



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES  
ONCOLÓGICAS DEL HOSPITAL DE ONCOLOGÍA

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y CÁNCER

**Análisis de la capacidad inmunosupresora de células  
estromales mesenquimales derivadas de cáncer cérvico-  
uterino (CEMS-CaCu) mediante la producción de IL-10  
inducida por la vía CD73-Adenosina**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**MARÍN AQUINO LUIS ANTONIO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

**ASESOR INTERNO:**

DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA



MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **MARÍN AQUINO LUIS ANTONIO**, con número de cuenta **305220798**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **24 de marzo de 2015**, a las **16:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

**VOCAL** Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA\*

**SECRETARIO** Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

**SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

**SUPLENTE** Dr. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Análisis de la capacidad inmunosupresora de células estromales mesenquimales derivadas de cáncer cérvico-uterino (CEMS-CaCu) mediante la producción de IL-10 inducida por la vía CD73-Adenosina.**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 30 de enero de 2015.

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECCIÓN

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

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/GO9/762; FIS/IMSS/PROT/G11-2/1014; y FIS/IMSS/PROT/MD13/1258.

**“La ciencia no es sino una perversión de sí misma a menos que tenga como objetivo final el mejoramiento de la humanidad”.**

Nikola Tesla

**“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”.**

Isaac Newton

**“No creo que haya otra cualidad tan esencial para el éxito de cualquier tipo como la perseverancia. Supera a casi todo, incluso a la naturaleza”.**

John D. Rockefeller

## **AGRADECIMIENTOS**

**A** mi madre en primer lugar por darme la vida, por todos estos años de entrega y esfuerzo para impulsarme adelante en el mundo, por todo ese amor incondicional y ayuda en las dificultades. Gracias por los cuidados y cosas grandes que haces cada día para hacerme feliz.

**A** mi padre por enseñarme lo que significa responsabilidad y que a base de un gran esfuerzo se puede llegar a la meta, que no importa que tan mal se pongan las cosas siempre hay que seguir siendo mejor en esta vida, por todos esos consejos y apoyo incondicional.

**A** mi hermano por ser mi mejor amigo, ya que siempre ha estado cuando es necesario, compartiendo grandes momentos llenos de peleas y risas pero siempre con un gran amor fraternal, por cuidarme aun siendo el menor y por preocuparse por cada aspecto de mi vida.

**A** mi amada Sofí por llenar mi vida de amor y felicidad, gracias por estar ahí cuando más te necesito ya sea en los buenos o malos momentos, por recorrer este mundo de la biología a mi lado todos estos años. Tu cariño, dulzura y comprensión son un tesoro invaluable que me ayuda a ser una mejor persona cada día.

**A** todos y cada unos de mis compañeros del laboratorio de inmunobiología de la FES Zaragoza, a los nuevos y viejos integrantes con los que logre entablar una valiosa amistad. Un especial agradecimiento a Azucena por ser mi primera maestra cuando ingrese al laboratorio, por su tiempo, sus consejos y sobre todo por brindarme su amistad. **A** mi amigo César por todos esos buenos momentos de trabajo, risas y diversión.

**A** mis compañeras y amigas del laboratorio de inmunología y cáncer de la UIMEO: Rosario, Berenice, Carmina, Nancy, y Gabriela por todos los buenos momentos que pasamos en estos años de trabajo, por recibirme con una sonrisa y abrirme las puertas a una nueva etapa. Pero sobre todo gracias por hacer del laboratorio un segundo hogar.

**A** Rosario por brindarme su inmensa ayuda para realizar y culminar este trabajo, por todo su tiempo, conocimientos, paciencia y comprensión. Muchas gracias por ser parte importante tanto de mi formación académica como por ser una maravillosa amiga.

**A** la Dra. María de Lourdes Mora García y el Dr. Alberto Monroy García por darme la oportunidad de ingresar al laboratorio y poder formar parte de su grupo de trabajo, por todo su apoyo y la confianza brindada todos estos años. Al Dr. Jorge Hernández Montes por el apoyo y todas las valiosas aportaciones que me brindo en el laboratorio.

**A** mis sinodales Dra. Lucila Álvarez Barrera, Dr. Alberto Monroy García, Dra. María de Lourdes Mora García, Dr. Hugo López Muñoz y Dr. Edgar Ledesma Martínez por sus importantes comentarios y observaciones que ayudaron a mejorar y enriquecer este trabajo.

## ÍNDICE

Contenido	Pág.
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cérvicouterino.....	4
Sistema Inmune.....	6
Inmunidad Innata.....	6
Inmunidad adaptativa y linfocitos T.....	6
Respuesta inmune contra CaCu.....	8
Mecanismos de evasión inmune en CaCu.....	9
Células Estromales Mesenquimales (CEM's).....	12
Vía adenosinérgica.....	17
Interleucina 10.....	22
Efectos <i>in vitro</i> de la IL-10 sobre células inmunes.....	22
IL-10 en CaCu.....	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
Objetivo General.....	30
Objetivos Particulares.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Material Biológico.....	31
Cultivos de CEM's en presencia de AMP y ADO.....	31
Cuantificación de IL-10 por ELISA.....	32
Análisis estadístico.....	33
Análisis de la actividad inhibitoria de IL-10 sobre linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	33
Generación de IL-10 por CEM's.....	33
Obtención de células mononucleares de sangre periférica y purificación de LT CD8 <sup>+</sup> .....	34
Análisis de la inhibición de la proliferación de LT CD8 <sup>+</sup> por IL-10.....	34
RESULTADOS.....	37
CEM's CaCu incrementan fuertemente la producción de IL-10 en presencia de AMP y ADO.....	37
IL-10 generada por CEM's inhibe de manera parcial la proliferación de LT CD8 <sup>+</sup> .....	43
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57



**ABREVIATURAS**

<b>ADO</b>	Adenosina
<b>ADP</b>	Del inglés Adenosine diphosphate (Adenosín Difosfato)
<b>AMP</b>	Del inglés Adenosine monophosphate (Adenosín Monofosfato)
<b>AMPc</b>	Del inglés Cyclic Adenosine monophosphate (Adenosín Monofosfato Cíclico)
<b>ATP</b>	Del inglés Adenosine triphosphate (Adenosin Trifosfato)
<b>CaCu</b>	Cáncer Cérvicouterino
<b>CD</b>	Célula Dendrítica
<b>CEM's</b>	Células Estromales Mesenquimales
<b>CEM's-CaCu</b>	Células Estromales Mesenquimales de Cáncer Cérvicouterino
<b>CEM's-CN</b>	Células Estromales Mesenquimales de Cérvix Normal
<b>CEM's-MO</b>	Células Estromales Mesenquimales de Médula Ósea
<b>CFSE</b>	Carboxifluoresceína
<b>CFU-F</b>	Del inglés Colony Forming Unit Fibroblast (Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos).
<b>CL</b>	Células de Langerhans
<b>CMSP</b>	Células Mononucleares de Sangre Periférica
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>DNA</b>	Del inglés Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desóxirribonucleico)
<b>ELISA</b>	Del inglés Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
<b>IDO</b>	Indolamina 2,3-dioxigenasa
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Interferón Gamma
<b>IL</b>	Interleucina

<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>LB</b>	Linfocito B
<b>LT</b>	Linfocito T
<b>LTc</b>	Del inglés Lymphocyte T Citotoxic (Linfocito T Citotóxico)
<b>LTh</b>	Del inglés Lymphocyte T helper (Linfocito T Cooperador)
<b>MHC</b>	Del inglés Major histocompatibility complex (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)
<b>MO</b>	Médula Ósea
<b>NK</b>	Linfocito Natural Killer
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>RA</b>	Receptor de Adenosina
<b>SITC</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
<b>TGF-β</b>	Del inglés Transforming Growth Factor Beta (Factor de Crecimiento Transformante Beta)
<b>TNF-α</b>	Del inglés Tumor Necrosis Factor Alpha (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)
<b>Treg</b>	Del inglés Regulatory Lymphocyte T (Linfocito T Regulador)
<b>VEGF</b>	Del inglés Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de Crecimiento Vaso Endotelial)
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano

## RESUMEN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por enfermedades oncológicas a nivel mundial según la OMS. La progresión de la enfermedad y el desarrollo de las células tumorales se deben en gran medida al establecimiento de un microambiente tumoral, caracterizado por el reclutamiento de diversos tipos celulares los cuales favorecen la inmunosupresión a través de la secreción de diversos factores solubles como IL-10. Las Células Estromales Mesenquimales (CEM's) participan de manera importante en el microambiente tumoral inhibiendo la actividad efectora de linfocitos T citotóxicos, a través de la producción de diversos factores solubles como son: IL-10, TGF- $\beta$ , IDO y PGE2, y adenosina (ADO) entre otros. Nuestro grupo de trabajo recientemente obtuvo y caracterizó CEM's de tumores de cáncer cérvicouterino (CEM's-CaCu), además de evaluar la expresión y actividad funcional de la ectonucleotidasa CD73 para generar ADO a partir de AMP. Tomando en consideración que algunas células inmunoreguladoras son capaces de generar IL-10 en presencia de ADO, en el presente trabajo se analizó si las CEM's-CaCu cultivadas en presencia de AMP o ADO son capaces de producir IL-10, y si a través de esta citocina suprimen la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos dan evidencia que las CEM's -CaCu son inducidas fuertemente a producir IL-10 en presencia de ADO o AMP, y que esta citocina inhibe la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) estimulados con anticuerpos anti CD3/CD2/CD28, asimismo se observó que anticuerpos neutralizantes para IL-10 bloquearon de manera importante dicha inhibición. Se concluye que las CEM's-CaCu presentan un mecanismo de inmunosupresión dual derivado de la vía adenosinérgica, en donde además de ser capaces de generar ADO a partir de AMP, generan IL-10 a través de la interacción de ADO con receptores para este nucleósido, que de manera conjunta pueden potenciar la actividad inmunosupresora sobre LT CD8<sup>+</sup>.

## MARCO TEÓRICO

### Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cérvicouterino

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer cérvicouterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por enfermedades oncológicas a nivel mundial, y cada año se diagnostican unos 500 000 casos nuevos en todo el mundo, donde el 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo (Muñoz *et al.*, 2006). En México, representa la tercera causa de muerte por tumores órgano genitales en mujeres, abarcando un 13.43 por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2013). El 99.8% de los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de un virus tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH).

El cáncer de cérvix se considera una enfermedad de transmisión sexual, siendo su principal etiología la infección por VPH. La asociación entre el CaCu y el VPH fue demostrada a principios de los años 80's por el Dr. Harald zur Hausen (sur Hausen, 1982). Los VPHs, pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos (Crosbie *et al.*, 2013).

Los VPHs tienen una estructura icosaédrica, compuesta por una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) con un diámetro aproximado de 55 nm, la cual contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2 (Muñoz *et al.*, 2006).

Este virus es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses. El genoma del VPH consiste de una molécula de DNA circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Figura 1) (Carreras, 2008).

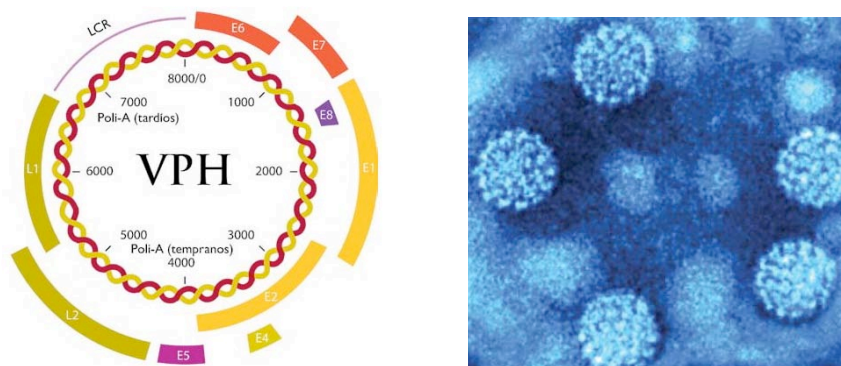


Figura 1. Organización del genoma del VPH.  
(Tomado de: López-Saavedra & Lizano-Soberón. 2006).

El VPH puede causar lesiones epiteliales. Basados en su asociación con el cáncer cervical y lesiones precursoras, puede dividirse en subtipos de alto y bajo riesgo. Los subtipos de bajo riesgo están asociados con las verrugas genitales benignas, mientras que los de alto riesgo están asociados con displasias cervicales y carcinomas invasivos (Jo *et al.*, 2005).

En personas con una deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persistente por VPH de alto riesgo genere lesiones malignas (López, 2006; Whiteside, 2005).

## **Sistema Inmune**

Funcionalmente la respuesta inmune puede dividirse en dos actividades relacionadas: el reconocimiento y la eliminación, en las cuales el sistema inmune es capaz de distinguir una gran variedad de compuestos químicos (micro y macromoléculas) y así poder distinguir un patógeno de otro. Para su estudio la respuesta inmunológica se divide en dos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa las cuales están estrechamente vinculadas para ejercer una mayor protección (Goldsby, 2004).

### **Inmunidad Innata**

Los principales componentes de la inmunidad innata son: 1) las barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas producidas en su superficie; 2) Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, leucocitos granulares y Linfocitos NK (del inglés Natural Killer Linfocite); 3) proteínas plasmáticas, las cuales incluyen miembros del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de la inflamación); 4) unas proteínas denominadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata (Janeway, 2009).

### **Inmunidad adaptativa y linfocitos T**

Las principales características que definen a la inmunidad adaptativa son su alta especificidad frente a diversas moléculas y la propiedad de “recordar” las repetidas exposiciones al mismo patógeno para poder responder con mayor energía. También posee la capacidad de reconocer gran variedad de sustancias microbianas y no microbianas y de reaccionar ante ellas. La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante mecanismos fundamentales como por ejemplo el que se realiza a través de los linfocitos T (LT). (Abbas, 2008; Martínez *et al.*, 2000).

Los LT, son los mediadores de la inmunidad celular, estas células se generan en la médula ósea y migran hacia el timo, donde proliferan y se diferencian a subpoblaciones funcionalmente distintas de LT maduras de memoria o efectoras (Abbas, 2008; Janeway, 2009). Los diferentes LT efectores llevan a cabo diversas funciones especializadas. Existen dos subpoblaciones bien definidas de LT: linfocitos T cooperadores o helper (LTh) y los linfocitos T citotóxicos (LTc). La mayoría de los LTh expresan una proteína de superficie llamada  $CD4^+$ , y gran parte de los LTc expresan otra diferente denominada  $CD8^+$  (Kindt, 2007; Goldsby, 2004).

Para la diferenciación de los linfocitos  $CD8^+$  vírgenes en LTc funcionales precisa el reconocimiento del antígeno, citocinas como Interleucina 12 (IL-12) y la participación de LTh en algunas situaciones. Los antígenos inician la respuesta y las citocinas estimulan la proliferación y la diferenciación en LTc. Estas células eliminan los microbios intracelulares, sobre todo al matar a las células infectadas, mediante el reconocimiento específico de células diana y la liberación de proteínas que inducen la muerte celular. Los LTc matan dianas que expresan el mismo antígeno asociado a la molécula de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) que desencadenó la proliferación y diferenciación de los LT  $CD8^+$  (Abbas, 2008; Díaz *et al.*, 2013).

El mecanismo mejor conocido por el cual el LTc lleva a cabo su función se basa en la secreción de gránulos cargados con distintas proteínas que producen la lisis de la célula. A medida que se elimina el antígeno y la respuesta inmunitaria innata asociada a la exposición al antígeno desaparece, las señales que mantienen normalmente en proliferación a los linfocitos activados ya no se encuentran activas. El resultado neto de estos cambios es que la mayoría de las células producidas por la activación mueren y la generación de células recién activadas declina, de manera que el grupo de linfocitos activados por el antígeno se contrae (Roitt *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013).

## Respuesta inmune contra CaCu

Las células malignas derivadas de tejidos normales que han sufrido transformaciones por VPH proliferan de manera incontrolada e invaden tejidos vecinos y pueden colonizar sitios distantes al tejido de origen, fenómeno conocido como metástasis. Para controlar estos errores en la proliferación y función normal de las células, el organismo cuenta con un mecanismo conocido como inmunovigilancia tumoral, el cual consta de dos principales procesos inmunológicos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Muñoz *et al.*, 2006). El organismo posee diferentes mecanismos para eliminar la infección del virus, uno de ellos es la respuesta inmune humoral mediante la neutralización viral mediada por anticuerpos específicos contra el virus. Sin embargo una vez que la infección ha ocurrido los anticuerpos son incapaces de eliminar el virus, particularmente si el virus es capaz de entrar en un estado latente en el cual su DNA se integra al cromosoma del hospedero (Stanley *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la respuesta inmune mediada por células es la más importante para eliminar las células neoplásicas. Esta respuesta es dependiente de la activación de los LT y de las células presentadoras de antígenos (CPA). La mayor parte de linfocitos en el epitelio cervical son LTc y, en menor cantidad LTh ambos se pueden encontrar en las capas basales del epitelio escamoso y también pueden estar en grandes números en la zona de transformación ectocervical (Delvenne, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

Las células blanco infectadas, que son blanco para el reconocimiento y lisis de LTc, son los queratinocitos presentes en las capas intermedias del epitelio escamoso, donde la transcripción y replicación viral se lleva a cabo y las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) son abundantemente expresadas.



