción (Robertson, 1998).

Inmunidad Específica, Adquirida o Adaptativa

Una segunda forma de inmunidad, conocida como inmunidad adaptativa, se establece en respuesta a las infecciones y se adaptará para reconocer, eliminar y más tarde recordar al patógeno invasor. La inmunidad adaptativa se desarrolla a partir de la innata y comienza pocos días después de la infección inicial (Kindt, 2007). Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adquirida, la inmunidad humoral y la celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos o de sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica llamadas antígenos (Ag) (Abbas *et al.*, 2006).

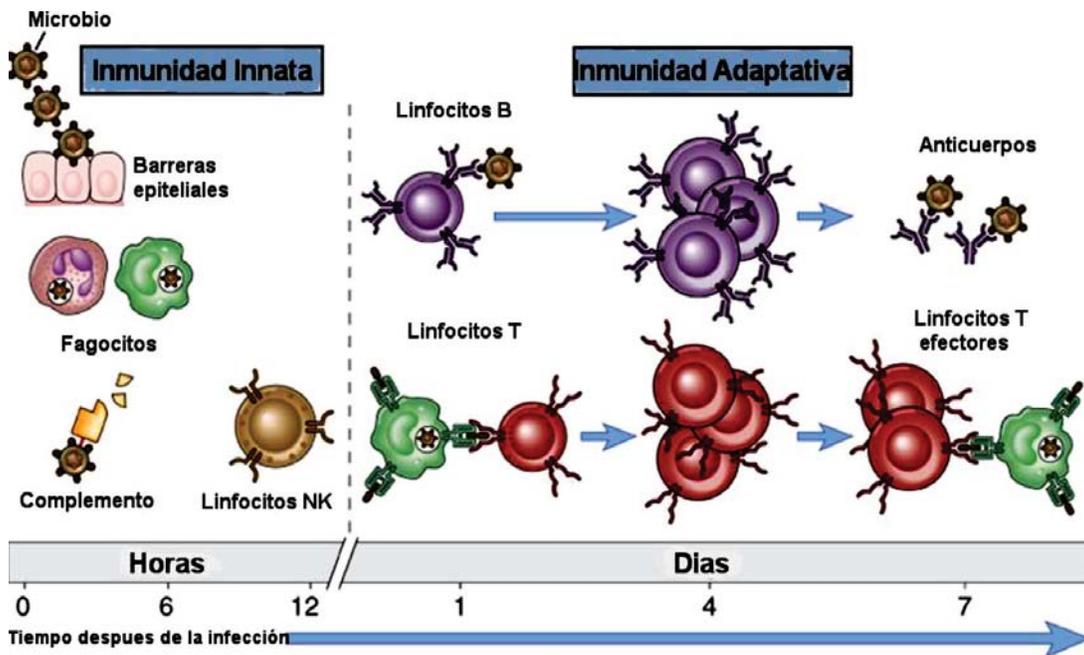


Figura 3. Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen la primera barrera defensiva contra la infección. Las respuestas inmunitarias adaptativas se desarrollan después y consisten en la activación de los linfocitos T y B, (Abbas *et al.*, 2006).



Inmunidad humoral

En la inmunidad humoral participan moléculas presentes en la sangre y en las mucosas, denominadas anticuerpos, que se producen a partir de células conocidas como linfocitos B. Estos anticuerpos reconocen específicamente antígenos microbianos, y los linfocitos neutralizan la infectividad de los microorganismos y dirigen su acción para su eliminación por diversos mecanismos efectoros. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas debido a que los anticuerpos secretados pueden unirse a estos microorganismos y toxinas para facilitar su eliminación (Roitt, 2004).

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. (Abbas *et al.*, 2006)

Linfocitos T

Las células T no producen anticuerpos, sus receptores de antígenos son moléculas de la membrana distintas de los anticuerpos, pero estructuralmente relacionadas con ellos. Los linfocitos T colaboradores y citotóxicos (LTC), tienen una especificidad limitada para los antígenos; sólo reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y que se expresan en la superficie de



otras células (Stites *et al.*, 2000). Los linfocitos T, células de la inmunidad celular, se subdividen en poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejor definidas son las células T colaboradoras (CD4) y las células T citotóxicas (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 CPH que reconocen. Aproximadamente el 70% de las células T son CD4 mientras que el 25% son CD8; cerca del 4% fuera del timo son CD4- CD8-, dobles negativas y el 1% pueden ser doble positivas (Abbas *et al.*, 2006).

Los linfocitos T auxiliares o CD4+, reconocen péptidos presentados por moléculas del CPH-II. Este reconocimiento es el estímulo inicial para su activación, además secretan proteínas llamadas citocinas que promueven la proliferación y diferenciación siendo la principal la interleucina 2 (IL-2). Se pueden distinguir dos grupos de células de las reacciones defensoras: TH1 que secretan: IL-2, IL-3, IFN γ y factor de necrosis tumoral (TNF) y las TH2 que secretan: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y GM-CSF (Marais *et al.*, 1999).

Los linfocitos T citotóxicos tienen la capacidad de destruir células extrañas; presentan en su superficie moléculas CD8+ y sólo reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas CPH-I. El linfocito T citotóxico activado produce gránulos citolíticos constituidos por enzimas proteolíticas (perforinas) para destruir células blanco (Van Leuween *et al.*, 1999). Por lo tanto los linfocitos CD8+ han sido considerados por muchos años las principales células efectoras contra el crecimiento de tumores (Abbas *et al.*, 2006).

Dentro de las funciones más importantes de los linfocitos T están la defensa frente a microorganismos intracelulares y la activación de otras células, como macrófagos y linfocitos B. La tarea de mostrar los antígenos de los microorganismos asociados a células para su reconocimiento por las células T es realizada por proteínas especializadas codificadas por genes situados en un *locus* llamado *Complejo Principal de Histocompatibilidad* (Roitt, 2004).



Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH)

Las moléculas de histocompatibilidad, llamadas en su conjunto como genes de histocompatibilidad, pueden influir en la capacidad de respuesta inmunitaria frente a antígenos particulares moldeando el repertorio de células T maduras. Las moléculas codificadas por los genes de histocompatibilidad en humanos son conocidas como Antígenos Linfocitarios Humanos (*HLA*, del inglés *Human Leukocyte Antigens*); mientras que en ratón son denominados como antígenos *H-2* (Rojas *et al.*, 2001; Anibal *et al.*, 1996; Guizar, 2001). Existen cuando menos cuatro familias de antígenos codificados por genes situados en la región CPH: los antígenos de clase I, II, III y IV. Dos de estas familias de antígenos CPH se muestran en la figura 4, (antígenos de clase I y II) corresponden a los antígenos principales de histocompatibilidad por ser las que participan en la comunicación entre células, la presentación de antígenos, regulación inmune, vigilancia inmunológica (importante para la detección y eliminación de células tumorales) y también como potentes antígenos de trasplante (Anibal *et al.*, 1996).

Las moléculas de CPH de clase I están constituidos por dos cadenas polipeptídicas separadas; una de 338 aminoácidos codificada por el CPH, denominada pesada, (cadena α) y otra cadena de 12 a 16 aminoácidos denominada β 2-microglobulina asociada no covalentemente a la cadena α y no unida directamente a la célula. Los genes que codifican para la cadena pesada de las moléculas de histocompatibilidad se encuentran en el cromosoma 6 en humanos; β 2-microglobulina es codificada en el cromosoma 15 en humanos. En el hombre existen tres CPH de clase I distintas, éstas son HLA-A, HLA-B y HLA-C, mientras que en ratón son H2-K, H2-D y H2-L, y todas ellas cumplen la función de presentación de péptidos a los linfocitos T CD8+. En cada caso, las moléculas codificadas por los tres locus se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células con excepción de los glóbulos rojos y el sincitio del trofoblasto (Trigo, Jimenez, 1997).

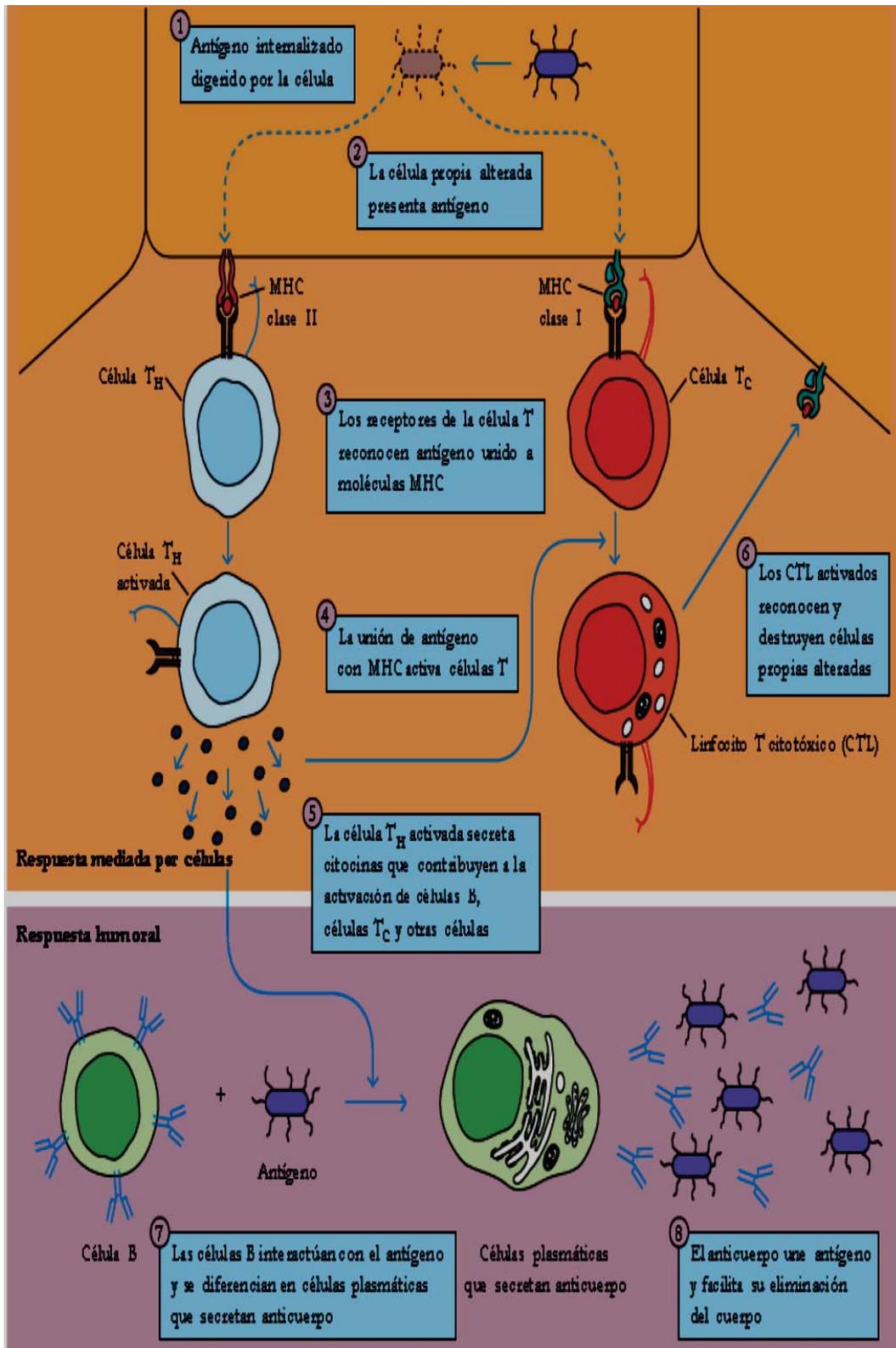


Figura 4. Vías CPH Procesamiento y presentación de antígeno, (Kindt *et al.* 2007).



Complejo principal de histocompatibilidad Clase I (CPH-I)

Las moléculas de CPH de clase I, se expresan de manera constitutiva en prácticamente todas las células; este patrón de expresión está ligado a las funciones de las células T con restricción por moléculas clase I del CPH.

Debido a que los virus pueden infectar cualquier célula nucleada, todas las células de este tipo deben presentar los ligandos que serán reconocidos por las células T CD8+, proporcionando así un sistema de presentación de los antígenos virales (Goldsby *et al.*, 2004; Estupiñán, 2004).

Como se muestra en la figura 5 las moléculas CPH clase I son sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) y en este sitio adquieren péptidos derivados de la degradación de proteínas citosólicas, provenientes de virus o de proteínas propias transformadas (en el caso de células tumorales) que son fragmentadas por proteasas multicatalíticas, constituidas por dos subunidades de bajo peso molecular denominadas LMP2 y LMP7, este conjunto enzimático es llamado proteasoma. Los péptidos generados por proteasomas son transportados al interior del RE por una proteína heterodímera denominada TAP (TAP-1/TAP-2) localizada en la membrana del RE y directamente comunicada con las moléculas CPH recién sintetizadas. Los péptidos se unen entre los dominios alfa 1 y alfa 2 de la cadena pesada del CPH y al ensamblarse con la subunidad β 2-microglobulina, el complejo formado (CPH-péptido) es trasladado a la membrana celular para ser presentado al receptor del linfocito T (Murphy *et al.*, 2008).

