



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
(UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Inmunobiología

Análisis *in vivo* del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino sobre linfocitos T citotóxicos a través de la vía Adenosinérgica (CD73-Adenosina).

TESIS

Para obtener el Título de:

BIOLOGA

Presenta:

Rodríguez Reyes Estephany Guadalupe

Director de Tesis:

Dra. María de Lourdes Mora García



México, D.F., 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **RODRÍGUEZ REYES ESTEPHANY GUADALUPE**, con número de cuenta **307280565**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **7 de abril** a las **12:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. BENNY WEISS STEIDER

VOCAL Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SECRETARIO M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SUPLENTE Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SUPLENTE Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

[Handwritten signatures of the jury members]

El título de la tesis que presenta es: **Análisis *in vivo* del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino sobre linfocitos T citotóxicos a través de la vía Adenosinérgica (CD73-Adenosina).**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÉ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 10 de marzo de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

El presente trabajo se desarrollo 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 Tecnologica (PAPIIT) de la UNAM** clave del proyecto IN217013 “Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromale mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73”. Agradezco a DGAPA-UNAM la beca recibida.

Asimismo parte de este trabajo se desarrollo en el laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO H. Oncología SXXI IMSS, con el apoyo financiero de los proyectos: FIS/IMSS/PROT/G09/762; FIS/IMSS/PROT/G11-2/2014 Y FIS/IMSS/PROT/MD13/1258.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al laboratorio de Inmunobiología de la Fes Zaragoza UNAM, donde realicé mi trabajo de tesis y a todo el equipo que lo integra especialmente a la Dra. María de Lourdes Mora García y al Dr. Alberto Monroy García por permitirme formar parte de su equipo y proporcionarme las herramientas necesarias para llevar a cabo mi trabajo de investigación y sus conocimientos, de igual manera agradezco de manera muy especial el apoyo incondicional que recibí del Dr. Jorge Hernández Montes, por el tiempo que dedico a responder cada una de mis dudas generando una gran enseñanza, conocimiento y comprensión a lo largo de este estudio, muchas gracias.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio: M. en C. Luis, M. en C Vianey, M. en C Azucena, Itzel, Estrella y Víctor por hacer que el trabajo a su lado fuera siempre agradable y porque cada uno de ustedes de alguna manera me apoyaron en el desarrollo de este trabajo con sus consejos, por transmitir sus conocimientos sobre las técnicas que empleamos en el laboratorio y que formaron base para la realización de este trabajo experimental.

Al laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO H. Oncología SXXI IMSS especialmente a la M en C. Rosario por apoyarme y transmitirme sus experiencias y conocimientos desde un inicio en mi estancia en ese laboratorio para realizar parte del trabajo experimental.

Al laboratorio de Hematología, de la UIMEO H. Oncología SXXI IMSS especialmente a la Dra. Patricia Piña por brindarme la oportunidad de realizar una parte importante del trabajo experimental de este estudio en su laboratorio, por los consejos y enseñanzas dadas. También agradezco la ayuda técnica para llevar a cabo los experimentos de manera satisfactoria al Sr. Juan de Dios.

A mis sinodales y revisores del trabajo ya que con sus consejos y observaciones realizadas permitieron la culminación de este proyecto.

Dr. Benny Weiss Steider, Dra María de Lourdes Mora García, Dra. Rosalva Rangel Corona, Dr. Hugo Lopez y Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

DEDICATORIA

A mis queridos papas, Ma. Lourdes y Cesar, por todo su cariño y amor me han dado, gracias por todo su apoyo,, por esas enseñanzas y consejos que me han ayudado a realizar la primera meta de mi gran proyecto de vida, estoy orgullosa de ustedes porque han luchado para que nosotras podamos seguir adelante, es por ello que este logro no solo es mio sino también de ustedes, gracias papis los amo.

A mis hermanas Jessica y Jennifer que son mi gran alegría, gracias por su cariño, por aguantarme y apoyarme es por ello que este logro también es suyo, las amo mis niñas.

A mi amiga Fernanda, por todo tu apoyo y sabiduría, especialmente gracias por estos años de amistad que ha hecho que mi vida sea más linda en esos momentos difíciles y divertida por tantos anécdotas que hemos pasado juntas, te quiero amiga.

A Demian una persona muy importante en mi vida que me ha enseñado mucho, gracias por confiar en mí, por animarme en esos momentos difíciles y echarme porras en esos logros, que a pesar de las adversidades que hemos vivido juntos, siempre estas apoyándome y sobre todo por enseñarme a disfrutar la vida y que nada es imposible, gracias por todo tu cariño.

A mis amigos de la universidad: Eva, Mitzi, Miroslava, Tizel, Fernando Solano, Lisandro, Fernando Bedolla, Itzel, gracias por brindarme su amistad, por todo su apoyo y consejos y sobre todo por esas bellas experiencias que pasamos juntos o a lo largo de nuestra estancia.

A la familia Reyes Zepeda, por todo su apoyo a lo largo de estos años, por siempre echarme porras y por su cariño, los quiero mucho.

A mi abuelo Jesus Rodríguez, que ha pesar de que ya no se encuentra con nosotros me enseñó muchas cosas y me dio mucho amor y en mi corazón vive su recuerdo.

“La mayor gloria no es nunca caer sino levantarse siempre”

Nelson Mandela

“Cualquier destino por largo y complicado que sea, consta en realidad de un sólo momento: el momento en el que el hombre sabe para siempre quien es”

J.L. Borges

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEORICO.....	5
4.1. VPH	5
4.1.1. Estructura del VPH	5
4.1.2. Clasificación del VPH	8
4.1.3. Ciclo de vida e infección por VPH	9
4.2. SISTEMA INMUNE	11
4.2.1. Inmunidad innata	11
4.2.2. Inmunidad adaptativa.....	12
4.2.3. Inmunidad humoral	12
4.2.4. Inmunidad celular	13
4.3. LINFOCITOS T	14
4.3.1. Linfocitos T citotóxicos (CD8+)	14
4.4. SISTEMA INMUNE Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO (CaCu)	16
4.5. VÍA ADENOSINÉRGICA.....	18
4.5.1. 5'-ectonucleotidasa (CD73).....	19
4.5.2. Adenosina y su Respuesta Inmune en Tumores.....	20
4.6.CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (CEMs).....	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	27
6. HIPÓTESIS.....	28
7. OBJETIVOS.....	28
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
8. MATERIALES Y MÉTODO.....	29
8.1. CÉLULAS.....	29

8.2. RATONES.....	29
8.3. INMUNIZACIÓN E INOCULACIÓN DE CÉLULAS PARA LA INDUCCIÓN DE TUMORES..	29
8.4. MEDICIÓN DE TUMORES.....	30
8.5. DETERMINACIÓN DE LTC ESPECÍFICOS AL PÉPTIDO RAHYNIVTF.....	30
8.6. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
8.7 CUANTIFICACIÓN DE ADENOSINA MEDIANTE UPLC.....	31
8.8. EXTRACCIÓN TOTAL DE RNA, SINTESIS CDNA Y PCR-RT	32
9. RESULTADOS	33
9.1. INDUCCIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6 SIN PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA Y EN PRESENCIA DE CEMs	33
9.2. INDUCCIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6 CON PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA Y EN PRESENCIA DE CEMs	34
9.3. ANÁLISIS DE LA POLACION DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS PROVENIENTES BAZO EN LOS RATONES CON PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA.....	35
9.4. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSINA PROVENIENTES DE SUERO DE RATONES CON Y SIN PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA	37
9.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO Y A NIVEL MEMBRANA DE CD73 EN TUMORES CON/SIN PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA.....	38
10. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
11. CONCLUSIONES.....	46
12. PERSPECTIVAS.....	47
13. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CONTENIDO	Pág.
FIGURA 1. Virus del Papiloma Humano.....	6
FIGURA 2. Esquema del genoma circular del virus del papiloma humano.....	7
FIGURA 3. Mecanismo de infección del virus del Papiloma Humano en cérvix.....	10
FIGURA 4. Representación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.....	13
FIGURA 5. Representación del funcionamiento de un linfocito T citotóxico y auxiliar contra una célula tumoral	15
FIGURA 6. Progresión celular de células T CD8+ naive-de memoria después de la infección aguda o vacunación.....	16
FIGURA 7. Esquema del metabolismo de la adenosina extracelular inducida por el tumor en la supresión inmune.....	19
FIGURA 8. Efectos inmunosupresores de la adenosina extracelular.....	21
FIGURA 9. Receptores para Adenosina.....	22
FIGURA 10. Efectos inmunomodulatorios de MSCs en la respuesta inmune.....	25
FIGURA 11. Cinética de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 sin protección inmunológica.....	34
FIGURA 12. Cinética de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 bajo condiciones de protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF.....	35
FIGURA 13. Gráfica del porcentaje de linfocitos T citotóxicos específicos al péptido RAHYNIVTF en ratones inmunizados.....	36
FIGURA 14. Gráfica de la generación de adenosina en los ratones C57BL/6 retados con células tumorales TC-1 o con células CEM-CaCu+TC-1 con y sin previa inmunización.....	38
FIGURA 15. Gráfica de la expresión de RNA mensajero de CD73 en los tumores inducidos en ratones de la cepa C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 o CEM-CaCu+TC-1.....	39
FIGURA 16. Esquema de la expresión de CD73 a nivel membrana en tumores inducidos en ratones de la cepa C57BL/6 mediante la inoculación de células tumorales TC-1 o TC-1+CEMs-CaCu.....	40
TABLA 1. Función de las proteínas virales del HPV.....	7
TABLA 2. Sistema de inoculación de células tumorales y CEMs.....	30

1. ABREVIATURAS

VPH.....	Virus del Papiloma Humano
ADO.....	Adenosina
CEMs.....	Células Estromales Mesenquimales
CEMs-CaCu.....	CEMs humanas derivadas de Cáncer Cérvico Uterino
MHC.....	Complejo principal de histocompatibilidad
CPA.....	Células Presentadoras de Antígeno
HLA.....	Antígeno Leucocitario Humano
LTC.....	Linfocito T citotóxico
NK.....	Células Natural Killer
DC.....	Células Dendríticas
CaCu.....	Cáncer Cérvico Uterino
Tregs.....	Células T reguladoras
IL.....	Interleucina
IFN- γ	Interferon gamma
HGF.....	Factor de Crecimiento de Hepatocitos

2. RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema importante de salud pública en nuestro país, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres mexicanas con cáncer, y su desarrollo se asocia etiológicamente con la infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo. No obstante, otros factores ambientales e intrínsecos del hospedero, pueden contribuir al proceso carcinogénico del VPH. Tal es el caso de un microambiente inmunosupresor, el cual favorece la proliferación de las células infectadas por VPH y células tumorales, para la progresión de la enfermedad. Recientemente se ha descrito que las Células Estromales Mesenquimales (CEMs), participan de manera importante en la supresión de la respuesta inmune en el microambiente tumoral a través de varios mecanismos, como es la generación de adenosina mediante la fosfohidrólisis de ATP, por acción de las ectoenzimas CD39 y CD73. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha logrado aislar y caracterizar estirpes de CEMs de tumores de CaCu (CEMs-CaCu). El presente estudio tuvo como finalidad la de analizar la participación de CEMs-CaCu, en la supresión de linfocitos T citotóxicos a través de la vía adenosinérgica (CD73-adenosina) en un modelo tumoral de ratones de la cepa C57BL/6.

En nuestro modelo experimental se encontró que la inoculación de células tumorales TC-1 de manera simultánea con CEMs-CaCu en ratones C57BL/6, no modificó el crecimiento tumoral en relación con aquel observado en ratones donde sólo se inocularon las células tumorales TC-1. Por otro lado, cuando los ratones fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, se observó protección ante el reto tumoral con las células TC-1; no obstante cuando las CEMs-CaCu se inocularon de manera simultánea con las células TC-1, se observó un importante crecimiento del tumor, el cual fue asociado con una reducción en el porcentaje de células T CD8+ específicas al péptido RAHYNIVTF, particularmente después de los 20 días de haber sido inoculadas con ambos tipos celulares. Por otra parte, en los tejidos tumorales de los ratones inoculados con células TC-1 o CEMs-caCu y células TC-1, se observó una mayor expresión de la proteína CD73 en la membrana de las células tumorales y también a nivel de ARNm del tejido tumoral; mientras que en los ratones inmunizados y a quienes se les aplicaron CEMs-CaCu y células TC-1, la expresión de CD73 fue menor. De manera interesante, en aquellos ratones que no tuvieron protección inmune con el péptido RAHYNIVTF, las concentraciones de adenosina sérica fueron mayores que la observada en aquellos ratones que fueron previamente inmunizados antes del reto con ambos tipos celulares. Finalmente se concluye que, las CEMs-CaCu juegan un papel importante en la supresión inmune de la respuesta inmune antitumoral, al suprimir la población de linfocitos TCD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF, en el modelo tumoral de ratones C57BL/6 con células tumorales TC-1 y CEMs-CaCu; y que la vía-CD73/adenosina puede jugar un papel importante en dicho proceso.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa más común de muerte especialmente en mujeres jóvenes de alrededor del mundo (Lowy et al, 2006). De acuerdo a estadísticas de la Organización Mundial de la Salud existen aproximadamente 500,000 nuevos casos cada año, de los cuales un tercio mueren a causa de esta enfermedad (Yugawa et al, 2009); en México también constituye la segunda causa de mortalidad por cáncer y son diagnosticadas más de 10 000 mujeres con CaCu al año (INEGI, 2010).

Es reconocido que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), ya que el 99.7% de muestras analizadas puede encontrarse ADN de alguno de los tipos de VPH considerados de alto riesgo tales como VPH-16 Y -18. En contraste, tipos de VPH de bajo riesgo como 6 y 11 son encontrados principalmente en verrugas benignas (Walboomers et al., 1999; Bosch and Muñoz, 2002; de Villiers et al, 2004).

La persistencia de VPH en el tracto genital, también se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos; así como por la inducción de linfocitos T reguladores (Tregs) antígeno-específica infiltrados en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser et al., 2007; Molling et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Piersma et al., 2007). La evidencia de reclutamiento de linfocitos Tregs al microambiente tumoral ha hecho que se proponga que las células estromales mesenquimales (CEMs) participan en dicho reclutamiento, debido a que estas se caracterizan por tener *per se* actividad inmunosupresora de la respuesta inmune además se ha visto que tienen la capacidad de inducir, reclutar y mantener la función reguladora de linfocitos Tregs (Pittenger et al., 1999; Dominici et al., 2006; Prevosto et al., 2007; Di Ianni et al., 2008).

También se ha observado que cuando las CEMs son trasplantadas o inyectadas, tienen la capacidad de migrar a una variedad de órganos y tejidos, esta capacidad se ve incrementada en sitios de inflamación y ciertas patologías debido a su capacidad de reparación y remodelación de tejidos (Chapel et al., 2003). En el caso particular de los tumores, se ha demostrado que existen mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral similares a los producidos en heridas que proveen las condiciones propicias para el arribo de CEMs angiogénicas, así mismo contribuyen a la formación del estroma tumoral y proveen un nicho permisivo para el desarrollo de las células tumorales. A pesar de que existen varios avances en el tema, el papel de las CEMs en el microambiente tumoral aún es incierto. Algunos estudios han demostrado que favorece el implante y crecimiento tumoral, debido a sus propiedades inmunomodulatorias y pro-angiogénicas (Yen and Yen, 2008; Karnoub et al., 2007; Djouad et al., 2003); mientras que otros estudios han descrito un efecto de inhibición del crecimiento tumoral o mantenimiento de la sobrevivencia del tumor (Khakoo et al., 2006). Las CEMs actúan como moduladores inmunes con actividades reportadas en la supresión de la respuesta inmune innata y adaptativa. Las funciones supresoras inmunes de las CEMs son muy amplias, e incluyen la regulación a través de la producción de citocinas, la supresión de las funciones de las células T citotóxicas, la inhibición de la diferenciación de las células dendríticas y el aumento de las células T reguladoras, lo que sugiere que puede influir en el comportamiento de casi todas las actividades inmunes clave que participan en el desarrollo de tumores (Houthuijzen, 2012).