Las proteínas tardías L1 y L2 no son buenos blancos para los LTc ya que se expresan en las capas superficiales donde las células ya están liberadas (Crosbie *et al.*, 2013; Hellner *et al.*, 2009). Los LTc son más abundantes en el sitio de la exposición al antígeno y tienen un papel crítico en la respuesta inmune. A nivel de cérvix un infiltrado con predominio LTh puede significar persistencia y la progresión de la infección viral (Nicol *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2003; Stanley, 2006).

El largo período de latencia desde la infección hasta la resolución de la enfermedad indica que el VPH ha evolucionado para escapar a la respuesta inmune, esto a pesar de la inmunovigilancia por lo cual las células tumorales presentan diversos mecanismos de evasión inmune, que permiten su crecimiento eficiente.

### **Mecanismos de evasión inmune en CaCu**

La falla del sistema inmune para detectar la entrada del virus y su posterior descendencia se lleva a cabo por que el ciclo de vida del VPH es no lítico, con lo cual no se desencadena una señal proinflamatoria que active las células dendríticas e induzca su reclutamiento hacia el ambiente local. Esto limita la captación de antígenos que serán procesados y presentados a la respuesta inmune adaptativa. Además, el virus codifica sólo proteínas que no son secretadas. La mayoría de estas, las proteínas E, se expresan en niveles bajos y principalmente en el núcleo de las células infectadas. La señal esencial que se requiere para la iniciación de la respuesta inmune se encuentra ausente en las células del epitelio escamoso (Chagas *et al.*, 2013; Crosbie *et al.*, 2013).

Se sabe que para el progreso de un carcinoma cervical es necesario que exista una falla en la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T. Muchas infecciones víricas toman como blanco a células inmunocompetentes como los LTh y células de Langerhans (CL), comprometiendo así la eliminación de la infección por alteración de los mediadores en el montaje de la respuesta inmune o con la inducción de alteraciones funcionales en las CL. Por ejemplo, en células infectadas por VPH, frecuentemente se ve disminuida o pérdida la expresión de moléculas MHC-I, las cuales son pieza clave en el reconocimiento inmune mediado por LTc (Welters *et al.*, 2008; Aldurthi *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo del CaCu, se ha demostrado la generación de un microambiente tumoral de inmunosupresión que contribuye a su progresión, a causa de la expresión o represión de diferentes genes (como Fas, ligando de Fas, citocinas y quimiocinas), importantes en la respuesta inmune y en la célula tumoral; también se producen citocinas inmunosupresoras en el sitio tumoral, las cuales favorecen la progresión del proceso neoplásico (Piersma *et al.*, 2007; Koopman *et al.*, 2000).

Dado que las citocinas tienen funciones pleiotrópicas, es difícil determinar la participación de una citocina en particular en la progresión del cáncer. Esto se debe a la relación con otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas, que actúan simultáneamente en el sitio del tumor, así como con el blanco celular sobre el que actúan (Crosbie *et al.*, 2013).

Dentro de las citocinas que se ha demostrado están relacionadas con el crecimiento, progresión y metástasis de células tumorales se encuentran: Interleucina 10 (IL-10), TGF- $\beta$  (del inglés Transforming Growth Factor Beta), VEGF (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor) e Interleucina 6 (IL-6).

Estas citocinas contribuyen a mantener un microambiente inmunosupresor donde se ven alteradas las funciones normales de los diferentes tipos celulares que lo constituyen (Joyce *et al.*, 2009).

Se ha identificado que estas citocinas son producidas por células tumorales e inducidas por proteínas del VPH, además la elevada expresión de estas citocinas es debido a que células infiltrantes del tumor (macrófagos y LT) también las producen. Esta inmunosupresión, produce disminución de la activación de los LTc, células clave en la eliminación del tumor. Esta disminución se debe principalmente a la alta expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ . Esto representa un mecanismo de evasión del virus a la respuesta inmune celular (Halak *et al.*, 1999; Alcocer *et al.*, 2006; De Grujil *et al.*, 1999; Peralta *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha descrito que el microambiente en donde se desarrollan las células neoplásicas, denominado estroma tumoral, está compuesto de matriz extracelular, vasos sanguíneos, tejido conectivo, células de la respuesta inmune y recientemente nuestro grupo de investigación ha aislado y caracterizado células estromales mesenquimales (CEM's) a partir de diferentes fuentes, las cuales incluyen tejidos normales y tumorales del cuello uterino demostrando su papel clave en el desarrollo tumoral, debido a que estas células responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del tumor, incluyendo soporte estructural, vascularización y matriz extracelular (Albini *et al.*, 2007; Valtieri & Sorrentino, 2008; Montesinos *et al.*, 2013; Joyce & Pollard, 2009; Hu & Polyak, 2008).

### **Células Estromales Mesenquimales (CEM's)**

Las CEM's son definidas como células troncales de origen no hematopoyético con propiedades multipotenciales capaces de autorrenovarse y poseen la habilidad de diferenciarse en diversos tipos celulares como: condrocitos, osteocitos y adipocitos. Presentan morfología fibroblastoide y capacidades adherentes *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999; Saldanha *et al.*, 2011). El estudio de las CEM's comenzó a finales de la década de los 60's con los trabajos realizados por Friedenstein y colaboradores (1968), donde por primera vez se describió una población de células con capacidades adherentes presentes en la médula ósea (MO) que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células se denominaron unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F, por sus siglas en inglés) (Friedenstein *et al.*, 1968; Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1978).

Estudios recientes proponen la capacidad de las CEM's para dar origen no solo a células de mesodermo sino también pueden formar células de las capas endodermal y ectodermal, capacidad denominada plasticidad celular. La plasticidad se define como la capacidad que tiene una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las del tejido de origen (Herzog *et al.*, 2003).

Debido a que alrededor del mundo diversos grupos de investigación trabajan con las CEM's, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC), ha propuesto a la comunidad científica adoptar medidas estándares para la identificación de las CEM's, para lo cual ha propuesto tres criterios: 1) las células deben ser adherentes al plástico cuando son mantenidas en cultivo; 2) deben ser positivas para los antígenos CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD90<sup>+</sup>, adicionalmente deben ser negativas para la expresión de los antígenos hematopoyéticos tales como CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD79<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, y 3) deben ser capaces de diferenciarse hacia adipocitos, osteocitos y condrocitos (Dominici *et al.*, 2006).

Recientemente, las CEM's han llamado la atención debido a sus propiedades tales como su baja inmunogenicidad, su función inmunorreguladora y sobre todo su potente capacidad de inmunosupresión en contra de LT, CD, LB y células NK (Krampera *et al*, 2003; Nwabo *et al.*, 2011). Estudios *in vitro* han demostrado que las CEM's son capaces de inhibir la proliferación de los LTc, aún bajo condiciones de estímulo ya sea en presencia de mitógenos, aloantígenos o anticuerpos tales como anti-CD3 y anti-CD28 (Rasmusson *et al* 2003; Prevosto *et al* 2007). Así mismo, en modelos *in vivo* las CEM's además de inhibir la proliferación de LTc activados, generan un ambiente anti inflamatorio caracterizado por la presencia de LTh y citocinas tipo Th2 como: TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 (PGE2), Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), Óxido nítrico (NO) e IL-10 (Ucelli *et al.*, 2007; Maccario *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2006).

La función fisiológica de la inmunosupresión mediada por las CEM's es algo difícil de entender. Recientemente, se ha planteado que las células estromales tienen una función inmunomoduladora *in vivo*, la cual previene la activación inapropiada de LTc, pero también genera un ambiente tolerogénico durante la reparación de heridas y así terminar con la respuesta inmune (Di Nicola *et al.*, 2002; Le Blanc *et al.*, 2003; Krampera *et al.*, 2003).

Esta hipótesis es apoyada por estudios de las propiedades inmunosupresoras de fibroblastos de piel, que son similares a las observadas en CEM's. Debido a las propiedades inmunosupresoras de las CEM's, aunado a su potencial de diferenciación son células atractivas para el desarrollo de protocolos de terapia celular (Aggarwal *et al.*, 2005; Zappia *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2003).

La MO es considerada como la fuente principal para el aislamiento de este tipo de células, debido a la posibilidad de aislarla con alta eficiencia y su capacidad de diferenciación a diversos tipos celulares mesodérmicos.

Pero debido a la limitación en la toma de muestra y a que es un procedimiento invasivo se han buscado fuentes alternas para la obtención de las mismas (Kern *et al.*, 2006). Por lo que también se ha reportado su obtención a partir de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal (Wexler *et al.*, 2003; Bieback *et al.*, 2004; Sabatini *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005).

Estudios mencionan que estas CEM's, pueden ser aisladas de varios tumores como cáncer de ovario (McLean *et al.*, 2011), de células gigantes de hueso (Wulling *et al.*, 2003), neuroblastomas (Johann *et al.*, 2010), osteosarcomas (Gibbs *et al.*, 2007), lipomas (Lin *et al.*, 2007), así como de cáncer gástrico (Cao *et al.*, 2009) y recientemente se reportó la identificación de CEM's en tejido de CaCu (Montesinos *et al.*, 2013).

Las CEM's presentan tropismo y una gran capacidad para migrar al sitio de la lesión, mediado por la presencia de factores solubles secretados en el foco de la inflamación o en el sitio del desarrollo tumoral en donde se da lugar al incremento en la neovascularización y crecimiento tumoral (Karp *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2010). Studeny y colaboradores (2002) han demostrado la interacción y establecimiento de CEM's en tumores malignos en un modelo *in vivo* de ratones, al inyectar CEM's humanas marcadas con proteína verde fluorescente y mostrar su migración hacia tumores de melanoma implantados. Asimismo, Djouad y colaboradores (2003), mediante un modelo de ratón alogénico reportaron, que el co-transplante de CEM's con células de melanoma, favorece el implante y crecimiento del tumor (Figura 2).

Grupos de investigación demostraron que las CEM's por medio de factores solubles interrumpen la maduración de las CD, alterando diversas moléculas como CD80, CD86 y MHC-II. La importancia de esto radica en que la maduración de las CD son un prerrequisito para la inducción de la respuesta inmunogénica antitumoral de las células T (Zhang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2012).

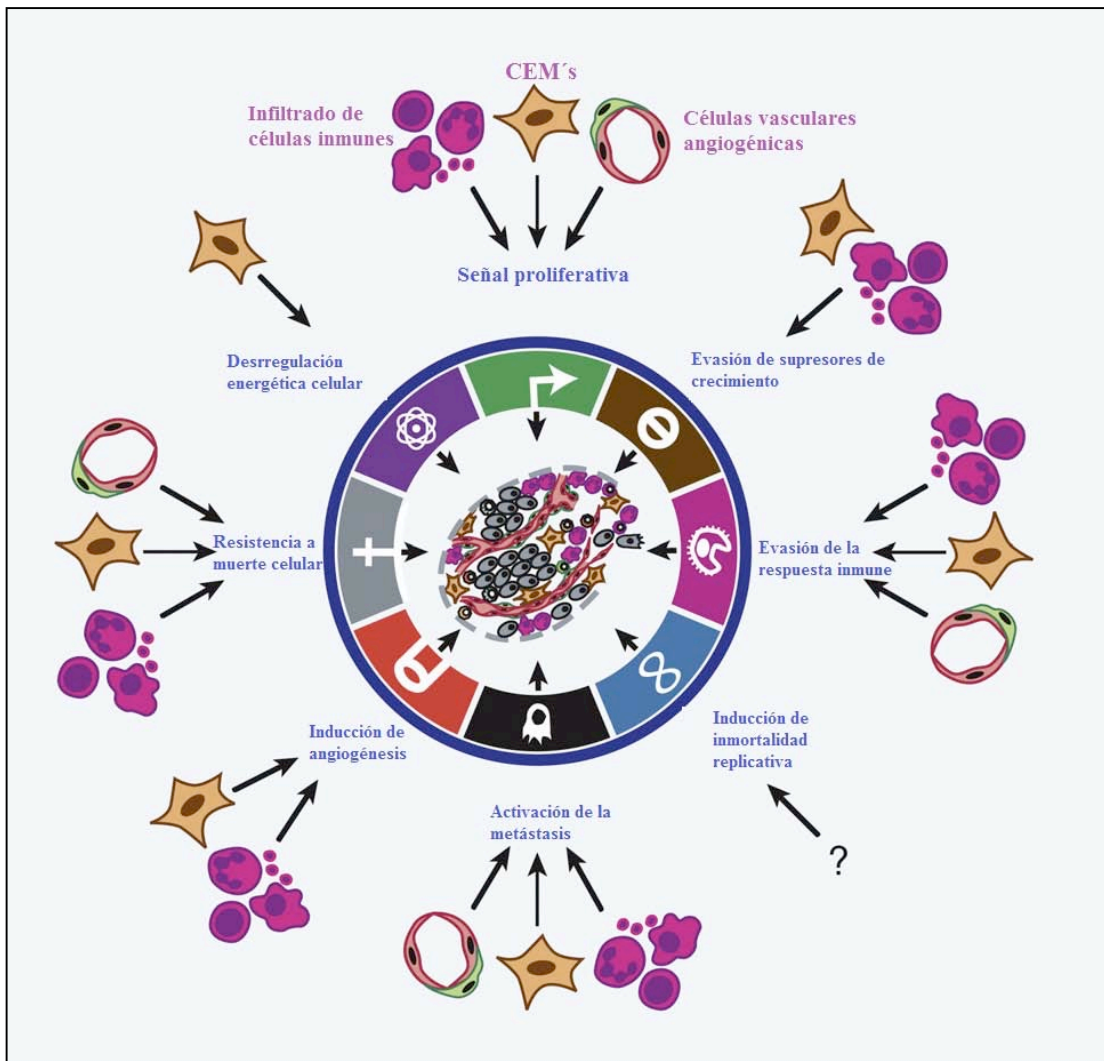


Figura 2. Contribuciones multifactoriales de las CEM's al microambiente tumoral (Tomada y modificada de: Hanahan & Coussens, 2012).

Otros autores como Karnoub y colaboradores (2007), observaron en un modelo de xenotransplante, que cuando CEM's de MO humana son mezcladas con células tumorales, se incrementa el potencial metastásico de varias líneas celulares de cáncer de mama cuando son insertadas subcutáneamente en ratones. Estos fenómenos se han atribuido a las características inherentes de estas células como son sus propiedades inmunosupresoras y a su habilidad para migrar al sitio de la lesión vía secreción de quimiocinas, por ejemplo CC L5/RANTES (Karnoub *et al.*, 2007).

Recientemente nuestro grupo de trabajo analizó las propiedades inmunosupresoras de CEM's-CaCu, co-cultivándolas en presencia de líneas celulares de cáncer cérvicouterino, como por ejemplo CaSki, encontrando que estas CEM's inducen desregulación en las moléculas MHC-I de las células CaSki (Montesinos *et al.*, 2013).

Por otra parte, la IL-10 es una potente citocina inmunosupresora, producida principalmente por las células Th2 como macrófagos, LB y poblaciones de LTh. Tiene una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la inmunosupresión, capacidad antiinflamatoria y propiedades inmunomoduladoras, que regulan la diferenciación de una gran variedad de las células inmunes y sus eventos de proliferación. Esta citocina suprime fuertemente el reconocimiento de células de CaCu por los LTc, por lo que este mecanismo tiene importantes efectos en el crecimiento tumoral por medio de la evasión inmune (Liu W *et al.*, 2013).

Estudios han demostrado que la adenosina (ADO) incrementa la producción de IL-10 a través del receptor para adenosina (RA) A2B, el mecanismo implica que la adenosina incrementa la acumulación de mRNA para IL-10 por un proceso transcripcional mediante la activación de la vía de señalización JAK1 y STAT3, ya que esta vía comúnmente se encuentra expresada cuando las concentraciones de IL-10 son elevadas (Koscsó *et al.*, 2012).



Así mismo la generación de adenosina por las CEM's a través de CD73 constituye un novedoso mecanismo de inhibición de la respuesta inmune mediada por LT (Kobie *et al.*, 2006). Este compuesto es generado a partir de nucleótidos extracelulares catalizados por ectonucleotidasas como CD39 y CD73 expresadas en diferentes tipos celulares como por ejemplo LT CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y las propias CEM's, CD73 está involucrado directamente en la regulación de la respuesta inmune (Deaglio *et al.*, 2007).