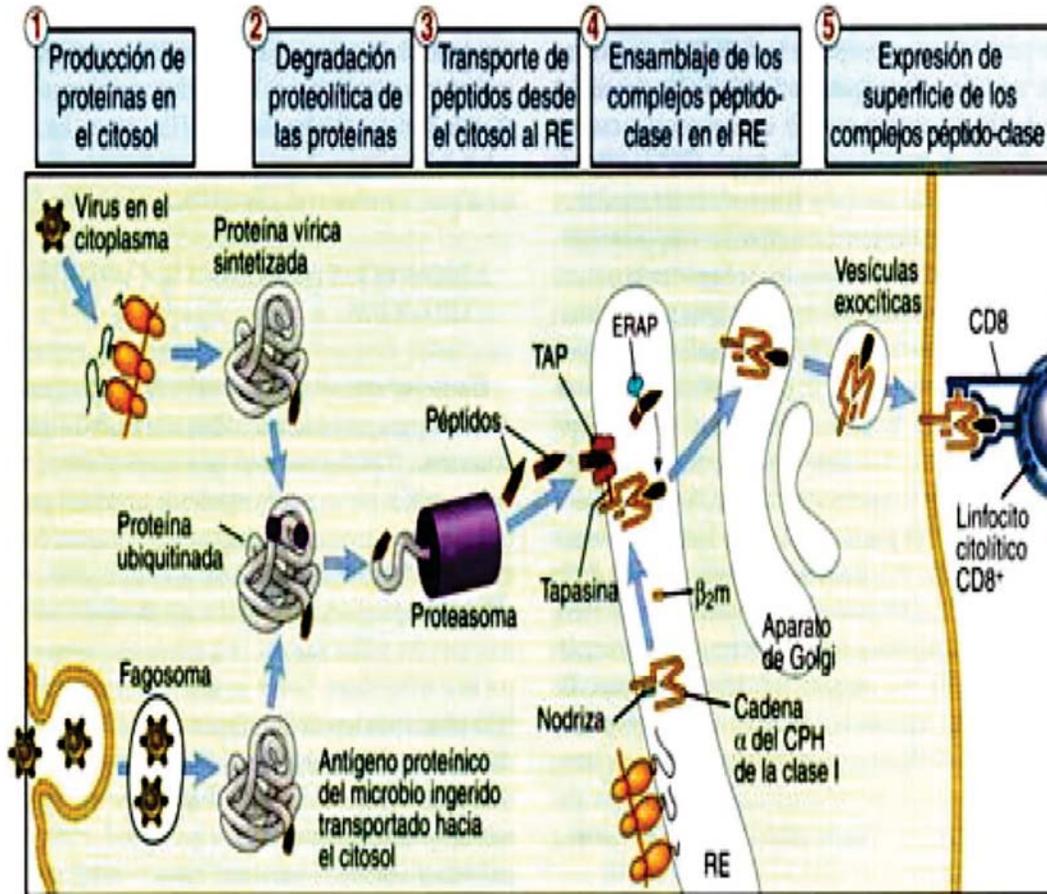


Figura 5. Procesamiento de antígeno asociado a moléculas del CPH-I (Abbas, 2004).

Virus del Papiloma Humano (VPH) y Cáncer Cérvico Uterino (CaCu)

El cáncer cervical o carcinoma de cuello uterino (CaCu), es la segunda causa más frecuente de muerte por neoplasias en mujeres en todo el mundo, después del cáncer de mama (Clifford *et al.*, 2002; Monie *et al.*, 2009), siendo un problema importante de salud pública, con medio millón de nuevos casos y cerca de 300.000 muertes cada año (Insinga *et al.*, 2009). En los países en desarrollo, el CaCu a menudo es el cáncer más común en las mujeres y puede constituir hasta un 25% de todos los tipos de cáncer en la mujer (Harro *et al.*, 2001); en México, esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad de mujeres entre 35- 59 años de edad (Sosa *et al.*, 2009).



La familia de los VPH cuenta con más de 150 tipos virales que en función de su tropismo se clasifican en cutáneos y mucosales. Los cutáneos se detectan primordialmente en las verrugas cutáneas, en las lesiones cutáneas de enfermos con epidermodisplasia verruciforme y en algunos cánceres de piel diferentes a melanoma. En relación con su potencial oncogénico, los VPH mucosales se clasifican en tipos de alto, probable y de bajo riesgo oncogénico. (Castellsagué *et al.*, 2007)

Los reportes epidemiológicos señalan que el ADN del VPH se presenta en 99.7% de los casos positivos CaCu y en estudios nacionales se ha reportado que la presencia de VPH de alto riesgo aumenta 78 veces la probabilidad de presentar CaCu (Hernández *et al.*, 2002; Tirado *et al.*, 2005). Alrededor de 30 tipos de VPH causan infecciones ano-genitales, como se aprecia en la figura 6 (Joura *et al.*, 2007); de éstos, 15 serotipos se consideran de alto riesgo (Muñoz *et al.*, 2004) siendo los tipos 16, 18, 31 y 45 los más frecuentes. Los tipos 16 y 18 originan 70% de los casos de CaCu (Bosch *et al.*, 2008).

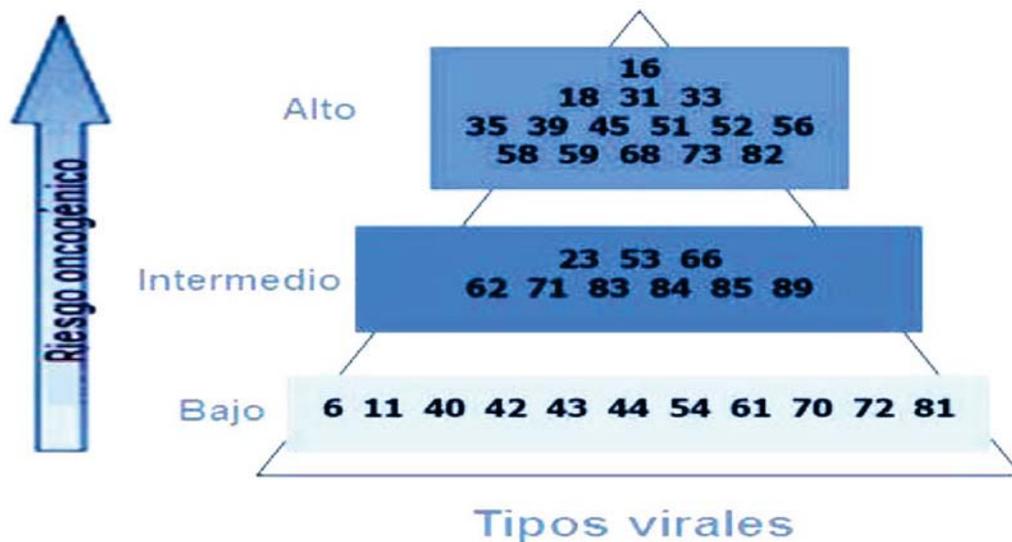


Figura 6. Riesgo oncogénico asociado a los diferentes genotipos virales causantes del CaCu (Markowitz *et al.*, 2007).

Se estima que al menos la mitad de las mujeres en el mundo se ha infectado por VPH en algún momento en su vida. La infección por el VPH causa además



otros carcinomas anogenitales, incluyendo el cáncer de pene, vagina, vulva y ano. Además, se ha implicado al VPH como posible agente causal de cánceres no anogenitales, como algunos carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (García, 2007).

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, de estructura icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) con un diámetro aproximado de 55nm, como se aprecia en la figura 7 (Hebner *et al.*, 2006). Los VPH son pequeños, con un genoma circular de doble cadena de aproximadamente 8kb mostrado en la figura 8 (Howley *et al.*, 2006). El genoma del VPH comprende ocho marcos de lectura abierta (ORF) divididos entre la región temprana que codifica las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y la región tardía, que codifica las proteínas L1 y L2. (Spink *et al.*, 2005).

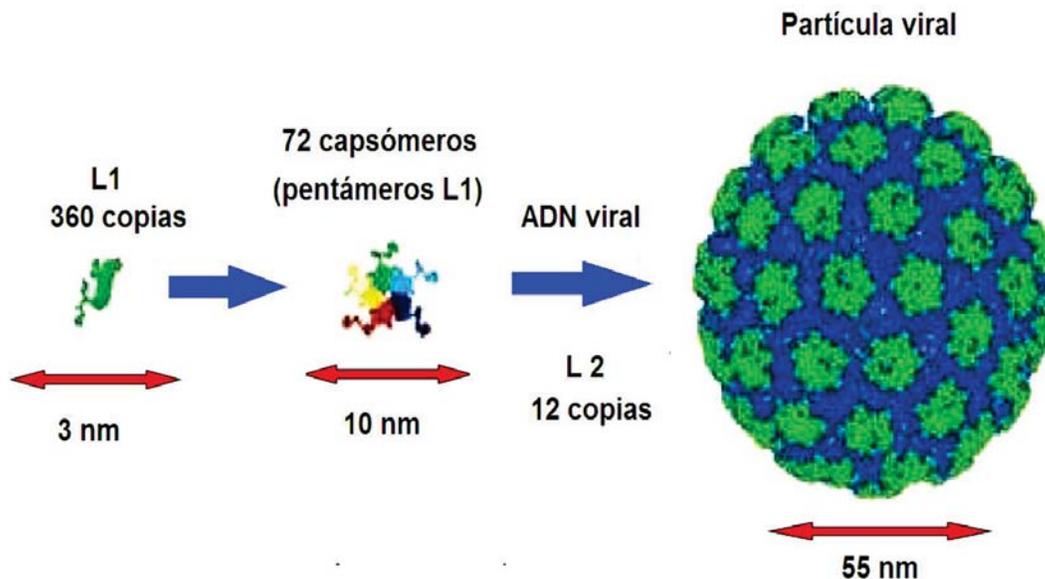


Figura 7. Estructura de una partícula del Virus del Papiloma Humano (VPH) (Hebner *et al.*, 2006).

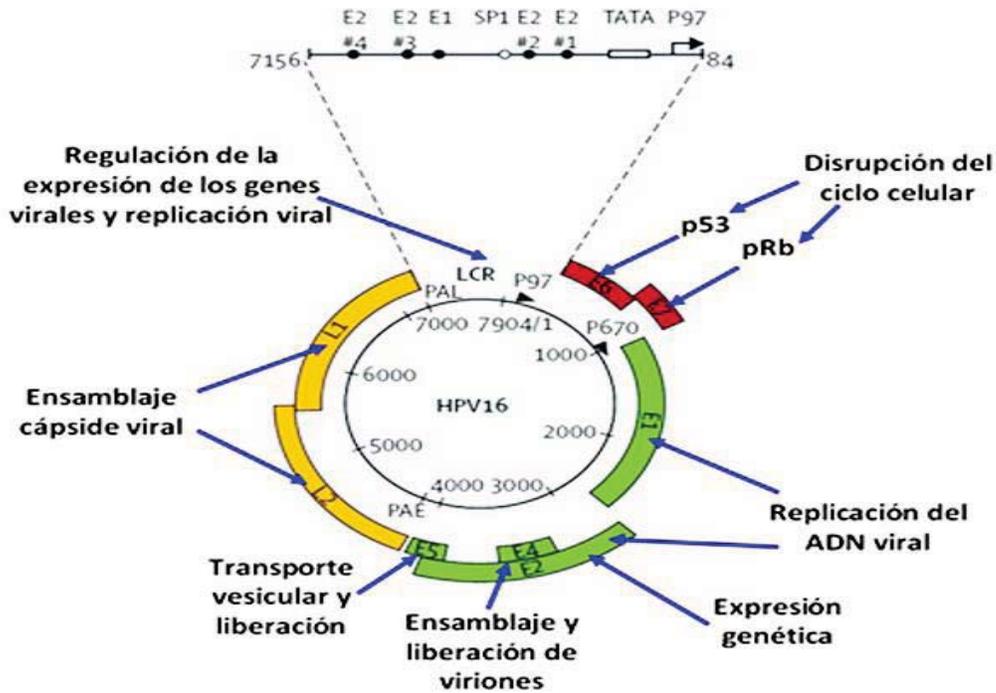


Figura 8. Genoma del VPH (Schiffman *et al.*, 2007)

Las distintas etapas del ciclo de vida de VPH se desarrollan en la zona de transformación cervical, mostrada en la figura 9 en ella permanentemente sufre cambios en el epitelio escamoso, que es el área más vulnerable a la infección del epitelio cervical (Giroglou *et al.*, 2001). En la célula infectada la expresión de las proteínas E1 y E2 conduce la replicación del genoma viral manteniendo inicialmente un bajo número de copias de ADN. Sin embargo, este número de copias aumenta dramáticamente cuando se mueven las células infectadas a las capas superiores del epitelio. Durante esta fase de amplificación, los genomas son empaquetados en viriones infecciosos antes de su liberación. La activación del promotor dependiente de diferenciación conduce a una mayor expresión de las proteínas E1, E4 y E5, mientras que la L1 y la L2 se expresan en la capa superior del epitelio para facilitar su ensamblaje y la formación de viriones. El virión que se libera puede infectar el epitelio basal o extenderse a nuevos huéspedes (Stanley, 2006).



Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH actúan para aumentar la proliferación de las células infectadas por el VPH en el epitelio. La actividad de estas proteínas subvierte el proceso normal de diferenciación terminal, provocando un aumento en el número de células infectadas que a la larga producen viriones infecciosos. Las proteínas E6 y E7 estimulan la progresión del ciclo celular y ambas están asociadas con reguladores del ciclo celular. La principal función de la proteína E6 es la de unirse a la proteína supresora de tumores p53 en conjunción con la ligasa de ubiquitina celular E6AP y marcar a p53 para la degradación. Por otra parte, la asociación de E7 con los miembros de la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular ha sido bien caracterizada. Se sabe que pRb es un regulador negativo del ciclo celular que controla la entrada en la fase S al asociarse con los miembros de la familia E2F de factores de transcripción de ADN; en este sentido, E7 interrumpe esta función mediante la unión a pRb y desplazando las proteínas E2F. Por lo tanto las células entran en la fase S y activan los factores de la replicación celular, necesarios para la replicación viral. E7 también marca pRb para la degradación proteolítica por la vía de proteosomas de ubiquitina a través del proteosoma 26S (Abdul *et al.*, 2009).

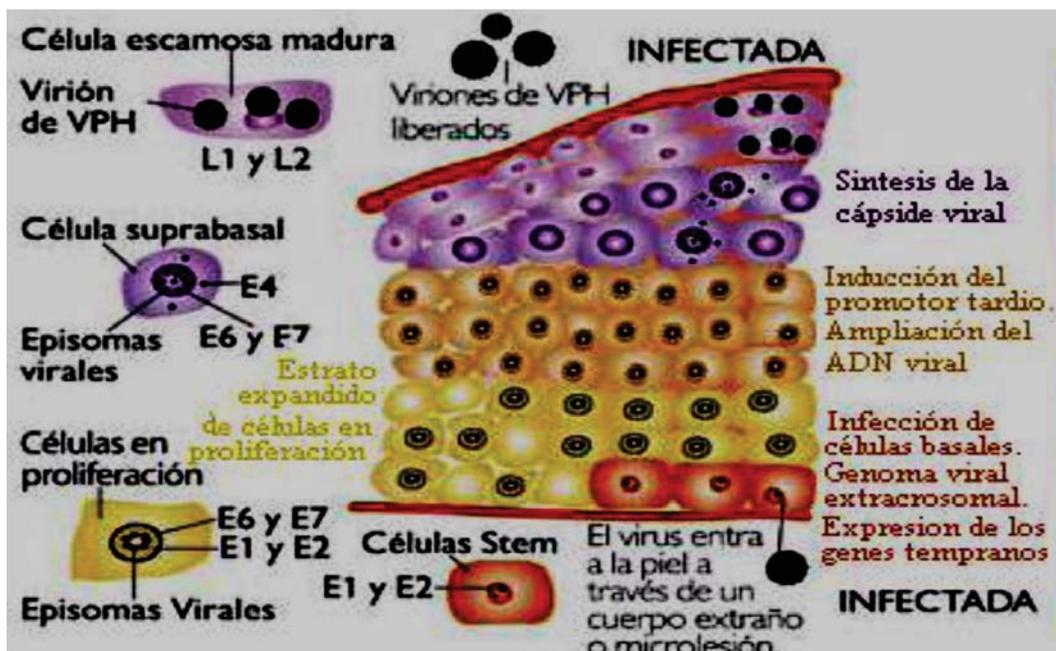


Figura 9. Etapas del ciclo de vida del VPH (Frazer, 2004)



Respuesta inmune contra el CaCu y sus mecanismos de evasión.

El VPH ha evolucionado conjuntamente con los humanos durante mucho tiempo y por tanto, su ciclo replicativo es muy complejo, de tal forma que puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con un bajo perfil de expresión, lo que genera una muy pobre respuesta inmune innata (Tindle, 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), debido a que el 70-90% de mujeres infectadas resuelven la infección en 12 a 30 meses (Evander *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando la infección es persistente y el sistema inmune está suprimido, se puede favorecer la integración del genoma del VPH a la célula hospedera, y eventualmente el desarrollo de una neoplasia que puede derivarse hacia tumores avanzados con metástasis (Zur Hausen, 2000).

Las infecciones virales son inicialmente intracelulares y los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. El sistema inmune está involucrado en la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el VPH, en especial la respuesta inmune mediada por células. En las etapas previas al cáncer invasor, el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener el tumor localizado. Durante la regresión de las verrugas genitales se presentan infiltrados locales de células mononucleares, incluyendo LTC, NK y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas. Sin embargo las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T antitumorales. Estos mecanismos pueden cooperar en etapas avanzadas del cáncer para limitar la capacidad del sistema inmune para frenar el tumor y la eficacia de las estrategias de inmunoterapia para erradicar con éxito las células malignas (Rabinovich *et al.*, 2007).

Dichos mecanismos incluyen: anomalías en la presentación de antígenos como la ausencia total de la expresión de CPH-I causada por mutaciones del



gen β 2-microglobulina; disminución de la expresión de CPH-I debido a la pérdida selectiva de los distintos alelos HLA (Rivoltini *et al.*, 2002; Hicklin *et al.*, 1999; Wang Z *et al.*, 1993; Natali *et al.*, 1989); 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 procesamiento de antígenos (TAP) y los componentes del inmunoproteasoma (LMP2 y LMP7) (Marincola *et al.*, 2000; Rivoltini *et al.*, 2002); falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos; además de la evasión de la respuesta inmune por el tumor se ve favorecida por la inducción de linfocitos T reguladores específicos de antígeno, su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser *et al.*, 2007; Molling *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007).

Debido a la estrecha relación causal entre la infección por el VPH y el desarrollo de CaCu y otras patologías, se desarrollan múltiples estrategias que tienen como objetivo prevenir o revertir la transformación celular inducida por el virus, por medio del reconocimiento inmune de las células infectadas. De este

modo, ha sido profusamente empleado como modelo de progresión tumoral la implantación en ratones de células singénicas transfectadas para expresar las proteínas virales. Particularmente, las células TC-1 en los ratones C57BL/6 desarrollan tumores que permiten evaluar la eficacia de inmunizaciones dirigidas hacia las proteínas oncogénicas E6 y E7 del HPV-16, en el contexto de moléculas de histocompatibilidad clase-I H-2^b.



PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer es un problema de salud pública en todo el mundo, representando unas de las causas principales de decesos (OMS, 2014). El cáncer cervico-uterino se encuentra fuertemente asociada con la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo (Walboomers *et al*, 1999). Se ha reportado que durante el desarrollo de la neoplasia cervical, varios factores inmunosupresores pueden intervenir para evitar la respuesta inmune celular de manera eficiente, ya que las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento inmune (Tindle, 2002). Los tumores muestran comúnmente una disminución en la expresión de moléculas CPH-I y en las moléculas del procesamiento de antígenos, lo cual está asociado con un bajo o nulo reconocimiento mediado por células T (Mehta *et al.*, 2008). Este fenómeno está relacionado con la infiltración de células inmunosupresoras en el microambiente tumoral, tal como las células T reguladoras y células estromales mesenquimales (Crosbie *et al*, 2013). Nuestro grupo de investigación ha obtenido y caracterizado CEM. En estudios *in vitro* hemos encontrado que CEM cocultivadas con células tumorales de cáncer cérvico uterino, favorecen la disminución en la expresión de moléculas CPH-I en las células tumorales, evitando el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. Además la producción IL-10 fue asociada con la disminución en la expresión de moléculas CPH-I en las células tumorales. Aunado a esto la producción de IL-10 fue asociada con un bajo o nulo reconocimiento por las moléculas CPH-I en células tumorales (Montesinos *et al*, 2013). En nuestro grupo de estudio se han realizados trabajos en un modelo de ratón con una protección inmune y se sometió a un reto tumoral, donde se observó que al administrar CEM, estas células son capaces de suprimir la respuesta inmune antitumoral y de favorecer el crecimiento tumoral (Don, 2010 y Contreras, 2011). Por ello en este estudio se plantea analizar si la generación de adenosina mediante la vía adenosinérgica (CD73-adenosina) influye en la disminución de moléculas CPH-I en las células tumorales cuando éstas son cocultivadas con las CEM. Los resultados de este estudio serán de gran importancia para poder establecer estrategias terapéuticas que permitan contrarrestar la evasión de la respuesta inmune producida por las CEM y mejorar la respuesta inmune antitumoral.



HIPÓTESIS

Se sabe que las células estromales mesenquimales (CEM) son atraídas hacia el microambiente tumoral donde secretan diversos factores con función inmunosupresora y que eventualmente pueden favorecer el desarrollo tumoral. Entre estos factores se cuentan la producción de adenosina y de interleucina-10. También, está ampliamente documentado que el desarrollo tumoral se asocia con una deficiente actividad de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Por tanto, en el presente estudio se espera una disminución en la expresión de moléculas CPH-I (H-2^b) en las células tumorales de ratón TC-1 al cultivarlas con CEM-CN.



OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto de células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal (CEM-CN) en la proliferación y en la expresión de moléculas del CPH-I (H-2^b) de células tumorales TC-1.

Objetivos particulares

- a) Evaluar el efecto de CEM-CN sobre la expresión de moléculas CPH-I (H-2^b) en las células tumorales TC-1.
- b) Analizar la participación directa de Adenosina y AMP sobre la expresión de moléculas CPH-I (H-2^b) en las células tumorales.
- c) Evaluar la presencia de IL-10 de medios condicionados de cultivos y cocultivos de CEM-CN y células TC-1.
- d) Evaluar el efecto de CEM-CN sobre la proliferación las células tumorales TC-1.
- e) Analizar la participación directa de Adenosina y AMP sobre la proliferación en las células tumorales TC-1.



MATERIAL Y MÉTODO

Líneas y estirpes celulares.

Las células TC-1 son derivadas de carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6, y expresan de manera permanente los genes *E6* y *E7* de VPH-16 junto con el gen *Ras* (Lin *et al.*, 1996). Estas células fueron cultivadas con medio de cultivo RPMI 1640 (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino (Life Technologies, USA) al 10%. También se emplearon células estromales mesenquimales (CEM) provenientes de cérvix normal (CEM-CN) mantenidas con medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino (Life Technologies, USA) al 15%. Las CEM utilizadas en este proyecto fueron caracterizadas bajo los criterios morfológicos, fenotípicos y de diferenciación, establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Montesinos *et al.*, 2009). Todas las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C con 5 % de CO₂ y humedad saturada.

Evaluación del efecto de CEM-CN y adenosina en la proliferación y expresión de moléculas CPH-I (H-2^b) de células TC-1.

Para analizar el efecto de las CEM-CN sobre la proliferación y expresión de moléculas H-2^b en las células tumorales TC-1, se realizaron cocultivos de forma directa entre 5x10⁴ CEM-CN y 2x10⁵ TC-1, mantenidos con 60% de medio de cultivo DMEM y 40% de medio de cultivo RPMI 1640 con suero fetal de bovino (SFB) (Life Technologies, USA) al 15%, durante 96 horas.

Para evaluar el efecto de la adenosina, 2x10⁵ células TC-1 fueron incubadas en RPMI al 10% de SFB (Life Technologies, USA) durante 96 horas en presencia



de diferentes concentraciones de adenosina purificada (Sigma,USA) y de AMP y APCP (Sigma, USA) donde correspondía.

Determinación de la expresión de moléculas del CPH clase I (H-2^b).

Después de los cultivos de 4 días, las células se cosecharon por remoción con tripsina 0.05% en EDTA, y se pasaron a placas de 96 pozos fondo U para incubarse con anticuerpo anti-H-2D^b/H-2K^b (Novus Biologicals, USA), a una dilución 1:50 durante 30 minutos en frío (<5°C) y en oscuridad. Después de este tiempo, las células se lavaron con PBS-SFB al 2%, para eliminar el exceso del anticuerpo. Posteriormente las células se incubaron con un anticuerpo secundario (FITC-Goat anti-mouse IgG Zymed Laboratories Invitrogen Immunodetection, USA) (dilución 1:100) por 15 minutos a 4°C y en oscuridad, y se lavaron las células con PBS-SFB 2% en 2 ocasiones. Por último las células se colocaron en tubos de plástico con 200 µl de solución PBS-SFB y con 200µl de paraformaldehído al 4% para fijar las células y realizar su lectura en un citómetro de flujo (FACScalibur Becton Dickinson, USA).

Determinación de la concentración de IL-10 en los medios condicionados por CEM-CN y TC-1.

Para determinar la concentración de IL-10 en medios condicionados por las células tumorales TC-1 cocultivadas con CEM y TC-1 cultivadas con medio previamente condicionado de CEM-CN se utilizó la técnica de ELISA (PeproTech).

En una placa para ELISA de 96 pozos (Costar USA), se colocaron por triplicado 100µl de un anticuerpo monoclonal específico para IL-10 a una concentración de 2.0µg/ml y se dejó incubando durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se lavó 4 veces con 300µl de una solución de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) y se bloquearon los espacios vacíos con una solución de bloqueo



(BSA-PBS 1%) por 1h. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar 4 veces y se añadió 100µl de una muestra estándar en diferentes concentraciones (3000-46.8) y 100µl de la muestra problema, y se incubó por 2h. Una vez transcurrido este tiempo se lavó 4 veces la placa con 300µl de una solución de lavado (PBS-Tween 0.05%) y a continuación se adicionaron 100µl de un anticuerpo específico para IL-10 y ligado a la enzima peroxidasa a una concentración de 0.5µg/ml dejándolo en incubación por 2h (este anticuerpo fue diluido en una solución de PBS-0.05%Tween-20 y 0.1% BSA). Después se realizaron 4 lavados para remover el anticuerpo ligado a enzima que no se unió; después se adicionó 100µl por pozo de una solución de avidin-HRP conjugada 1:2000 y se incubó por 30min. Posteriormente se lavó 4 veces y se añadió 100µl de substrato ABTS (2,2'azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, SIGMA,USA) a temperatura ambiente; se monitoreó el desarrollo de color cada 10min durante 1h. La intensidad del color verde fue determinada en un lector de placas de ELISA (Molecular Device Emax) a una longitud de onda de 405nm con una corrección a 650nm.