Recientemente se ha postulado que uno de los mecanismos inmunosupresores que utilizan las CEMs es la generación de adenosina a partir de nucleótidos extracelulares como es el ATP; esta es catalizada por la acción de las ectonucleotidasas CD39 (*Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase* ENTPDase1) y CD73 (*ecto -5'- nucleotidasa -NT5E*). CD39 hidroliza ATP en ADP y AMP; mientras que CD73, hidroliza a AMP para generar a la adenosina. CD73 participa en las interacciones célula-célula y célula-matriz, tiene funciones inmunoregulatoras y actúa como factor proliferativo, ya que participa en el control de crecimiento celular, diferenciación, invasión, migración, adherencia y metástasis de las células tumorales; promueve la quimiotaxis y la angiogénesis tumoral (Zhang, 2012; Allard et al., 2014). La adenosina constitutivamente se encuentra presente en los medios extracelulares en una concentración muy baja, pero su concentración aumenta en condiciones de estrés fisiológico, particularmente en el microentorno del tumor. Después de su lanzamiento, la adenosina se une a receptores de membrana que pertenecen a una familia de receptores de proteínas G. La familia de receptores para adenosina está compuesta por cuatro miembros, denominados A1, A2A, A2B y A3, que median diferentes vías celulares a través de la unión de adenosina. A bajas concentraciones de adenosina, los receptores A1, A2A de alta afinidad, y los receptores A3 están involucrados, mientras que a altas concentraciones, como los observados en el microambiente del tumor, el receptor A2B de baja afinidad está implicado en la señalización (Ghiringhelli, 2012). Los receptores A2A y A2B se encuentran dispuestos predominantemente en la membrana de linfocitos T citotóxicos CD8+, y son los responsables de ejercer efecto supresor sobre estas células efectoras a través de su interacción con adenosina extracelular (Huang et al, 1997 y Koshiba et al 1997). Por tanto, la presencia de células cancerosas, así como de células inmunosupresoras que se infiltran en el microambiente del tumor, tal como las CEMs y linfocitos T reguladores, son capaces de inhibir a las células efectoras antitumorales mediante la liberación de adenosina a través de la actividad de CD73 (Ghiringhelli, 2012).

4. MARCO TEORICO

4.1 VPH

El VPH representa un grupo heterogéneo de agentes que infectan tejidos epiteliales que producen papilomas y tumores benignos. En algunos casos la infección viral puede llevar a una transformación maligna. En 1949 por microscopia electrónica se identificaron partículas virales en verrugas humanas, surgiendo la idea que el VPH era el agente causal de CaCu, concediéndole el Premio Nobel en 2009 al profesor Harald Zur Hausen (Zur Hausen et al, 1994; Lizano et al., 2009).

La infección por VPH esencialmente es una enfermedad de transmisión sexual. De esta manera, tanto como hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, pudiendo ser acarreadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH (Lizano et al., 2009). Los VPH han sido aislados en al menos 24 especies de animales incluyendo aves, reptiles y mamíferos y en algunas de estas especies se ha asociado a cáncer invasivo (Zur Hausen et al, 1994).

La diversidad génica del VPH no refleja la adquisición rápida de mutaciones, sino una historia antigua de adaptaciones del virus a diferentes células del hospedero y a los mecanismos de control viral desarrollados por el mismo. Actualmente el mayor aliciente para el interés en el VPH se debe, no solo al aumento de la prevalencia de la infección por este virus a nivel mundial en los últimos años, sino al descubrimiento de su relación causal con el cáncer de cuello uterino, cáncer de vulva, cáncer anogenital para mujeres y posiblemente otros cánceres humanos, entre ellos tumores de piel y mucosa para hombres (Androphy, 1994; Lizano et al., 2009).

4.1.1 Estructura del VPH

El VPH pertenece al género Papillomavirus de la familia Papilomaviridae (Dias et al., 2005). El VPH es relativamente pequeño, sin envoltura, de 55 nanómetros (nm) de diámetro, con un genoma de ADN de doble cadena circular que contiene aproximadamente 8kb u 8,000 pares de bases de longitud (Hebner et al, 2006) (Figura 1). El genoma esta encapsulado en una estructura icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) que están formados en un 95% por la proteína L1 y un 5% por la proteína L2 (Pagliusi and Aguado, 2004).

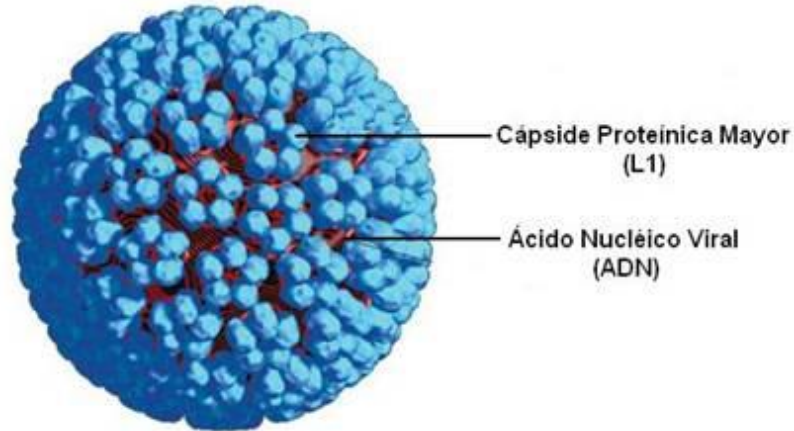


Figura 1. Virus del Papiloma Humano. Muestra ADN circular de doble cadena protegido por una cápside proteica. (Tomado de <http://dimygen.webcindario.com/31.html>).

El genoma del VPH es funcionalmente dividido en tres regiones (Figura 2): la primera es una región reguladora no codificante denominada región larga de control LCR (Long Control Region), es la encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E7 (Rincon et al., 2007), que en los tipos de VPH de alto riesgo son capaces de interactuar con proteínas reguladoras del ciclo celular, y por tanto, de inducir un estado transformado a la célula hospedera (Galloway et al., 1996); la segunda es una región temprana E (Early) que contiene marcos de lectura abierta (ORF'S por sus siglas en inglés), la cual codifica para las proteínas virales E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Burk et al., 2009) necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular y una tercera región o mejor denominada como región tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside las cuales facilitan el empaquetamiento del genoma viral (tabla 1) (Chen et al., 2007 ; Lizano et al., 2009).

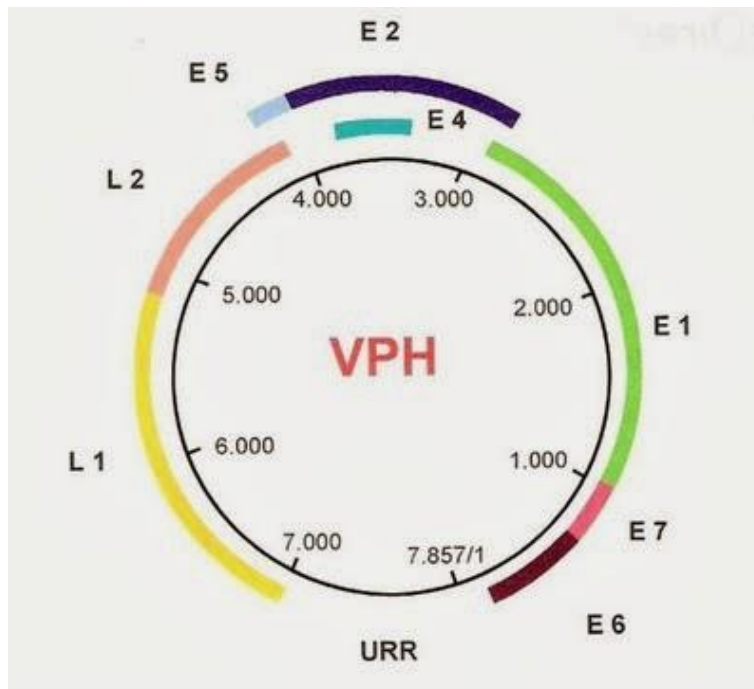


Figura 2. Esquema del genoma circular del virus del papiloma humano mostrando la disposición de las proteínas no estructurales (Región no temprana) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Tomado de López et al., 2006).

La región temprana (E) contienen seis proteínas virales (E1,E2,E4,E5,E6 y E7) de las cuales E1 codifica dos proteínas requeridas para la replicación extracromosómica del ADN viral y para completar su ciclo vital, E2 son esenciales en la transcripción y replicación extracromosómica viral, E4 se une a citoqueratinas y participa en la modificación de la red del citoesqueleto (Galloway et al, 1996), E5 se sabe que interacciona con receptores de membrana por ejemplo los factores de crecimiento y de esta manera podría estimular la proliferación de las células infectadas por el VPH (García, 2007) y E6 y E7 poseen un papel fundamental, ya que ambas son identificadas como las proteínas oncogénicas del VPH y de inmortalización celular, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica (Lizano et al.,2009).

Proteínas	Características
E1	Codifica una helicasa para la replicación episomal de ADN viral
E2	Regula la expresión temprana de los genes E6 Y E7, facilitando la replicación del virus.
E4	Permite el ensamblaje viral y altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus.
E5	Altera el pH endosomal y el reciclamiento de receptores de (EGF) a la superficie celular.
E6	Inactiva la función p53 e inhibe la apoptosis.
E7	Se une a pRB y reactiva la síntesis de ADN del huésped.
L1	Constituye el 95% de la cápside (cubierta viral).
L2	Constituye el 5% de la cápside viral.

Tabla 1. Función de las proteínas virales del HPV (tomado de Cid- Arregui, 2009).

E6 está conformada por casi 150 a.a y tiene la característica de poseer un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y su principal función es descrita como el de cooperadora de la proteína E7 para llevar a cabo la transformación celular. Al ser una proteína temprana, ayuda a cambiar el microambiente celular propiciando el bloqueo de la apoptosis, al igual interfiere con el sistema inmune al evitar el reconocimiento de las células infectadas y con esto facilitar la supervivencia del virus y evitar su eliminación al interactuar con el factor regulador de interferón (IRF-3), así mismo es capaz de inhibir o activar la transcripción de genes celulares mediante diversas interacciones involucrados en la transducción de señales y/o angiogénesis, como una sobreactivación de la telomerasa, lo que le permite extender la vida celular y del gen VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Schiffman et al., 2007; Lizano et al., 2009), además es capaz de enlazarse a la proteína supresora de tumor p53 como parte de un complejo trimérico con la ubiquitina ligasa celular (Longworth and Laimins, 2004).

Por su parte, E7 es una proteína conformada aproximadamente por 100 a.a, esta proteína está involucrada en procesos como síntesis de DNA estableciendo un complejo con la forma hiposforilada de pRb induciendo su degradación y provocando la activación del factor de transcripción E2F así como apoptosis mediante su interacción con IGFBP-3 (proteína 3 de unión al factor de crecimiento semejante a insulina) (Lizano et al., 2009).

La región tardía (L) contiene dos regiones codificantes L1 y L2 las cuales generan proteínas que forman parte de la cápside viral. L1 codifica la más importante de las proteínas ya que constituye aproximadamente el 95% la cual es una forma muy extendida entre los distintos virus específicos de cada especie. Tiene la capacidad de generar anticuerpos que pueden ser detectados en pacientes infectadas. De la región L2 se codifican proteínas de menor tamaño y mayor variabilidad interespecies de la cápside viral. La transcripción de L1 y L2 está regulada por factores de transcripción que se producen solo en células epiteliales más diferenciadas de la capa superficial del cérvix, esto explica el hecho de que la producción de viriones y el efecto citopático es más pronunciado en las regiones histológicamente de más bajo grado (Giroglou, 2001).

4.1.2 Clasificación del VPH

El aislamiento y caracterización del ADN del virus del papiloma de la piel y las verrugas genitales reveló la existencia de distintos tipos de VPH. Actualmente más de 200 tipos de VPHs se han identificado sobre la base de datos de secuencias de ADN que presentan diferencias genómicas (Joura et al., 2007; McLaughlin-Drubin and Münger, 2009) de los cuales ochenta y cinco genotipos de VPH están bien caracterizados y otros 120 aislamientos son parcialmente caracterizados como nuevos genotipos (Zur Hausen, 1999). Un distinto tipo de VPH se asigna cuando la totalidad del genoma es clonado y la secuencia de nucleótidos completa de su gen L1 difiere de la de cualquier otro tipo por lo menos 10% (Burk et al., 2009) o bien aquel cuyo ADN tiene menos del 90% de homología en la secuencia con cualquier tipo de VPH (Beristain, 2004).

Los tipos virales que infectan el tracto genital se separan en 2 categorías: de alto riesgo y de bajo riesgo. Los de alto riesgo están asociados con el desarrollo de cánceres anogenitales, incluyendo aquellos que infectan el área de cérvix, mientras que las infecciones de bajo riesgo inducen solo verrugas genitales benignas. Los tipos de alto riesgo más comunes incluyen VPH-16, -18, -31, -33, -

35, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 y 82 de los cuales el tipo 16 y 18 originan 70% de los casos de CaCu (Bosch et al., 2008; Lizano et al., 2009) y los tipos de bajo riesgo son frecuentemente VPH-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81 y CP6108 (Catellsagué et al., 2007).

4.1.3 Ciclo de Vida e Infección por VPH

La Infección por Papilomavirus requiere que las partículas virales entren al epitelio basal y accedan a las células en división (Patterson et al., 2005) mediante una microabrasión en el epitelio estratificado (Doorbar, 2005). Actualmente hay controversia acerca de la naturaleza precisa del receptor que requiere el virus para entrar a la célula, pero se piensa que los proteoglicanos de heparán sulfato pueden jugar un papel importante en el enlace inicial y/o a la entrada del virus (Joyce et al., 1999; Paterson et al., 2005) así mismo se ha sugerido la participación de la $\alpha 6$ integrina (McMillan et al., 1999; Bossis et al., 2005).

El ciclo de vida del VPH comienza con la infección de las células basales epiteliales que incluye la entrada a la célula huésped, manteniendo su genoma a un bajo número de copias por célula infectada, y requiriendo la expresión de E1 y E2. La segunda fase, incluye ya el primer paso hacia la transformación celular, es decir, la integración del genoma del VPH a la célula. E1 y E2 se unen al origen de replicación viral y enganchan a las ADN polimerasas celulares y otras proteínas necesarias para la replicación del ADN. El genoma viral se cree que se mantiene en 10 a 200 copias por célula en la capa basal de toda la infección. Sin embargo, este número de copias aumenta dramáticamente cuando se mueven las células infectadas a las capas superiores del epitelio. Durante esta fase de amplificación, los genomas son empaquetados en viriones infecciosos ante su liberación. Las células infectadas son morfológicamente diferentes y se denominan coilocitos en esta etapa con un núcleo ampliado y a menudo múltiples núcleos por célula. La activación del promotor dependiente de diferenciación conduce a una mayor expresión de las proteínas E1, E4 y E5, mientras que L1 y L2 se expresan en la capa superior del epitelio para facilitar su ensamblaje y la formación de viriones. Las cápsides se someten a un proceso de maduración provocada por el procesamiento proteolítico de los componentes del virión antes de la liberación de la célula. El virión que se libera puede infectar el epitelio basal o extenderse a nuevos huéspedes (Stanley, 2006).

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

E7 también marca pRb para la degradación proteolítica por la vía de proteosoma de ubiquitina a través del proteosoma 26S (Abdul et al., 2009).

El análisis de las moléculas de ARN mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas demuestran que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos más superficiales, donde también ocurre el ensamblado de las cápsides virales que dan lugar a la formación de viriones (Baseman and Koutsky, 2005). No obstante, la producción de éstos es tan sutil que no alcanza a haber una lisis importante en las células, este estado puede permanecer casi inalterado por varios años, produciendo algunas alteraciones celulares en forma de displasia (Doorbar, 2006) que al parecer, siguen fases bien definidas pero variables en la infección transitoria y en el desarrollo de lesiones pre malignas y malignas del cuello uterino (Clifford et al., 2005) (Figura 3).

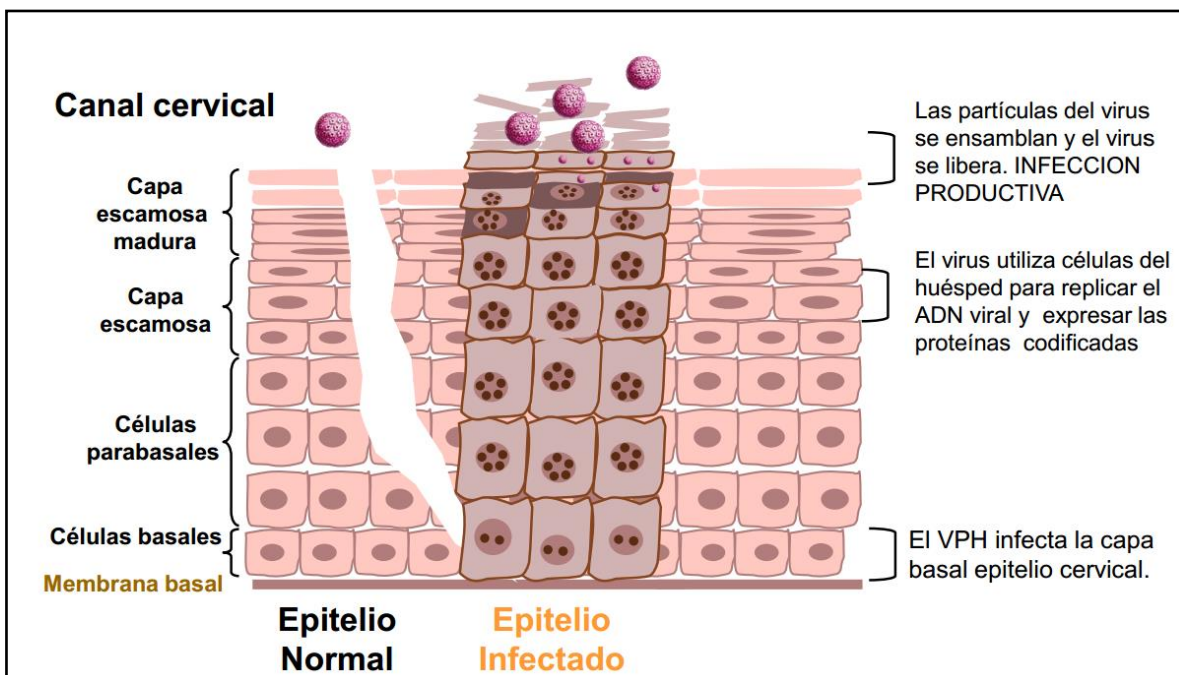


Figura 3. Imagen del mecanismo de infección del virus del Papiloma Humano en cérvix, mostrando la entrada del virus a la capa basal del epitelio, así como la integración aleatoria en el genoma del hospedero y posterior transformación celular (Adaptado de Frazer et al., 2004).