### Vía adenosinérgica

La generación de adenosina por las CEM's constituye un novedoso mecanismo de inhibición de la respuesta inmune mediada por LT. Este compuesto es generado por la desfosforilación de nucleótidos de adenina, y en muchos tejidos, los nucleótidos de adenina son exportados al espacio extracelular, donde son desfosforilados a AMP por las ectoenzimas CD39 (ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa-1), y el AMP es desfosforilado en adenosina por CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) (Kobie *et al.*, 2006; Deaglio *et al.*, 2007).

CD39 es una proteína integral de membrana que fosfohidroliza adenosín trifosfato (ATP) y menos eficientemente adenosín difosfato (ADP), de manera dependiente de Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup> produce adenosín monofosfato (AMP) (Heine *et al.*, 2001). Es constitutivamente expresada en bazo, timo, hígado y placenta (Enjyoji *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999; Mizumoto *et al.*, 2002; Kapojos *et al.*, 2004), y en estos órganos se encuentra asociada primariamente con células endoteliales y poblaciones de células inmunes, como: LB, células NK, CD, monocitos, macrófagos y LTh (Dwyer *et al.*, 2007). Su expresión es regulada por diversas citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo e hipoxia.

En adición, la expresión de CD39 incrementa en diversos tumores sólidos como: cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas así como en leucemia linfocítica crónica, lo que sugiere que esta enzima se encuentra involucrada en el desarrollo y progresión tumoral (Deaglio *et al.*, 2011; Eltzschig *et al.*, 2009; Bastid *et al.*, 2012).

El segundo paso en el metabolismo de los nucleótidos de purina es llevado a cabo por CD73 que desfosforila AMP extracelular en ADO (Sträter, 2006). CD73 se encuentra en una gran variedad de tejidos, incluyendo colón, cerebro, riñón, hígado, pulmón y corazón; en los leucocitos derivados de sangre periférica, bazo, timo y médula ósea (Thompson *et al.*, 2004; Lennon *et al.*, 1998).

Diversos estudios muestran que la expresión y función de esta ectoenzima está sobre regulada bajo condiciones de hipoxia, así como por la presencia de diversos mediadores proinflamatorios, como TGF- $\beta$ , interferones (IFNs), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y PGE2. El incremento en su expresión ha sido reportada en diversos tejidos neoplásicos, lo que sugiere que está involucrada en el inicio y progresión de una neoplasia (Synnestvedt, 2002; Eltzschig *et al.*, 2003; Beavis *et al.*, 2012; Regateiro *et al.*, 2011).

Dado que la combinación de CD39 y CD73 degradan ATP, ADP y AMP hacia adenosina básicamente se les puede considerar como interruptores inmunológicos que impulsados por ATP modifican la actividad proinflamatoria de las células inmunes hacia un estado antiinflamatorio, inhibiendo la activación, expansión clonal y “homing” de células T tumor específicas. Varios estudios señalan el papel crítico del complejo CD39/CD73 en el proceso de inmunoescape tumoral contribuyendo directamente a la modulación del crecimiento, diferenciación y metástasis de células cancerígenas debido a los altos niveles de ADO (Bastid *et al.*, 2012; Zhang, 2012; Pellegatti *et al.*, 2008).

La adenosina es una molécula autocoide lo que significa que se encuentra en todas las células del cuerpo y esta propiedad le confiere múltiples funciones en los sistemas fisiológicos, entre los que se encuentran el sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, urogenital, respiratorio y sistema linfático (Góngora *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2008).

La generación de ADO se observa como consecuencia de lesión tisular, necrosis e isquemia, por lo que es considerada una de las fuentes más importantes de este nucleósido de manera extracelular en diversos tumores sólidos como cáncer de vejiga, cáncer de colon, glioma y glioblastoma entre otros (Zhang *et al.*, 2010; Sitkovsky *et al.*, 2008). Las altas concentraciones de ADO extracelular en el microambiente tumoral se han confirmado recientemente.

La concentración extracelular de adenosina es generalmente constante en la mayoría de los tejidos, pero puede incrementar rápidamente 100 veces más en tejido hipóxico y en respuesta a la inflamación (Ohta *et al.*, 2006; Schulte *et al.*, 2003).

La actividad funcional de la adenosina es llevada a cabo por el acoplamiento con sus receptores con cuatro subtipos, conocidos como: RA1, RA2A, RA2B, y RA3. RA1 y RA2A presentan mayores afinidades relativas para la adenosina mientras que RA2B y RA3 son de baja afinidad, estos receptores se encuentran expresados en diversos tipos celulares implicados en la respuesta inmune. Por ejemplo en leucocitos tales como neutrófilos y macrófagos donde se expresan los cuatro tipos de receptores, en LB está presente RA2A, y en LT por lo general se encuentran RA2A, RA2B y RA3 (Figura 3). Estos conducen principalmente a efectos antiinflamatorios tales como la reducción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, Interferón Gamma (IFN- $\gamma$ ), y la secreción elevada de IL-10 (Clayton *et al.*, 2011).

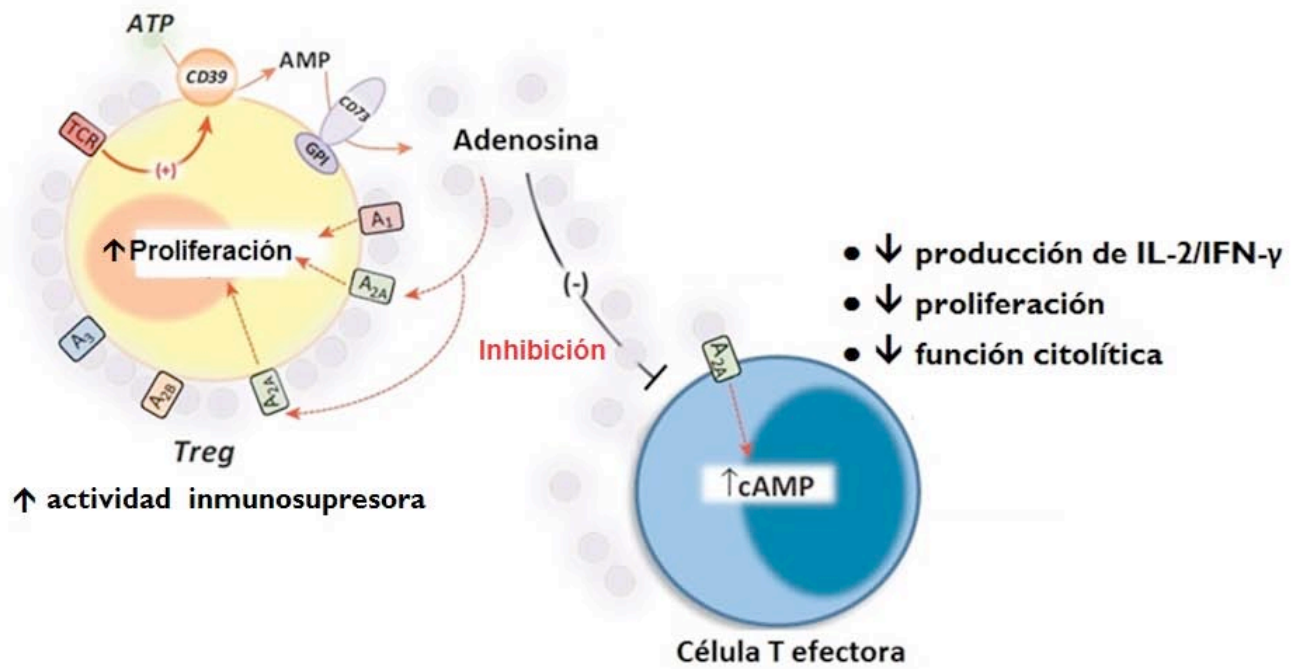


Figura 3. Vía adenosinérgica: Generación de ADO y su interacción con sus receptores en linfocitos (Tomada y modificada de: Antonioli *et al.*, 2013).

Estos cuatro receptores se encuentran acoplados a distintas proteínas de tipo G. G<sub>i</sub> se encuentra acoplado a RA1 y RA3 que disminuyen los niveles de AMP cíclico intracelular (AMPc), mientras que G<sub>s</sub> está acoplado a los receptores RA2A y RA2B que aumentan los niveles de AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa (Hasko *et al.*, 2004). En contraste con los otros receptores de adenosina, que están activados en concentraciones fisiológicas de adenosina (30-300 nM en el fluido intersticial), el RA2B requiere altos niveles de adenosina generada en respuesta a condiciones patológicas (Fredholm *et al.*, 2001).

RA2A y RA2B son de alta y baja afinidad respectivamente, dispuestos predominantemente en la membrana de LTc, son los responsables de ejercer efecto sobre estas células efectoras (Huang *et al.*, 1997). La elevada producción de AMPc a través de la señalización vía RA2A y RA2B resulta en la inhibición de la activación de los LT (Takayama *et al.*, 1989; Sugiyama *et al.*, 1992), y muchas otras funciones efectoras, incluyendo proliferación, expansión y la secreción de citocinas importantes con función antitumoral como IFN- $\gamma$  (Koshiba *et al.*, 1997) y TNF- $\alpha$  (Poehlein *et al.*, 2003).

La estimulación de RA2A durante la activación de LTc inhibe significativamente la citotoxicidad y la producción de citocinas y se ha informado que se inhibe la proliferación de estas células, induciendo anergia y una baja en la producción de IFN- $\gamma$  (Ohta *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2004; Deaglio *et al.*, 2007; Csoka *et al.*, 2008; Zarek *et al.*, 2008).

En la última década, se ha señalado a la cafeína o los análogos de esta (teofilina, y teobromina) como posible tratamiento para combatir el cáncer. La cafeína es un antagonista análogo en estructura a la adenosina que es capaz de bloquear la transformación celular en un modelo celular murino. Se ha propuesto que la cafeína puede inhibir el crecimiento tumoral, ya que al bloquear los RA, principalmente el RA2A presente en los LTc, se impide su inhibición y actividad efectora, dando como resultado una mejor actividad antitumoral y como consecuencia reducción de la metástasis y la angiogénesis en los tumores (Ohta *et al.*, 2006; Franco, 2008; Nomura, *et al.*, 2005).

Como ya se mencionó el poder de inmunosupresión de la adenosina es altamente eficiente sobre los diversos tipos de células inmunes, sin embargo la acción directa de esta ADO no es el único mecanismo por el cual se puede ver afectada una correcta respuesta inmunológica.

Estudios demuestran que esta adenosina al interactuar con su RA2B presente en células de microglia activadas, se incrementa la producción de IL-10, mediante un proceso de transcripción promoviendo un aumento en la acumulación de mRNA para esta citocina antiinflamatoria, al mismo tiempo que se suprime la producción de citocinas proinflamatorias (Koscsó *et al.*, 2012). Por otra parte también se ha demostrado que CD73 presente en las CEM's es capaz de generar adenosina la cual tiene efectos directos sobre la respuesta inmune mediada por LT, así mismo esta adenosina puede interactuar con sus receptores presentes en membrana, específicamente RA2A, RA2B y RA3 (Montesinos M. *et al.*, 2004).

### **Interleucina 10**

IL-10 es una potente citocina inmunosupresora, que presenta una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la inmunosupresión, capacidad antiinflamatoria y propiedades inmunomoduladoras, que regulan la diferenciación de una gran variedad de las células inmunes y sus eventos de proliferación (Liu W *et al.*, 2013). La diversidad de células hematopoyéticas que producen IL-10 ha crecido, y ahora se sabe que es producida tanto por células inmunes innatas y adaptativas, incluyendo además a células Th2 como: macrófagos, monocitos, CD, LB y LTh (Figura 4) (Hawrylowicz & O'Garra, 2005; O'Garra *et al.*, 2007).

#### **Efectos *in vitro* de la IL-10 sobre células inmunes**

Independientemente del tipo celular que produzca la IL-10, su principal papel parece ser la contención y supresión de la respuesta inflamatoria con la finalidad de inmunomodular la respuesta efectora y minimizar el daño a tejidos en respuesta a los retos microbianos (Asadullah *et al.*, 2003; Wakkach *et al.*, 2003). La IL-10 promueve la síntesis de citocinas con perfil Th2 para inhibir la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T, particularmente mediante la supresión de IL-12 en las células accesorias. De acuerdo con esto, IL-10 co-estimula la proliferación y diferenciación de LB (Romagnani *et al.*, 1995).

Por otra parte IL-10 suprime la producción de citocinas pro inflamatorias y la capacidad de presentación antigénica de monocitos/macrófagos y CD, mediante la disminución del MHC-II inducido por IFN- $\gamma$ , y por la desregulación de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y algunas moléculas de adhesión como CD58 (De Wall *et al.*, 1991; Fiorentino *et al.*, 1991; Willems *et al.*, 1994; Creery *et al.*, 1996).

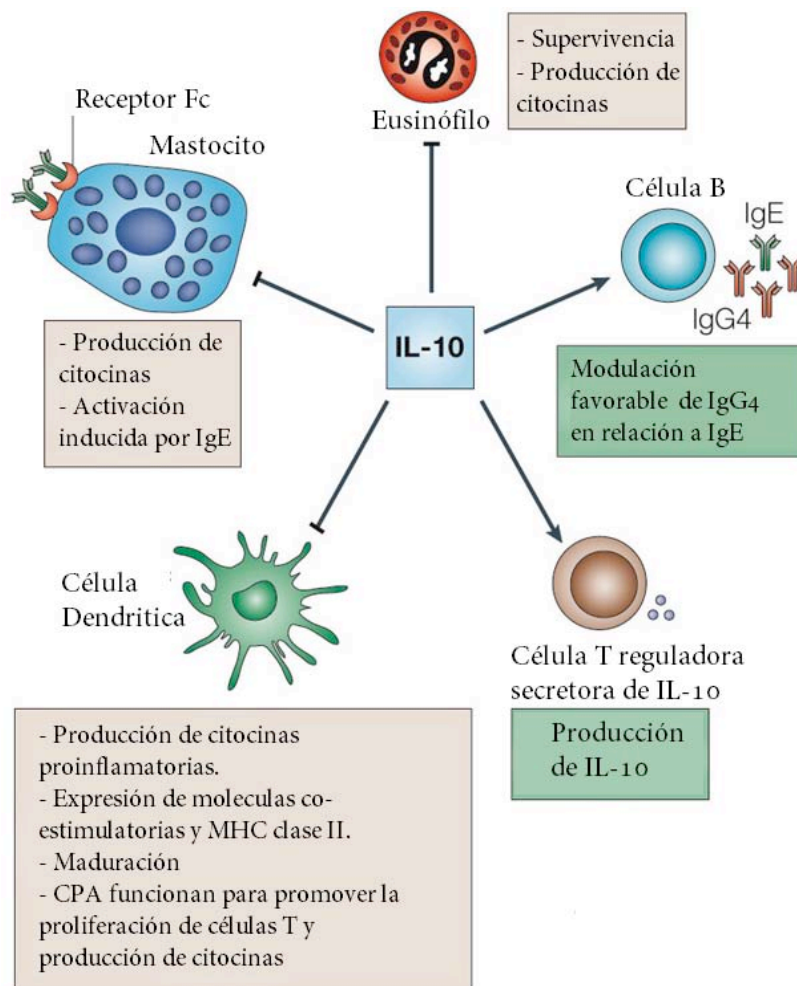


Figura 4. Principales funciones de IL-10 sobre el sistema inmune (Tomada y modificada de: Hawrylowicz & O'Garra, 2005)

Estudios muestran que después de la estimulación con lipopolisacáridos las células dendríticas maduras secretan altos niveles de IL-10, la cual se sabe inhibe la maduración y función de las CD. De esta manera se inhibe la habilidad de las CD para producir IL-12 la cual es esencial para impulsar la diferenciación de células Th1 (Kim *et al.*, 2011).

Además del impacto indirecto a través de las CPA, IL-10 también ejerce efectos directos sobre los linfocitos T. Principalmente, los efectos inhibitorios sobre los linfocitos CD4<sup>+</sup>, donde IL-10 inhibe su proliferación y síntesis de citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  (Del Prete *et al.*, 1993; Groux *et al.*, 1996). La presencia de esta citocina durante la activación de los LTh está relacionada con el desarrollo de fenotipos reguladores como lo son los Treg (Groux *et al.*, 1997; Zeller *et al.*, 1999; Levings *et al.*, 2001).

Trabajos *in vitro* muestran que la falta en la respuesta por las LTc inducida por IL-10 tiene efectos también en la inhibición de la presentación antigénica y la función accesoria de los monocitos, dado que esta citocina está relacionada con la desregulación en la expresión de MHC-I y otras moléculas accesorias sobre estas células. La falla de los LTc para proliferar en respuesta a los monocitos en presencia de IL-10 correlaciona con la reducción en la capacidad de lisis de estos linfocitos (Groux *et al.*, 1998; Bejarano *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993).

Bolpetti y colaboradores (2010), demostraron en un modelo murino tumoral a partir de células TC-1, que paralelamente a la reducción del tumor en ratones deficientes de IL-10 o tratados con anticuerpos IL-10 neutralizantes incrementa el infiltrado de LTc y Treg, indicando que la ausencia de IL-10 incrementa el infiltrado de LTc. Por lo que IL-10 no tiene efecto sobre la proliferación de las células tumorales sino en la inducción de linfocitos T con un perfil regulador lo que minimiza la respuesta efectora anti tumoral.