Evaluación de la proliferación celular.

Para medir la proliferación de las células tumorales TC-1, se marcaron 1×10^6 células con $1 \mu\text{M}$ de *Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester* (CFSE, Sigma) en 1 ml de PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con medio de cultivo con SFB se contaron las células para sembrarlas con los tratamientos correspondientes. Al término de 4 días de cultivo, se midió la fluorescencia emitida por la CFSE en las células TC-1 a través de citometría de flujo. Una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por la CFSE es considerada como un indicativo proporcional de proliferación celular.



RESULTADOS

Células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal inducen una reducción en la expresión de moléculas del CPH clase I (H-2^b) en células tumorales TC-1.

Las células estromales mesenquimales tienen la capacidad de suprimir al sistema inmune, afectando la respuesta de linfocitos T, linfocitos B, y células asesinas naturales, e induciendo células dendríticas tolerogénicas inmaduras y linfocitos T reguladores (Uccelli *et al.*, 2007; Rasmusson *et al.*, 2003; Prevosto *et al.*, 2007 y Di Ianni *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce si las CEM afectan también directamente a las células tumorales para favorecer su escape inmunológico. Por tanto, en el presente estudio evaluamos *in vitro*, si las CEM provenientes de Cérvix Normal (CEM-CN), influyen en el reconocimiento de células tumorales por parte de los linfocitos T citotóxicos, el cual depende de la expresión de las moléculas del CPH clase-I en las células blanco.

Las células TC-1 de ratón se cultivaron en presencia de CEM-CN o de medio previamente condicionado por CEM-CN. Después de 4 días se analizó la expresión superficial de moléculas H-2^b en las células TC-1 y en ambos casos se observó una disminución en su expresión entre 30 y 40%, con respecto al control (Figura 10). En la figura 11 se observa que esta disminución en la expresión de las moléculas del CPH clase-I de las células TC-1 cocultivadas con CEM-CN con respecto a las células control persistió hasta 24 días después de concluido el cocultivo. A los 4 días de cocultivo hay una baja de más del 50% del CPH clase I en células TC-1+CEM CN a comparación con nuestro control; terminado el cocultivo, se evaluó cada 4 días la expresión de las moléculas del CPH-I en las células TC-1 y para el día 8 la baja de más del 50% se mantenía, para el día 12 la baja de CPH clase I era de un 40%, y para el día 16 y 20 la baja era tan solo del 10% aproximadamente; para el día 24 las moléculas del CPH clase I ya se había restablecido a poco más del 98%.

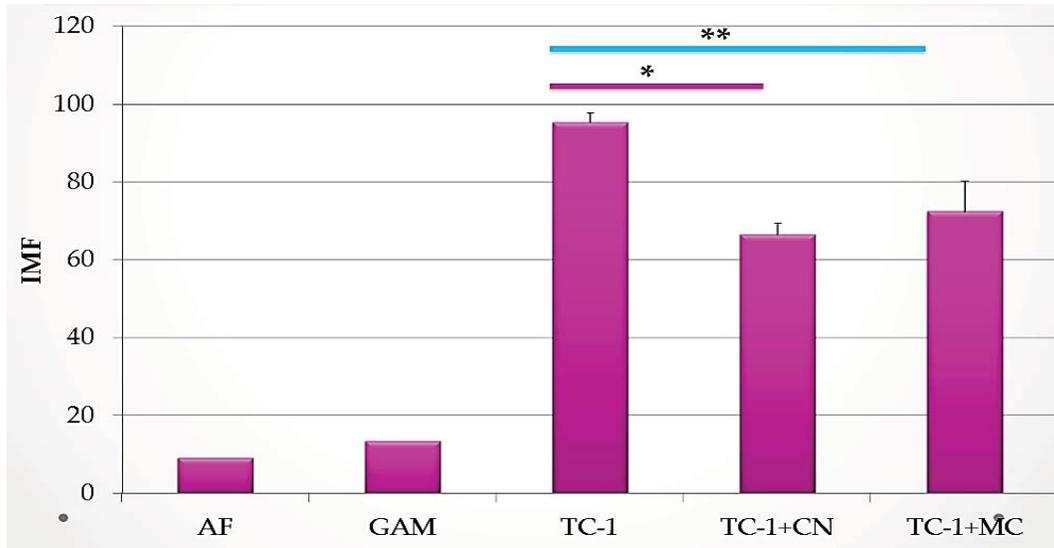


Figura 10 Expresión de moléculas del CPH-I (H-2^b) en células TC-1 cocultivadas con CEM-CN. Las células TC-1 fueron cultivadas durante cuatro días en ausencia de estímulo (TC-1), en presencia de células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal (TC-1+CN) o de medio condicionado previamente por las células estromales mesenquimales (TC-1+MC). Al término de la incubación la expresión de moléculas del CPH-I fue determinada mediante citometría de flujo. IMF: intensidad media de fluorescencia; AF: autofluorescencia; GAM: incubación sólo con anticuerpo secundario. * p=0.00014345, **p=0.00752906

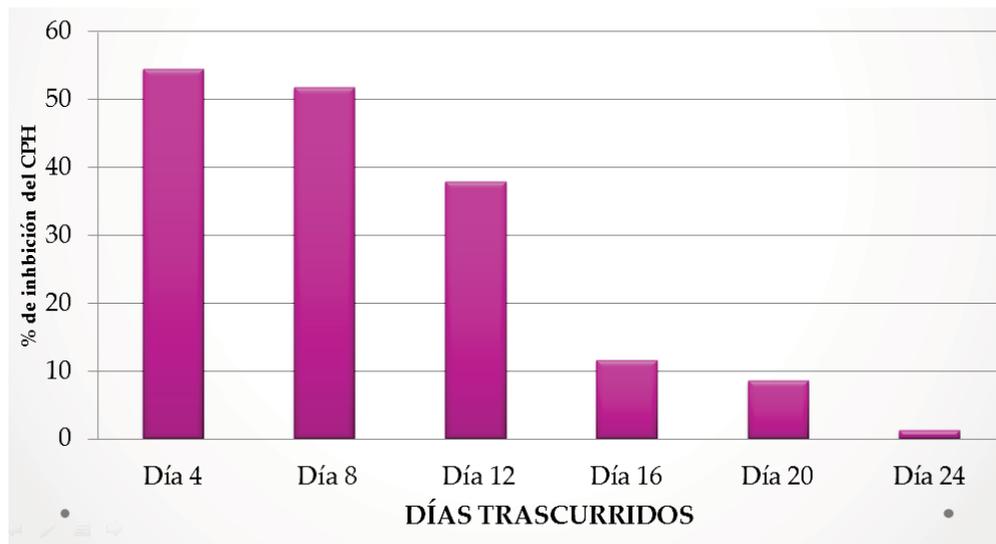


Figura 11. Expresión de moléculas H-2^b determinada mediante citometría de flujo, en células TC-1, posteriormente al término del cocultivo con células estromales



mesenquimales derivadas de cérvix normal. El porcentaje de inhibición de la expresión se determinó mediante la fórmula:

$$(1 - [\text{IMF de TC-1 proveniente de cocultivo} / \text{IMF de TC-1 control}]) \times 100.$$

Se sabe que la acción biológica de la ectoenzima CD73, presente en las CEM entre otras, es la hidrólisis de nucleótidos monofosfatos como el AMP hacia nucleósidos bioactivos intermedios como lo es la adenosina, y que este metabolito presenta una actividad supresora sobre los linfocitos T. Para evaluar si la capacidad de las CEM-CN para inducir una disminución en la expresión de moléculas del CPH clase-I en las células TC-1 podría deberse también a esta vía, cultivamos a las células TC-1 con el substrato de CD73: AMP, en ausencia o presencia de CEM-CN. En la figura 12 se observa que en cocultivos de TC-1 con CEM-CN la adición de AMP no afectó significativamente la inhibición de la expresión de moléculas del CPH-I en las TC-1 inducida por las CEM-CN. Sin embargo, claramente esta inhibición se ve revertida cuando al cocultivo en presencia de AMP se le adiciona también APCP, un inhibidor de la actividad mediada por CD73, lo cual podría sugerir la participación de CD73 y de adenosina en esta inhibición. Por otra parte, la adición de AMP en el cultivo de células TC-1 en ausencia de CEM-CN no tuvo ningún efecto sobre la expresión de las moléculas del CPH-I en las células TC-1.

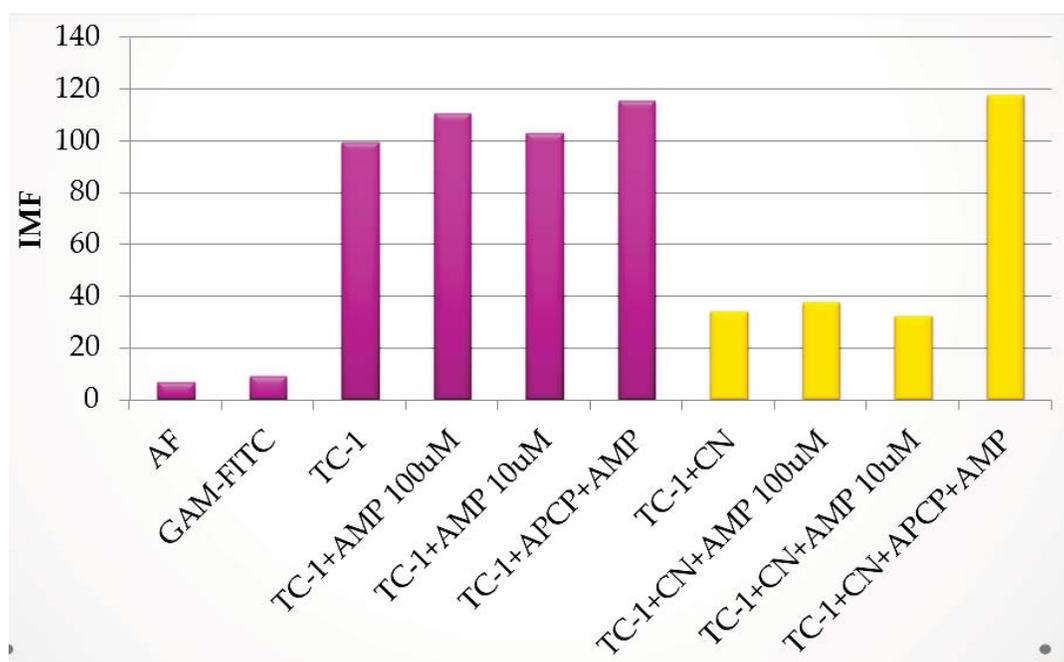




Figura 12 Expresión de moléculas del CPH-I (H-2^b) en células TC-1 incubadas con CEM-CN, AMP y APCP. Las células TC-1 fueron cultivadas durante cuatro días en ausencia de estímulo (TC-1), o en presencia de células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal (TC-1+CN). Donde correspondió se adicionó 10 ó 100 μ M de monofosfato de adenosina (AMP) o el inhibidor de CD73 difosfato de adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno (APCP). Al término de la incubación la expresión de moléculas del CPH-I fue determinada mediante citometría de flujo.

IMF: intensidad media de fluorescencia; AF: autofluorescencia; GAM: incubación sólo con anticuerpo secundario.

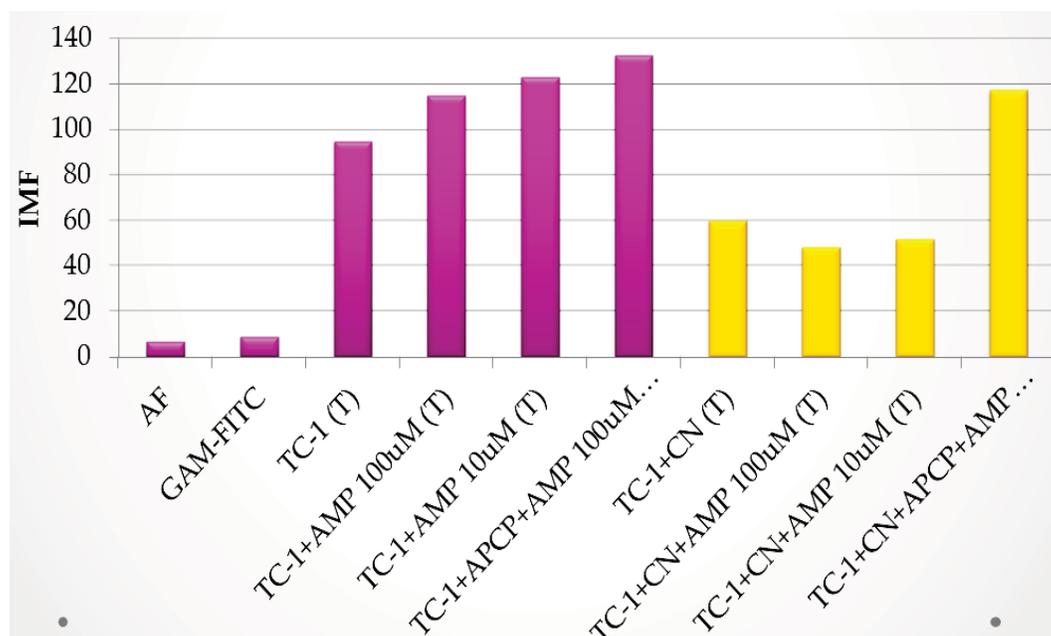


Figura 13 Expresión de moléculas del CPH-I (H-2^b) en células TC-1 incubadas con CEM-CN, AMP y APCP. Las células TC-1 fueron cultivadas durante cuatro días en ausencia de estímulo (TC-1), o en presencia de células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal (TC-1+CN), separadas por medio de una membrana permeable (*transwell*). Donde correspondió se adicionó 10 ó 100 μ M de monofosfato de adenosina (AMP) o el inhibidor de CD73 difosfato de adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno (APCP). Al término de la incubación la expresión de moléculas del CPH-I fue determinada mediante citometría de flujo.