Los VPH, aprovechan la maquinaria celular para replicarse, son epitelio tróficos y una vez que alcanzan las células basales pueden permanecer en forma episomal, en estado latente, o abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio cervical. De forma paralela a la maduración del epitelio cervical. El VPH expresa sus genes de forma secuencial: en primer lugar los genes tempranos (E1-E7) en las capas basales y posteriormente, en las capas superficiales del epitelio más diferenciado, expresando sus proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo (Moodley, 2005).

En algunos casos, la infección viral es claramente seguida de la activación del sistema inmune y la eliminación de la infección del hospedero, sin embargo, las lesiones ocasionalmente persisten y progresan malignamente causando tumores. La falla en la eliminación del virus es atribuida a una pobre respuesta inmunológica, la cual es vital en la protección contra el VPH, y la subsecuente progresión neoplásica (Gariglio et al., 1992; Hilders et al., 1994; Gúzman-Rojas et al., 1998).

4.2 Sistema Inmune

El término Inmunidad deriva de la palabra latina *immunitas*, que hace referencia a la exención de diversas obligaciones civiles y procesamiento legales ofrecida a los senadores romanos durante el desempeño de sus cargos. En un sentido histórico inmunidad significa protección contra la enfermedad y más en concreto, contra una enfermedad infecciosa (Abbas et al, 2006).

El sistema inmune, puede ser definido como el conjunto de células y moléculas que protegen al cuerpo contra un agente potencialmente dañino, y la importancia de éste reside en el hecho que el accionar coordinado y conjunto de estos componentes de la inmunidad genera una eficaz protección. El sistema inmune tiene cuando menos tres propiedades funcionales principales que permiten la defensa del cuerpo. La primera es su extrema especificidad, con la propiedad de reconocer y distinguir un número grande de moléculas blanco distintas y responder (o no hacerlo), la segunda, efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, y la tercera es que posee una memoria con la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas con un agente patógeno (Roitt et al., 2008), por lo tanto su funcionamiento normal es crítico para la supervivencia del organismo en un ambiente lleno de patógenos, así como para hacer frente a factores de riesgo internos como neoplasias y enfermedades autoinmunes (Wu and Meydani, 2008).

La defensa en contra de estos agentes potencialmente dañinos, es llevada a cabo en una primera fase por la inmunidad innata y posteriormente por la inmunidad adaptativa.

4.2.1 Inmunidad Innata

La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) incluye mecanismos moleculares y celulares que se montan antes de una infección y cuyo fin es prevenirla o eliminarla. Esta primera línea de defensa altamente eficaz impide la mayoría de las infecciones desde el principio o las anula en las horas que siguen a su contacto con el sistema inmunitario innato. Los elementos de reconocimiento de este sistema distinguen de manera precisa entre lo propio y lo extraño, pero no están especializados para distinguir diferencias pequeñas en las moléculas extrañas (Abbas et al 2006; Kindt, 2007).

La inmunidad innata comprende, en primer lugar, barreras físicas y anatómicas: la piel y los epitelios de los tractos respiratorios, digestivo y genitourinario. La integridad de estas barreras naturales impide la penetración de los patógenos en el organismo. Si la barrera impuesta por los epitelios a los microorganismos patógenos se supera, se establece en el organismo un foco infeccioso primario. A fin de hacerle frente, la inmunidad innata pone en marcha de inmediato un conjunto de mecanismos celulares y humorales. Entre los componentes celulares se destacan: neutrófilos,

macrófagos, células NK (Natural Killer), células dendríticas, mastocitos, células endoteliales. Los mecanismos humorales involucran: el sistema del complemento, las proteínas de fase aguda, los interferones α y β (Fainboim y Geffner, 2005).

La inmunidad innata es alertada por daño, estrés o muerte celular, fenómeno que activa los sensores de la inmunidad innata como receptores tipo Toll manifestados por la inflamación. En el proceso inflamatorio las células efectoras de la inmunidad innata son reclutadas y las células del parénquima y fagocitos son activados para secretar citosinas inflamatorias y otras moléculas de defensa que reclutan más efectores citotóxicos en el foco inflamatorio. Crucialmente las células dendríticas en la periferia son activadas para poner en marcha la respuesta inmune adaptativa por presentación del antígeno a células T vírgenes en los nódulos linfáticos (Medzhitov et al., 1997).

4.2.2 Inmunidad Adaptativa

Una segunda forma de inmunidad, conocida como inmunidad adaptativa, se establece en respuesta a las infecciones y se adaptará para reconocer, eliminar y más tarde recordar al patógeno invasor. La respuesta inmune adaptativa recibe este nombre ya que surge como respuesta a la exposición hacia una infección y necesita una adaptación para poder sobrellevar dicha infección. Este tipo de inmunidad tiene un alto grado de especificidad hacia una gran variedad de moléculas y está entre sus características el poseer una “memoria inmune”, lo que permite recordar la exposición hacia un mismo agente infeccioso o ajeno y con esto llevar su eliminación de una manera más efectiva. La inmunidad adaptativa se desarrolla a partir de la innata y comienza pocos días después de la infección inicial (Kindt, 2007).

Ambas repuestas están involucradas en la protección del organismo en contra del cáncer sin embargo, la respuesta inmune adaptativa, es la que está involucrada principalmente con el reconocimiento de células cancerígenas y su eliminación. Para esto, el sistema inmune adaptativo cuenta con diferentes herramientas como son los linfocitos T (LT) con sus diferentes poblaciones, linfocitos B (LB), células presentadoras de antígeno (CPA), citocinas y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Figura 4) (Ruddon, 2007).

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la inmunidad humoral y la celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos o de sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica llamadas antígenos (Ag) (Abbas et al., 2006).

4.2.3 Inmunidad humoral

Los linfocitos B son las células encargadas de la inmunidad humoral, especializadas en una única función: la producción de anticuerpos, función que llevan a cabo una vez que se han diferenciado en células plasmáticas. Los anticuerpos constituyen un componente esencial de la inmunidad adaptativa. Con ellos se combate a los microorganismos que se replican en los espacios extracelulares y se previene la dispersión de los que se multiplican dentro de las células (Fainboim y Geffner, 2005).

4.2.4 Inmunidad celular

Los microorganismos intracelulares, tales como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas (Abbas et al., 2006). En la inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, participan células llamadas linfocitos T (Gostout et al., 2003). Los linfocitos T se clasifican dependiendo de su receptor en: linfocitos T γ/δ y linfocitos T α/β . Estos últimos, dependiendo de la función que realizan, se subdividen en: cooperadores o helper (CD4+), citotóxicos (CD8+) y reguladores (CD4+CD25+). Los linfocitos cooperadores se subdividen en Th1 y Th2 dependiendo del patrón de citocinas que secretan (Fernández et al., 2009).

Las células Th2 colaboraron con los linfocitos B y permiten su correcta activación, expansión y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por lo tanto, cumplen un papel central en la repuesta inmune humoral y por consiguiente, en la inmunidad frente a bacterias extracelulares e infecciones virales. Por otro lado, también tiene una función destacada en la inmunidad antiparasitaria en los tejidos periféricos al inducir la activación de eosinófilos, basófilos y mastocitos. Las células Th1 median la activación de los macrófagos y contribuyen, además, a la activación y expansión de los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Participan así en la inmunidad frente a patógenos intravesiculares, mediante su capacidad de inducir la activación de los macrófagos y frente a las infecciones virales, por su capacidad de promover el desarrollo de respuestas T CD8+ citotóxicas (Fainboim y Geffner, 2005).

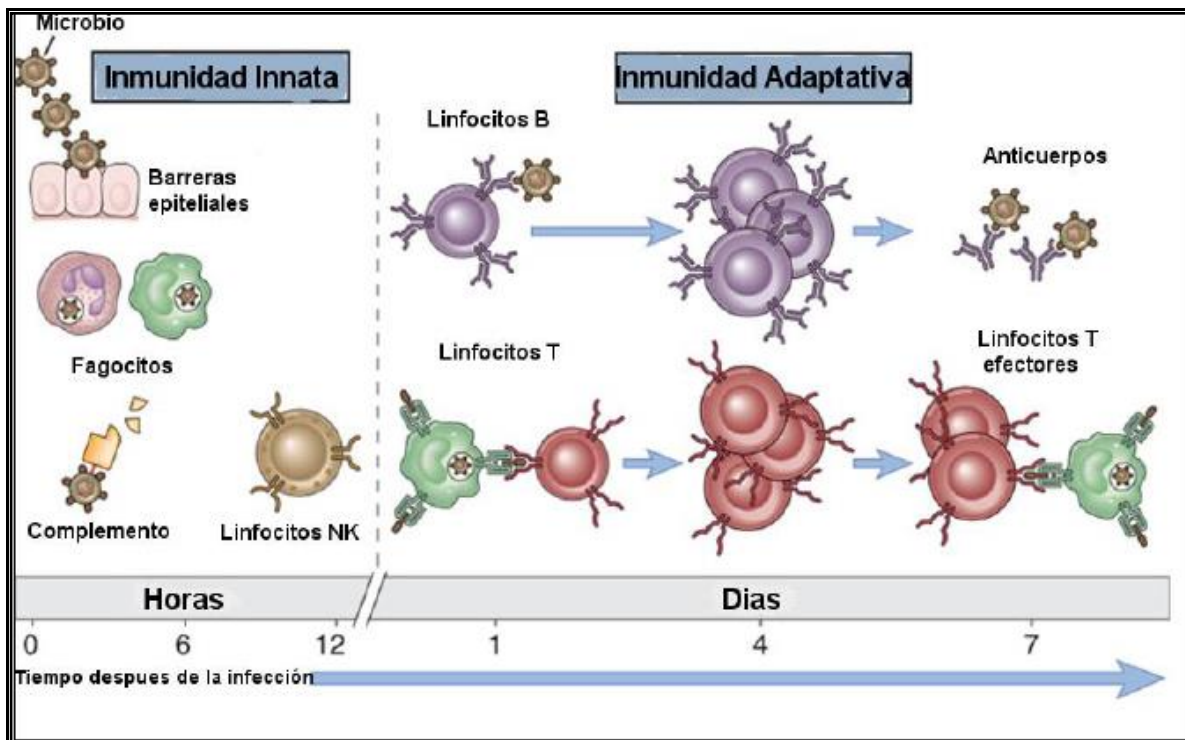


Figura 4. Representación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa en una cinética de tiempo aproximada y que puede variar entre las distintas infecciones (Tomado de Abbas et al, 2006).

4.3 Linfocitos T

Los linfocitos T o células T no producen anticuerpos, sus receptores de antígenos son moléculas de la membrana distintas de los anticuerpos, pero estructuralmente relacionadas con ellos. Los linfocitos T colaboradores y citotóxicos (CTL), tienen una especificidad limitada para los antígenos y estos últimos son los encargados de la citotoxicidad de células infectadas; solo reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan en la superficie de otras células (Stites et al., 2000). Los linfocitos T, células de la inmunidad celular, se subdividen en poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejor definidas son las células T colaboradoras (CD4) y las células T citotóxicas (CD8), los linfocitos maduros expresan casi siempre una de las dos proteínas y ésta se relaciona con su función celular y con el tipo de proteína MHC que reconocen. Aproximadamente el 70% de las células T son CD4 mientras que el 25% son CD8; cerca del 4% son CD4- CD8, dobles negativas y el 1% pueden ser doble positivas (Abbas et al., 2006).

En particular, los LT juegan un papel importante en la eliminación del cáncer. Su nombre deriva del lugar en donde maduran, el timo y es aquí en donde adquieren la capacidad de expresión del receptor de célula T (TCR), que es una molécula única de unión a antígeno. El TCR solo tienen la capacidad de reconocer moléculas unidas al MHC (Kindt et al., 2007).

4.3.1 Linfocitos T citotóxicos (CD8+)

Los péptidos que se acoplan al MHC Clase I y que son producidos por las células malignas como antígenos tumorales, constituyen el estímulo para la inducción de respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8+ (Batista, 2003; Francois et al., 2010). Los linfocitos T CD8+ son importantes en la defensa contra los virus, bacterias intracelulares, protozoos patógenos y son también potencialmente importantes en la defensa contra el cáncer (Haring et al., 2006).

Estos linfocitos reconocen a las células tumorales a través del receptor de células T. Una vez efectuado el reconocimiento antigénico las células reciben señales de activación por citocinas procedentes de los linfocitos T CD4+ auxiliares que se encuentran en su vecindad. Estos últimos también reconocen antígenos tumorales a través de células presentadoras de antígenos que han internalizado y procesado elementos antigénicos procedentes de células tumorales previamente destruidas (Batista, 2003; Zhang and Bevan, 2011) (Figura 5).

Las citocinas procedentes de los linfocitos T cooperadores y que participan en la activación de las células T citotóxicas son del patrón Th1, es decir TNF β , IL-2, IL-12, IFN γ . Estas citocinas también favorecen o incrementan la expresión de MHC de clase I en la superficie tumoral, incrementando la efectividad de los linfocitos citotóxicos.

Una vez activados los linfocitos citotóxicos, éstos van a secretar perforinas, las cuales producen agujeros en la membrana celular tumoral, lo que resulta en el colapso del potencial de membrana. Otras enzimas también liberadas son las granzimas, las cuales degradan el ADN de la célula maligna (Batista, 2003; Van Leeuwen et al., 1999).

El patrón de citocinas, así como las diferencias en la capacidad migratoria, han señalado la existencia de dos tipos de linfocitos T CD8+: Tc1 y Tc2, además, se reconoce la existencia de linfocitos T CD8+ supresores, los cuales intervienen en la regulación de la reacción inmunitaria (Hernández, 2006).

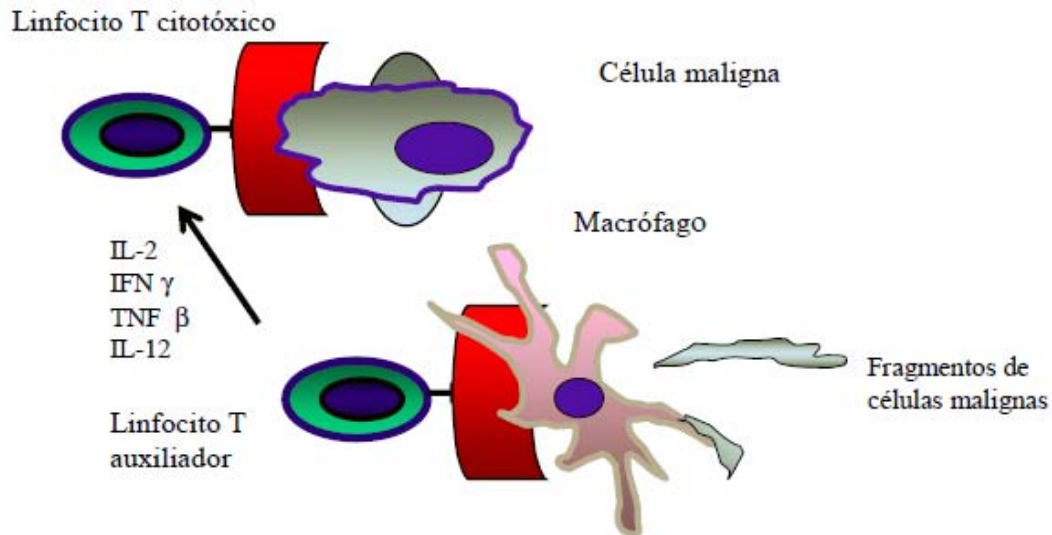


Figura 5. Cooperación celular entre linfocito T citotóxico y los auxiliares para la destrucción de la célula tumoral (Batista, 2003).