## IL-10 en CaCu

Diferentes estudios han reportado un incremento en los niveles de IL-10 en sueros de pacientes con melanoma (Mazurenko *et al.*, 2006) y otros tumores sólidos (Carosella *et al.*, 2008), así como la expresión de IL-10 por células tumorales (Le Gal *et al.*, 1999; Marchal *et al.*, 2001; Gros *et al.*, 2008). Uno de los mecanismo frecuentemente ligado al escape tumoral de la vigilancia inmune del hospedero es la alteración en el MHC-I (García *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2001). La pérdida completa de las moléculas MHC-I da como resultado la resistencia de las células tumorales a la lisis por parte de los LTc. Esta pérdida total de las moléculas ha sido reportada en diferentes tipos de tumores humanos como: pulmón, hígado, entre otros (Garrido *et al.*, 1993; Garrido *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 1997).

En pacientes con CaCu, IL-10 es secretada por Treg estimulados con antígenos de VPH y recientemente utilizando un modelo tumoral TC-1 HPV-16 de ratón, se demostró que la IL-10 es producida también por macrófagos asociados a tumor que inducen el desarrollo de un fenotipo regulador sobre los linfocitos como un mecanismo de escape que facilita el crecimiento del tumor, sugiriendo la correlación entre la alta expresión de IL-10 y el riesgo de desarrollar CaCu en mujeres infectadas por VPH. (Bolpetti *et al.*, 2010; Agaoglu *et al.*, 2011). La progresión del CaCu está asociada con un cambio en la producción de citocinas de Th1 a Th2. Este cambio a un perfil inmunosupresor, está caracterizado por la secreción de IL-10, asociado con la progresión de lesiones pre malignas a cáncer (Bais *et al.*, 2007; Clerici *et al.*, 1997).

Debido a sus habilidades inmunosupresoras sobre distintas poblaciones de células inmunes, especialmente LT, las CEM's han ganado la atención de diversos grupos de trabajo. Especialmente estudiando la inmunosupresión mediada por factores solubles como lo es la IL-10. Liu W y colaboradores (2013), demostraron que las CEM's secretan bajas concentraciones de IL-10, pero al ser co-cultivadas con células dendríticas (mediante un sistema transwell) se ven incrementadas de manera significativas las concentraciones de esta citocina en sobrenadante.

Por otro lado la maduración de las CD se encontró disminuida por la presencia de IL-10, aunada a la disminución de IL-12. Estos datos sugieren que las CEM's pueden modular el sistema inmune, no sólo actuando directamente sobre LT, sino también en la primera etapa de la respuesta inmune a través de la inhibición de la diferenciación y maduración de CD. Mediante esta falla en la maduración de las CD se ve comprometida en gran medida la presentación antigénica y la activación de LT capaces de responder en contra del tumor.

Esta IL-10 además puede contribuir en gran medida a un deterioro en la respuesta inmune antitumoral a través de la desregulación del MHC-I ayudando al tumor a escapar de los LTc. Rodríguez y colaboradores (2011), demostraron en un modelo de CaCu que la pérdida o desregulación del MHC-I se encontraba en pacientes con alta producción de IL-10 en el microambiente tumoral. Adicionalmente, IL-10 facilita el crecimiento tumoral por la inducción de Treg, por lo que la mayoría de las mujeres con CaCu tienen en circulación Treg que inhiben la respuesta efectora en contra del tumor (de Jong *et al.*, 2004).

Por su parte Montesinos y colaboradores (2013) reportaron que en sobrenadantes de co-cultivos de CEM's (de tres fuentes diferentes: CaCu, Médula ósea normal y cérvix normal) con líneas celulares de cáncer cérvicouterino (principalmente CaSki), existe un incremento en las concentraciones de IL-10, la cual está directamente involucrada en una desregulación de la molécula MHC-I en estas líneas de CaCu. Por lo que pacientes con alta expresión de IL-10 correlacionan con lesiones de alto grado, por tanto, la presencia de estas CEM's en el microambiente tumoral contribuyen fuertemente en la producción de esta citocina, promoviendo el crecimiento e invasión de estas células malignas, las cuales no pueden ser reconocidas y eliminadas por LTc, dado que IL-10 desregula las moléculas del procesamiento antigénico como MHC-I. La generación de IL-10 mediante la maquinaria de estas CEM's, a través de la vía adenosinérgica constituye un novedoso mecanismo por el cual el tumor mantiene un microambiente inmunosupresor.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El CaCu representa un problema importante de salud en nuestro país, puesto que ocupa el tercer lugar de mortalidad por cáncer entre las mujeres en edad productiva (INEGI, 2013). Esta enfermedad se asocia en aproximadamente 99.8% con la infección por VPH. Sin embargo uno de los principales rasgos en el desarrollo de la enfermedad es la falla en la respuesta inmune celular mediada por LTc. Las células tumorales de CaCu frecuentemente muestran disminución o pérdida en la expresión de moléculas del procesamiento antigénico y del MHC-I, lo que les permite evadir el reconocimiento inmune mediado por LTc (Serman, 2002). Por otro lado, se ha propuesto que otras células que se encuentran en microambiente tumoral, tal como las CEM's, juegan un papel importante para favorecer el crecimiento del tumor mediante mecanismos de inmunosupresión (Albini *et al.*, 2007; Pittenger *et ál.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007).

Nuestro grupo de investigación ha obtenido y caracterizado CEM's de tejidos normales de cuello uterino (CEM's-CN) y de tumores avanzados de CaCu (CEM's-CaCu), y recientemente se demostró que el co-cultivo de CEM's con células tumorales disminuye la expresión de moléculas MHC-I en la membrana de las células tumorales y por tanto su reconocimiento inmune mediado por LTc (Montesinos *et al*, 2013). Por otra parte, también hemos encontrado que estas CEM's tienen una alta expresión de moléculas CD73 en membrana celular y son capaces de desfosforilar AMP y convertirla en adenosina (Morales-Ramírez, 2014). Asimismo, estas CEM's expresan en membrana receptores específicos para ADO como son A2A, A2B y A3 (Pérez, 2012; Montesinos M. *et al.*, 2004).

Uno de los mecanismos por el cual las CEM's mantienen un estado de inmunosupresión sobre las células del sistema inmune es la generación de IL-10 (Ucelli *et al.*, 2007; Maccario *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2006). Con base en lo anterior y al hecho de que se ha reportado que la interacción de adenosina con receptores específicos como A2B, inducen la generación de IL-10 (Koscsó *et al.*, 2012), en el presente proyecto se analizó la capacidad de CEM's-CaCu para producir IL-10 mediante la inducción con AMP y ADO, así como su capacidad inhibitoria sobre la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> a través de esta citocina.

## HIPÓTESIS

Se sabe que las CEM's expresan de manera característica la enzima 5'ectonucleotidasa (CD73), la cual convierte el monofosfato de adenosina (AMP) en adenosina (ADO). Por otro lado, se ha demostrado que la interacción de ADO con receptores específicos en células inmunosupresoras como células T reguladoras, es capaz de inducir la producción de IL-10. Además, se ha demostrado que IL-10 tiene un efecto supresor sobre la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>. Nuestro grupo de investigación ha obtenido y caracterizado CEM's derivadas de tumores de cáncer cérvicouterino (CEM's-CaCu), asimismo ha demostrado la presencia de CD73 y receptores para adenosina en estas células. Por tanto, se espera que al cultivar CEM's-CaCu en presencia de AMP y ADO, estas células produzcan IL-10, la cual tenga un efecto inhibitor sobre a proliferación de LT CD8<sup>+</sup>.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Analizar la capacidad de CEM's-CaCu para generar IL-10 en presencia de monofosfato de adenosina (AMP) y adenosina (ADO), y su capacidad inmunosupresora mediante esta citocina sobre Linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar si las CEM's-CaCu cultivadas en presencia de AMP y ADO son inducidas a producir IL-10.
- Analizar la capacidad supresora de la IL-10 producida por los CEM's-CaCu sobre Linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

#### Células Estromales Mesenquimales (CEM's)

Se contó con un banco de 5 estirpes de células estromales mesenquimales (CEM's) obtenidas de cáncer cérvicouterino (CEM's-CaCu); 5 estirpes de CEM's de cérvix normal (CEM's-CN); y 5 estirpes de CEM's de médula ósea normal (CEM's-MO), las cuales fueron utilizadas como controles estándar. Las CEM's fueron caracterizadas con base en los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, mostrando las siguientes características: adherencia en condiciones estándar de cultivo; expresan los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecen de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79/CD19 en membrana celular; y finalmente han sido caracterizadas por su capacidad de diferenciarse a osteocitos, adipocitos y condrocitos (Montesinos *et al.*, 2013). Las células fueron cultivadas con Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) bajo en glucosa (In vitro, S.A.) el cual fue suplementado con SFB (Gibco, USA) al 15%, penicilina (100 IU/mL) (Lakeside, México), 100 µg/ml estreptomina (Sigma Aldrich, USA), L-glutamina 2mM (Sigma Aldrich) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Cultivos de CEM's en presencia de AMP y ADO

Con la finalidad de evaluar si las CEM's son inducidas a producir IL-10 en cultivo con AMP (Sigma Aldrich, USA) en ADO (Sigma Aldrich, USA), 200,000 CEM's derivadas de médula ósea (CEM's-MO), de cérvix normal (CEM's-CN) y de CaCu (CEM's-CaCu) fueron cultivadas durante un periodo de 1-3 días, en placas de 24 pozos (Corning costar, USA) con medio DMEM bajo en glucosa (In vitro, S.A.), suplementado con SFB (Gibco, USA) al 15%, penicilina (100 IU/mL) (Lakeside, México), 100 µg/ml estreptomina (Sigma Aldrich, USA), L-glutamina 2mM (Sigma Aldrich, USA) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las concentraciones de AMP y ADO utilizadas se representan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Concentraciones de AMP y ADO utilizadas en el cultivo de las CEM's.**

<b>Tipo Celular</b>	<b>Adenosina <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>AMP <math>\mu\text{M}</math></b>
CEM's de MO	1,10,100	1,10,100
CEM's de CaCu	1,10,100	1,10,100
CEM's de CN	1,10,100	1,10,100

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron colectados a las 24, 48 y 72 horas en tubos Ependorff de 1.5 mL (Corning, USA) y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriormente llevar a cabo la determinación de IL-10 mediante ensayo por inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) con un kit para IL-10 (PrepoTech Inc., USA).

#### **Cuantificación de IL-10 por ELISA**

Para la cuantificación de IL-10 producida en los cultivos de CEM's en presencia de AMP y ADO, se utilizó un protocolo para la determinación estándar de IL-10 mediante ELISA (PeproTech Inc. USA). Este ensayo consiste en la técnica de sándwich de un inmunoensayo enzimático. El anticuerpo de captura fue fijado en una placa 96 pozos fondo plano (Corning costar, USA) toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa 4 veces con 300  $\mu\text{l}$  de amortiguador de lavado (0.05% de Tween en PBS), para posteriormente bloquear con 300  $\mu\text{l}$  de otra solución amortiguadora r (1% de BSA en PBS) incubando 1 hora. Posteriormente se lavó la placa 4 veces (300  $\mu\text{l}$ ) para adicionar la muestra estándar y los sobrenadantes de los cultivos dentro de los pozos, incubando 2 horas para posteriormente realizar 4 lavados (300  $\mu\text{l}$ ) y adicionar un anticuerpo específico a IL-10 para determinar su presencia, se incubó nuevamente por 2 horas.



Después de lavar la placa 4 veces (300  $\mu$ l), se agregaron 100  $\mu$ l de avidina unida a la enzima peróxidasa a una dilución 1:200 en 0.05% de Tween con 0.1% de BSA en PBS, incubando durante 30 minutos. Después de 4 lavados, se adicionaron 100  $\mu$ l del sustrato líquido ABTS (Sigma Aldrich, USA) para iniciar la reacción a temperatura ambiente hasta que el color se desarrolló (aproximadamente 60 minutos), y en seguida se leyó la placa en un lector de ELISA a 405nm-650nm.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando Graph Pad Prism (6.0). Las comparaciones entre las concentraciones de IL-10 por ELISA en los diferentes grupos fueron analizadas por ANOVA y un post test de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando la probabilidad de rechazo de la hipótesis nula fue menor o igual a 5% ( $p < 0.05$ )

### **Análisis de la actividad inhibitoria de IL-10 sobre linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

#### **Generación de IL-10 por CEM's**

Se cultivaron 200,000 CEM's de cada tipo CEM's-CN, CEM's-MO y CEM's-CaCu por duplicado en placas de 6 pozos con DMEM bajo en glucosa y suplementado con SFB al 15%, penicilina 100U, 100  $\mu$ g/ml estreptomycin, 2mM de L-glutamina a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, para permitir la adherencia de las células. Al día siguiente se retiró el medio para ser reemplazado con DMEM suplementado conteniendo AMP y ADO a una concentración 1 $\mu$ M (2mL por pozo) por un periodo de tiempo de 72 horas, estas condiciones fueron determinadas en base a los resultados obtenidos por ELISA.

### **Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica y purificación de LT CD8<sup>+</sup>**

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron de donadores normales (Laboratorio de inmunología y cáncer, UIMEO), la sangre fue colectada en tubos vacutainer de 6 mL con anticoagulante ACD (Becton Dickinson, USA). La sangre se colocó en un tubo de 50 mL (Corning, USA) donde se agregó PBS a la sangre a una proporción 1:1, homogenizando bien.

Posteriormente se agregaron 10 mL de la mezcla a tubos de 15 mL conteniendo 3mL de ficoll- histopaque (Sigma Aldrich, USA).

Después de centrifugar a 2500 rpm durante 30 minutos, se procedió a retirar la capa de células mononucleares. Las células fueron lavadas con PBS dos veces. Al final del último centrifugado el botón de células se resuspendió en 2mL de PBS+ SFB al 2% para realizar el conteo con ayuda de un hemocitómetro y azul de tripano.

Los LT CD8<sup>+</sup> se separaron por selección negativa con base al protocolo de *EasyStep Human CD8<sup>+</sup> enrichment kit* (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada). Los LT CD8<sup>+</sup> fueron teñidos con carboxifluoresceína (CFSE) a una concentración final de 4µM durante 20 minutos antes de ser co-cultivados con las CEM's.

### **Análisis de la inhibición de la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> por IL-10**

Para determinar la inhibición de la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> a través de IL-10, las CEM's previamente tratadas con AMP o ADO fueron co-cultivadas a una proporción 1:1 con los LT CD8<sup>+</sup> marcados con CFSE (5µM) y estimulados con perlas las cuales contienen anti-CD3/CD2/CD28 (Invitrogen, USA) en una proporción 1:2 (perla: LT).

Se utilizó medio DMEM enriquecido con aminoácidos esenciales 100X (Sigma Aldrich, USA), piruvato de sodio 100X (Sigma Aldrich, USA), mercaptoetanol 1000X (Invitrogen, USA) y glutamax 100X (Gibco), esto por 72 horas.

En los co-cultivos se adicionó cafeína a una concentración de 300 µM/mL, la cual se sabe bloquea los receptores para de ADO (Góngora *et al.*, 2005), y de la mismas manera se agregaron 2 µg/mL de Anti-Human IL-10 (PeproTec Inc., USA) como se muestra en la tabla 2. Los controles utilizados en este ensayo se muestran en la tabla 3.