IMF: intensidad media de fluorescencia; AF: autofluorescencia; GAM: incubación sólo con anticuerpo secundario.

Resultados semejantes fueron obtenidos cuando el cocultivo se realizó con los tipos celulares separados por una membrana permeable (*transwell*), lo cual indica que la inhibición de la expresión de moléculas del CPH-I en las células



TC-1 es inducida por lo menos parcialmente por medio de factores solubles secretados por las CEM-CN (Fig 13).

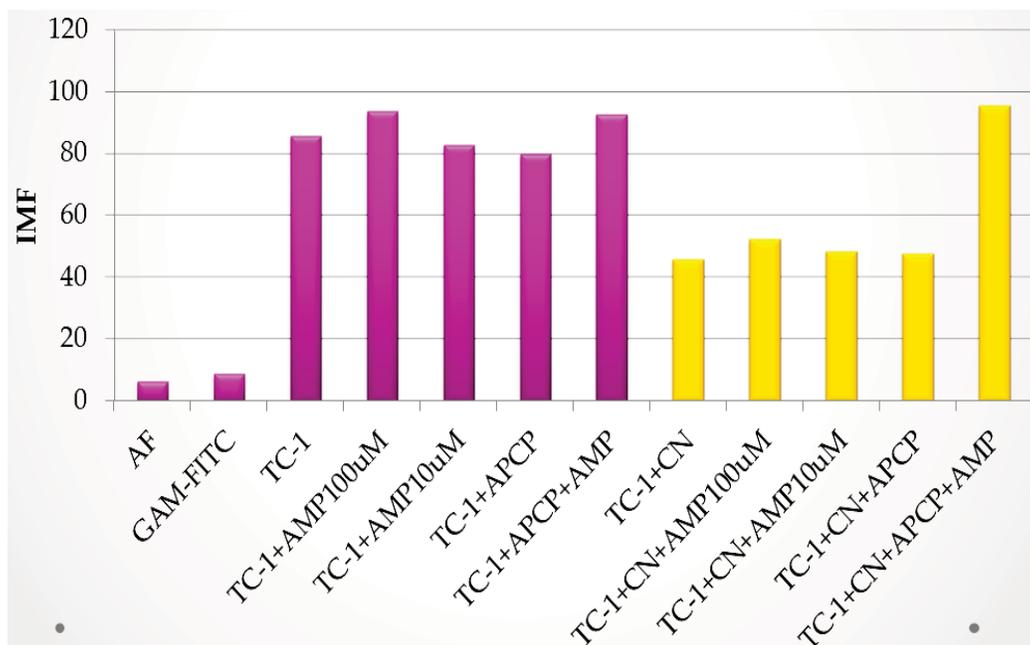


Figura 14 Expresión de moléculas H-2^b en células TC-1 incubadas con CEM-CN, AMP y APCP. Las células TC-1 fueron cultivadas durante cuatro días en ausencia de estímulo (TC-1), o en presencia de CEM-CN (TC-1+CN). Donde correspondió se adicionó 10 ó 100µM de AMP o APCP. Al término de la incubación la expresión de moléculas del CPH-I fue determinada mediante citometría de flujo.

IMF: intensidad media de fluorescencia; AF:autofluorescencia; GAM: incubación sólo con anticuerpo secundario.

Como se refirió anteriormente, la adición de APCP, inhibidor de CD73, al cocultivo de las TC-1 con las CEM-CN en presencia de AMP tiene como consecuencia la recuperación de la expresión de las moléculas del CPH-I en las células tumorales, lo cual sugiere una participación de adenosina en este fenómeno; sin embargo el cocultivo de las TC-1 con CEM-CN también resulta en la inhibición de la expresión de las moléculas del CPH-I en las células tumorales en ausencia del substrato AMP. Cuando adicionamos al cocultivo el APCP en ausencia de AMP, no observamos una recuperación de la expresión de las moléculas del CPH-I, al nivel del control sin tratamiento, (Figura 14).



El cultivo de células tumorales TC-1 en presencia de adenosina no afecta la expresión de moléculas clase I del CPH (H-2^b), y en presencia de AMP aumenta su expresión.

Para evaluar directamente si la adenosina puede inducir la inhibición de la expresión de las moléculas del CPH-I en las células tumorales, se cultivaron células tumorales TC-1 en presencia de diferentes concentraciones de adenosina purificada. En la figura 15 se observa que las diferentes concentraciones de adenosina no inducen una reducción en la expresión de moléculas del CPH-I sobre las células TC-1. Cuando las células TC-1 fueron cultivadas con diferentes concentraciones de AMP, se observó un franco aumento en la expresión de las moléculas del CPH-I (Figura 16).

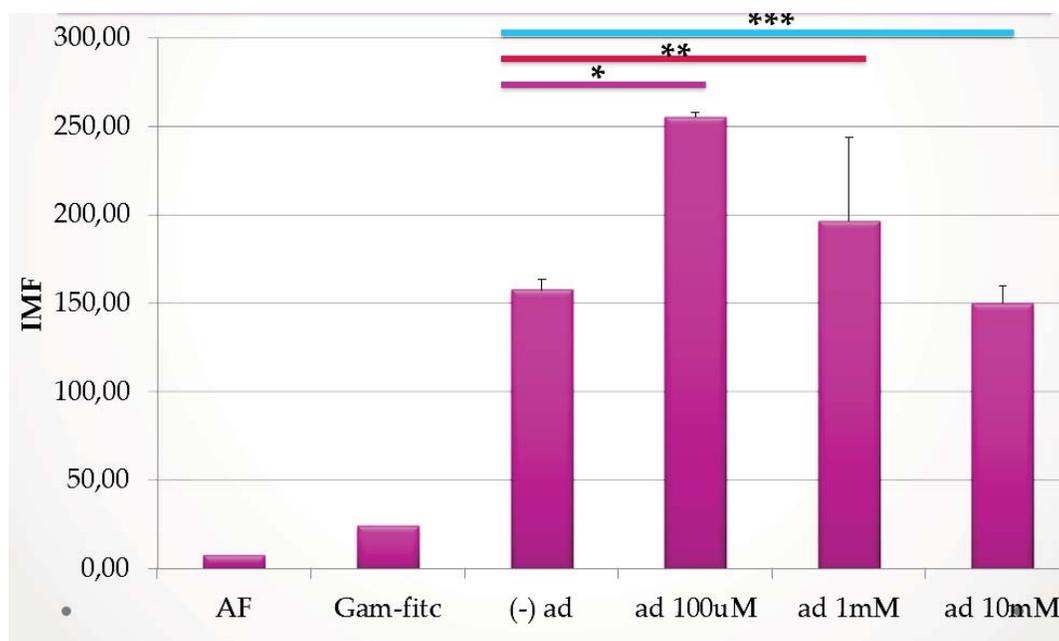


Figura 15. Expresión de moléculas del CPH-I (H-2^b) en células TC-1 cultivadas con adenosina purificada. Las células TC-1 fueron cultivadas durante cuatro días en ausencia de estímulo (- ad), o diferentes concentraciones de adenosina. Al término de la incubación la expresión de moléculas del CPH-I fue determinada mediante citometría de flujo.

IMF: intensidad media de fluorescencia; AF: autofluorescencia; GAM: incubación sólo con anticuerpo secundario. *p=0.00206793, **p=0.36620421 y ***p0.43577147.

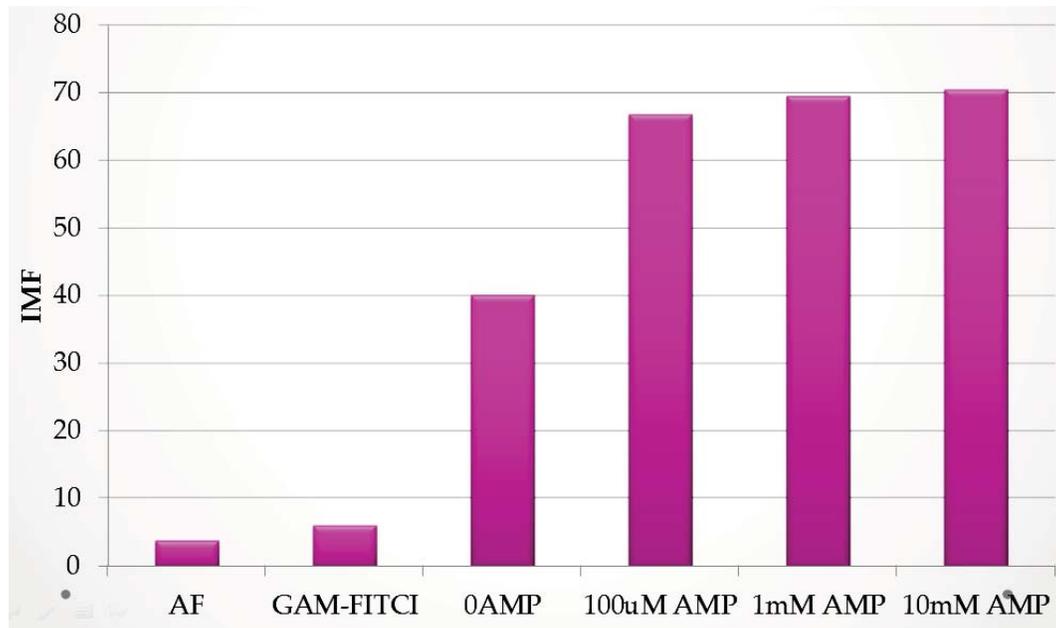


Figura 16. Expresión de moléculas del CPH-I (H-2^b) en células TC-1 cultivadas con AMP purificado. Las células TC-1 fueron cultivadas durante cuatro días en ausencia de estímulo (0AMP), o diferentes concentraciones de AMP. Al término de la incubación la expresión de moléculas del CPH-I fue determinada mediante citometría de flujo. IMF: intensidad media de fluorescencia; AF: autofluorescencia; GAM-FITC: incubación sólo con anticuerpo secundario.

Los medios condicionados de cultivos y cocultivos de células TC-1 y CEM-CN contienen bajas concentraciones de IL-10.

Las CEM secretan una gran cantidad de factores solubles con actividad inmunosupresora; asimismo, son capaces de alterar el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, con un incremento en la secreción de IL-10, IL-4 y TGF- β y un decremento en la producción de TNF- α , IL-17 e INF- γ (Djouad *et al* 2007; English, 2013; Kucerova *et al.*, 2010). Para evaluar otro posible factor que influyera en la disminución de las moléculas del CPH-I en las células TC-1 al cocultivarlas con la CEM-CN, se obtuvieron medios condicionados de estos para evaluar la concentración de IL-10. Sin embargo, al extrapolar en la curva patrón los resultados de las muestras, los valores caen en rangos bajos de concentraciones (figura 17). Se obtuvo una concentración de 58.84 pg/ml para



el medio condicionado por TC-1, 81.29 para TC-1+ medio condicionado de CEM- CN y 42.50 para cocultivos de TC-1+CEM-CN.

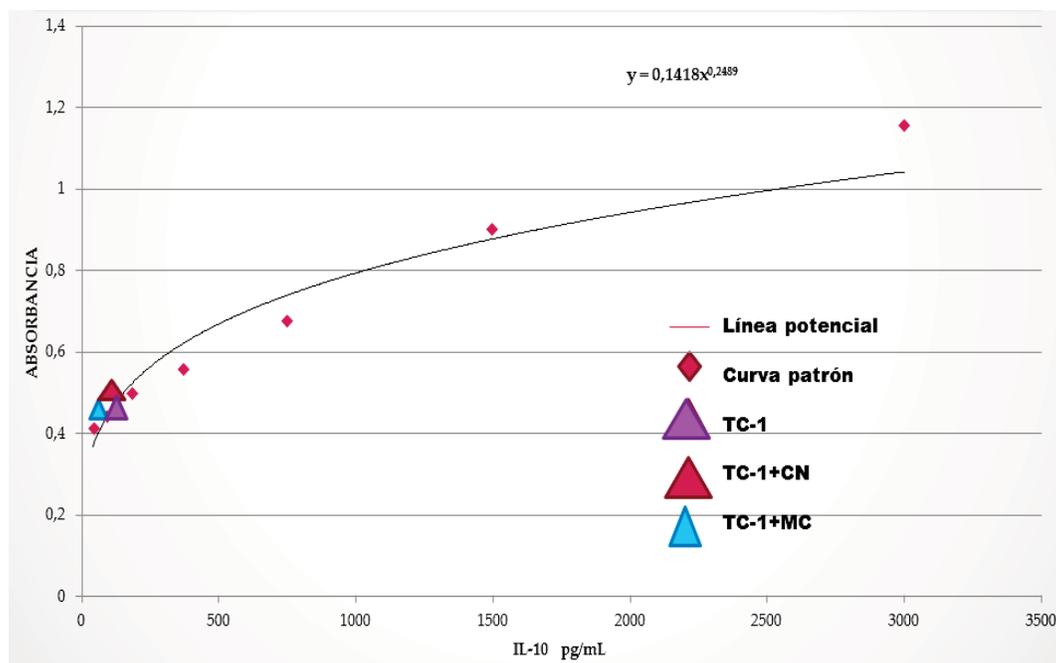


Figura 17. Determinación de la concentración de IL-10 de ratón en los medios condicionados por células TC-1 cocultivadas con CEM-CN. La concentración de IL-10 de ratón en los medios condicionados por células TC-1 cocultivadas con CEM-CN fue determinada mediante ELISA, interpolando la D.O. obtenida en una curva patrón generada mediante concentraciones conocidas de IL-10 recombinante.