Las células T CD4+ y las células dendríticas (DC) se han referido en una adecuada respuesta de células T CD8+, aunque su participación no se ha entendido por completo. Si bien solo las CPA pueden efectuar una adecuada coestimulación a la célula T CD8+. De esta manera, es preciso un mecanismo que permita activar a las células T CD8+ para inducir su expansión clonal, el desarrollo de su función efectora y la generación de memoria (Hernández, 2006). La activación de las células T CD8+ se pueden dividir en cuatro fases. La activación inicial (fase 1) es críticamente dependiente de interacciones relativamente estables entre células T naive y maduras, el antígeno y DC que expresan moléculas coestimuladoras. La fase posterior en la proliferativa (expansión), tiene una duración de 5-8 días, durante el cual el número de células T CD8+ antígeno específico incrementa 10,000 veces. La expansión clonal también está asociada con la diferenciación de células T efectoras que migran a lo largo del cuerpo para defenderse contra la infección. La tercera fase consiste en una concentración de la serie, donde el 90%-95% de las células efectoras son eliminados durante la semana siguiente, y la fase final es la iniciación y mantenimiento de las células T CD8+ de memoria por las células sobrevivientes de fase de contracción (Figura 6). Varios estudios indican que en conjunto las fases de expansión, contracción y la fase de memoria de las células T CD8+ son en gran parte respuestas no completamente independientes de la continua visualización de Ag (antígeno), sugiriendo que un breve encuentro con Ag es suficiente a instigar el programa pleno de diferenciación de células T CD8+ (Haring et al., 2006). Por lo tanto los linfocitos CD8+ han sido considerados por muchos años las principales células efectoras contra el crecimiento de tumores (Abbas et 2006).

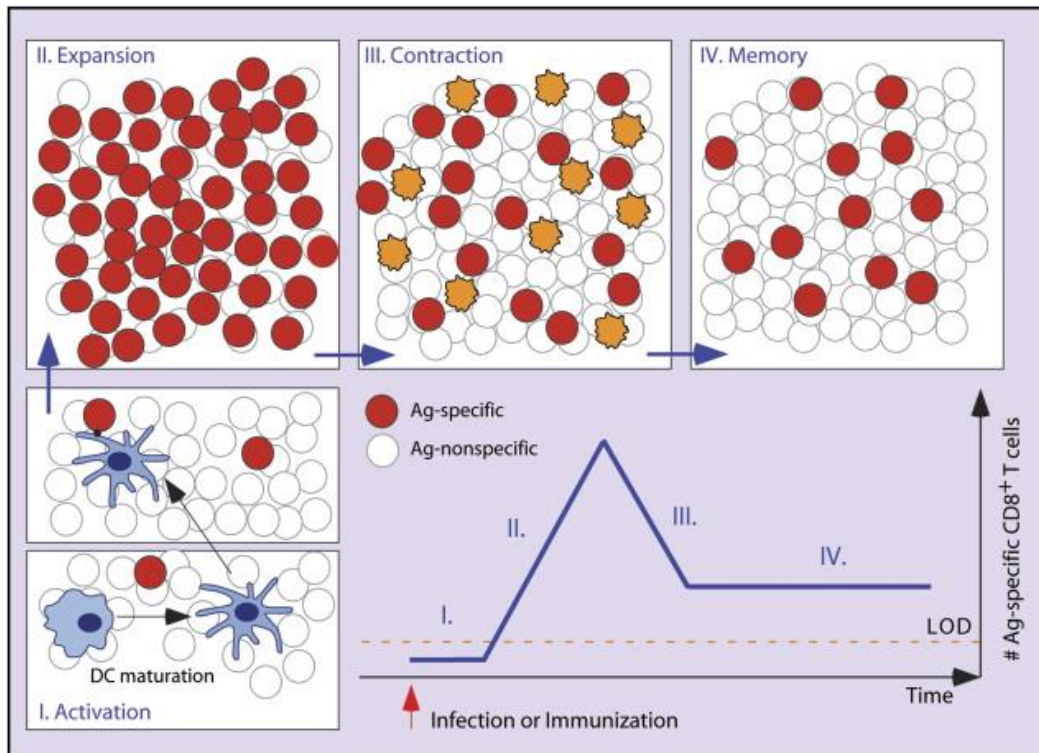


Figura 6. Progresión celular de células T CD8+ naive-de memoria después de la infección aguda o vacunación. Los péptidos antigénicos presentados por las células dendríticas maduras (DC) a células TCD8+ naive para la expansión y diferenciación a células T CD8+ efectoras. Entre el 5%-10% de células T CD8+ detectadas en el pico de expansión sobreviven a la fase de contracción inician el bloque de memoria (Haring et al., 2006).

4.4 Sistema inmune y Cáncer Cérvico uterino (CaCu)

Actualmente, es reconocido por la Organización Mundial de la Salud que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por VPH, demostrado por primera vez en la década de 1980 por Harold Zur Hausen, virólogo alemán, y que la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual propagada, aunque se estima que solo un 5 a 8% de mujeres que la padecen desarrollan CaCu (Bosch et al., 2002; Franco, 1995).

EL VPH ha evolucionado conjuntamente con los humanos durante mucho tiempo y por tanto, su ciclo replicativo es muy complejo, de tal forma que puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con un bajo perfil de expresión, lo que genera una muy pobre respuesta inmune innata (Tindle, 2002). Cuando logra establecerse, una respuesta adaptativa es más eficiente, y por eso, aunque la tasa de infección es muy alta, no todas las infecciones progresan hasta CaCu (Doorbar, 2006). Sin embargo, cuando la infección es persistente y el sistema inmune está deprimido, puede darse lugar la integración del genoma del VPH a la célula hospedera y eventualmente, al desarrollo de una neoplasia que puede derivarse hacia tumores avanzados y finalmente hasta metástasis (Zur Hausen, 2000).

Es por ello que el sistema inmune se encuentra íntimamente relacionado con el desarrollo tumoral a través del papel protector ejercido por ciertas poblaciones celulares y otras implicadas en la promoción del tumor (Salama et al., 2009), de manera que puede reconocer y eliminar de forma natural las células tumorales, ejerciendo cierta presión selectiva que los tumores deben evadir para poder crecer (Dong et al., 2002). Estas células transformadas expresan moléculas que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune, tal como si fuera un agente externo (virus, bacterias, hongos, etc.) el activador de dicha respuesta. La principal respuesta que se ha encontrado en varios tipos de cáncer es mediada principalmente por LTC, células NK y macrófagos.

La capacidad del Sistema Inmune para limitar el desarrollo del CaCu ha sido evaluada desde hace varios años, mediante el uso de modelos experimentales *in vitro*, o modelos animales determinando la respuesta específica contra antígenos de VPH. Las estrategias empleadas incluyen la caracterización de péptidos antigénicos de proteínas virales de VPH, uso de células dendríticas como adyuvantes en la generación de la respuesta inmune y la inmunización con péptidos sintéticos y partículas tipo virales (VLPs) (Rudolf et al., 2001; Salit et al., 2002; Stern, 2005).

Sin embargo las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T anti-tumorales. Estos mecanismos pueden cooperar en etapas avanzadas del cáncer para limitar la capacidad del sistema inmune para frenar el tumor y la eficacia de las estrategias de inmunoterapia para erradicar con éxito las células malignas (Rabinovich et al., 2007; Calixto-Gómez, 2005). Dichos mecanismos incluyen los defectos en la función inmunoestimuladora mediante citocinas y moléculas coestimuladoras de células dendríticas (Tuyaerts et al., 2007), la expresión defectuosa y/o disminuida del antígeno leucocitario humano (HLA) y de los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAPs) (Brady et al., 2000; Evans et al., 2001) y la asociación de ciertos alelos HLA clase I y clase II que conducen a una deficiente presentación de antígenos al linfocito T citotóxico (Wang and Wang, 2007; Guermonprez et al., 2002). Asimismo, se ha demostrado que células T reguladoras inmersas en el microambiente tumoral participan de manera activa en la desregulación de la respuesta inmune efectora, observándose que esta población de linfocitos suprimen repuestas de linfocitos T efectores (CD4+ y CD8+) *in vivo* (Curiel et al., 2004, Horwitz et al., 2008; Nizar et al., 2009).

Los antecedentes mencionados sugieren que la presencia de VPH en el desarrollo del CaCu se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1, por linfocitos T citotóxicos y por la inducción de linfocitos T reguladores antígeno-específicos, su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser et al., 2007; Molling et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Piersma et al., 2007), lo cual ha sugerido que durante el desarrollo de la enfermedad se genera tolerancia inmunológica hacia el tumor con la concomitante aparición de células inmunosupresoras.

Otro mecanismo inmunosupresor, recientemente propuesto, es la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular la cual está presente en concentraciones inmunosupresivas dentro del microambiente de tumores sólidos y células cancerosas y por lo tanto ser un factor importante en la evasión inmune por las células tumorales (Blay et al., 1997; Stagg et al., 2010; Otha et al., 2006). La generación de adenosina extracelular implica la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina, y está regulada por la etapa terminal enzimática catalizada por la 5'ecto-

nucleotidasa (CD73) (Deaglio et al., 2007; Kobie et al., 2006; Thompson et al., 2004, Sitkovsky et al., 2008; Pellegatti et al., 2008).

4.5 Via Adenosinérgica

Como su nombre lo indica, esta vía es activada mediante la adenosina (Ado), la cual es una molécula derivada del adenosin-trifosfato (ATP). La Ado es una molécula autocoide (Franco, 2008), 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 (Gongora-Alfaro et al., 2005).

La producción de adenosina extracelular es generada a partir de nucleótidos extracelulares (ATP, ADP) catalizados por ectonucleotidasas como NTPDase 1 (CD39) y ecto-5'-NT (CD73) expresados en linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ FoxP3, células endoteliales, monocitos, células dendríticas foliculares, células tumorales y células estromales mesenquimales entre otros (Kobie et al., 2006; Deaglio et al., 2007). Este proceso se produce en una reacción de tres pasos:

Como primer paso, varios tipos de células liberan nucleótidos intracelulares almacenados, particularmente en forma de ATP y ADP (Eltzschig, 2009). Es importante señalar que los niveles intracelulares de ATP son muy altos (5-8 mM) y durante condiciones perjudiciales el ATP intracelular es liberado de la apoptosis y necrosis celular (Chen et al., 2006; Starcevic et al., 2001).

Como segundo paso CD39, ENTPD1 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1) (EC. 3.6.1.5) hidroliza ATP y ADP a sus respectivos nucleótidos (Robson et al., 2005). Esta ectonucleotidasa fue descrita por primera vez como un marcador de activación de linfocitos B y se expresa en NK, monocitos, DC y subconjunto de células activadas.

Como tercer y último paso en la generación de adenosina extracelular la 5'-ectonucleotidasa o CD73 (EC 3.1.3.5) hidroliza nucleótidos de monofosfato extracelulares hacia nucleósidos intermedios bioactivos, metabolizando AMP hacia adenosina (Figura 7) (Colgan et al., 2006; Resta y Thompson, 1997).

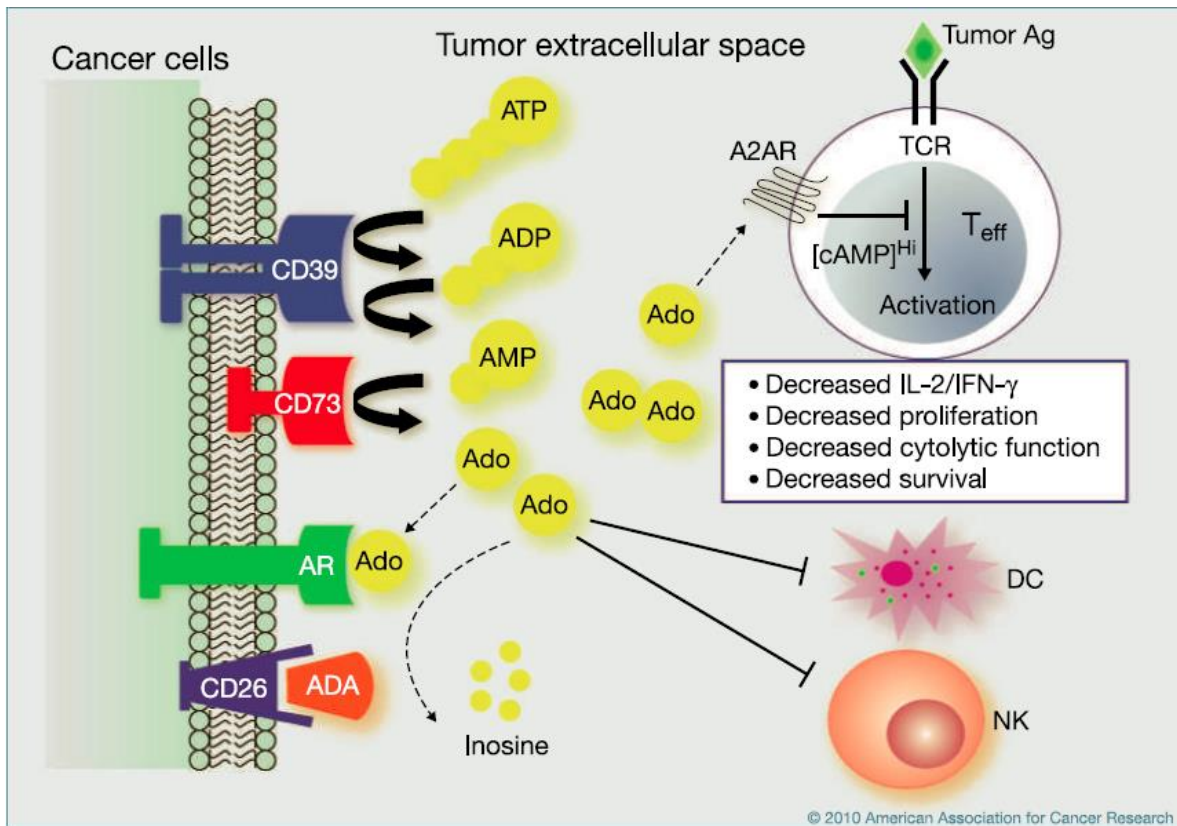


Figura 7. Esquema del metabolismo de la adenosina extracelular inducida por el tumor en la supresión inmune. Muestra una vía principal de generación de adenosina extracelular de adenosina en el microambiente tumoral, el aumento de la actividad de CD39-CD73 y la disminución de la ecto-adenosina desaminasa (ADA), que en las células humanas pueden estar enlazados a la superficie celular por CD26, contribuye a los elevados niveles de adenosina extracelular durante la progresión del tumor. Modificada de Zhang et al., 2010.

4.5.1 5'-ectonucleotidasa (CD73).

CD73 conocida como una 5'-ectonucleotidasa (EC 3.1.3.5) es una glicoproteína anclada a membrana de 70 Kilodaltones (kDa) vinculada a proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI), encontrada en varios tejidos (Colgan et al., 2006). Fue originalmente definida como un antígeno de diferenciación de los linfocitos, con función de una molécula de co-señalización en los linfocitos T y una molécula de adhesión para la unión del linfocito al endotelio. CD73 se encuentra en la superficie celular de la mayoría de los tejidos expresándose abundantemente en el endotelio vascular y con bajo nivel en ciertos tipos celulares, incluidos los subconjuntos de linfocitos, células endoteliales y las células epiteliales (Colgan et al., 2006; Dachuan et al., 2010).

Se ha reportado que CD73 está vinculada con el control de una variedad de respuestas fisiológicas incluyendo transporte de fluidos e iones epiteliales, lesión de los tejidos el preconditionamiento isquémico, fuga vascular, la función plaquetaria, función de barrera vascular, restricción de la migración de linfocitos a los ganglios linfáticos, estimulación de la hidratación de la mucosa (Colgan et al., 2006; Thompson et al., 2004; Lennon et al., 1998; Takedachi et al., 2008; Madara et al., 1993). También se ha demostrado que participa en interacciones célula-célula y célula-matriz, está

implicada en la resistencia a las drogas, la promoción de tumores y actúa como factor proliferativo, ya que participa en el control de crecimiento celular, diferenciación, al igual promueve la quimiotaxis y la angiogénesis tumoral (Airas et al., 1995; Zhang, 2012), además se expresa ampliamente en muchas líneas celulares tumorales y está regulada en diversos carcinomas, incluidos los de colon, pulmón, páncreas y ovario (Spychala, 2000) y el aumento de los niveles de expresión se asocia con neovascularización tumoral, invasión, migración, adhesión y metástasis (Wang et al., 2008).

Se ha demostrado que células epiteliales tumorales de ratones expresan CD39 y CD73 y que, por ejemplo algunas células tumorales de melanoma pueden producir adenosina. Es importante resaltar que CD73 está significativamente aumentada en los tejidos cancerosos acompañada de una alta actividad enzimática, lo que puede mediar en la producción de adenosina extracelular (Zhang, 2010; Spychala, 2000). Por lo tanto las células tumorales contribuyen a los elevados niveles de la adenosina en el microambiente tumoral a través de la actividad enzimática de CD73 y sus altos niveles de expresión en el tumor probablemente sean inducidos en el microambiente tumoral local.