**Tabla 2: Condiciones de cultivo de los LT CD8<sup>+</sup>.**

CEM's-CN			CEM's-MO			CEM's-CaCu		
<b>Basal</b>	<b>AMP</b>	<b>ADO</b>	<b>Basal</b>	<b>AMP</b>	<b>ADO</b>	<b>Basal</b>	<b>AMP</b>	<b>ADO</b>
	Cafeína	Cafeína		Cafeína	Cafeína		Cafeína	Cafeína
	LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>		LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>		LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>
	<b>AMP</b>	<b>ADO</b>		<b>AMP</b>	<b>ADO</b>		<b>AMP</b>	<b>ADO</b>
Cafeína	Cafeína	Cafeína	Cafeína	Cafeína	Cafeína	Cafeína		
LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>	LTCD8 <sup>+</sup>		
αIL-10	αIL-10	αIL-10	αIL-10	αIL-10	αIL-10	αIL-10		

**Tabla 3: controles de LTCD8<sup>+</sup> utilizados para citometría de flujo.**

Controles de LTCD8 <sup>+</sup> para citometría				
Autofluorescencia	CFSE sin estímulo	CFSE sin estímulo (marcados con CD8 <sup>+</sup> )	CFSE con estímulo	LT CD8 <sup>+</sup> (marcados con CD8 <sup>+</sup> )

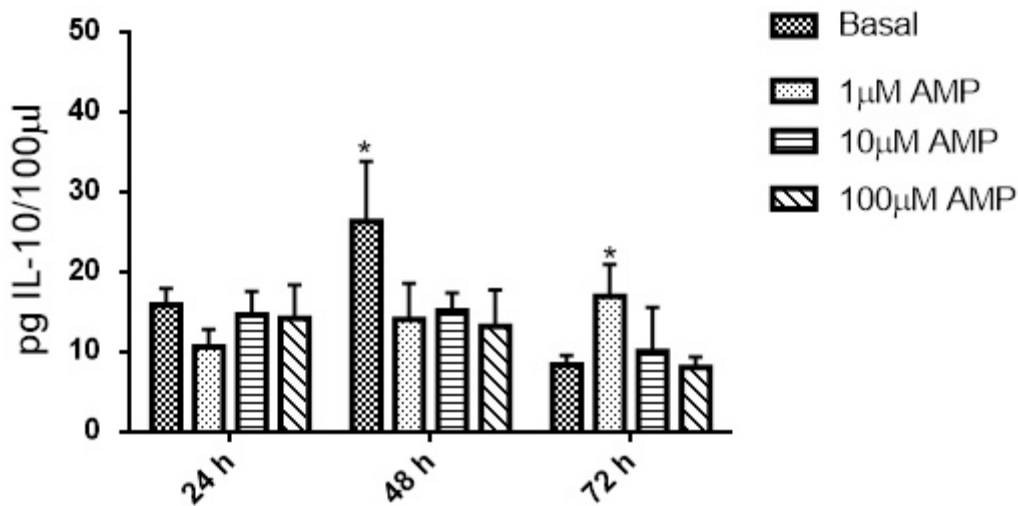
Después de las 72 horas de co-cultivo, los LT CD8<sup>+</sup> fueron colocados en tubos para citometría de flujo (BD Biosciences), para lavarlos 2 veces con PBS+ SFB al 2% a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Los LT CD8<sup>+</sup> fueron resuspendidos en 100 µl de PBS+SFB al 2% en presencia de anticuerpo anti-human CD8<sup>+</sup> marcado con APC (BD Biosciences) e incubados durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 1500 rpm 5 minutos y lavadas dos veces con PBS+ SFB al 2%, y finalmente resuspendidas en 300 µl de PBS+ SFB al 2% para su lectura en un citómetro de flujo (FACScalibur). Para determinar la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> se consideraron 15,000 eventos, posteriormente los resultados fueron analizados con el programa Summit V.4.3 (Dako, USA).

## RESULTADOS

### CEM's-CaCu incrementan fuertemente la producción de IL-10 en presencia de AMP y ADO.

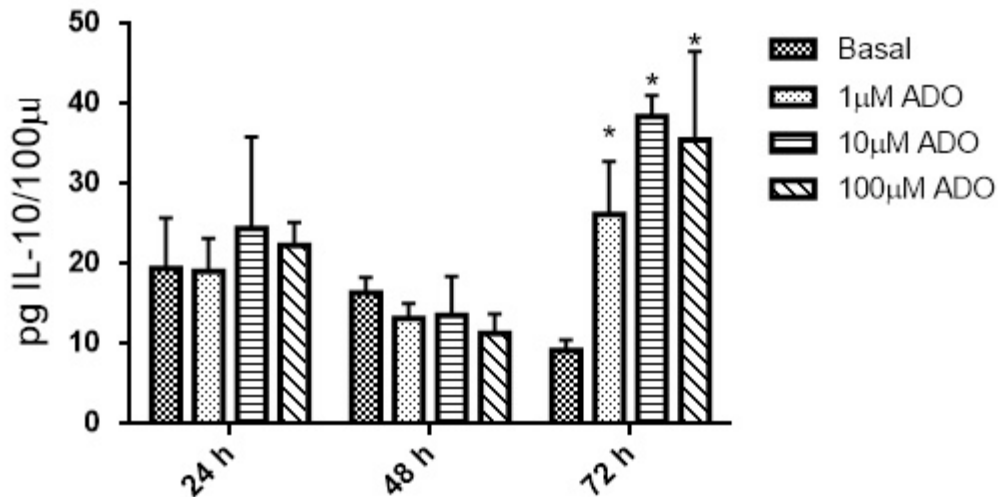
Con el propósito de evaluar la capacidad de las CEM's para producir IL-10 en presencia de AMP y ADO, CEM's derivadas de cérvix normal (CN), cáncer cérvicouterino (CaCu) y médula ósea (MO) fueron incubadas con AMP o adenosina (ADO) a las concentraciones de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas, y posteriormente se determinó la cantidad de esta citocina secretada en el sobrenadante a través de la técnica ELISA.

Las CEM's-CN cultivadas en presencia de las diferentes concentraciones de AMP no mostraron incrementos significativos en la producción de IL-10 en relación a la cantidad basal de esta citocina (17pg) detectada en los sobrenadantes de estas CEM's cultivadas en ausencia de AMP (Gráfica 1).



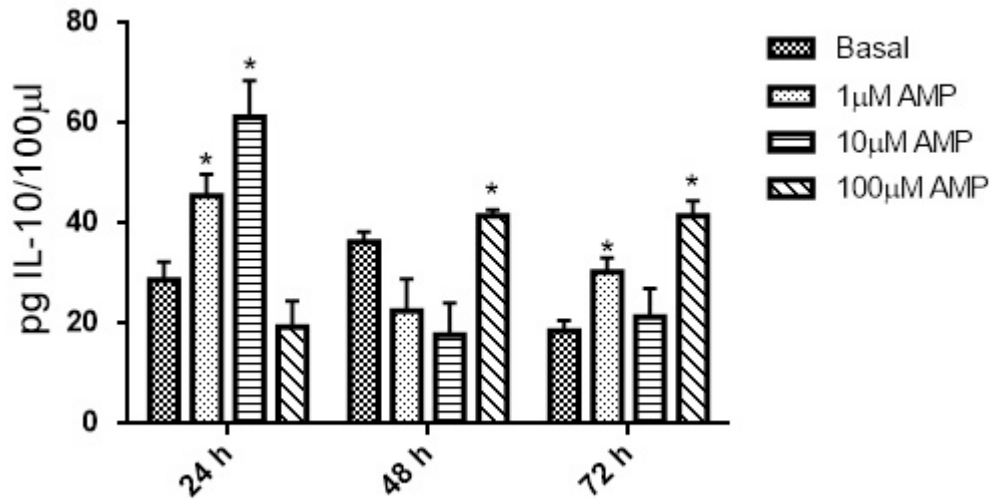
**Gráfica 1: Generación de IL-10 por CEM's-CN cultivadas en presencia de AMP.**  $2 \times 10^5$  CEM's-CN fueron cultivadas en presencia de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de AMP durante 24, 48 y 72 horas. Todos los datos representan la media de 3 ensayos independientes. \*Diferencias significativas  $P < 0.05$ , en relación al basal de las CEM's-CN mostrado en el tiempo de cultivo indicado.

Por otro lado, cuando las CEM's-CN fueron cultivadas en presencia de ADO a las diferentes concentraciones, se observó un incremento significativo de IL-10 en relación a la cantidad de IL-10 producida de manera basal por estas células, después de 72 horas de cultivo (Gráfica 2). Cabe mencionar que en este tiempo de cultivo, la concentración de IL-10 se triplicó, en relación a la concentración basal (10pg/100µl), cuando las CEM's-CN se cultivaron en presencia de 10 µM y 100 µM de ADO, obteniéndose concentraciones de IL-10 de 38.4 pg/100µl y 35.5 pg/100µl respectivamente.



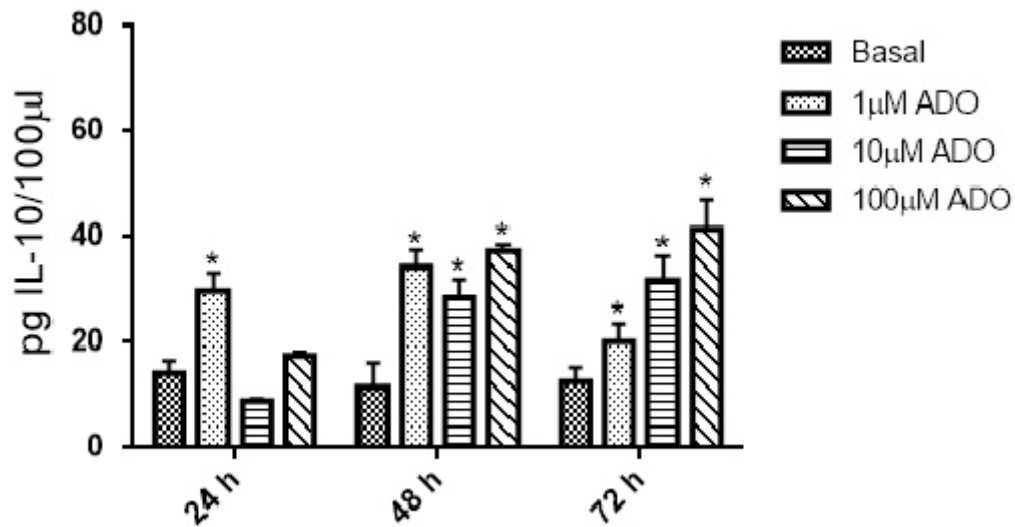
**Gráfica 2: Generación de IL-10 por CEM's-CN cultivadas en presencia de ADO.**  $2 \times 10^5$  CEM's-CN fueron cultivadas en presencia de 1 µM, 10 µM y 100 µM de ADO durante 24, 48 y 72 horas. Todos los datos representan la media de 3 ensayos independientes \*Diferencias significativas  $P < 0.05$ , en relación al basal de las CEM's-CN mostrado en el tiempo de cultivo indicado.

La concentración de IL-10 detectada en los cultivos de CEM's-MO en presencia de AMP, mostró un incremento importante durante las primeras 24 horas de cultivo en relación a la concentración basal de las CEM's (30pg/100µl), encontrándose una producción de 61.2 pg cuando las CEM's-MO se cultivaron en presencia de 10µM de AMP. A 48 y 72 horas de cultivo sólo se observó un ligero incremento cuando las células se cultivaron en presencia de 100µM de AMP (Gráfica 3).



**Gráfica 3: Generación de IL-10 por CEM's-MO cultivadas en presencia de AMP.**  $2 \times 10^5$  CEM's-MO fueron cultivadas en presencia de 1 µM, 10 µM y 100 µM de ADO durante 24, 48 y 72 horas. Todos los datos representan la media de 3 ensayos independientes \*Diferencias significativas  $P < 0.05$ , en relación al basal de las CEM's-MO durante el tiempo de cultivo indicado.

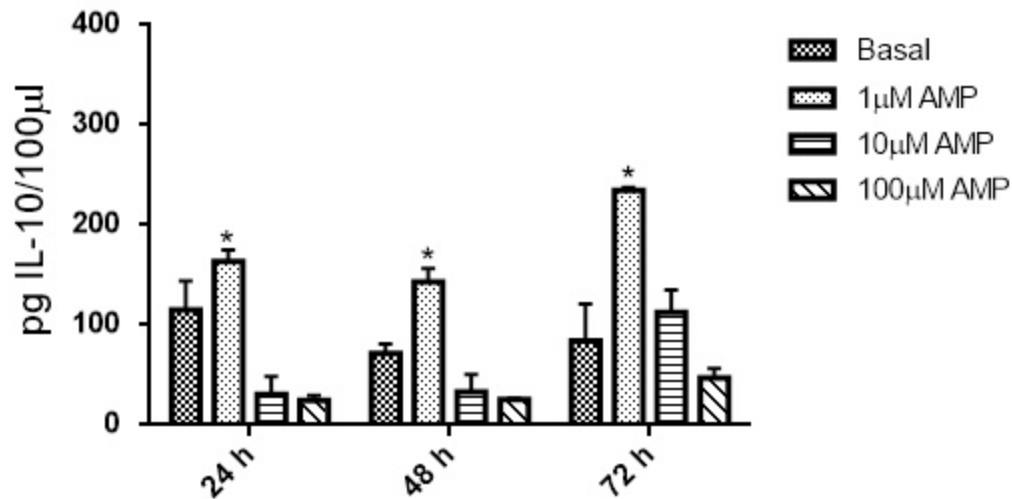
Por otra parte, cuando las CEM's-MO se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de ADO, se observó un incremento significativo respecto a la concentración basal en la producción de IL-10 después de 48 y 72 horas de cultivo con las diferentes concentraciones de ADO (Gráfica 4).



**Gráfica 4: Generación de IL-10 por CEM's-MO cultivadas en presencia de ADO.**  $2 \times 10^5$  CEM's-MO fueron cultivadas en presencia de 1 µM, 10 µM y 100 µM de ADO durante 24, 48 y 72 horas. Todos los datos representan la media de 3 ensayos independientes \*Diferencias significativas  $P < 0.05$ , en relación al basal de las CEM's-MO durante el tiempo de cultivo indicado.

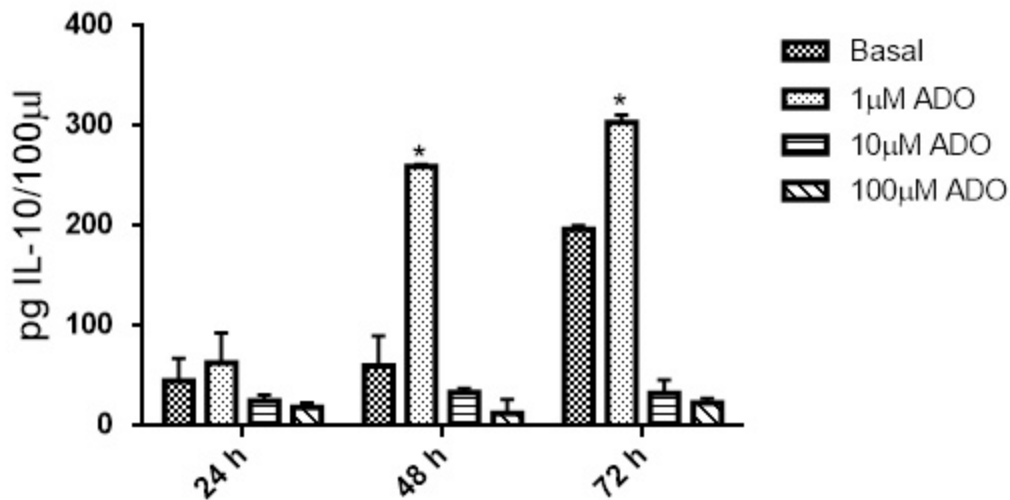


Al analizar la producción de IL-10 en los cultivos de CEM's-CaCu, se encontró que de manera basal esta citocina es producida en mayores cantidades que la detectada en las CEM's-CN y de MO, obteniéndose concentraciones promedio de 115 pg/100 $\mu$ l. No obstante, sólo cuando estas células fueron cultivadas en presencia de 1  $\mu$ M de AMP, se logró detectar un importante incremento de IL-10, superior a 200pg/100 $\mu$ l, principalmente después de 72 horas de cultivo (Gráfica 5).



**Gráfica 5: Generación de IL-10 por CEM's CaCu cultivadas en presencia de AMP.**  $2 \times 10^5$  CEM's-CaCu fueron cultivadas en presencia de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de ADO durante 24, 48 y 72 horas. Todos los datos representan la media de 3 ensayos independientes \*Diferencias significativas  $P < 0.05$ , en relación al basal de las CEM's-CaCu en el tiempo de cultivo indicado.

De manera similar, cuando CEM's-CaCu fueron cultivadas en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de ADO, después de 48 y 72 horas, se encontraron incrementos importantes en la producción de IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos, obteniéndose valores de 260pg y 303pg respectivamente (Gráfica 6).



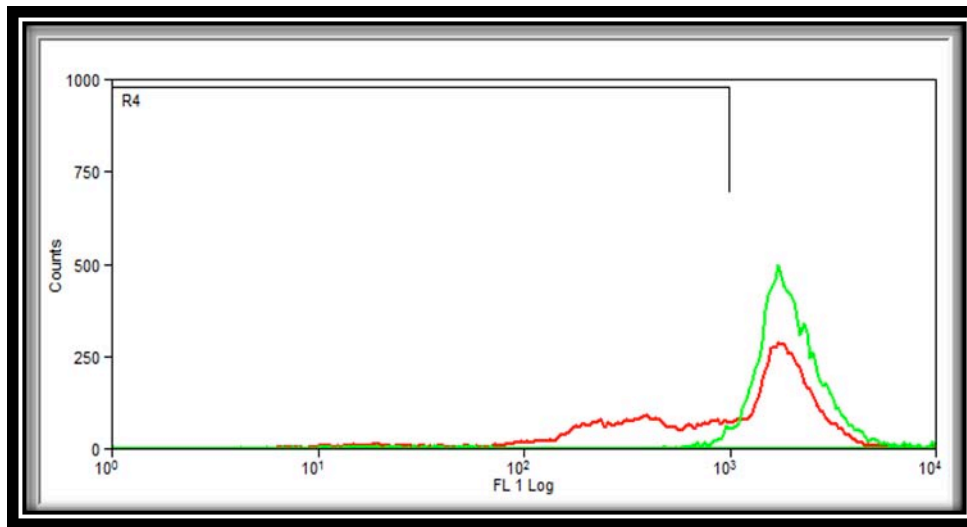
**Gráfica 6: Generación de IL-10 por CEM's-CaCu cultivadas en presencia de ADO.**  $2 \times 10^5$  CEM's-CaCu fueron cultivadas en presencia de 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de ADO durante 24, 48 y 72 horas. Todos los datos representan la media de 3 ensayos independientes \*Diferencias significativas  $P < 0.05$ , en relación al basal de las CEM's-CaCu en el tiempo de cultivo indicado.