El cocultivo de células TC-1 con células estromales mesenquimales de tejido cérvix normal (CEM-CN) no afecta la proliferación de las células tumorales.

Las CEM también se caracterizan por su capacidad de migrar a una variedad de órganos y tejidos, y su presencia se ve incrementada en sitios de inflamación, heridas y ciertas patologías, debido a su propiedad de reparación y remodelación de tejidos (Chapel *et al.*, 2003). Se sabe que estas células participan de manera importante en el microambiente tumoral, interactuando con las células tumorales a través de la liberación de diversos factores tales como citocinas, quimiocinas y proteasas entre otras, así favoreciendo el



implante, crecimiento y metástasis de células tumorales (Udagaw *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 2008).

Para analizar si las CEM-CN influyen también directamente en la proliferación de las células tumorales, se realizaron cocultivos de CEM-CN con células tumorales TC-1, previamente marcadas con *Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester* (CFSE). La proliferación de las TC-1 después de 4 días de cocultivo con las CEM-CN se determinó mediante la disminución de la intensidad del marcaje celular, consecuencia de la división celular. En la figura 18, se aprecia que en comparación con los cultivos control, el cocultivo de estas células con CEM-CN o la presencia de AMP no favorecen su proliferación. Incluso, el cocultivo de TC-1 con CEM-CN en presencia de AMP tiene como efecto una ligera disminución no significativa de su proliferación. Por lo tanto, el cultivo de células TC-1 en presencia de CEM-CN no afecta significativamente su proliferación.

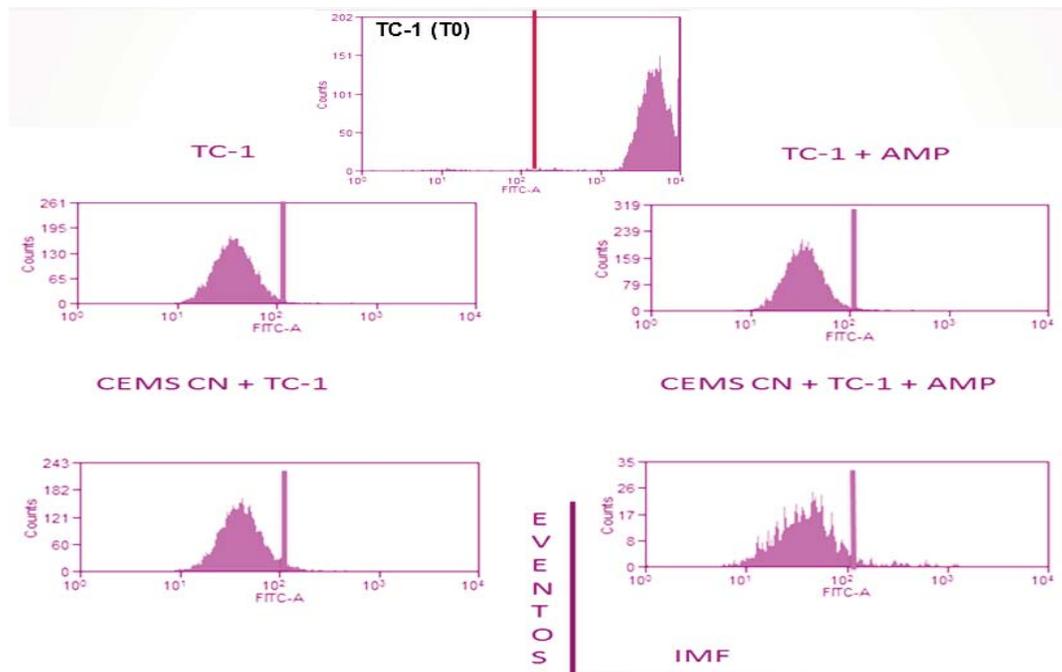


Figura 18. Proliferación de células TC-1 en cocultivos con CEM-CN en presencia y ausencia de AMP. 2×10^5 células TC-1 marcadas con carboxifluoresceína fueron cultivadas durante cuatro días en presencia o ausencia de células estromales mesenquimales derivadas de cérvix normal (CEM-CN) y AMP. Después de cuatro días



de cultivo se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, y una disminución de la marca en comparación con las células del control, se consideró como indicativo de proliferación celular.

La adenosina no influye en la proliferación de las células TC-1.

Tomando en consideración que las células mesenquimales expresan en su membrana a la ectoenzima CD73, la cual tiene la capacidad de hidrolizar al AMP para generar concentraciones significativas de adenosina, evaluamos también la proliferación de las células TC-1 en presencia de adenosina y de AMP sintéticos adicionados directamente al cultivo celular. Para analizar la proliferación de las células tumorales TC-1 en presencia de adenosina y AMP a diferentes concentraciones se marcaron previamente con *Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester* (CFSE) y después de 96 horas de cultivo, se determinó la proliferación celular por citometría de flujo. La proliferación celular se determinó a través de la disminución del marcaje celular (fluorescencia) como consecuencia de la división celular. En la figura 19, se aprecia que en cultivos con adenosina no se presenta una diferencia significativa en la proliferación de celular TC-1 respecto al control que no tiene adenosina.

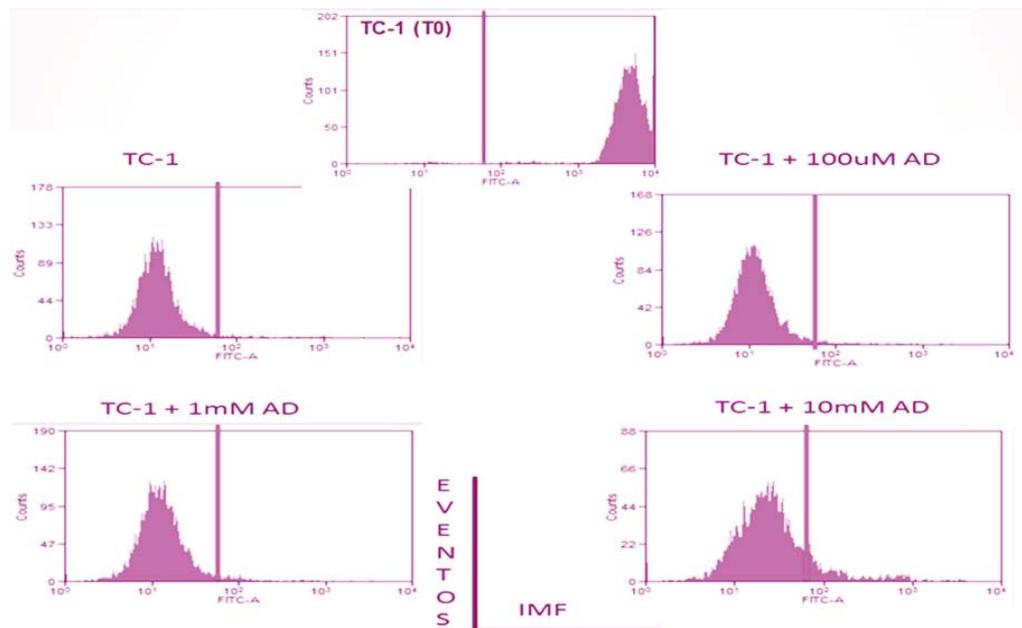




Figura 19 Proliferación de células TC-1 en cultivadas en presencia de adenosina. 2×10^5 células TC-1 marcadas con carboxifluoresceína fueron cultivadas durante cuatro días en de adenosina purificada. Después de cuatro días de cultivo se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, y una disminución de la marca en comparación con las células del control, se consideró como indicativo de proliferación celular.

Las células TC-1 disminuyen su proliferación cuando son cultivadas con altas concentraciones de AMP.

En la figura 20 se muestran los resultados obtenido cuando se realizaron los ensayos con AMP a diferentes concentraciones; observamos que desde una concentración de 1mM ya se ve afectada la proliferación y este efecto es más intenso a la concentración de 10 mM.

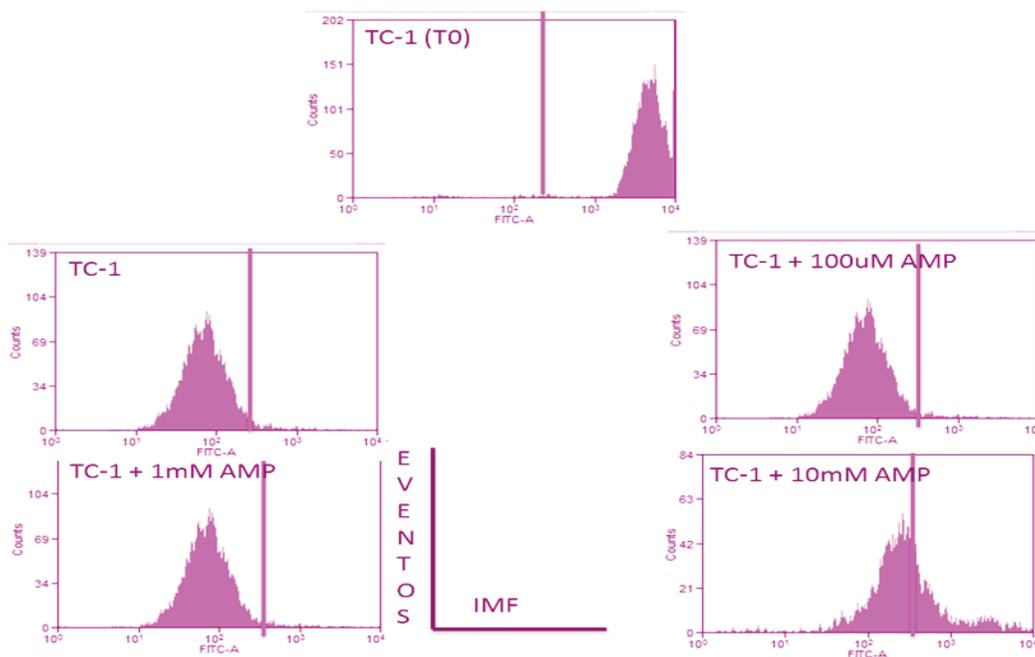


Figura 20 Proliferación de células TC-1 en cultivadas en presencia de AMP. 2×10^5 células TC-1 marcadas con carboxifluoresceína fueron cultivadas durante cuatro días en de AMP purificado. Después de cuatro días de cultivo se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, y una disminución de la marca en comparación con las células del control, se consideró como indicativo de proliferación celular.



DISCUSIÓN

El establecimiento y desarrollo de un tumor se ve favorecido por múltiples factores, cuya activación conduce a la proliferación celular, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y la supresión de la respuesta inmune. Estos factores pueden ser intrínsecos (mutaciones) y extrínsecos, como lo es la asistencia de tipos celulares cuya función normal se ve subvertida. Las células estromales mesenquimales (CEM) son una población de células troncales no hematopoyéticas localizadas esencialmente alrededor de la vasculatura y trabécula de la médula ósea, aunque también se encuentran en muchos otros tejidos y debido a su gran capacidad de migrar, su presencia se ve incrementada en sitios de inflamación, heridas y ciertas patologías como el cáncer (Chapel *et al.*, 2003). El papel de CEM en el microambiente tumoral aún es incierto, sin embargo, algunos estudios con modelos tumorales singénicos, alogénicos y xenogénicos, han mostrado que las CEM alogénicas y xenogénicas injertan de manera independiente al Complejo principal de histocompatibilidad del huésped, y pueden favorecer el implante y el crecimiento tumoral (Yen, Yen, 2008; Karnoub *et al.*, 2007; Djouad *et al.*, 2003).