4.5.2 Adenosina y su Respuesta Inmune en Tumores

La adenosina, un nucleósido cíclico formado de adenina y un azúcar ribosa, es un molécula endógena biológicamente activa de alta importancia (Eltzschig et al., 2003), se encuentra en el espacio intracelular en una concentración considerada entre 10-50 nM (Cunha, 2001), o extracelular en un rango de concentración de 25-250 nM (Dunwiddie y Masino, 2001). Muchos estudios han indicado en general las propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias de la adenosina que resaltan su papel en la regulación del sistema inmunológico, la estimulación de la angiogénesis y la inhibición de la inflamación en el sitio de la lesión (Spychala, 2000 y 2004).

La adenosina está implicada en una gran variedad de funciones biológicas básicas, entre las cuales está la biosíntesis de nucleótidos o de metabolismo energético celular. Entre sus funciones específicas inmunosupresoras de la adenosina incluyen inhibición potencial de una serie de respuestas de células T como: regulación de CD25, secreción de IL-2 y citocinas proinflamatorias como el Interferón- γ y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), inducción de moléculas efectoras citolíticas como perforinas y el ligando de Fas, adhesión de los linfocitos asesinos a las células tumorales, exocitosis de gránulos por los linfocitos T citotóxicos, además puede suprimir células NK e inhibe la proliferación de células T (Figura 8) (Hoskin e t al., 2008).

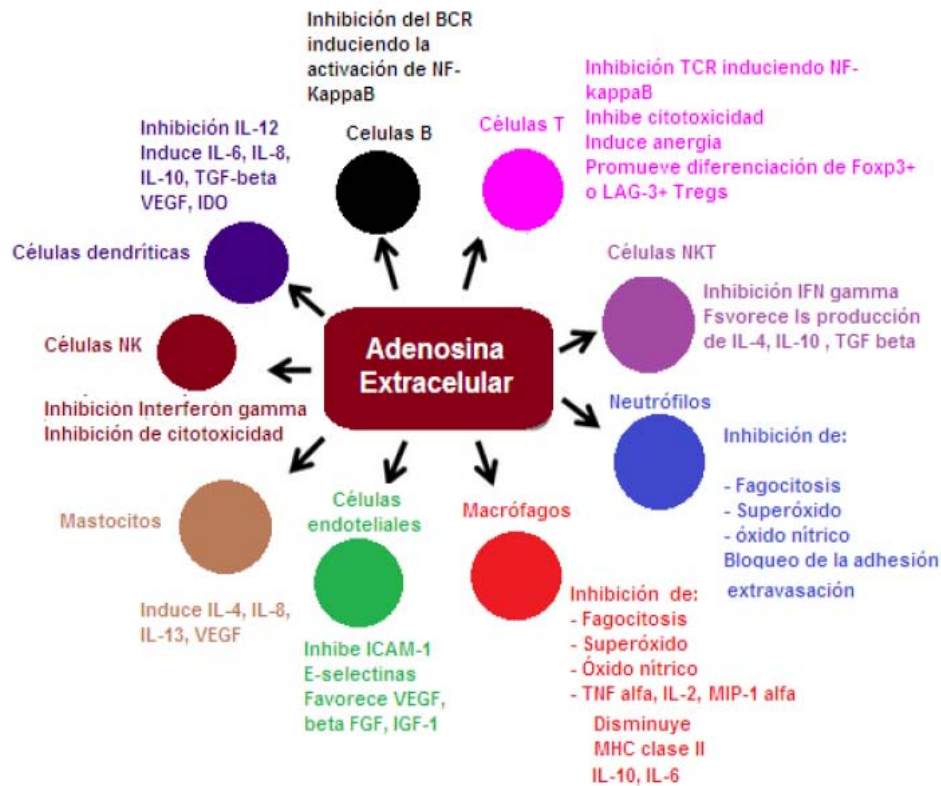


Figura 8. Efectos inmunosupresores de la adenosina extracelular. La adenosina es producida por efecto de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 a través de la fosfohidrólisis del ATP y actúa como un potente mecanismo inmunosupresor en las funciones de las células de la inmunidad innata y adaptativa (Stagg et al., 2010).

En el exterior de la de la célula, sirve como una molécula de señalización. Sin embargo durante condiciones de estrés celular (inflamación, lesión, isquemia e hipoxia aguda) se acumula en el espacio extracelular (Haskó et al., 2008; Eltzhig, 2010).

La generación de adenosina extracelular ha sido ampliamente implicada como una respuesta adaptativa a la hipoxia y ésta puede ser producida como consecuencia de: a) la difusión o el transporte de adenosina intracelular o b) debido a la hidrólisis enzimática del ATP extracelular (Sitkovsky et al., 2008). La adenosina extracelular induce sus potentes efectos inmunosupresores vía 4 receptores (ARs) específicos y bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3 (Fredholm et al., 2001; Linden et al., 2001) (Figura 9). Los ARs tienen siete dominios transmembrana que abarcan y se acoplan a proteínas de unión GTP intracelulares (Proteínas G), utilizando AMP cíclico intracelular (AMPC) como segundo mensajero (Haskó et al., 2008), estos receptores poseen diversos efectos que dan ventaja al inmunoescape tumoral, entre estos están incluidos citoprotección y promoción de células tumorales, incremento de angiogénesis y supresión de efectos (antitumorales) de células T (Aliagas, 2014).

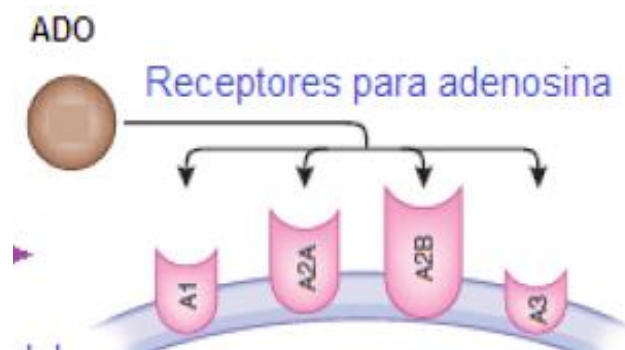


Figura 9. Los 4 receptores para adenosina anclados a la membrana celular.

El receptor A1 de alta afinidad y el receptor A3 de baja afinidad pesan 35 kDa y están acoplados a proteínas Gi. Estos receptores inhiben la actividad de la adenilciclase y la proteína quinasa, disminuyendo así los niveles de AMPc intracelular y tienen una importante función en la angiogénesis (Clark et al., 2007; Reichelt et al., 2005; Hochhauser et al., 2007).

Los receptores A2 se subdividen en A2A de alta afinidad y A2B de baja afinidad los cuales están acoplados a proteínas Gs incrementando AMPc (Linden, 2001; Thiel et al., 2003; Sitkovsky, 2003, 2008) y dispuestos predominantemente en la membrana de linfocitos T citotóxicos CD8+ siendo los responsables para ejercer un efecto regulador sobre estas células efectoras (Lappas et al., 2005; Huang et al., 1997). El receptor A2A de 45kDa, tiene una estructura que consta de siete hélices trans membrana (Lebon et al., 2011). Se expresa en monocitos, macrófagos, mastocitos, granulocitos, linfocitos, CDs, NKC, NKT, células epiteliales y endoteliales (Frenholm et al., 2007). Se ha identificado el receptor A2A como un importante antiinflamatorio asociado con las células T (Minguet et al., 2005; Otha et al., 2006), y debido a su alta afinidad para la adenosina, tiene un papel inmunosupresor no redundante (El-Tayeb et al., 2009). Se ha observado que la activación de este receptor en las células endoteliales favorece la angiogénesis tumoral, esto es consistente con el hecho de que las células endoteliales asociadas con tumores expresan niveles más altos de receptores de adenosina A2A (Ahmad et al., 2009) y promueven la supervivencia de las células tumorales (Etique et al., 2009), además de poseer efectos angiogénicos y proliferativos es un potente supresor de la inmunovigilancia en tumores endógenos con un microambiente rico en adenosina (Ohta et al., 2006). La señalización vía receptor A2A en las células T resulta en la inhibición de la activación y de la expresión del receptor del linfocito T y muchas otras funciones efectoras. Varias de estas señalizaciones incluyen la proliferación mediante la inhibición de IL-2, la secreción y expansión de citocinas importantes con función antitumoral como IFN- γ , TNF- α e IL-4 (Sevigny et al., 2007; Otha, 2006; Mirabet et al., 1999). En cambio el receptor A2B difiere de los otros receptores por su baja afinidad a la adenosina (Yang et al., 2006). Los receptores A2B tienen un papel importante en la angiogénesis (Feoktistov et al., 2004). Este efecto pro-angiogénico es debido a que se expresa tanto en células endoteliales como en hematopoyéticas (Ryzhov et al., 2008). La expresión de receptores de adenosina A2B sobre los mastocitos también puede mejorar significativamente la angiogénesis tumoral (Ryzhov et al., 2004).

También se ha demostrado en un modelo de ratón que la adenosina, a través del receptor A3, puede interferir con el reconocimiento de las células tumorales y la actividad citolítica de los

linfocitos citotóxicos que bajo condiciones de activación están regulados por estos receptores y pueden contribuir a los efectos provocados por la adenosina (Gessi et al., 2004).

La resistencia de muchos tumores sólidos para organizar la respuesta inmune ha sido en gran parte atribuida a mecanismos inmunosupresores que han sido bien documentados tanto en ratones portadores de tumores como en pacientes con cáncer (Zou, 2005; Rabinovich, 2007). CD73 en conjunto con CD39 poseen una alta efectividad para inhibir a las células antitumorales de la inmunidad celular y promover el crecimiento del tumor a través de su actividad enzimática, mediante adenosina extracelular (Zhang, 2010; Jin, 2010). La adenosina se encuentra dentro de los tumores sólidos en concentraciones elevadas (Otha, 2006), de tal forma que puede favorecer el crecimiento del tumor al estimular la angiogénesis tumoral y la inhibición de respuestas inmunes antitumorales (Spychala, 2000; Stagg et al., 2010).

Dadas las propiedades inmunosupresoras fuertes de la adenosina y su concentración alta en los tumores sólidos, es razonable inferir que la adenosina puede constituir una parte importante de la llamada “barrera inmunológica” que conduce a un fracaso en la respuesta inmune antitumoral.

Contribuyendo a esto se ha demostrado que las Células Estromales Mesenquimales (CEMs) juegan un papel importante en el establecimiento del tumor gracias a sus propiedades inmunosupresoras que ejercen sobre varios tipos celulares (Rasmusson, 2006).

4.6 Células Estromales Mesenquimales (CEMs)

Las Células Estromales Mesenquimales (CEMs) representa una población heterogénea de células multipotentes con propiedades benéficas para los procesos regenerativos y/o de inmunomodulación (Kucerova et al., 2010).

Las CEMs fueron caracterizadas inicialmente entre las décadas de los años 60's y 70's con los trabajos realizados por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes, de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al., 1974). La Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT en el año 2006, postuló tres criterios fundamentales para definir a las CEMs como: a) la adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo; b) la expresión de los antígenos de superficie CD105, CD73 Y CD90 y la ausencia de antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B y c) su capacidad para diferenciarse en osteoblasto, adipocitos y condroblastos *in vitro* (Páez et al., 2007); sin embargo ya se ha demostrado que también puede diferenciarse hacia mioblastos, células endoteliales pericitos, fibroblastos, células epiteliales o células neurales (Montesinos, 2010; Houthijzen et al., 2012). Las MSC expresan Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (CPH-I) pero no expresan moléculas CPH-II, B7-1, B7-2, CD40 o CD40L. Además tienen la capacidad de secretar citocinas y moléculas reguladoras que juegan un papel importante (Aggarwal and Pitterger, 2005). Las CEMs poseen varios tipos de propiedades entre las cuales están: 1) Propiedades Tróficas que constituyen la secreción de factores de crecimiento y otras quimiocinas e inducen la proliferación de células y angiogénesis. Entre estos factores se pueden encontrar factor de crecimiento tumoral alfa (TGF- α), TGF- β , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), factor de crecimiento de insulina -1, angiopoyetina-1 y

factor de crecimiento endotelial (VEGF). 2) Propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias. En respuesta a moléculas inflamatorias están la secreción de interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-12 factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interferón gama (IFN- γ). En las citocinas inmunomoduladoras se incluyen la prostaglandina 2, TGF- β 1, HGF, SDF-1, indoleamina 2, dioxigenasa-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1. Y por último 3) Propiedades anti-apoptóticas, donde las CEMs tienen la capacidad de salvar a células apoptóticas causado por exposición traumática a hipoxia, acidez química, daño mecánico y radiación (Murphy et al., 2013).

La fuente principal de las CEMs es la médula ósea, sin embargo diversos estudios señalan la posibilidad de obtener este tipo de células de fuentes diferentes tales como tejido adiposo, hígado fetal, pulmón, pulpa dental, músculo esquelético, cerebro y páncreas. También ha sido posible detectar CEMs en la sangre de cordón umbilical (SCU), placenta (PL) y vena de cordón umbilical (Montesinos, 2010).

Debido a las características que presentan las CEMs como son: su plasticidad, la secreción de citocinas y su baja inmunogenicidad, las hacen candidatas para terapia celular e ingeniería celular (Cárcamo et al., 2008).

Otra propiedad de estas células es su potencial inmunoregulator donde se ha encontrado evidencia que indica su capacidad para incrementar la neovascularización y crecimiento tumoral (Suzuki et al., 2011). Esto se debe a que existe cierto tropismo de estas células hacia los tumores, mediado por la presencia de ciertos factores solubles secretados por las células tumorales similares a los que existe en la respuesta inflamatoria, ya que las CEMs tienen la capacidad de migrar a tejidos dañados donde existe una respuesta inflamatoria para así contribuir con la regeneración del tejido (Karp and Leng, 2009). Estudios recientes *in vivo* han demostrado que las CEMs tienen la capacidad de modificar el microambiente celular (a través de efectos parácrinos) de un escenario pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio (Montesinos, 2010). Evidencias en aumento muestran que estas CEMs juegan un rol en la patogénesis del tumor y progresión (Djouad et al., 2003; Zhu et al., 2006; Kucerova, 2010).

Se ha observado varios mecanismos para explicar estos posibles efectos como son la secreción de factores anti-inflamatorios, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento entre otros (Figura 10). (Rasmusson, 2006, Sun et al., 2014) modulación del desarrollo celular (Aggarwal and Pitterger, 2005; Jiang et al., 2005), la supresión de linfocitos T efectoros (Potian et al., 2003; Rasmusson, 2003; Houthijzen et al., 2012), inhibición en la diferenciación de células dendríticas y el reclutamiento de LTreg (Di Ianni et al., 2008; Houthijzen et al., 2012), quienes estos últimos poseen una membrana CD39 y CD73 (Saldanha-Araujo et al., 2011), lo que sugiere que su actividad reguladora está involucrada con la vía adenosinérgica.

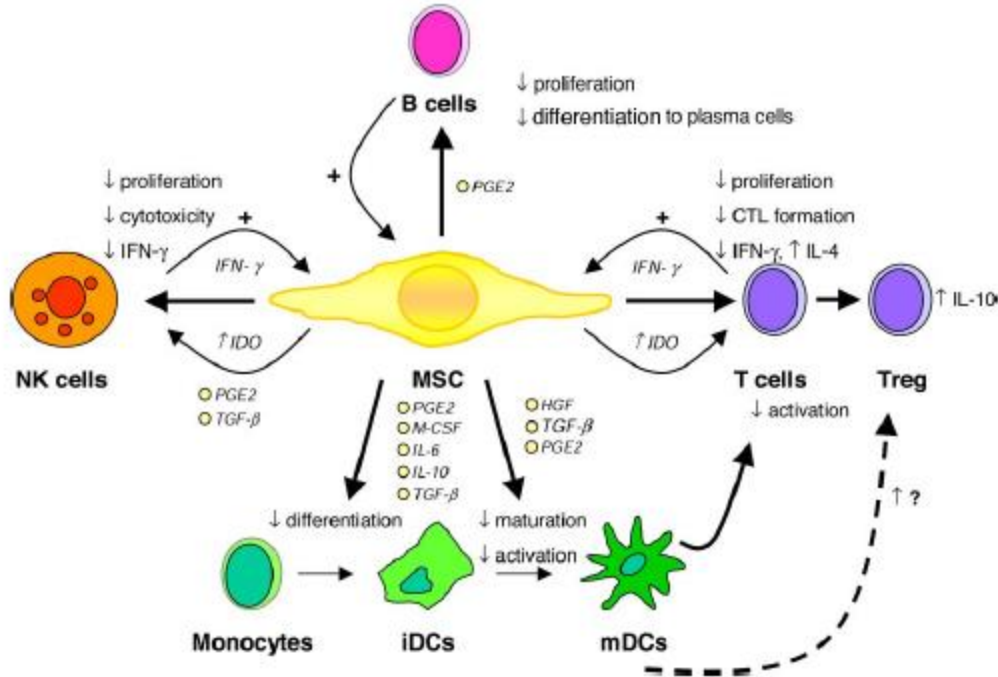


Figura 10. Efectos inmunomodulatorios de MSCs en la respuesta inmune al interactuar con células inmunes, incluyendo células T, células B, células dendríticas (DCs), células T reguladoras (Tregs) y natural Killer (NK) (Nauta and Fibbe, 2007).