### **IL-10 generada por CEM's inhibe de manera parcial la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>**

Después de encontrar que las CEM's (CN, MO y CaCu) son inducidas a producir IL-10 cuando son cultivadas en presencia de AMP o ADO, se procedió a analizar si esta citocina tenía efecto supresor sobre la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>. Para ello,  $2 \times 10^5$  LT CD8<sup>+</sup> fueron adicionados a los cultivos de CEM's que previamente fueron cultivados en presencia o ausencia de  $1 \mu\text{M}$  de AMP o ADO durante 72 horas. Posteriormente en estos cultivos se adicionó cafeína ( $300 \mu\text{M}$ ), para bloquear los receptores para adenosina presentes en los LT CD8<sup>+</sup> (Huang *et al.*, 1997; Clayton *et al.*, 2011), y por tanto, para bloquear el efecto inhibitorio de la ADO residual (Sitkovky *et al.*, 2008). Por otro lado, para determinar la participación de IL-10 sobre la inhibición de la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>, en algunos pozos se adicionó un anticuerpo neutralizante anti-IL-10 (Peprotech, Inc, USA).

Para evaluar la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>, después de aislarlos, estos fueron marcados con CFSE y estimulados con perlas de activación conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 durante 72 horas. Al llevar a cabo el análisis por citometría de flujo, se observó que el porcentaje de proliferación de LT CD8<sup>+</sup> cultivados bajo estas condiciones fue de 40.2% del total de células analizadas región R4 (Figura 5).

Tomando en consideración estos parámetros, se procedió a analizar la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>, en co-cultivo con las diferentes CEM's y en presencia de AMP o ADO.



**Figura 5: Proliferación de LT CD8<sup>+</sup>.**  $2 \times 10^5$  LTCD8<sup>+</sup> fueron marcados con CFSE (5mM) y posteriormente estimulados con perlas conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 durante 72 horas. En verde se muestran los LT CD8<sup>+</sup> marcados con CFSE sin estímulo y en rojo se muestra la población de LT CD8<sup>+</sup> que fue estimulada con perlas, bajo condiciones de cultivo después de 72 horas antes mencionadas. R4, muestra la población de las células que proliferaron y dividieron el contenido de CFSE.

Al evaluar la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> co-cultivados en presencia de CEM's-CN en condiciones basales (sin adicionar AMP o ADO), se encontró una disminución importante en el porcentaje de proliferación celular ya que de 40.2% disminuyó a 25.6% en ausencia y a 26.4% en presencia de anti-IL-10 (Gráfica 7, Tabla 4). Sin embargo, de manera muy interesante, la adición de AMP al co-cultivo, disminuyó aún más la proliferación celular de los LT CD8<sup>+</sup>, encontrándose porcentajes de proliferación de tan solo 6.13 % y 6.51% en ausencia o presencia de anti-IL-10 respectivamente (Gráfica 7, Tabla 4). Por otro lado, en los co-cultivos donde se adicionó ADO, la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> en ausencia de anti-IL10 fue de 7.52%, y cuando se adicionó el anticuerpo anti-IL-10, la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> se recuperó hasta un 17.24% (Gráfica 7, Tabla 4).

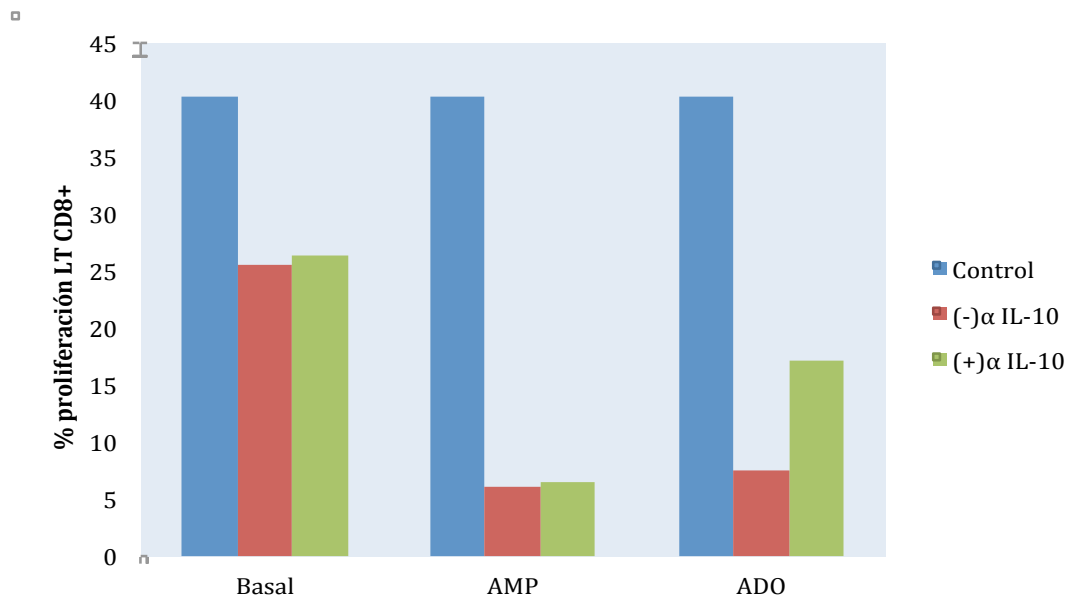
Por otro lado, al evaluar la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> co-cultivados en presencia de CEM's-MO en condiciones basales, también se encontró una disminución importante en el porcentaje de proliferación celular, de 40.2% a 18.5% y 19.1% en ausencia o presencia de anti-IL-10 respectivamente (Gráfica 8, Tabla 4). De igual manera que en el caso anterior, la adición de AMP al co-cultivo, disminuyó aún más la proliferación celular, encontrándose porcentajes de proliferación de solo 3.45 % y 5.99% en ausencia o presencia de anti-IL-10 respectivamente (Gráfica 8, Tabla 4). Mientras tanto, en los co-cultivos donde se adicionó ADO, la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> en ausencia de anti-IL10 fue de 9.22%, y en presencia del anticuerpo neutralizante para IL-10, la proliferación se recuperó hasta un 16.74% (Gráfica 8, Tabla 4).

Finalmente, al evaluar la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> co-cultivados en presencia de CEM's-CaCu en condiciones basales, se encontró una mayor disminución en el porcentaje de proliferación celular que el inducido por las CEM's-CN o CEM's-MO, encontrándose en este caso una disminución de 40.2% a 16.7% y 17.89% en ausencia o presencia de anti-IL-10 respectivamente (Gráfica 9, Tabla 4). Al igual que en los casos anteriores, en el co-cultivo de LT CD8<sup>+</sup> con CEM's-CaCu, la adición de AMP, disminuyó fuertemente la proliferación celular, encontrándose porcentajes de proliferación de 3.82% y 7.07% en ausencia o presencia de anti-IL-10 respectivamente (Gráfica 9, Tabla 4). No obstante, en los co-cultivos donde se adicionó ADO, la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> fue de 5.89% en ausencia de anti-IL10, y cuando se adicionó el anticuerpo neutralizante para IL-10, la proliferación incrementó hasta un 13.68% (Gráfica 9, Tabla 4).

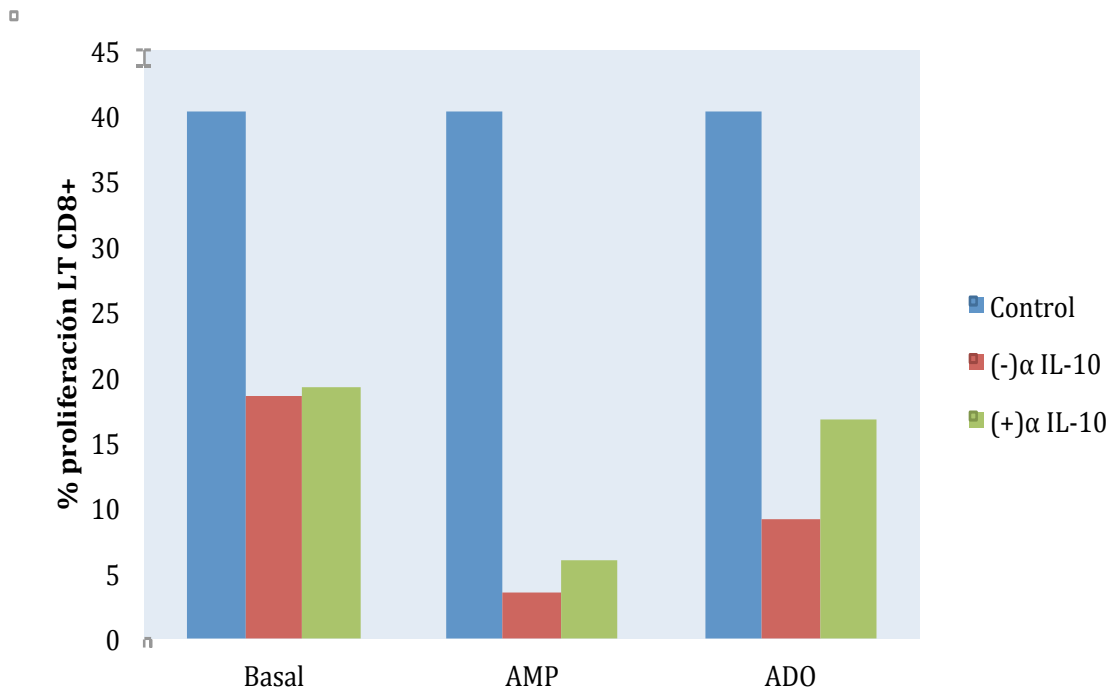
Con base en estos resultados, podemos sugerir que IL-10 participa de manera parcial en la inhibición de la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>, particularmente cuando ADO está presente en los co-cultivos con las diferentes CEM's. debido a que cuando se utilizó  $\alpha$ -IL-10 se observó un incremento en la proliferación, comparado con el uso de AMP donde la recuperación fue mínima.

**Tabla 4. Porcentajes de proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's.** 2x10<sup>5</sup> LT CD8<sup>+</sup> fueron co-cultivados durante 72 horas con CEM's de cérvix normal (CEM's-CN), médula ósea (CEM's-MO), o de cáncer cérvicouterino (CEM's-CaCu) en condiciones basales, o en presencia de ya sea 1μM de AMP o de ADO. En algunos co-cultivos se adicionaron 2ug/mL anticuerpo neutralizante anti-IL-10 ((+) α-IL-10).

	LT CD8 <sup>+</sup> /CEM's-CN		LT CD8 <sup>+</sup> /CEM's-MO		LT CD8 <sup>+</sup> /CEM's-CaCu	
	<i>(-)α IL-10</i>	<i>(+)α IL-10</i>	<i>(-)α IL-10</i>	<i>(+)α IL-10</i>	<i>(-)α IL-10</i>	<i>(+)α IL-10</i>
<b>Basal</b>	25.6%	26.4%	18.5%	19.1%	16.7%	17.89%
<b>AMP</b>	6.13%	6.51%	3.45%	5.99%	3.82%	7.07%
<b>ADO</b>	7.52%	17.24%	9.22%	16.74%	5.89%	13.68%

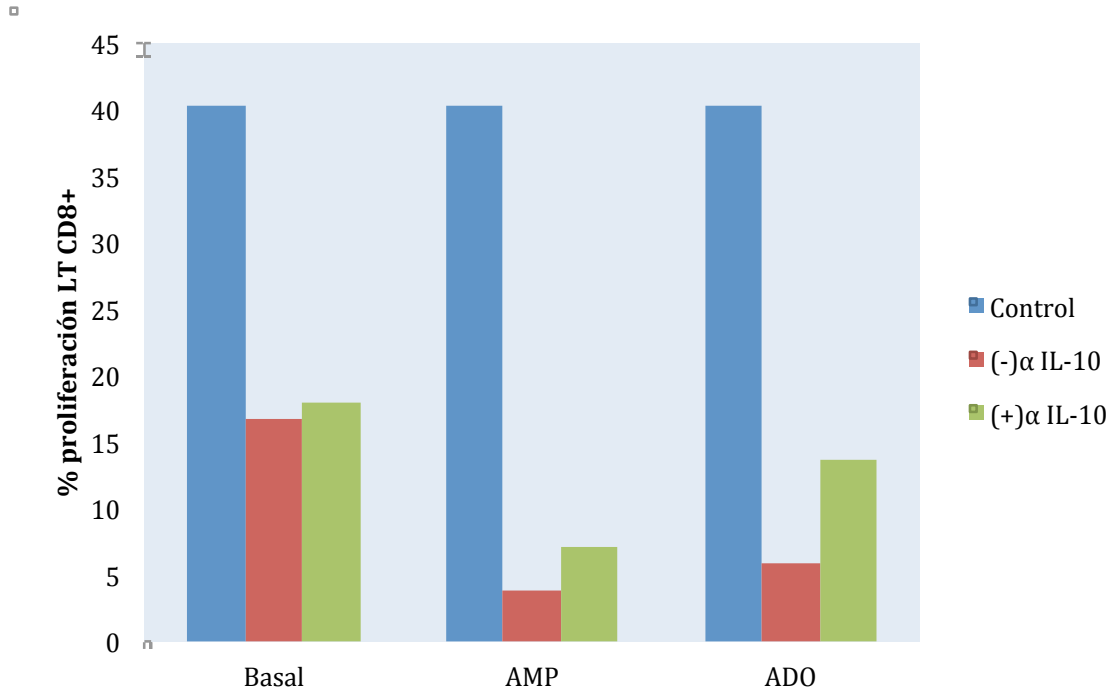


**Gráfica 7. Proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-CN.** Se muestra la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-CN en condiciones basales así como en presencia de AMP o ADO durante 72 horas. A los co-cultivos se adicionó cafeína (300 μM), para bloquear los receptores para adenosina presentes en los LT CD8<sup>+</sup>. En azul se muestra la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> inducida por perlas conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 en ausencia de CEM's-CN (control positivo). La proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-CN en ausencia (rojo) o en presencia (verde) de 2 μg/mL de anticuerpo neutralizante anti-IL-10, también es mostrada.



**Gráfica 8. Proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-MO.** Se muestra la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-MO en condiciones basales así como en presencia de AMP o ADO durante 72 horas. A los co-cultivos se adicionó cafeína (300 μM), para bloquear los receptores para adenosina presentes en los LT CD8<sup>+</sup>. En azul se muestra la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> inducida por perlas conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 en ausencia de CEM's-MO (control positivo). La proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-MO en ausencia (rojo) o en presencia (verde) de 2 μg/mL de anticuerpo neutralizante anti-IL-10, también es mostrada.





**Gráfica 9. Proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-CaCu.** Se muestra la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-CaCu en condiciones basales así como en presencia de AMP o ADO durante 72 horas. A los co-cultivos se adicionó cafeína (300 μM), para bloquear los receptores para adenosina presentes en los LT CD8<sup>+</sup>. En azul se muestra la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> inducida por perlas conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 en ausencia de CEM's-CaCu (control positivo). La proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> en co-cultivo con CEM's-CaCu en ausencia (rojo) o en presencia (verde) de 2 μg/mL de anticuerpo neutralizante anti-IL-10, también es mostrada.

## DISCUSIÓN

Las CEM's son un componente importante del microambiente tumoral, se estima que en los tejidos tumorales sólidos representan aproximadamente el 0.01% del número total de células dentro de estos tejidos (Ren *et al.*, 2012). Recientemente se ha reportado que las CEM's ejercen funciones importantes en el microambiente tumoral tales como: favorecer la proliferación de las células tumorales (Liu Y *et al.*, 2011); inducir la transición de epitelio a mesénquima (Kabashima-Niibe *et al.*, 2013); incrementar el número de células troncales tumorales (Liu Y *et al.*, 2011); promover la angiogénesis y metástasis tumoral (Sun *et al.*, 2014); y participar en la inmunosupresión de células efectoras de la respuesta inmune a través de varios mecanismos, entre los cuales se incluyen la generación de un ambiente anti inflamatorio caracterizado por la presencia de LTh y citocinas tipo Th2 como: TGF- $\beta$ , PE2, IDO, NO e IL-10 (Krampera *et al.*, 2003; Nwabo *et al.*, 2011; Ucelli *et al.*, 2007; Maccario *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2006).