Un factor esencial para la progresión tumoral es la evasión de la respuesta inmune, la cual puede darse como consecuencia de la activación de múltiples mecanismos inmunosupresores que en conjunto generan un microambiente de tolerancia (Rabinovich *et al.*, 2007; Turley *et al.*, 2008). Entre los mecanismos reconocidos destacan: la pérdida o regulación negativa de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I (CPH-I) en las células tumorales; una deficiencia en la capacidad de reconocimiento y activación de los linfocitos T; y la presencia de factores inmunosupresores confinados al microambiente tumoral (linfocitos T reguladores, células dendríticas tolerogénicas, citocinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Li *et al.*, 2006), interleucina 10 (IL-10), IL-13 (Teraben *et al.*, 2000; Gerlini *et al.*, 2004), así como pequeñas moléculas inhibitorias



como la prostaglandina E2 (PGE2) (Akasaki *et al.*, 2004) y la adenosina. Las CEM pueden inducir cambios en la maduración y la función de las células presentadoras de antígenos (CPA) a través de la reducción de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, así como de moléculas coestimuladoras, para dar lugar a CPA que no pueden apoyar la respuesta inmune específica mediada por linfocitos T auxiliares y citotóxicos (Apparailly *et al.*, 2008).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la inoculación de CEM en ratones C57BL/6 implantados con células tumorales TC-1, rompe el efecto inmunoprotector mediado por la inmunización con el péptido RAY de la proteína E7 del VPH-16 y favorece el desarrollo del tumor (Don, 2010, Contreras, 2011). Con la finalidad de evaluar algunos mecanismos involucrados en dicho modelo, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar si CEM derivadas de tejido cervical normal (CEM-CN), influyen directamente en la proliferación y el reconocimiento inmune de células tumorales. Para ello, se utilizó un modelo *in vitro*, en el cual células tumorales de ratón TC-1 (positivas a la expresión de las proteínas E6 y E7 de VPH-16) derivadas de la cepa de ratón C57BL/6 (haplotipo H-2^b), fueron cocultivadas, tanto en contacto directo como separadas por una membrana permeable, con CEM-CN para evaluar la proliferación celular y la expresión de moléculas del CPH-I en las células tumorales. En ambos casos, como resultado del cocultivo, las células TC-1 disminuyeron notable y consistentemente la expresión de moléculas H-2^b, hasta 24 días después de finalizado el cocultivo, lo cual puede influir negativamente en su reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos y favorecer la evasión inmune.

A la vista de esta notable capacidad de las CEM-CN para inducir una disminución en la expresión de moléculas del CPH-I en las células tumorales TC-1, y que en este efecto participan moléculas solubles, procedimos a evaluar si este efecto podría ser mediado por la acción de la adenosina. Se ha reportado que las CEM son capaces de generar grandes cantidades de adenosina en un microambiente de hipoxia, como lo es el microambiente



tumoral, debido a que sobre-expresan la enzima 5'-ectonucleotidasa (CD73), la cual es capaz de hidrolizar nucleósidos como adenosina 5'-monofosfato (AMP) a adenosina (Hoskin *et al.*, 2008). Se ha reportado que la interacción de adenosina con receptores específicos, tal como A2bR (Saldanha *et al.*, 2011) pueden suprimir la respuesta efectora de linfocitos T citotóxicos (Ramasamy *et al.*, 2008; Prevosto *et al.*, 2007; y Di Ianni *et al.*, 2008). Estudios recientes sugieren que la función de CD73 en tumores está implicada en la resistencia a las drogas, la promoción, control, crecimiento y progresión tumoral, metástasis y alteración de la respuesta inmune antitumoral (Airas *et al.*, 1995; Stagg *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010; Wang L *et al.*, 2011). Por tanto, el análisis de la expresión, de la actividad funcional de CD73 en células tumorales y su papel en la supresión de la respuesta inmune resulta relevante para el establecimiento de nuevas estrategias de terapia antitumoral.

Para probar si la adenosina podía influir directamente en las células tumorales induciendo la evasión de la respuesta inmune, cultivamos a las TC-1 en presencia de adenosina, de AMP (substrato de CD73) y de APCP (inhibidor de CD73). Sin embargo, no encontramos una disminución sustancial en la expresión de las moléculas H-2^b cuando las células fueron incubadas en presencia de adenosina purificada. Tampoco observamos este efecto cuando las células fueron incubadas en presencia de AMP, y en este caso, el efecto observado fue incluso una tendencia a aumentar la expresión de las moléculas del CPH-I. La incubación con APCP tampoco tuvo un efecto en la expresión de las moléculas presentadoras de antígeno en las células TC-1, lo cual sugiere que la disminución de la expresión de las moléculas H-2^b inducido por las CEM-CN en las células TC-1, no es mediado por adenosina.

Cuando adicionamos AMP o APCP a los cocultivos de las CEM-CN con las TC-1, no observamos una diferencia significativa en la disminución de la expresión de las moléculas del CPH-I de TC-1, en comparación con los cocultivos en ausencia de estos fármacos, lo cual refuerza la idea de que el efecto inhibitorio observado no es dependiente de CD73, y por tanto, de adenosina. Sin embargo, cuando los cocultivos se realizaron en presencia de AMP y APCP



simultáneamente, la expresión de las moléculas del CPH-I en las TC-1 regresó al nivel de las células control, cultivadas en ausencia de CEM-CN. Puesto que la adición de adenosina directa a las TC-1 no induce una disminución en la expresión de las moléculas del CPH-I en las TC-1, consideramos que el efecto observado bajo estas condiciones es debido a que el AMP presente no es metabolizado por CD73; por tanto, el AMP parece efectivamente inducir un aumento en la expresión de las moléculas del CPH-I, que revierte el efecto inhibitorio inducido por las CEM-CN. Este resultado indica además, que en nuestro modelo experimental las CEM-CN efectivamente son capaces de producir adenosina a partir de AMP, aun cuando ésta no induce la disminución en la expresión de las moléculas del CPH-I. El inhibidor APCP, ha sido probado con éxito en diferentes modelos tumorales disminuyendo el crecimiento tumoral en ratones (Synnestvedt *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Eltzschig *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2006; Stagg *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010; Wang L *et al.*, 2011). En otros reportes se ha mostrado que el uso del inhibidor APCP en el cultivo de células tumorales SKOV-3 (derivada de adenocarcinoma de ovario humano) y U251 (derivada de glioblastoma), disminuyó significativamente el consumo de AMP hacia adenosina (Cho *et al.*, 2006). En otros estudios Stagg y colaboradores (2010) mostraron que en las estirpes celulares provenientes de cáncer de mama de ratón 4T1.2 tratadas con AMP, se inhibió significativamente la generación de adenosina extracelular por tratamiento con el APCP.

En la búsqueda de la determinación del efecto inhibitorio de la expresión de las moléculas del CPH-I inducido en las TC-1 por las CEM-CN se evaluó la presencia de IL-10 en los cocultivos de las CEM-CN y las TC-1. En diversos estudios se ha reportado que la IL-10 tiene la capacidad de inhibir las funciones efectoras de las células Th1 y que tiene efecto inhibitorio sobre la expresión de moléculas que participan en la vía del procesamiento y presentación de antígenos en las células presentadoras de antígeno (Moore *et al.*, 2001; Dennis *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013); además, altas concentraciones de IL-10 se correlacionan con disminución de la expresión de moléculas del CPH clase I y



II en distintos tipos celulares (Breitbart *et al.*, 2013; Luheshi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013).

Sin embargo, en nuestro análisis se encontró que en los cocultivos de células tumorales TC-1 con las CEM, y en cultivos de TC-1 con medio condicionado de CEM-CN, la citosina IL-10 está presente en muy bajas concentraciones, las cuales pueden no ser suficientes para modular la expresión de moléculas CPH-I en las células tumorales, y por tanto sugiere la participación de otros factores producidos por las mismas CEM que puedan inhibir la expresión de estas moléculas en las células tumorales; por ejemplo, el TGF- β , el cual se ha descrito como un inhibidor importante de la presentación antigénica por células dendríticas y mesenquimales, al disminuir la expresión de moléculas CPH-I (Strobl *et al.*, 1999; Delvig *et al.*, 2002; Francois *et al.*, 2009).

Además del efecto de las CEM-CN sobre la evasión de la respuesta inmune de las células TC-1, quisimos evaluar su efecto sobre la proliferación celular. El papel de las CEM en ensayos experimentales realizados en modelos *in vivo*, se ha demostrado que aumentan el potencial metastático de células de cáncer de mama o de carcinoma de colon, cuando son inoculadas de manera conjunta en ratones (Karnoub *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2006). Sin embargo, las CEM derivadas de cervix normal prácticamente no influyen sobre la proliferación de las células tumorales TC-1, mostrando una pequeña tendencia a disminuir la proliferación en presencia de AMP. En cultivos de TC-1 adicionando adenosina y AMP purificadas se observa una tendencia a la disminución de la proliferación únicamente en altas concentraciones, cuestionando el significado fisiológico de esta observación.

Avila en el 2011 evaluó el efecto de diferentes concentraciones del lote de adenosina pura (Sigma, USA) usada en nuestros ensayos, sobre la proliferación de linfocitos T de sangre periférica de donadores normales, donde se observó que a la concentración de 20 μ M la adenosina inhibió notablemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica, con ello podemos decir que la



molécula de la adenosina tiene un efecto inmunosupresor en células del sistema inmune pero no en células tumorales

La propiedad de las CEM para favorecer el crecimiento tumoral ha sido reportada en modelos tumorales experimentales, por ejemplo el grupo de Karnoub *et al.*, 2007, al coinyectar CEM humanas derivadas de médula ósea junto con células de cáncer de mama marcadas con proteína verde fluorescente en una proporción 3:1 en ratones inmunocomprometidos, observó que las CEM aceleraron el crecimiento tumoral de la línea MCF/Ras. En otro experimento, las CEM derivadas de médula ósea fueron capaces de incrementar *in vivo* el crecimiento de tumores inducidos por células de cáncer de colon, linfoma y células de melanoma (Djouad *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Maby-El *et al.*, 2007). Otro ejemplo en el cual se sugiere que la presencia de CEM suprime la respuesta inmune para dar paso al crecimiento tumoral, fue el experimento en donde al trasplantar células de melanoma B16 en ratones inmunocompetentes, se logró inducir crecimiento tumoral sólo cuando estas células tumorales fueron coinoculadas con CEM derivadas de médula ósea (Djouad *et al.*, 2003). Un estudio más donde se observó que en líneas de cáncer de pulmón y CEM derivadas de médula ósea normal se vio un aumento en el crecimiento tumoral con respecto a los tratamientos sin CEM (Suzuki *et al.*, 2011) y en otro estudio donde se vio que las CEM de médula ósea pueden prolongar la supervivencia de trasplantes alogénicos (Nuta, Fibbe, 2007).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que las CEM juegan un papel importante en el microambiente tumoral ya que además de suprimir la respuesta inmune celular mediante la inhibición de la proliferación y activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, así como de su capacidad citotóxica, como ha sido previamente reportado (Di Nicola *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2003; Feng, Chen 2009; Glennie *et al.*, 2005; Rasmusson *et al.*, 2003), también contribuyen de manera importante en la evasión del reconocimiento inmune de las células blanco, al disminuir la expresión de moléculas del CPH-I sobre las células tumorales. Esta observación es importante en virtud de que en las infecciones producidas por VPH, las células T CD8+ juegan un papel importante en la



limpieza satisfactoria de células infectadas por virus y/o células tumorales (Delgado *et al*, 2008; Wang, *et al*, 2008). Por tanto, resulta importante determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales las CEM-CN inducen esta disminución de las moléculas del CPH-I sobre las células TC-1.



CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de este estudio podemos decir que:

- A. El cocultivo de TC-1 con CEM-CN y el cultivo de TC-1 con medio condicionado por CEM-CN induce una disminución en la expresión de las moléculas del CPH clase I (H-2^b) de las células tumorales, en comparación con las células TC-1 sin cocultivo.
- B. La adenosina purificada no tiene un efecto en la expresión de moléculas H-2^b, sobre células tumorales TC-1 en cultivo, mientras que el AMP induce un aumento en la expresión de dichas moléculas.
- C. La adenosina purificada no tiene un efecto sobre la proliferación de las células tumorales TC-1. El AMP induce un ligero decremento en la proliferación de células TC-1.
- D. En el medio condicionado que se obtuvo de cultivos de células TC-1 y de TC-1 más Medio Condicionado de CEM-CN y del cocultivo de células TC-1 y CEM-CN se produce una mínima cantidad de IL-10.
- E. Por tanto, concluimos que el cocultivo de CEM-CN con células TC-1 induce una disminución en la expresión de moléculas del CPH-I en las células tumorales, por un mecanismo que involucra mediadores solubles, que es independiente de adenosina y de IL-10. Resulta importante determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales las CEM-CN inducen esta disminución de las moléculas del CPH-I sobre las células TC-1.



LITERATURA CONSULTADA.

- Abbas A, Linchman A. 2006. Inmunología Celular y Molecular. 6a ed. Ed. Elsevier. España. 83.
- Abdul N, Brown C, Gaston K. 2009. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci.* 66: 1700 – 1717.
- Aggarwal S, Pittinger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate alloantigen immune cell responses. *Blood* 105:1815-22.
- Airas L, Hellman J and Salmi M. 1995. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* 182:1603–1608.
- 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.
- Aníbal M. 1996. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. 5ta ed. Ed. Médica Panamericana: Buenos Aires. 593-605.
- Apparailly F, Jorgensen C, Lazennec G. 2008. Multipotent stromal cells: controversial impact on tumor development and metastasis. *MedSci.* 6:4. 350-360.
- Avila Ibarra L R. 2011. Análisis 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. UNAM. FES Zaragoza.
- Barry F, Murphy J. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Biochem Cell Biol.* 36: 568-584.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.*105: 2214-2219.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L. 2008. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infection and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26S: k1-k16.
- Breitbart W, Rosenfeld B, Tobias K, Pessin H, Ku Y, Yuan J, Wolchok J. 2013. Depression, cytokines, and pancreatic cancer. *Psycho-Oncology.* 10.1002:1-7.
- Cao H, Xu W, Qian H, Zhu W, Yan Y, Zhou H, Zhang X, Xu X, Li J, Chen Z, Xu I. 2009. Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer.* 274: 61-71.
- Cárcamo I, Trigueros C. 2008. Células madre mesenquimales y trasplante hematopoyético. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 30: 3-6.