Evidencias han mostrado que las CEMs suprimen la proliferación de células T *in vitro*, se ha visto que la proliferación de linfocitos T citotóxicos puede ser suprimida de manera CPH independiente, traspasando la barrera entre especies (Djouad et al., 2003). Las CEMs pueden inhibir la activación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos aloantígeno específico estando presentes en una proporción mayor que las células efectoras, sin embargo en una proporción menor pueden disminuir o incrementar la actividad citotóxica de linfocitos T aloantígenos. (Locatelli et al., 2007). Otra propiedad de las CEMs es que durante la maduración de células dendríticas, éstas pueden inhibir la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos como CD1a, CD40, CD80, CD86 y HLA-DR, fenómeno mediado por la producción de citocinas, en particular HGF y TGF- β 1 los cuales pueden contribuir a la interacción de células estromales y células malignas en el microambiente tumoral (Arévalo et al., 2007; Turley et al., 2008).

Por otro lado, estudios demuestran que las CEMs favorecen el crecimiento tumoral *in vivo* (Djouad et al., 2003; Zhu et al., 2006). También se ha encontrado que las CEMs pueden ser uno de los tipos celulares implicados en la inducción de poblaciones de linfocitos T reguladores (Pittenger et al., 1999; Dominici et al., 2006; Prevosto et al., 2007; Di Ianni et al., 2008), la metástasis y supresión de la respuesta inmune en tumores malignos (Yen et al., 2008).

Estudios muestran que durante el desarrollo de tumores se llega a perder los contactos existentes entre células, lo cual puede contribuir a aumentar las capacidades migratorias y de metástasis de

algunas células. En algunos reportes se ha demostrado que las CEMs migran hacia sitios del tumor y se incorporan dentro del microambiente tumoral influenciando el crecimiento y la progresión del tumor (Nakamura et al., 2004; Hung et al., 2005; Nakamizo et al., 2005), por lo tanto se ha propuesto que las propiedades inmunosupresoras de las CEMs permiten la proliferación de las células del tumor y la estimulación de la formación de vasos sanguíneos (Zhu et al., 2006).

Sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales las CEMs inmunosuprimen, aún no son tan claros debido a que pueden exhibir muy diferentes funciones en distintos microambientes a causa de diversas vías de señalización que puedan activar estas células (Sun et al., 2014). La supresión de la proliferación de las células T estimuladas por linfocitos alogénicos, células dendríticas y mitógenos ha sido bien documentada (Barry et al., 2004) y han demostrado que están involucrados tanto la vía contacto célula-célula como la actividad de factores solubles (Beyth et al., 2005). Por otra parte han sido reportados datos que sugieren que la actividad inmunosupresora de las CEMs no está asociada con la secreción de HGF o TGF- β 1 (Tse et al., 2003) y que parte de la supresión inmune se debe a la generación de células Tregs CD8+ (Djouad et al., 2003). En estudios más recientes, ha sido reportado que las CEMs inhiben la proliferación de células T a través del impedimento de la división celular (Glennie et al., 2005). En varios estudios más se muestra que las CEMs alteran el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, como un aumento en la secreción de IL-10 e IL-4 y un decremento en la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e Interferón- γ (IFN- γ) (Aggarwal and Pittenger, 2005; Don, 2010).

Nuestro equipo de investigación ha obtenido y caracterizado CEMs de tejidos normales de cuello uterino y de tumores avanzados de CaCu. En estudios previos hemos encontrado que las CEMs obtenidas de tumores malignos de cuello uterino, al cultivarlas en contacto con linfocitos heterólogos de donadores normales, se favorece la inducción de poblaciones de linfocitos T regs CD4+ CD25+ FoxP3+ CTLA-4+ (Montesinos et al., 2009). Así mismo en estudios in vitro hemos encontrado que CEM-CaCu inhiben fuertemente la proliferación de linfocitos T mediante la producción de adenosina y dicha actividad es suprimida al inhibir la expresión de CD73 mediante RNAi o adicionando cafeína, un agente bloqueador de los receptores de adenosina (Navarro, 2013). Por otro lado en estudios de protección inmune ante el reto tumoral en un modelo de ratón se ha encontrado que la administración de CEM-CaCu es capaz de suprimir fuertemente la protección inmune antitumoral dada por la inmunización con el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16 y favorecer el crecimiento tumoral (Contreras, 2011) así como un aumento en los niveles de IL-10 (Montoro, 2014).

Aunque diversos estudios han proveído datos que muestran efectos promotores y supresores de las CEMs en la respuesta inmunológica con respecto a la progresión tumoral, algunos datos aún permanecen a prueba debido a su gran complejidad de los procesos de crecimiento del tumor. Por tanto, la presencia de células cancerosas, así como de células inmunosupresoras que se infiltran en el microambiente del tumor, tal como las CEMs y linfocitos T reguladores, son capaces de inhibir a las células efectoras antitumorales mediante la liberación de adenosina a través de la actividad de CD73 (Ghiringhelli et al., 2012).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El CaCu es un problema importante de salud pública en nuestro país, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres mexicanas con cáncer, siendo más frecuente en mujeres entre los 20 y 50 años de edad (Hunter et al., 2008). La mayoría de las pacientes ingresan con enfermedad avanzada, con un mal pronóstico y representa una enorme pérdida de recursos humanos y económicos. Esta enfermedad se encuentra fuertemente asociada (cerca al 100%) con la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, en donde VPH-16 es el tipo de papiloma carcinogénico más comúnmente encontrado en los tumores de cuello uterino a nivel mundial (Walboomers et al., 1999). La presencia de VPH en este tipo de cáncer genital, también se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos; así como a la presencia de células inmunosupresoras que se encuentran infiltradas en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado, generando tolerancia inmunológica hacia el tumor (Visser et al., 2007; Molling et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Piersma et al., 2007).

Se ha reportado que las células estromales mesenquimales (CEMs) contribuyen a la formación del estroma tumoral y proveen un nicho permisivo para el desarrollo de las células tumorales, debido a que estas células tienen la capacidad de migrar al sitio del tumor para favorecer el implante, crecimiento y metástasis de tumores malignos, así como inhibir a través de varios mecanismos una variedad de células del sistema inmune incluyendo a linfocitos T citotóxicos (Yazhou et al., 2004; Tsujino et al., 2007; Yen BL and Yen ML, 2008).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar CEMs de tejidos normales de cuello uterino y de tumores avanzados de CaCu (Montesinos et al., 2013). En estudios *in vitro* hemos encontrado que CEMs-CaCu inhiben fuertemente la proliferación de linfocitos T mediante la producción de adenosina y dicha actividad es suprimida al inhibir la expresión de CD73 mediante RNAi o adicionando cafeína, un agente bloqueador de los receptores de adenosina (Navarro, 2013). Además en estudios de protección inmune ante el reto tumoral en un modelo de ratón, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la administración de CEM-CaCu es capaz de suprimir fuertemente la protección inmune antitumoral dada por la inmunización con el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16 y favorecer el crecimiento tumoral (Contreras, 2011; Montoro, 2014). Lo anterior hace sugerir que las CEM-CaCu a través de la vía CD73 puede jugar un papel importante en la supresión de la respuesta inmune antitumoral.

En este estudio se planteó analizar el efecto supresor de células estromales mesenquimales obtenidas de tumores de cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu) sobre la actividad antitumoral de linfocitos T citotóxicos, a través de la vía adenosinérgica (CD73-adenosina) en un modelo tumoral *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6. Los resultados de este estudio serán de gran importancia para poder establecer estrategias terapéuticas que permitan contrarrestar la supresión inmunológica ejercida por las CEMs y mejorar la respuesta inmune antitumoral.

6. HIPOTESIS

Es conocido que las Células Estromales Mesenquimales (CEMs), están implicadas en la supresión de la respuesta inmune y que son capaces de favorecer el implante, crecimiento y metástasis de tumores malignos, al igual que inhiben fuertemente la proliferación y función efectora de linfocitos T mediante la producción de adenosina. Asimismo, hemos encontrado que las CEM-CaCu inhiben la respuesta protectora antitumoral dada por la inmunización con el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, permitiendo el desarrollo del tumor cuando los ratones son expuestos al reto tumoral con células tumorales (TC-1) positivas a la expresión de la proteína E7 de VPH-16. Por lo tanto, se espera que en ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 junto con CEM-CaCu, la población de linfocitos T citotóxicos específicos (LTC) al péptido RAHYNIVTF se vea disminuida y se encuentre un incremento de adenosina.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Analizar el efecto de células estromales mesenquimales derivadas de cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu) en la supresión de linfocitos T citotóxicos a través de la vía adenosinérgica (CD73-adenosina) en un modelo tumoral de ratones de la cepa C57BL/6.

7.2 Objetivos Específicos

- 1) Analizar el efecto de CEMs-CaCu en el crecimiento tumoral en ratones con y sin previa inmunización antígeno específica.
- 2) Analizar las poblaciones de linfocitos T citotóxicos específicos (LTC) al péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16 en los animales inmunizados e inoculados con CEM-CaCu y células tumorales TC-1.
- 3) Analizar la expresión de CD73 en tejidos de tumores de ratón inmunizados.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Células

Se utilizaron células tumorales TC-1 derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6 las cuales expresan de manera permanente los genes E6 y E7 de VPH-16 junto con el gen Ras. Estas células fueron cultivadas con medio de cultivo RPMI de GibcoBRL (Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies) al 10%. También se emplearon estirpes de CEMs (humanas), las cuales fueron previamente obtenidas de Cáncer Cérvico Uterino (CEMs-CaCu). Estas estirpes celulares fueron establecidas en colaboración con el Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales a cargo del Dr. Juan José Montesinos Montesinos, en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN SXXI (Montesinos et al, 2013). Todas las estirpes de CEMs utilizadas en este proyecto fueron caracterizadas bajo los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para definir a las CEMs (Dominici et al., 2006) y que consisten en: ser adherentes en condiciones estándar de cultivo; expresan los marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecer de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR en la membrana celular; y finalmente han sido caracterizadas por su capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Las CEMs fueron cultivadas con medio de cultivo consistente en DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies) al 15%. Antes de ser inoculadas, todas las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5% de CO₂ y humedad saturante.

8.2. Ratones

Para la inducción de tumores se emplearon 6 grupos de 6 ratones hembra cada uno de la cepa C57BL/6 (Haplotipo H2-D^b) de 6-8 semanas de edad, se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con alimento y agua *ad libitum*, conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto 2001.

8.3. Inmunización e inoculación de células para la inducción de tumores.

Para inducir protección inmunológica en los ratones C57BL/6, se tomaron tres grupos de seis ratones cada uno y fueron inmunizados con tres dosis de péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 VPH 16) de 100 µg cada una, vía cavidad peritoneal. El péptido aplicado fue disuelto en PBS (Solución Salina de Fosfatos) y emulsionado con Adyuvante Completo de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1 para la primera dosis, en las dosis subsecuente se utilizaron 100 µg del péptido emulsionado con Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1, el tiempo transcurrido entre cada inmunización fue de 10-12 días.

Los tres grupos de ratones sin protección inmunológica y los tres grupos que se recibieron previamente protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, fueron tratados con las células tumorales y/o CEMs de acuerdo con la tabla numero 2:

TRATAMIENTOS	NO INMUNIZADOS	INMUNIZADOS CON PÉPTIDO RAHYNIVTF
	TC-1:CEMs	TC-1:CEMs
	0:0	0:0
(-)	100,000:0	100,000:0
CEMs-CaCu	100,000:100,000	100,000:100,000

Tabla 2. Sistema de inoculación de células tumorales y CEMs.

Los ratones recibieron un refuerzo de células tumorales TC-1 15 días después iniciado el tratamiento.

8.4. Medición de Tumores

El tamaño de los tumores fue evaluado cada tercer día, posterior a la aplicación del refuerzo de células tumorales. El volumen del tumor fue calculado en cada momento tras medir el largo y ancho del tumor con ayuda de un vernier y aplicando la siguiente formula: $V = (R1+R2^2)/2$, donde R1 y R2 son los valores obtenidos a partir de la medición perpendicular del tumor (Paz de la Rosa et al., 2009).

8.5. Determinación de LTC específicos al péptido RAHYNIVTF

Con el fin de evaluar la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos en los ratones inmunizados, así como la influencia de las CEMs sobre su actividad funcional, se analizó su presencia en el bazo en el momento en que se inició el crecimiento tumoral en los ratones. Por tal motivo, ratones que fueron inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF y posteriormente tratados con células tumorales TC-1 y CEMs, fueron sacrificados en los días 10, 20 y 30 para obtener los bazos correspondientes y analizar las poblaciones de linfocitos T específicos al péptido RAHYNIVTF. Los bazos fueron colocados en una caja Petri de 50mm X 15mm (Corning, USA) con 3 ml de PBS sobre una organza estéril para obtener los linfocitos mediante presión con un émbolo. Las células obtenidas de los macerados fueron tratadas con 5 ml de buffer de lisis para eritrocitos y posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS para obtener el botón celular. Se realizó conteo celular con azul de tripano para observar su viabilidad celular. Enseguida se utilizó un kit de enriquecimiento de células T CD8+ de ratón (EasySep Enrichment Cocktail, Stem cell Technologies, USA). Se colocaron 25 millones de células en un volumen de 1mL con PBS+SFB-2% en un tubo estéril de poliestireno de 5 ml y se agregó 12.5 µl de Enrichment cocktail y se incubó a 4-8°C por 15 min. Después se le añadió 25 µl de Biotin Selection Cocktail y se volvió a incubar a 4-8°C por 15 min. Posteriormente se agregó 12.5 µl de Magnetic Nanoparticles y se incubó por 15 min a 4-8°C. Se colocó el tubo de la suspensión celular en un magneto por 5 min y se recolectaron las células no adheridas a la pared del tubo, se centrifugaron, y luego se contaron para llevar a cabo los ensayos correspondientes.

Posteriormente, en una placa de 96 pozos de fondo U (Corning, NY, USA) se colocaron 1.5 millones de células de bazo en un volumen de 100 µl con PBS+SFB-2% de cada muestra por pozo. Después

de un lavado con PBS, las células fueron resuspendidas en 50 μ l de PBS+SFB-2% y posteriormente se agregó 1 μ g (10 μ L) de moléculas pentaméricas marcadas con ficoeritrina (PE) (Proimmune, UK), constituido por 5 moléculas H-2Db asociadas al péptido RAHYNIVTF. Después de resuspender, se dejó a temperatura ambiente 10 min en oscuridad. A continuación se realizó un lavado con PBS+SFB-2% y se incubaron con 5 μ l de anticuerpo contra CD8+ Aloficocianina, (APC) (R&D Systems, USA) durante 20 minutos a 4°C y después de dos lavados se evaluó su expresión mediante citometría de flujo (FACS-ARIA BD, USA). Como controles, se utilizaron células de bazo de ratones sin inmunización previa.

8.6 Inmunohistoquímica

Se analizó la expresión de la molécula CD73 en los tejidos tumorales de los ratones tratados. Para su procesamiento, los tejidos fueron sometidos a cambios de diferentes porcentajes de alcohol (50-100%) para ser deshidratados y posteriormente en xilol para poder ser incluidos en parafina. Posteriormente, con ayuda de un micrótopo (Leica, USA) se realizaron cortes histológicos de 3 μ m de grosor y se colocaron en laminillas.

La detección de CD73 se realizó con ultra View Universal DAB Detection Kit del Sistema Ventana™ el cual consistió en:

1. Recuperación antigénica por 8 minutos en amortiguador básico basado en TRIS (CCI).
2. Inhibición de la peroxidasa endógena con H₂O₂.
3. Incubación con el anticuerpo primario (CD73 clone polyclonal antibody, Novus Biologicals), por 30 minutos a 37° C.
4. Anticuerpo secundario basado en el sistema multímero marcado con peroxidasa de rábano.
5. Revelado con diaminobenzidina.
6. Contraste con hematoxilina.

Posteriormente al tratamiento realizado por el equipo, se lavaron las laminillas, se deshidrataron en alcoholes ascendentes y se aclararon con Xilol, para finalmente ser montadas en resina. Se dejaron secar perfectamente para analizar la expresión de CD73 en membrana a través de un microscopio óptico tomándose fotografías de las tinciones realizadas. Se empleó el parámetro de Intensidad media de expresión (IME) el cual se evaluó mediante el programa Image J^R (Image processing and analysis Microsoft Java 1.1.4).