Uno de los mecanismos utilizados por las CEM's para suprimir la respuesta inmune, es a través de la generación de adenosina (ADO), mediante la hidrólisis del monofosfato de adenosina extracelular (AMP), llevada a cabo por la ectoenzima CD73 (Allard *et al.*, 2014). CD73 es un marcador fenotípico de las CEM's (Caplan *et al.*, 1992), y la ADO generada puede ejercer sus efectos inmunosupresores sobre linfocitos T citotóxicos, al interactuar con receptores específicos de alta afinidad para adenosina como es el receptor A2A (Allard *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que la interacción de ADO con el receptor para adenosina A2B en algunos tipos celulares como son las de microglia y células inmunoreguladoras, es capaz de inducir la producción de IL-10 (Koscsó *et al.*, 2012).

Nuestro grupo de trabajo recientemente obtuvo y caracterizó CEM's de tejido cervical de cuello uterino normal y de cáncer cérvicouterino (Montesinos *et al.*, 2013). Además ha caracterizado la expresión de marcadores de la vía adenosinérgica y la actividad funcional de CD73 en las diferentes CEM's para generar ADO cuando éstas son cultivadas en presencia de AMP (Pérez, 2012; Morales, 2014). Tomando en consideración lo anterior, en el presente trabajo se procedió a analizar si las CEM's cultivadas en presencia de AMP o ADO son capaces de producir IL-10, y si a través de esta citocina suprimen la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos dan evidencia que el cultivo de CEM's, particularmente aquellas derivadas de CaCu (CEM's-CaCu), al ser cultivadas en presencia de ADO o AMP, son inducidas fuertemente a producir IL-10, y que esta citocina inhibe la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (LT CD8<sup>+</sup>) estimulados con anticuerpos anti CD3/CD2/CD28, dado que la inhibición de la proliferación fue revertida de manera importante cuando se adicionaron anticuerpos neutralizantes para dicha citocina. Por otro lado, la adición de cafeína, un agente bloqueador de receptores para adenosina, inhibió el efecto supresor de ADO generada cuando las CEM's se cultivaron con este nucleósido, o en presencia de AMP.

En relación a la capacidad de las CEM's para generar IL-10, cuando fueron cultivadas en presencia de ADO o AMP, se observó que las concentraciones más altas de IL-10 detectadas en los cultivos de CEM's fueron observadas en los cultivos de CEM's-CaCu. De hecho, los sobrenadantes de CEM's-CaCu cultivadas solo con medio presentaron una mayor concentración de IL-10 que la detectada en los sobrenadantes de CEM's-CN y MO. Las CEM's-CaCu produjeron altas concentraciones de IL-10 aún en la concentración de 1µM de AMP o ADO, obteniéndose valores de 260 y 303 pg de IL-10/100µl de sobrenadante respectivamente; y de tan solo 35 y 26 pg/100 µl por las CEM's-CN, o de 40 pg/100 µl en las CEM's -MO.

Tomando en consideración que las CEM's-CaCu derivan de un microambiente tumoral, es factible que su interacción con células tumorales y células inmunoregulatoras participantes en dicho microambiente generen un mayor acondicionamiento en estas CEM's y una expresión diferencial en los receptores para ADO presentes en estas CEM's, promoviendo sus funciones inmunosupresoras, ya sea a través de la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento (Liu S *et al.*, 2011), o a través de la inducción de vías de señalización intracelular que conducen a la generación de IL-10 (Kobayashi *et al.*, 2008), como lo demostrado por Koscsó y colaboradores (2012), quien encontró que en células de microglía, la inducción de IL-10 a través de la interacción de ADO con el receptor para adenosina A2B, se activa la vía JAK1 STAT-3, lo cual resulta conveniente analizar en las CEM's-CaCu en estudios posteriores.

Además de ADO, otros factores solubles contenidos en los sobrenadantes pueden inducir a la producción de IL-10, como recientemente fue publicado por nuestro grupo de trabajo, en donde en co-cultivos de CEM's-CaCu con células tumorales de cuello uterino, en ausencia de ADO o AMP adicionados de manera exógena, se encontraron valores altos de IL-10 (500 pg/mL) (Montesinos *et al.*, 2013); asimismo, el TGF- $\beta$  contenido en los sobrenadantes, también puede participar en la inducción de IL-10 (García-Rocha, manuscrito en preparación). Asimismo, factores producidos por células dendríticas activadas, también pueden inducir la producción de IL-10, como mostrado por Liu W y colaboradores (2013) donde obtuvieron una concentración de 600 pg/mL de IL-10. Esta citocina suprime fuertemente el reconocimiento inmune de las células tumorales mediado por los LTc, debido a una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la inmunosupresión, capacidad antiinflamatoria y propiedades inmunomoduladoras, que regulan la diferenciación de una gran variedad de las células inmunes y sus eventos de proliferación (Liu W *et al.*, 2013).

En nuestro estudio evaluamos si la IL-10 producida en los cultivos de CEM's, inhibía la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>. Al co-cultivar los LT CD8<sup>+</sup> estimulados con perlas conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 con las diferentes CEM's, en todos los casos se observó una disminución de prácticamente el 50% de la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>; de 40.2% disminuyó a menos de 20% principalmente cuando la CEM's-CaCu fueron adicionadas. Por otra parte, en los co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> con las diferentes CEM's, al adicionarles 1μM de AMP o ADO por 72 horas, se pudo evidenciar que hubo una mayor inhibición en la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>. La inhibición se asoció fuertemente con los altos contenidos de IL-10 detectados en los sobrenadantes de CEM's particularmente donde se adicionó ADO, ya que la adición de anticuerpos neutralizantes para IL-10, bloquearon de manera importante la inhibición de la proliferación observada sobre los LT CD8<sup>+</sup>. Estos resultados son comparables con resultados obtenidos en estudios *in vitro*, en donde han demostrado que las CEM's son capaces de inhibir la proliferación de los LTc, aún bajo condiciones de estímulo ya sea en presencia de mitógenos, aloantígenos o anticuerpos tales como anti-CD3 y anti-CD28 (Rasmusson *et al.*, 2003; Prevosto *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que aunque en los co-cultivos de CEM's con los LT CD8<sup>+</sup>, también se adicionó cafeína, un agente bloqueador de los receptores de ADO, la adición de anticuerpos neutralizantes para IL-10 en algunos casos no fue capaz de bloquear de manera total la inhibición de la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>, tal como se observó cuando AMP fue adicionada a los co-cultivos, lo cual podría deberse a otros factores como son TGF-β,IDO, PE2, etc., que se sabe son producidos por las propias CEM's (Schiedel *et al.*, 2013; Rasmusson *et al.*, 2003) generando un efecto inmunosupresor, y podrían ser inducidas por el AMP, lo cual sería interesante analizar en estudios posteriores.

Por otra parte se ha demostrado que en co-cultivo estas CEM's inhiben significativamente la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activadas, esto de manera dependiente del contacto célula-célula. Esta reducción en la proliferación correlaciona con una alta expresión de PD-L1 sobre las CEM's y CTLA-4 en células T, correlacionado con el incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , IL-10 y PGE2 (Castro *et al.*, 2014).

En estudios previos, nuestro grupo de trabajo demostró que las CEM's-CaCu inhibieron la proliferación y función efectora de LT CD8<sup>+</sup> cuando fueron cultivados con AMP (Pérez, 2012). De igual manera, en estudios *in vivo*, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la inoculación de CEM's-CaCu en un modelo tumoral de inmunoprotección, la presencia de estas CEM's fue capaz de inhibir la protección inmune mediada por linfocitos T citotóxicos antígeno específicos, promoviendo el crecimiento tumoral en ratones (Contreras, 2011).

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que las CEM's-CaCu presentan un mecanismo de inmunosupresión dual derivado de la vía adenosinérgica, en donde además de ser capaces de generar ADO a partir de AMP, generan IL-10 a través de la interacción de ADO con receptores para este nucleósido, que de manera conjunta pueden potenciar la actividad inmunosupresora sobre LT CD8<sup>+</sup>.

## CONCLUSIONES

- ❑ Las CEM's derivadas de CaCu generan las mayores concentraciones de IL-10 de manera basal en comparación a las otras dos estirpes, estas CEM's son fuertemente inducidas a incrementar la producción de esta citocina particularmente al ser cultivadas en presencia de ADO.
- ❑ La IL-10 generada a través de AMP/ADO por las CEM's-CaCu inhibe de manera importante la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>.

## **PERSPECTIVAS**

Al demostrar en el presente trabajo que bajo condiciones de cultivo con AMP o ADO las CEM's son capaces de generar IL-10, resulta necesario analizar la participación directa de CD73 para la generación de esta citocina, mediante la desregulación de esta ectoenzima.

Por otra parte, será indispensable estudiar la interacción específica de ADO sobre alguno de sus receptores presentes en las CEM's, los cuales inducen la producción de IL-10. Esto debido a que puede existir una expresión diferencial de los mismo en cada estirpe de CEM's dependiendo de la fuente de obtención.

Evaluar si en un modelo tumoral in vivo, la vía CD73/ADO/IL-10, participa en la supresión de la respuesta inmune antitumoral, lo cual será de gran relevancia para establecer nuevas estrategias antitumorales.



**BIBLIOGRAFÍA**

Abbas Abul K., Lichtman Andrew H., Pillai Shiv. 2008. Inmunología celular y molecular. 6ª edición. Elsevier Saunders. España. Pp 6, 48-55, 194-195.

Agaugue S., Carosella ED., Rouas-Freiss N. 2011. Role of HLA-G in tumor escape through expansión of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood*.117: 7021–7031.

Aggarwal, S. and Pittenger, M.F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105: 1815– 1822.

Albini A., Sporn MB. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 7: 139-147.

Alcocer González JM., Berumen J., Tamez R., Bermúdez VH., Peralta O., Hernández R., Moreno J., Gariglio P., Madrid Marina V. 2006. *In vivo* expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunolog*. 19: 481-491.

Aldurthi S., Krishna S., Mukherjee G., Bafna U., Jayshree R. 2008. Regulatory T cells in a spectrum of HPV- induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol*. 60:1. 53-65.

Allard B., Turcotte M., Spring K., Pommey S., Royal I., Stagg J. 2014. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 134: 1466-1473.

Asadullah K., Sterry W., Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev*. 55: 241–269.

Avila L. 2011. Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

Bais AG., Beckmann I., Ewing PC., Eijkemans MJ., Meijer CJ., Snijders PJ., Helmerhorst TJ. 2007. Cytokine release in HR-HPV+ women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV– controls. *Mediators Inflamm*. 2: 41-47.

Barrera Rodríguez R., Peralta Zaragoza O., Madrid Marina V. 1995. Bases moleculares de la inmunología del cáncer. *Salud pública México*. 4: 344-353.

Bastid J. *et al.* 2012. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.269>.

Beavis P.A. *et al.* 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 33: 231–237.

Bejarano M. T., de Waal Malefyt J. S., Bigler Abrams, M., Bacchetta R., de Vries J. E., Roncarolo M. G. 1992. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int. Immunol*. 4: 1389.

Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 22: 625-634.

Boehmer Harald V. 2005. Mechanism of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology*. 6, 4: 338-344.

Bolpetti A., Silva João S., Villa L., Lepique A. 2010. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunology*. 11: 27-35.

Carreras R. Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero. 2008. Editorial Médica Panamericana. 1ª edición. México. 27-29, 65-77.

Castro Manrreza Marta E., Mayani H., Monroy García A., Flores Figueroa E., Chávez Rueda K., Legorreta Haquet V., Santiago Osorio E., Montesinos J.J. 2014. Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells. *Stem Cells*. 23, 11.

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 Lett*. 274, 1: 61-71.

Caplan AI., Haynesworth SE., Baber MA. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 13:69-80.

Carosella ED., Favier B., Rouas-Freiss N., Moreau P., LeMaoult J. 2008. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*. 111: 4862–4870.

Chagas Simas B., Gurgel D.A.P.A., Da cruz A.L., Madeiros Amaral C.M., Vinicius Cardoso M., Silva Neto da Costa J., Ferreira da Silva L.A., Bezerra da Albuquerque M.E., Cartaxo Muniz T.M. de Freitas C.A. 2013. An Interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in woman infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infection, genetics and Evolution*. 19: 32-37.

Clayton A, Tai S, Webber J. 2011. Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. *J Immunol*. 187: 676-683.

Clerici M., Merola M., Ferrario E., Trabattoni D., Villa ML., Stefanon B., Venzon DJ., Shearer GM., De Palo G., Clerici E. 1997. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 89: 245–250.

Contreras Landeros Selene 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. FES Zaragoza, UNAM.

Creery WD., Diaz-Mitoma F., Fillion L., and Kumar A. 1996. Differential modulation of B7–1 and B7–2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur J Immunol* 26:1273–1277.

Crosbie Emma J., Einstein Mark H., Franceschi S., Kitchener Henry C. 2013. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Lancet*. 7, 382: 889-899.

Csoka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C et al. 2008. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J*. 22: 3491–3499.

Deaglio S., Dwyer KM., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen JF., Enjoji 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.

Deaglio S. and Robson S.C. 2011. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv. Pharmacol*. 61: 301–332.

De Grujil TD., Bontkes HJ., van den Muysenberg A.J.C., van Oostveen J.W., Stukart M.J., Verheijen R.H.M., Vange N. van der., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M., Wallboomers K.M.M., Scheper R.J. 1999. Differences in cytokine mRNA profiles between pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer* 35: 490-497.

de Jong A., van Poelgeest MI., van der Hulst JM., Drijfhout JW., Fleuren GJ., Melief CJ., Kenter G., Offringa R., van der Burg SH. 2004. Human papillomavirus type-16-positive cancer is associated with impaired CD4+ T cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*. 64: 5449-5455.

Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi MG., Biagiotti R., and Romagnani S. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*. 150: 353–360.

Delvenne P. 2005. Immunologic response to (pre)neoplastic cervical lesions associated with human papillomavirus. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 160: 287-293.

Díaz Benítez CE., Flores Sosa JA., Navarro Fuentes KR., Juárez Díaz J., Vázquez Cruz AD., Fernández Tilapa G., López Estrada G., Alonso de Ruíz P., Román Basaure E., González Mena LE., Uribe Salas FJ., Martínez Barnetche J., Lagunas Martínez A., Bermúdez VH., Moreno J., Hernández Pando R., Rosenstein Asoulay Y., Alcocer JM., Madrid Marina V. 2006. TGF- $\beta$ 1 and IL-10 inhibit T lymphocytes proliferation and CD3-expression in women with cervical cancer. *UICC Worl Cancer Congress*, 41-25.

Díaz Martín D., Rodríguez Barcenilla H., Corte Barrero M.J., Soto Álvarez-Mon M. 2013. Funciones efectoras de los linfocitos T. *Medicine*. 11, 28: 1742-1751.

Di Nicola M., Carlo Stella C., Magni M., et al. Human bone marrow stromal cells suppress Tlymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 99:3838-3843.

Djouad F., Pience P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noel D., Jorgensen C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 102:3837-3844.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 8: 315-317.

Dwyer K.M. *et al.* 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 3: 171–180.

Eltzschig H.K. *et al.* 2003. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med.* 198: 783–796.

Eltzschig H.K. *et al.* 2009. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood*. 113: 224–232.

Enjyoji K. *et al.* 1999. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* 5: 1010–1017.

Fainbom L., Geffner J. 2005. Introducción a la inmunología humana. 5ª edición. Médica Panamericana. Argentina. Pp 236,367.

Fiorentino DF., *et al.* 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 146:3444–3451.

Franco R. 2008. Café y Cáncer. *Med Clin (Bar)*. 131: 633-635.

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 53: 527–552.

Friedenstein AJ., Petrakova KV., Kurolesova AI., Frolova GP. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 6: 230-247.

Friedenstein AJ., Chailakhjan RK., Lalykina KS. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guineapig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 3: 393- 403.

Friedenstein AJ., Ivanov Smolenski AA., Chailakhjan RK., Gorskaya UF., Kurolesova AI., Latzinik NW., Gerasimow UW. 1978. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp Hematol*. 65: 440-444.

García Lora A., Algarra I., Garrido F. 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*. 195: 346–355.

Garrido F., Cabrera T., Concha A., Glew S., Ruiz-Cabello F., Stern PL. 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*. 14: 491–499.

Garrido F., Cabrera T., Lopez-Nevot MA., Ruiz-Cabello F. 1995. HLA class I antigens in human tumors. *Adv Cancer Res.* 67: 155–195.

Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez- Villar JJ., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M., Stern PL. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 18: 89–95.

Garrido F., Algarra I. 2001. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res.* 83: 117–158.

Gibbs CP., Kukekov VG., Reith JD., Tchigrinova O., Suslov ON., Scott EW., Ghivizzani SC., Ignatova TN., Steindler DA. 2007. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7: 967-976.