- Castellsagué X, Bosch F, 2007. Vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH): incorporación del pediatra en la lucha contra el cáncer de cuello uterino. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 93: S21-42
- Chapel A, Bertho J, Bensidhoum M, Fouillard L, Young R, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin N, Gourmelon P, Thierry D. 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *Gene Med*. 5.12: 1028-1038.
- Cho SY, Polster J, Engles JM, Hilton J, Abraham EH, Wahl RL. 2006. In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism. *J Nucl Med*. 47:837-845.
- Clifford G, Smith J, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 88: 63-73.
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. 2:351-60.
- Contreras Landeros S. Y. 2011. Análisis de la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino. Tesis de licenciatura. UNAM FES Zaragoza.
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. doi:pii: S0140-6736(13)60022-7
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257-1265.
- Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. 1997. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 81: 154-164.
- Delgado F, Martínez E, Céspedes M, Bravo M, Navas M, Cómbita A. 2008. Increase of human papillomavirus-16 E7-specific T helper type 1 response in peripheral blood of cervical cancer patients after radiotherapy. *J Immunol*. 126: 523-534
- Delvig A, Lee J, Chrzanowska-Lightowlers Z, Robinson J. 2002. TGF-beta1 and IFN-gamma cross regulate antigen presentation to CD4 T cells by macrophages. *J Leukoc Biol*. 72: 163-166.
- Dennis L. Kristen, Blatner Nichole R., Gounari Fotini, Khazaie Khashayarsha. 2013. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol*. 25: 637-645.



- Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cechini Z, Sportoletti P, Falzetti F y Tabilio A. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 36: 309-318.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni P, Malteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99: 3838-3843.
- Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 102: 3837-3844.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 315-317.
- Don López C. A. 2010. Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. Tesis de licenciatura. UNAM. FES Zaragoza.
- Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science.* 110: 525-541.
- Eltzschig H, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P, Odegard KC, Laussen PC, Thompson LF, Colgan S. 2006. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: The role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood.* 108:1602–1610.
- English K. 2013. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and Cell Biology.* 91: 19–26.
- Estupiñán T, Trujillo G. 2004. Complejo mayor de histocompatibilidad y desarrollo de vacunas. *Nova.* 2: 59-70.
- Evander M, Frazer I, Payne E, Qi Y, Hengst K and McMillan N. 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 71:2449-2456.
- Fainboim L, Geffner J. 2005. Introducción a la inmunología humana, 5ta ed., Ed. Medica Panamericana, Argentina, 484.
- Feng B, Chen L. 2009. Review of Mesenchymal Stem Cells and Tumors: Executioner or Coconspirator?. *Cancer Biother Radiopharm.* 24: 6.
- Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin M-N, Bramson J, Galipeau J. 2009. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Stem Cells.* 114: 2632-2638.
- Frazer H. 2004. Prevention of Cervical Cancer through Papillomavirus Vaccination. *Nature Immune.* 4: 46-54.



- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz K-N, Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol.* 53: 527–5522
- García P. 2007. Que hay en el horizonte sobre el virus del papiloma humano, vacunas y el control del cáncer cervical. *Peru Med Exp Salud Pública.* 24: 272-279.
- 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.* 165:1853–63.
- Giaccia A, Siim B, and Johnson R. 2003. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2:803–811.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck R, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75-3: 1565–1570
- Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E, Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 105: 2821.
- Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2004. *Inmunología.* 5ª ed. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México D.F.1-9.
- Guizar J. 2001. *Genética clínica. Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias.* 3a ed. Ed. Manual Moderno. México. 763-79.
- Grünewald K, Ridley A. 2010. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *Journal of Inflammation.* 7:10.
- Harro C, Pang Y, Roden R, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds M, Mast T, Robinson R, Murphy B, Karron R, Dillner J, Schiller J, Lowy D. 2001. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:284–292.
- Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. 2008. Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 7-9: 759–770.
- Hebner C, Laimins L. 2006. Human papillomavirus: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 16:83-97.
- Hernández HD, Apresa GT, Alvarado CI, García CA, Guido JM, González SJ, Cruz TF, Martínez EO. 2002. Virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en mujeres de dos hospitales de la Ciudad de México. *Invest Clin* 54: 299-306.
- Hicklin D, Marincola F, Ferrone S. 1999. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today.* 5:178–186
- Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chang C, Buró R. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 7: 423-428.



- 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 [Review]. *Int J Oncol.* 32:527–535.
- Howley P. 2006. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Amer Clin and Climatol Assoc.* 117:113-127.
- Huang S, Koshiba M, Apasov S, Sitkovsky M. 1997. Role of A2a adenosine receptor-mediated signaling in inhibition of T cell activation and expansion. *Blood.* 90: 1600–1610.
- INC Instituto Nacional de Cancerología. 2014. Definición de cáncer. Consultado en <http://www.cancer.gov/>
- Insinga R, Dasbach E, Elbasha E. 2009. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infectious Diseases.* 9 (119): 1471-2334.
- Jacobson K, Gao Z. 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 247–264.
- 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. *American Association for Cancer Research.* 6: 2245–2255.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang S, Wu Y, Yu X, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 105: 4120-4126.
- Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J. 2007. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* 369: 1693-1702.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. 2007. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 449: 557-563.
- Kindt T, Goldsby, R, Osborne B. 2007. *Inmunología de Kuby.* 6ª edición. Editorial McGraw-Hill. Mexico. pp 15-20.
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 50-adenosinemonophosphate to adenosine. *J Immunol* 177: 6780–6786.
- Koshiba M, Kojima H, Huang S, Apasov S, Sitkovsky MV. 1997. Memory of extracellular adenosine/A2a purinergic receptormediated signalling in murine T cells. *J Biol Chem.* 272:25881–25889.
- Koscsó B, Csóka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virág L, Haskó G.



2012. Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol.* 188:445-53.
- Koyama H, Kobayashi N, Harada M, Takeoka M, Kawai Y, Sano K, Fujimori M, Amano J, Ohhashi T, Kannagi R, Kimata K, Taniguchi S, Itano N. 2008. Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment. *Pathol.* 172. 179-193.
 - Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 101: 3722-3729.
 - Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova, AC. 2010. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Molecular Cancer.* 9:129. 2-15
 - Lappas C, Rieger J, Linden J. 2005. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 174:1073-80.
 - 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 KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56. 21–26.
 - Linden J. 2001. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 775–787
 - Liu WH, Liu J, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. 2013 Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells via Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway. *PLoS ONE.* 8:1. 1-13.
 - Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?. *Hematol.* 92: 872-877.
 - Luheshi N, Davies G, Poon E, Wiggins K, McCourt M, Legg J. 2013. Th1 cytokines are more effective than Th2 cytokines at licensing anti-tumour functions in CD40 activated human macrophages in vitro. *Eur J Immunol.* 00.1-11
 - Maby-El, Ame-TP, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, Bescher N, Monvoisin C, Dulong J, Lamy T, Fest T, Tarte K. 2009. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res.* 69. 3228-3237.
 - Marais D, Passmore J, Maclean J, Rose R and Williamson A. 1999. A recombinant human papillomavirus (HPV) type 16 L1-vaccinia virus murine



challenge models demonstrate cell. Mediated immunity against HPV virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 80: 2471-2475.

- 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
- Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER. 2007. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 56: 1-23.
- Mehta AM, Jordanova ES, Kenter GG, Ferrone S, Fleuren GJ. 2008. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 57:197-206.
- Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blomberg ME, Bontkes HJ. 2007. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 121:1749-1755.
- Monie A, Tsen S, Hung C, Wu T. 2009. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 8-9: 1221–1235.
- Montesinos J, Flores E, Flores P, Gutiérrez G, Arana R, Castillo S, Pérez A, Hernández E, Arriaga L, Mayani H. 2008. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk.* 32-9:1407-1416.
- 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.
- Moore W. Kevin, Malefyt de Waal Rene, Coffman L, Robert, O'Garra Anne. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19. 683–765.
- Moscow JA, Cowan KH. 2007. Biology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine.* 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier: chap 187
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJLM. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen?. The international perspective. *Cancer* 111: 278 –285.
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2008. *Janeway's Immunobiology.* 7aed. Ed. Garland Science. New York. 887.
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 2007. Expression of oncofamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of



- Foxp3-expressing regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 98:874-81.
- Natali P, Nicotra M, Bigotti A, Ventura I, Marcenaro L. 1989. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6719–6723.
 - Nauta JA, Fibbe EW. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *The American Society of Hematology.* 110:10. 3499-3506.
 - Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13132–13137.
 - OMS Organización Mundial de la Salud, 2014, Datos y cifras del cáncer, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
 - Páez D, Arévalo J, Rodríguez Y. 2007. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo 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.
 - Parham P. 2003. Innate Immunity: The unsung heroes. *Nature.* 423 -6935: 20.
 - 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.
 - Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst M, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. 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: 354-61.
 - Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-7.
 - Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. 2007. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematol.* 92: 881-888.
 - Ramasamy R, Kong C, Fong H, Vidyadaran S, Dazzi F. 2008. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 251:131-136.
 - Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplant.* 76: 1208-1213.
 - Rabinovich G, Gabrilovich D, Sotomayor E. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 25:267–296.
 - Resta R, Yamashita Y, Thompson LF 1998. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol.* 161: 95–109.



- Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L. 2002. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte–tumor cell interaction. *Immunol.* 188:97–113.
- Robertson M. 1998. Innate Immunity. *Current Biology Magazine.* 8 -17:595-597.
- Roitt I. 2004. *Inmunología Fundamentos.* 10ª ed. Ed. Médica panamericana. Argentina. 43-70 y 177-178.
- Rojas Espinosa O. 2001. *Inmunológica (de memoria),* 2a ed. Ed.: Médica Panamericana. México, D.F. 256-267.
- Saldanha-AF, Ferreira FI, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RH, Covas DT, Zago MA, Panepucci RA. 2011. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res.* 7:1. 66-74.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S, *Lancet.* 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. Sep 8.370:890-907.
- Semenza G. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3:721–732.
- Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson SC, Ohta A. 2008. Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol.* 153 :S457-64.
- Sosa LSG, Walker D, Serván E. 2009. Práctica de mastografías y pruebas de Papanicolaou entre mujeres de áreas rurales de México. *Salud Pública Mex.* 2: S236-S245.
- Sowa N, Taylor-BB, Zylka J. 2010. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits. *J Neurosci.* 30-6: 2235–2244.
- Spink K, Laimins L. 2005. Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J. Virol.* 79-8: 4918–4926.
- Szychala J. 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 87:161–173.
- Stagg J. 2008. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev.* 4. 119-24.
- Stagg J, Divisekeraa U, McLaughlina N, Sharkeya J, Pommeyb,c S, Denoyerd D, Dwyer K, Smytha M. 2010. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Pnas.* 107: 1547–1552.
- Stanley M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 24S1:16-22.
- Stites A, Terr A, Parslow T. 2000. *Inmunología básica y clínica.* 9a ed. Ed el manual moderno. México. pp. 200-250.
- Strobl H, Knapp W. 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1:1283-1290.



- 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: 3603-3608.
- Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y. 2011. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization. *M o l m e d.* 17:7 – 8. 579 - 587.
- Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. 2002. Ecto-50-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 110: 993–1002.
- Teraben M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C. 2000. NK T cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* 1:515–20.
- Thun MJ. 2007. Epidemiology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine.* 23a. ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. Chap 185.
- Tindle R. 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature.* 2:1-7.
- Tirado GL, Mohar BA, López CM, García CA, Franco MF, Borges G. 2005. Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública Mex* 47: 342-350.
- Thompson L, Eltzschig H, Ibla J, Van De Wiele C, Resta R, Morote-Garcia J, Colgan S. 2004. Crucial Role for Ecto-5-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia. *J.Exp. Med.* 200-11: 1395–1405.
- Tse W, Pendleton J, Beyer W, Egalka M, Guinan E. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplant.* 75: 389-397.
- Trigo M, Jiménez P. 1997. Complejo mayor de histocompatibilidad. *Jano.* 1237: 52-58.
- Turley E, Veiseh M, Radisky D, Bissell M. 2008. Mechanisms of disease: epithelialmesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression?. *Nat Clin Pract Oncol.* 5: 280-290.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?. *Trends Immunol,* 28:219-26.
- Udagawa T, Puder M, Wood M, Schaefer B, D'amato R. 2006. Analysis of tumor-associated strimal cells using SCID GFP transgenic mice: contribution of local and bone marrow-derived host cells. *FASEB.* 20. 95-102.
- Van Leeuwen J, Samelson L. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol.* 11-3:242-8.
- Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurung E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. 2007. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 150:199-209.



- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189: 12-19.
- Wang Z, Cao Y, Albino A, Zeff R, Houghton A, Ferrone S. 1993. Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2- microglobulin messenger RNA. *J. Clin. Invest.* 91:684–92.
- Wang X, Moscicki AB, Tsang L, Brokman A, Nakagawa M. 2008. Memory T cells specific for novel human papillomavirus type 16 (HPV 16) E6 epitopes in women whose HPV 16 infection has become undetectable. *J Immunol.* 15:937-945.
- 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.
- Yen BL, Yen ML. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer- for better or for worse. *Journal of cancer molecules* 4:5-9.
- Zhang B. 2010. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70-16:6407–6411.
- Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol.* 80: 267-274.
- Zimmerman H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 285: 345-365.
- Zur Hausen H . 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst.* 92:690-698.