8.7 Cuantificación de Adenosina mediante UPLC

Después del refuerzo de células tumorales, los ratones fueron sangrados al día 20, mediante punción de la vena auricular usando tubos eppendorf para coleccionar la sangre. Después de la formación del coágulo las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, para coleccionar los sueros correspondientes y fraccionarlos en alícuotas de 50 μ L cada uno. Los sueros fueron almacenados en ultra congelación a -70°C para su uso posterior en el análisis de cuantificación de adenosina (Ado). Para determinar la cantidad de Ado que se encuentra en los sueros de ratones se utilizó un equipo de UPLC de alta resolución (Waters, USA) y el análisis se realizó empleando el software Empower 3 (Waters, USA). Previo a las lecturas de las muestras, se

prepararon estándares de Ado a una concentración de 0.5-50 ng/ml disueltas en Fase Móvil (0.5% acetonitrilo: 5% metanol: 94.5% acetato de sodio 0.25M pH 6.3). Por otro lado, fueron adicionados 10 μ l de suero de ratón a tubos que contenían 1 ml de acetonitrilo, se agitaron en vortex durante 1 minuto y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 minutos para extraer las proteínas y estabilizar la Ado. Posteriormente el líquido fue evaporado mediante la aplicación de un flujo de aire conteniendo N₂. El botón se resuspendió en 90 μ l de fase móvil y posteriormente fue introducida al equipo para su determinación. Las condiciones de corrida de cada muestra fueron las siguientes: Velocidad de flujo 1.0 ml/min; Detector UV 254-260 nm; Tiempo de retención 7.5 minutos; T° ambiente; Columna LiChrosfer RP 18e 5 μ m, 100 RP-18 (tamaño mm x 4 mm, 5 mm de tamaño de partícula). La cantidad de adenosina en cada muestra se calculó con base en la curva patrón obtenida de las lecturas realizadas.

8.8 EXTRACCIÓN TOTAL DE RNA, SINTESIS cDNA y PCR-RT

Se analizó la expresión del gen CD73 en los tumores para cada tratamiento. Para ello se obtuvo de 50-100 mg de muestra de tejido tumoral macerado y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, Made in USA) y se refrigeraron a -60 o -70 °C. Después de 24 horas se incubaron 5 min a temperatura ambiente (T.A.), se adicionó 0.2 mL de cloroformo, se incubó por 3 min a T.C. y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente se removió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y se le añadió 0.5 mL de isopropanol al 100% previamente frío, se incubó por 10 min a T.A y se centrifugó nuevamente. Finalmente se realizaron 2 lavados con 1 mL de etanol al 75%, se agitaron y centrifugaron a 7 500 rpm por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet, por último se resuspendió en 20-50 μ l de agua libre de RNAasas.

Del RNA aislado, 2 μ g fueron utilizados para transcribirlos inversamente a cDNA, usando el High Capacity RNA-to-cDNA Kit Conversion (Applied Biosystems) en un volumen de 20 μ l, se centrifugaron los tubos y se metieron a un termociclador (1 hr a 37°C; 5 min a 95°C y 5 min a 4°C) para llevar a cabo la transcripción. Una vez terminado se hizo una alícuota con 1 μ l de cDNA en 49 μ l de agua libre de DNAasas. Posteriormente en un placa de 96 pozos (Corning, USA), 54 pozos fueron precargados con la mezcla del LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Made in Germany) la cual contiene 1.9 μ l de agua libre de RNAasas, 5 μ l de enzima, 0.2 μ l de sonda y 0.4 μ l de primer correspondiente para CD73 (Mouse CD73 5'GCCCGGCTCTACCAAG 3' Left/ 5'TCCAAAAACAGCACGTTGG 3' Right Uniparts) en combinación con 2.5 μ l de la alícuota de cDNA y se centrifugó a 12 000 rpm por 1 min. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando LightCycler® 480 System y por triplicado. Se utilizó como control endógeno GAPDH como gen normalizador. Los niveles de expresión relativa fueron calculados usando el método de ciclo umbral $\Delta\Delta$ (Ct).

9. RESULTADOS

9.1 Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 sin protección inmunológica en presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs).

El microambiente tumoral está compuesto de muchos tipos de células, en tumores sólidos como el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) su estroma está compuesto por una mezcla compleja de tipos celulares y tejidos, los cuales incluyen células endoteliales, células de la respuesta inmune, células estromales como fibroblastos no neoplásicos, vasos sanguíneos, matriz extracelular y las CEMs, que dinámicamente interactúan con el parénquima del tumor (células tumorales) (Albini and Sporn, 2007; Cuiffo et al., 2012; Lorusso, 2008; Joyce et al., 2009; Sun et al., 2014). Las CEMs se comunican con las células tumorales a través de contacto directo y de mecanismos de señalización parácrina mediada por la secreción de factores solubles tales como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Varios estudios han mostrado que el uso de CEMs inoculadas en animales juegan un papel importante en la progresión tumoral promoviendo la neovascularización del tumor (Stagg, 2008; Suzuki et al., 2008), así como en la supresión de la respuesta inmune al bloquear la proliferación de LT e inhibir la actividad efectora de LTC (Hoskin, 2007; Saldanha-Araujo et al., 2011). Recientemente se ha postulado un nuevo mecanismo inmunosupresor denominado vía adenosinérgica, la cual ejerce su efector supresor por medio de la secreción de adenosina, un nucleósido de purina encontrado dentro del fluido intersticial de los tumores sólidos y es capaz de inhibir las respuestas inmunes mediadas por células efectoras hacia células tumorales (Hoskin 2008).

Tomando en consideración lo anterior, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar el papel de CEMs provenientes de tumores malignos de cuello uterino (CEMs-CaCu) y su efecto inmunosupresor a través de la vía adenosinérgica en linfocitos T citotóxicos. Para poder analizar este efecto, primero se realizó la inducción de tumores en ratones de la cepa C57BL/6. Como ya se mencionó en materiales y métodos, las CEMs-CaCu fueron previamente caracterizadas de acuerdo con los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, que consisten en ser adherentes, tener marcadores CD105, CD73 y CD90 y carecer de marcadores de superficie tales como CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR en la membrana celular; asimismo por su capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Montesinos et al, 2013). La inducción del crecimiento tumoral, se realizó en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-Db, clase I) a los cuales se le inocularon células tumorales TC-1, que compartían el haplotipo H2-D^b con la cepa del ratón, además de expresar proteínas E6 y E7 de VPH tipo 16. Se establecieron 2 grupos de 6 ratones cada uno, con los siguientes tratamientos: 1) TC-1+CEMs-CaCu y 2) Solo con células tumorales TC-1. Al evaluar el crecimiento tumoral se observó que ambos grupos de ratones mostraron tumores con tamaño muy similar, ya que no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ellos. Los ratones que fueron inoculados sólo con células tumorales mostraron un tamaño promedio de 2.20 cm³; mientras que aquellos que fueron inoculados con TC-1+ CEMs-CaCu, alcanzaron un tamaño promedio de 2.30 cm³ (Figura 11). Estos resultados sugieren que la CEMs de CaCu no interfieren con el implante y crecimiento del tumor en los ratones tratados.

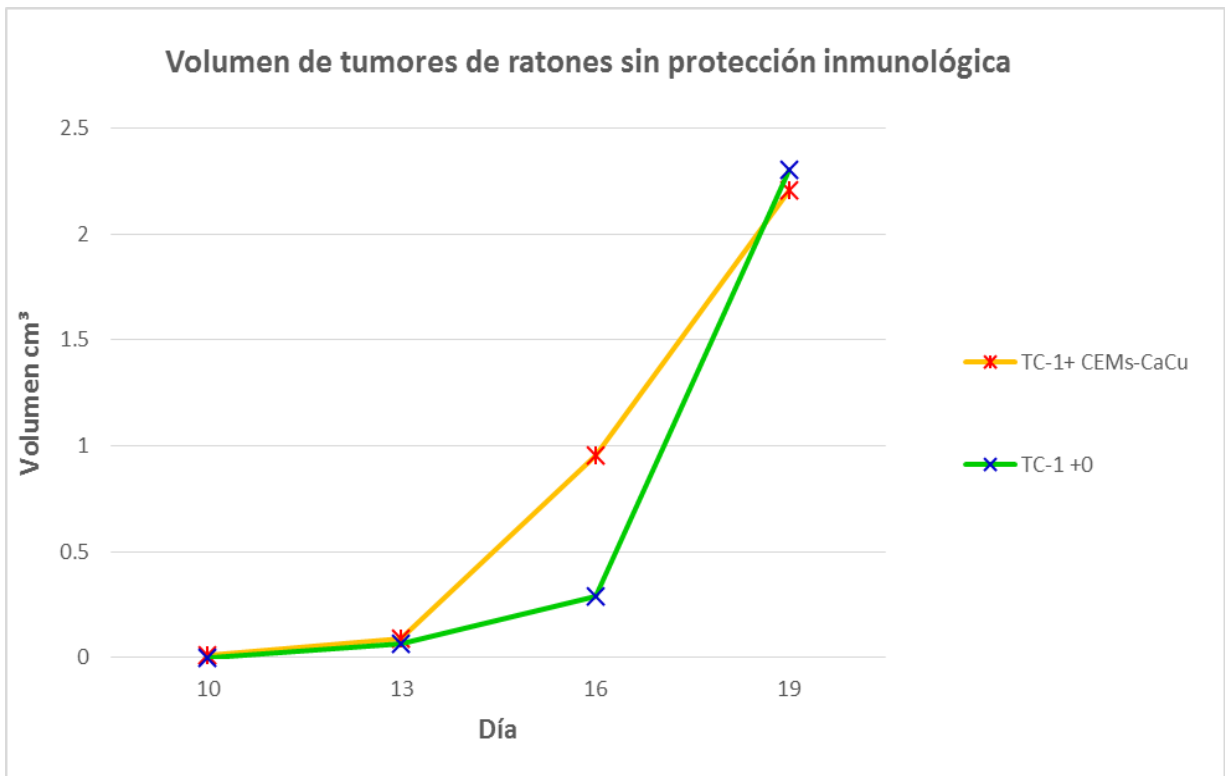


Figura 11. CEM-CaCu no interfieren con el crecimiento tumoral inducido en ratones de la cepa C57BL/6 con células tumorales TC-1. 10^5 células TC-1 fueron inoculadas en el dorso (vía subdérmica) de un grupo de ratones C57BL/6 en ausencia de CEM-CaCu (TC-1+0) (n=6); o de manera simultánea, vía vena caudal, con 10^5 CEM-CaCu (TC-1+CEMs-CaCu) (n=6). El volumen del tumor fue medido cada tercer día después de 10 días de haber inoculado las células tumorales.

9.2 Inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 con protección inmunológica en presencia de Celulas Estromales Mesenquimales (CEMs).

Nuestro equipo de trabajo, en estudios previos, ha demostrado que la inmunización de ratones C57BL/6 con el péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH16) los protege del crecimiento tumoral inducido por las células tumorales TC-1 (Paz de la Rosa et al., 2009), a través de la generación de linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF (Monroy-García et al, 2014). Con base en lo anterior, se evaluó el papel de las CEMs-CaCu en la supresión de la respuesta inmune antitumor en los ratones C57BL/6. Para ello, 2 grupos de 6 ratones C57BL/6 fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, y después de 10 días fueron inoculados con las células tumorales TC-1 en presencia y ausencia de CEMs-CaCu respectivamente. De manera interesante, se observó que el grupo de ratones que recibió inmunización con el péptido y posteriormente fue inoculado con células tumorales TC-1 no mostró crecimiento tumoral durante los 37 días de duración del experimento; sin embargo, el grupo de ratones que recibió células tumorales TC-1 junto con CEMs-CaCu, inició un crecimiento tumoral después de 19 días de haber iniciado el tratamiento, y al día 37 mostró un volumen final de 0.62 cm^3 (Figura 12).

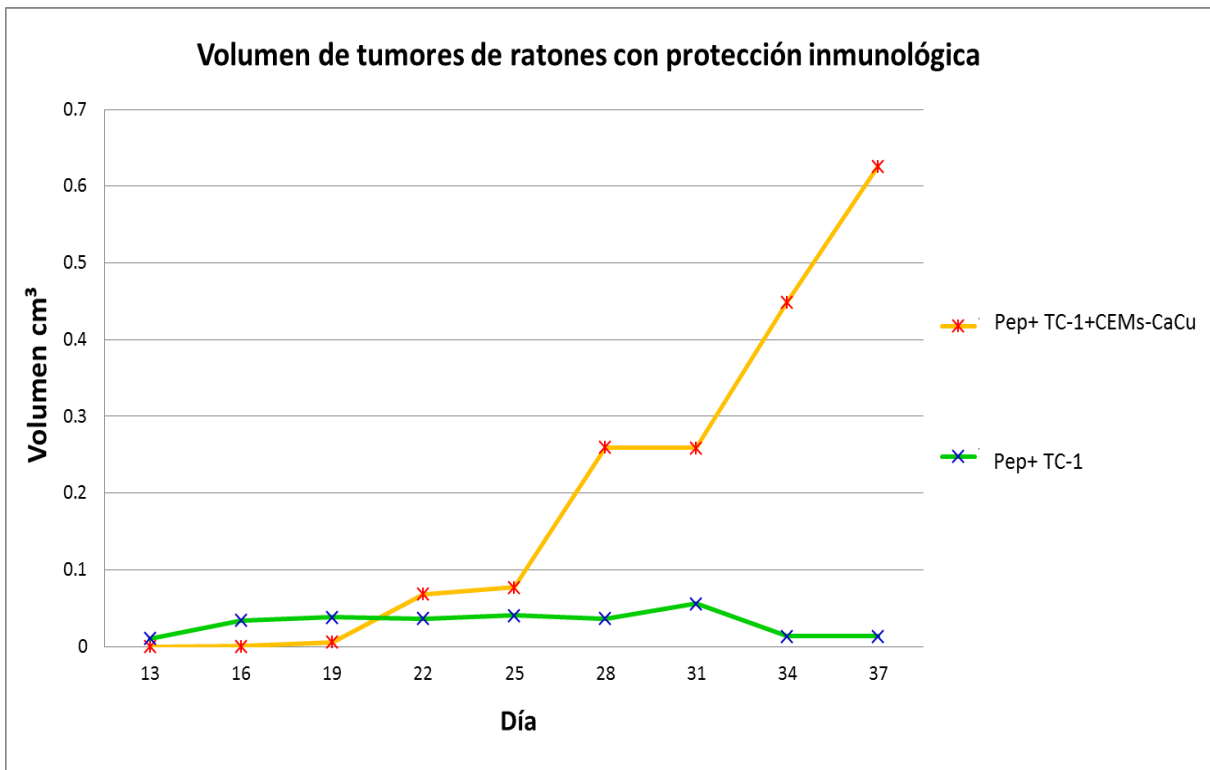


Figura 12. CEM-CaCu inducen crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 bajo condiciones de protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 100µg del péptido inmunogénico RAHYNIVTF, diez días después de la tercera inmunización, recibieron reto tumoral con 10^5 células TC-1 en ausencia de CEMs (TC-1+0) (n=6), o de forma simultánea con 10^5 CEMs-CaCu (Pep+TC-1+CEMs-CaCu) (n=6). El volumen del tumor fue medido cada tercer día, después de 10 días de haber inoculado las células tumorales.

9.3 Ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 o con TC-1+CEMs-CaCu disminuyen la población de linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF bajo condiciones de protección inmunológica.

Estudios recientes han mostrado que las CEMs tienen la capacidad de inhibir la proliferación de LTC (Sattler et al., 2011) y su actividad efectora (Saldanha-Araujo et al., 2011). Por tanto, se procedió a analizar si en el modelo de ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, la CEMs-CaCu inoculadas de manera simultánea con las células tumorales TC-1 tenían un efecto supresor sobre las poblaciones de linfocitos T citotóxicos específicos al péptido RAHYNIVTF. Para ello, dos grupos de ratones C57BL/6 fueron previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF y posteriormente recibieron los tratamientos con células tumorales TC-1, o con células TC-1+CEMs-CaCu, respectivamente. De cada grupo se tomaron ratones a los días 10, 20 y 30 y se aislaron células del bazo para determinar el porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF, con ayuda de moléculas pentaméricas H2-D^b/RAHYNIVTF, que tienen la capacidad de reconocer los receptores de los linfocitos T específicos al péptido. Como se muestra en la (Figura 13), a los 10 días de tratamiento, los ratones que sólo recibieron inmunización con el péptido RAHYNIVTF presentaron 0.18% de linfocitos positivos al pentámero, en cambio los ratones que no recibieron

protección inmune (pre-inmunes) mostraron 0.07% de células positivas; mientras que los ratones que recibieron inmunización con el péptido y fueron inoculados con células tumorales TC-1 (Pep+TC-1) presentaron 0.11% de células positivas; y los ratones que además de ser inoculados con células tumorales TC-1 recibieron CEMs-CaCu (Pep+TC-1+CEMs-CaCu) mostraron un promedio de 0.09% de células positivas al péptido RAHYNIVTF. A los 20 días de tratamiento, los ratones que solo fueron inmunizados con el péptido mostraron un incremento importante de células positivas al pentámero H2-Db/RAHYNIVTF (0.48%), mientras que los ratones pre-inmunes mostraron un promedio de 0.06%. En el caso de los ratones que fueron inoculados con células tumorales TC-1, o co-inoculados con células Pep+TC-1+CEMs-CaCu, mostraron una disminución en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos, obteniéndose 0.32% y 0.33% respectivamente. De manera interesante, en estos grupos de ratones las poblaciones de linfocitos T específicos al péptido disminuyeron fuertemente a los 30 días de tratamiento, encontrándose 0.09% de células positivas en el grupo de ratones inoculados con células tumorales TC-1, y de 0.06% en los ratones tratados con células Pep+TC-1+CEMs-CaCu (Figura 13).