Goldsby Richard A., Kindt Thomas J., Osborne Barbara A. 2004. *Inmunology Kuby.* 5ª edición. W. H. Mc Graw Hill. Interamericana, México. Pp 3-4, 11-12.

Góngora-Alfaro JL., Moo-Puc RE., Villanueva J., Arankowsky G., Álvarez FJ., Pineda JC., Heredia FJ., Bata JL. 2005. La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolonérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed.* 16: 99-111.

Gros F., Cabillic F., Toutirais O., Maux AL., Sebti Y., Amiot L. 2008. Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 38: 742–749.

Groux H., Bigler M., de Vries JE., and Roncarolo MG. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med.* 184:19–29.

Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries JE., and Roncarolo MG. 1997. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature (Lond).* 389:737–742.

Groux H., Bigler M., de Vries J. E., Roncarolo M. G. 1998. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on Human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 160: 3188-3193.

Halak B. K., Maguire, H. C. Jr., and Lattime E. C. 1999. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. *Cancer Res.* 59: 911–917.

Hanahan D., Coussens Lisa M. 2012. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer cell.* 21: 309-322.

Hasko G, Cronstein BN. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25: 33–39.

Hawrylowicz CM., O'Garra A. 2005. Potencial role of interleukin-10- secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 5, 4: 271-283.

Heine P. *et al.* 2001. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur. J. Biochem.* 268:364–373.

Herzog EL., Chai Li., Krause DS. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 102: 3483- 3493.

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.

Hu M, Polyak K. 2008. Molecular characterisation of the tumor microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer.* 44:2760-2765.

INEGI 2013. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).

Janeway C., Murphy K., Travers P., Walport M. 2009. *Inmunobiología de Janeway.* 7ª edición. Mc Graw Hill. Interamericana, España. Pp 5-7, 325-327.

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. 2003. CD4<sup>+</sup> T cells are required for secondary expansion and memory in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Nature.* 421:852-856.

Jo H., and Weon K. 2005. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy.* 3: 419-434.

Johann PD., Vaegler M., Gieseke F., Mang P., Armeanu- Ebinger S., Kluba T., Handgretinger R., Müller I. 2010. Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer.* 10:501.

Joyce J, Pollard J. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9:239-252.

Kabashima-Niibe A., Higuchi H., Takaishi H., Masugi Y., Matsuzaki Y., Mabuchi Y., Funakoshi S., Adachi M., Hamamoto Y., Kawachi S., Aiura K., Kitagawa Y., Sakamoto M., Hibi T. 2013. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 104:157-64.

Kanodia Shreya, Fahey Laura M., Kast W. M. 2007. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Current Cancer Drug Targets.* 7, 1.

Kapojos J.J. *et al.* 2004. Enhanced ecto-apyrase activity of stimulated endothelial or mesangial cells is downregulated by glucocorticoids in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 501: 191–198.

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 tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 449: 557-563.

Karp JM., Leng GS. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Stem Cells*. 4: 206-16.

Katebi Majid, Soleimani Mansooreh, Cronstein Bruce N. 2008. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *Journal of Leukocyte Biology*. 85.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*. 24: 1294–1301.

Kim YH., Wee YM., Choi MY., Lim DG., Kim SC., et al. 2011. IL-10 induced by CD11b+ cells and IL-10 activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allograft. *Mol Med*. 17, 7: 697–708.

Kindt Thomas J., Goldsby Richard A., Osborne Barbara A. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6ª edición. Mc Graw Hill. México. Pp. 243, 253, 262.

Kobie JJ., Shah PR., Yang L., Rebhahn JA., Fowell DJ., Mosmann TR. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5-adenosinemonophosphate to adenosine. *J Immunol*. 177: 6780–6786.

Kobayashi A., Weinberg V., Darragh T., Smith-McCune K. 2008. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunology*. 1, 5.

Koopman LA, Corver WE, van Der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med*. 191:961-76.

Kocsó Balázs, Csóka Balázs, Selmeczy Zsolt, Himer Leonóra, Pacher Pál, Virág László Virág, Haskó György. 2012. Adenosina augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol*. 188: 445-453.

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.

Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigenspecific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 101, 9: 3722–3729.

Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth SE., Ringden O. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *J Immunol*. 171:11-20.

Le Blanc K., Ringden O. 2006. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 18:586-91.

Le Gal FA., Riteau B., Sedlik C., Khalil-Daher I., Menier C., Dausset J., Guillet JG., Carosella ED., Rouas-Freiss N. 1999. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* 11: 1351–1356.

Lennon P.F., Taylor T., Stahl G., Colgan P. 1998. Neutrophil-derived 5'-adenosine promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med.* 188, 88: 1433–1443.

Levings MK., Sangregorio R., Galbiati F., Squadrone S., De Waal Malefyt R., and Roncarolo MG. 2001. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol.* 166:5530–5539.

Lin TM., Chang HW., Wang KH., Kao AP., Chang CC., Wen CH., Lai CS., Lin SD. 2007. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 361: 883-889.

Liu S., Ginestier C., Ou S., Clouthier G., Ratel H., Monville F., Korkaya H., Heath A., Dutcher J., Kleer G., Jung Y., Dontu g., Taichman R., Wicha S. 2011. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine network. *Cancer Res.* 71, 2: 614-624.

Liu W, Liu J, Wu J, Zhang L. 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: 487-495.

Liu Y., Han ZP., Zhang SS., Jing YY., Bu XX., Wang CY., Sun K., Jiang GC., Zhao X., Li R., Gao L., Zhao QD., Wu MC., Wei LX. 2011. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem.* 286: 25007-25015.

López Saavedra A., Lizano Soberón M. 2006. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM. Subdirección de investigación básica. Instituto Nacional de Cancerología. México D.F. *Cancerología.* 1: 31-55.

Maccario R., Podestà M., Moretta A., Cometa A., Comoli P., Montagna D. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 90:516-25.

McLean K., Gong Y., Choi Y., Deng N., Yang K., Bai S., Cabrera L., Keller E., McCauley L., Cho K., Buckanovich RJ. 2011. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest.* 121: 3206–3219.

Marchal-Bras-Goncalves R., Rouas-Freiss N., Connan F., Choppin J., Dausset J., Carosella ED., Kirszenbaum M., Guillet J. 2001. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc.* 33: 2355–2359.



Martínez castellanos R., Rosales Guevara M., Robinson Rodriguez R. 2000. Respuestas inmunes innata y adaptativa. *Medisan*. 4, 2:64-74.

Mazurenko NN., Blied AI., Bidzhieva BA., Peskov DI., Snigur NV., Savinova EB., Kiselev FL. 2006. Loss of heterozygosity at chromosome 6 as a marker of early genetic alterations in cervical intraepithelial neoplasias and microinvasive carcinomas (in Russian). *Mol Biol*. 40: 436–447.

Mizumoto N. *et al.* 2002. CD39 is the dominant Langerhans cell associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat. Med.* 8, 358–365.

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

Montesinos JJ., Mora-García MD., Mayani H., Flores-Figueroa E., García-Rocha R., Castro-Manreza M., Fajardo-Orduña G., Weiss-Steider B., Monroy-García A. 2013. In Vitro Evidence of the Presence of Mesenchymal Stromal Cells in Cervical Cancer and Their Role in Protecting Cancer Cells from Cytotoxic T Cell Activity. *Stem Cells*. 22, 18.

Montesinos M. C., Shaw J. P., Yee H., Shamamian P., Cronstein B. N. 2004. Adenosine A (2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am. J. Pathol.* 164: 1887–1892.

Moore K. W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., Mosmann T. R. 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11:165.

Morales Ramírez O. 2013. Análisis funcional de la vía adenosinérgica a través de la expresión de las ectoenzimas CD39/CD73 en células estromales mesenquimales derivadas de cérvix y su efecto inmunosupresor. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Muñoz N., Castellsague X., Berrington de González A., Gissmann L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24, 3.

Murray P., Rosenthal K. *Microbiología Médica*. 2009. Editorial Elsevier Mosby. 6ª edición. México. Pp. 87-123.

Nakamura T., Shima T., Saek A., Hidaka T., Nakashina A., Takikawa O., Saito S. 2007. Expression of indoleamine 2, 3- dioxygenase and the recruitment of Foxp3- expressing regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci*. 98, 6: 874-881.

Nash MA., Ferrandina G., Loercher A., Freedman RS. 1999. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocrine-Related Cancer*. 6:93-107.

Nicol AF., Fernandes AT., Bonecini-Almeida Mda G. 2005. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100:1-12.

- Nomura M, Ichimatsu D, Moritani S, Koyama I, Dong Z, Yokogawa K. 2005. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine. *Mol Carcinog.* 44:67-76.
- Nwabo Kamdje AH., Mosna F., Bifari F., Lisi V., Bassi G. 2011. Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood.* 118, 2: 380–389.
- O'Garra A., Vieira P. 2007. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol:* 7:425–428.
- Ohta A., Gorelik E., Prasad S., Ronchese F., Lukashev D., Wong M., Huang X., Calwell S., Liu K., Smith P., Chen J., Jackson E., Apasov S., Abrams S., Sitkovsky M. 2006. A2A adenosine receptor protects tumor from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103, 35: 13132-13137.
- Ohta A, Madasu M, Kini R, Subramanian M, Goel N, Sitkovsky M. 2009. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol.* 183: 5487–5493.
- Passmore S., Burch V., Shephard E., Marais D., Allan B., Kay P., Rose R., Williamson A. 2002. Single-cell cytokine analysis allows detection of cervical T-cell responses against human papillomavirus type 16 L1 in women infected with genital HPV. *Journal Med. Virol.* 67, 2: 234-240.
- Pellegatti P., Raffaghello Z., Bianchi G., piccardi F., Pistoia V., Di Virgilio F. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *Plos One.* 3, 7.
- Peralta O., Recillas F., Alcocer J.M., Bermúdez VH., Madrid V. 2006. Human papillomavirus-16 E6 and E7 proteins induce activation of human TGF- $\beta$  basal promoter in epithelial cells through a Sp1 recognition sequence. *Viral Immunology.* 19, 3: 468-480.
- Pérez-Saldaña K. 2012. Análisis funcional de la vía CD73 como mecanismo inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de neoplasias cervicales. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.
- Piersma S., Jordancia E., Van Poelgeest M., Kwappenberg K., Van der Hulst M., Drijfhout J., Melief C., Kenter G., Fleuren G., Offringa R., Van der Burg S. 2007. High number of intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer Res.* 67, 1: 354-361.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-147.
- Poehlein CH, Hu HM, Yamada J, Assmann I, Alvord WG, Urban WJ, Fox BA. 2003. TNF plays an essential role in tumor regression after adoptive transfer of perforin/IFN-gamma double knockout effector T cells. *J Immunol.* 170: 2004–2013.

Prevosto C., Zancolli M., Canevali P., Zocchi MR., Poggi A. 2007. Generation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematological*. 92:881-8.

Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 76:1208-13.

Regateiro F.S. *et al.* 2011. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur. J. Immunol.* 41: 2955–2965.

Regueiro JR., López C., González S., Martínez E. 2010. Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario. 4ª edición. Editorial Medica Panamericana. España. Pp. 108.

Ren G., Zhao X., Wang Y., Zhang X., Chen X., Xu C., Yuan ZR., Roberts AI., Zhang L., Zheng B., Wen T., Han Y., Rabson AB. 2012. CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF $\alpha$ . *Stem Cells*. 11:812-824.

Rodríguez-Pardo V., Fuentes LM., Aristizabal CJ., Vernot HJ. 2010. Aislamiento y caracterización de células “stem” mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientarium*. 15:224-239.

Roitt I., Delves P., Martin S. 2008. Inmunología Fundamentos. 11ª edición. Médica Panamericana. España. Pp 34-35, 112-113.

Rollinghoff M. 1997. Immunity, components of the immune system and immune response. *Biologicals*. 25:165-168.

Sabatini F., Petecchia I., Taviani M., Jodon V., Rossi G., Brouty-Boye D. 2005. Human bronchial fibroblast exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 85: 962-971.

Saldanha Araujo F., Ferreira FIS., Palma PV., Araujo AG., Queiroz RHC., Covas DT., Zago MA., Panepucci RA. 2011. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cells*. 7:66-74.

Sattler C., Steinsdoerfer M., Offers M., Fischer E., Schierl R. 2011. Inhibition of T-Cell Proliferation by Murine Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Mediated by CD39 Expression and Adenosine Generation. *Cell Transplantation*. 20: 1221–1230.

Schiedil, Anke C. 2013. Antiproliferative effects of selective adenosine receptor agonist and antagonist on human lymphocytes: evidence for receptor. Independent mechanisms. *Purigenic Signalling*. 9: 351-365.

Schulte G, Fredholm BB. 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal*. 15: 813–827.

Shi S., Bartold P., Miura M., Seo B., Robey P., Gronthos S. 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 8:191-199.

Serman F. 2002. Cáncer Cervicouterino: Epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 67: 318-323.

Sitkovsky M., Kjaergaard J., Lukashev D., Ohta A. 2008. Hypoxia- Adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hipoxia. *Cancer Res.* 14, 19: 5947- 5952.

Stanley M. 2006 Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 24, 1: 16-22.

Sträter N. 2006. Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships. *Purinergic Signal.* 2: 343–350.

Studený M., Marini FC., Champlin RE., Zompetta C., Fidler IJ., Andreeff M. 2002. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 62:3603-3608.

Sugiyama H, Chen P, Hunter M, Taffs R, Sitkovsky M. 1992. The dual role of the cAMP-dependent protein kinase C alpha subunit in T-cell receptor-triggered T-lymphocytes effector functions. *J Biol Chem.* 267: 25256–25263.

Sun Z., Wang S., Zhao RC. 2014. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol.* 7:14.

Suzuki K., Sun R., Origuchi M., Kanehira M., Takahata T., Itoh J., Umezawa A., Kijima H., Fukuda S., Saijo Y. 2010. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med.* 17: 579- 587.

Synnestvedt K. 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 110: 993–1002.

Takayama H, Sitkovsky MV. 1989. Potential use of an antagonist of cAMP-dependent protein kinase to block inhibition and modulate T-cell receptor-triggered activation of cytotoxic T-lymphocytes. *J Pharm Sci.* 78: 8–10.

Taylor DD., Gercel-Taylor C., Lyons KS., Stanson J., Whiteside TL. 2003. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-z by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* 9:5113-5119.

Thompson L.F. *et al.* 2004. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 200: 1395–1405.

Trinchieri G. 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol.* 9:17-23.

Tse WT., Pendleton JD., Beyer WM., Egalka MC., Guinan EC. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 75:389-397.

Uccelli A., Pistoia V., Moretta L. 2007. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*, 28:219-26. Valtieri M, Sorrentino A. (2008). The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Cell Physiol*. 217: 296-300.

Valtieri M, Sorrentino A. 2008. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Cell Physiol*. 217: 296-300.

Vignali Dario A., Collison Lauren W., Workman Creg J. 2008. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*. 8: 523-532.

Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breitmayer JP., Cottrez F., Groux H. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*.; 18:605–617.

Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 121: 368-374.

Welters M., Kenkv G., Piersma S., Vloon A., Löwik M., Berends- van der Meer D., Drijfhout J., Valentijn A., Oostendorp J., Fleuren G., Offringa R., Melief C., Van der Burg S. 2008. Induction of tumor- specific CD4 and CD8 T-cell immunity in cervical cancer patients by a human Papillomavirus Tyoe 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Cancer Res*. 14, 1: 178-187.

Whiteside Theresa L. 2005. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention, *Seminars in cancer Biology*. 16: 3-15.

Willems F., Marchant A., Delville JP., Gerard C., Delvaux A., Velu T., de Boer M., and Goldman M. 1994. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule- 1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*. 24:1007–1009.

Wulling M., Delling G., Kaiser E. 2003. The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Human Pathol*. 34: 983-993.

Zappia E., *et al*. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. *Blood*. 106: 1755–1761.

Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J et al. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 111: 251–259.

Zeller JC., Panoskaltsis-Mortari A., Murphy WJ., Ruscetti FW., Narula S., Roncarolo MG., and Blazar BR. 1999. Induction of CD4<sup>+</sup> T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol*. 163:3684–3691.

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS. 2003 The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 310:100-108.

Zhang B., Liu R., Shi D., Liu X., Chen Y., *et al.* 2009. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 113, 1: 46–57.

Zhang H., Conrad DM., Butler JJ., Zhao C., Blay J., Hoskin DW. 2004. Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and phosphatases. *J Immunol*. 173: 932–944.

Zhang B. 2010. CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 70, 16: 6407-6411.

Zhang B. 2012. CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology*. 1: 67–70.

Zhao ZG., Xu W., Sun L., You Y., Li F., *et al.* 2012. Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunol Invest*. 41, 2: 183–198.

Zimmermann H. 1999. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci*. 20: 231–236.

zur Hausen H. 1982. Human genital cancer; synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events?. *The Lancet*. 320, 8310: 1370–1372.