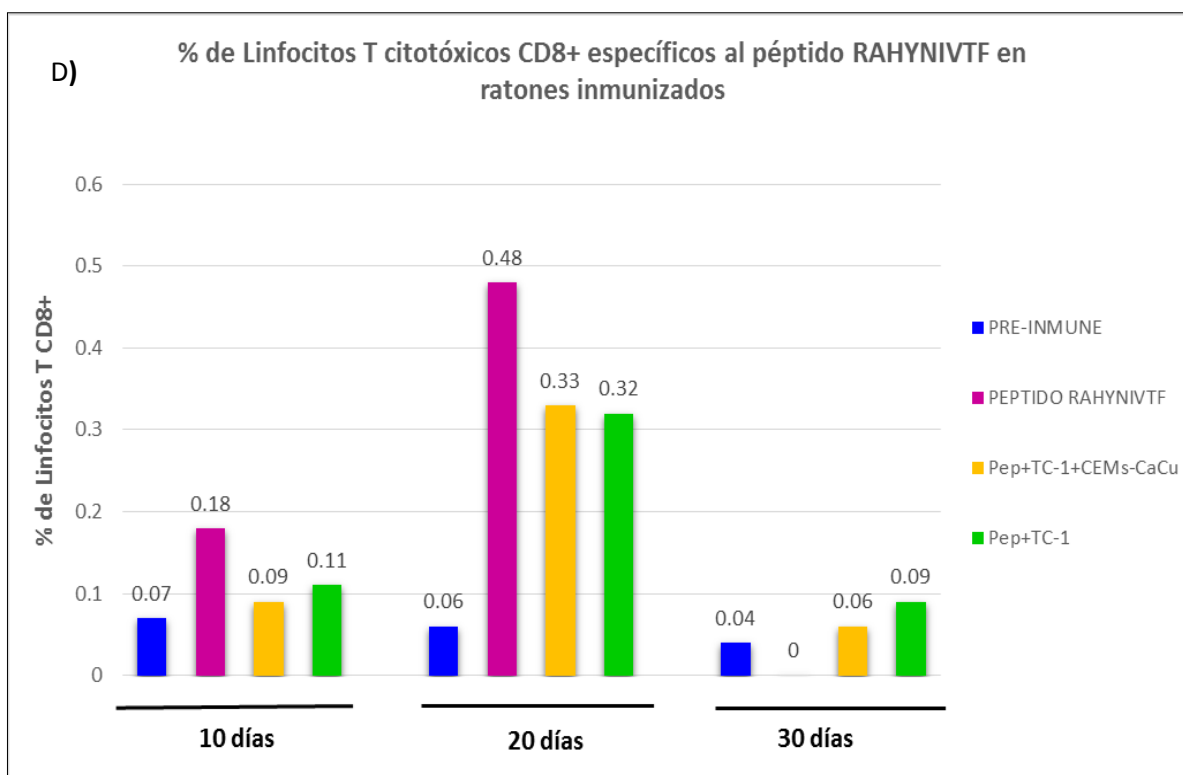


Figura 13. Ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 o con TC-1+CEMs-CaCu disminuyen la población de linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF bajo condiciones de protección inmunológica. Ratones C57BL/6 previamente inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de HPV-16), fueron inoculados con 10^5 células TC-1 en ausencia de CEMs (Pep+TC-1); o en presencia de 10^5 CEMs-CaCu (Pep+TC-1+CEMs-CaCu). Después de 10, 20 y 30 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados para analizar en células de bazo la presencia de linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF, empleando pentámeros de moléculas H-2B asociados al péptido RAHYNIVTF+(PE).

9.4 Ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido RAHYNIVTF e inoculados con células tumorales TC-1 o con células TC-1+CEM-CaCu presentan menor concentración de adenosina sérica que aquellos no inmunizados.

Numerosos estudios han reportado que la adenosina generada por CD73 en tumores juega un papel crucial en la inmunosupresión de la respuesta inmune (Wang et al., 2013). Tomando en consideración que tanto las células tumorales TC-1 como las CEMs-CaCu presentan CD73 en membrana, se procedió a analizar si en aquellos animales tratados con células tumorales TC-1 o la combinación de células TC1+CEM-CaCu se inducía una mayor producción de adenosina y pudiera ésta ser detectada en suero. En consecuencia, se procedió a analizar el contenido de adenosina en los sueros de estos grupos de ratones, tanto en aquellos que recibieron inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF, como aquellos que no la recibieron. Para ello se tomaron muestras de 10 µl de suero obtenidas de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento y a través de cromatografía líquida de ultraresolución (UPLC) se analizó el contenido de adenosina. Como se puede observar en la Figura 14, para aquellos grupos de ratones que no recibieron protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, los niveles de adenosina fueron más altos que aquellos que fueron previamente inmunizados antes del reto tumoral. Los ratones a los que se les inyectaron células tumorales TC-1 mostraron un valor de 94.01 ng de adenosina/mL de suero, y en aquellos ratones a los cuales se les inocularon células TC-1+CEMs-CaCu mostraron una concentración de 47.6 ng de adenosina/mL de suero. De manera interesante, se observó que aquellos grupos que fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF mostraron los niveles más bajos de adenosina en suero, obteniéndose 3.25 y 4.17 ng de adenosina/mL de suero en los grupos inoculados TC-1+CEMs-CaCu y TC-1 respectivamente. Estos valores fueron muy parecidos a los niveles de adenosina encontrados en los ratones pre-inmunes, en los cuales se detectaron valores de 3.36 ng de adenosina/mL de suero. Sugiriendo entonces que la protección inmunológica de los ratones con el péptido RAHYNIVTF inhibe la generación de adenosina en los animales tratados ya sea con células tumorales TC-1 o TC-1+CEM-CaCu.

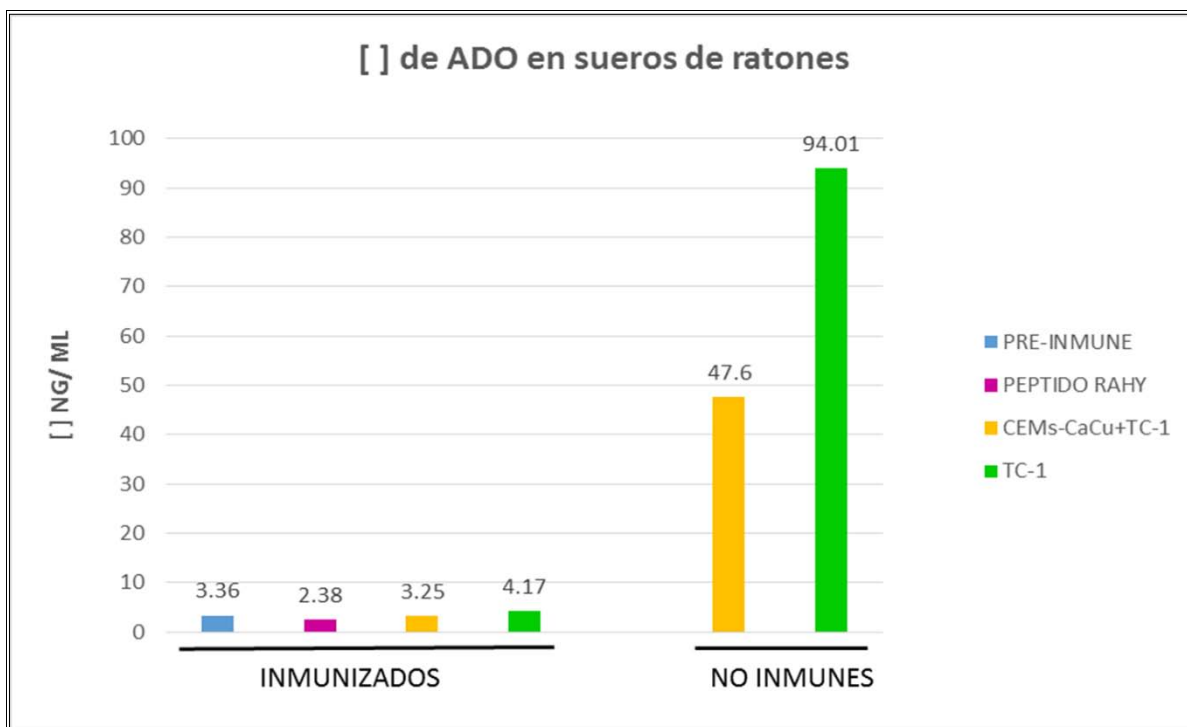


Figura 14. La protección inmune con el péptido RAHYNIVTF inhibe la generación de adenosina en los ratones C57BL/6 retados con células tumorales TC-1 o con células CEM-CaCu+TC-1. Se muestra la concentración de adenosina determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) en muestras séricas de ratones tratados con células tumorales TC-1 o con CEMs-CaCu + TC-1, con o sin inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF. Se incluyen las concentraciones de adenosina encontradas en ratones que no recibieron tratamiento (Preimmune), y en aquellos ratones que fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF.

9.5 Los tejidos tumorales de ratones no inmunizados con el péptido RAHYNIVTF presentan mayor expresión de CD73.

Con base en los datos anteriores, en donde se encontró que los ratones que no recibieron inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF y posteriormente fueron retados con las células tumorales TC-1 o TC-1+ CEM-CaCu, mostraron mayores concentraciones séricas de adenosina respecto a los animales que recibieron inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF, nos permitió sugerir que la expresión de CD73 en los tumores que se desarrollaron en estos animales, podría estar asociada con los niveles de adenosina encontrados en los mismos. Por tanto, se procedió a analizar la expresión de CD73 en los tejidos tumorales obtenidos de ambos grupos de ratones. Para ello, se tomaron muestras de 50-100 mg de tejido tumoral y se analizó mediante RT-PCR el nivel de expresión de RNA mensajero para CD73. La expresión del gen para el marcador CD73 fue significativamente mayor en los tejidos tumorales de los ratones que no tuvieron protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, encontrándose valores de expresión relativa entre 0.80-1 (Figura 15). De manera interesante al grupo que se le dio inmunización previa y posteriormente fue tratado con células tumorales TC-1, presentó valores muy reducidos de RNA mensajero para CD73 (0.155); mientras que los ratones que fueron tratados con TC-1+CEMs-CaCu, incrementaron la expresión de CD73 hasta un valor de 0.7929 (Figura 15). Estos datos coinciden con lo observado en las cinéticas de crecimiento tumoral, en donde los ratones que no fueron

inmunizados y fueron tratados con células tumorales TC-1 o células TC-1+CEM-CaCu, así como en aquellos en los que después de ser inmunizados fueron tratados con Pep+TC-1+CEMs-CaCu, desarrollaron crecimientos tumorales considerables, sugiriendo entonces que la expresión de CD73 puede tener un papel importante en el crecimiento tumoral en este modelo experimental.

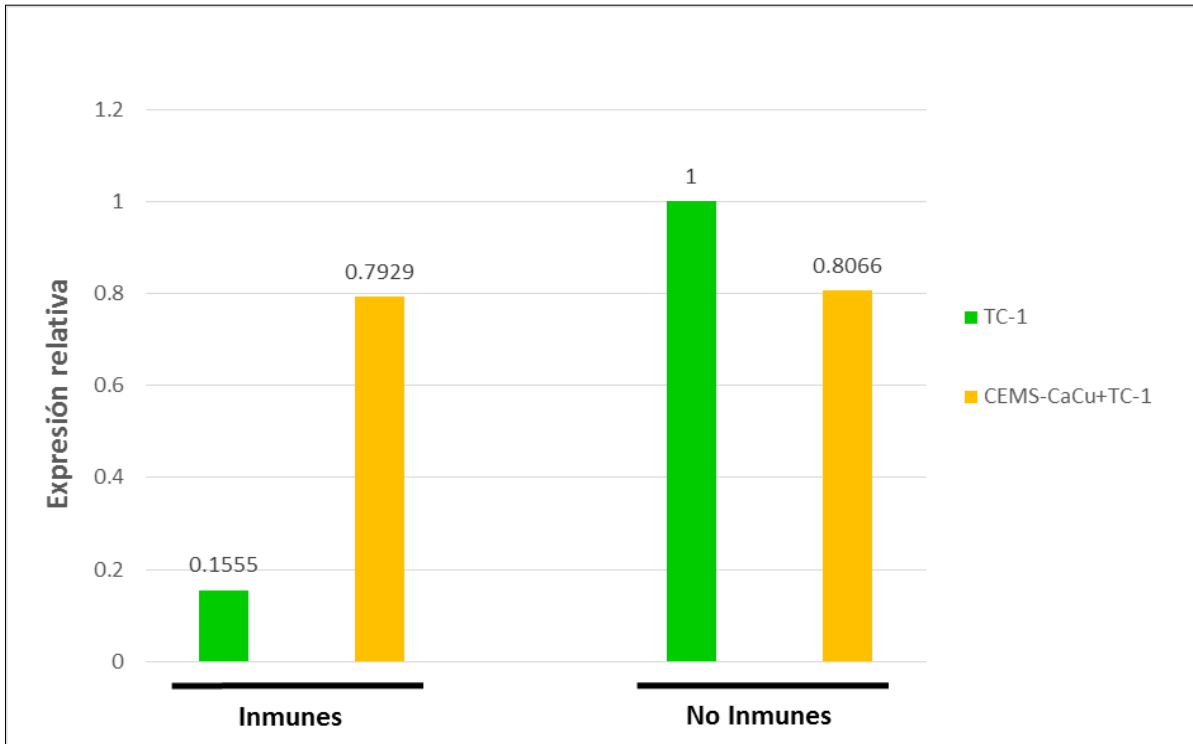


Figura 15. Expresión de RNA mensajero de CD73 en los tumores inducidos en ratones de la cepa C57BL/6 tratados con células tumorales TC-1 o CEM-CaCu+TC-1. Se muestra la expresión relativa de RNA mensajero de CD73 determinada en tejidos tumorales de ratones tratados con células tumorales TC-1 o CEM-CaCu+TC-1, con o sin inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF. Los valores mostrados representan la expresión relativa de RNA mensajero de CD73 respecto a la expresión de RNA del gen constitutivo de GAPDH como se describe en materiales y métodos.

Por otro lado, se ha reportado que la ectoenzima CD73 participa estrechamente en la progresión tumoral, debido a que se encuentra fuertemente expresada en muchos tumores sólidos humanos, y su actividad funcional se ha encontrado asociada con la invasividad y la metástasis tumoral, reduciendo así el tiempo de supervivencia en los pacientes (Jin et al., 2010; Ghiringheli et al., 2012). Tomando en consideración que en los tejidos tumorales de ratones tratados con células tumorales TC-1 o con TC-1+ CEM-CaCu y que no fueron inmunizados se encontró una mayor expresión de RNA mensajero para CD73, con respecto a aquellos que fueron previamente inmunizados, se procedió a analizar la expresión de la proteína CD73 en los diferentes tejidos tumorales. Para ello, los tumores de los ratones de ambos grupos fueron extirpados al día 37 y procesados para realizar cortes histológicos y analizar la expresión de CD73 con el anticuerpo anti-CD73 mediante la técnica de inmunohistoquímica. El análisis realizado en los cortes histológicos teñidos con el anticuerpo anti-CD73 nos permitió observar tinción específica de color marrón en membrana celular del tejido tumoral (Figura 16). De acuerdo con el análisis de imágenes, se pudo determinar que al analizar la

expresión de CD73 en los cortes histológicos de tejido tumoral de ratones que no tuvieron protección inmunológica y que recibieron únicamente células tumorales TC-1 mostraron una intensidad media de expresión (IME) de 50.8% (Figura 16C); mientras que los cortes histológicos de los ratones que recibieron tratamiento con TC-1 y CEMs-CaCu mostraron una IME de 53.6% (Figura 16D). De manera interesante en aquellos animales inmunizados y que posteriormente fueron inoculados con TC-1 y CEMs-CaCu, mostraron menor expresión de de CD73, obteniéndose una IME de 41.405% (Figura 16A). En aquellos animales inmunizados y que posteriormente fueron tratados con las células tumorales TC-1, no hubo desarrollo tumoral.

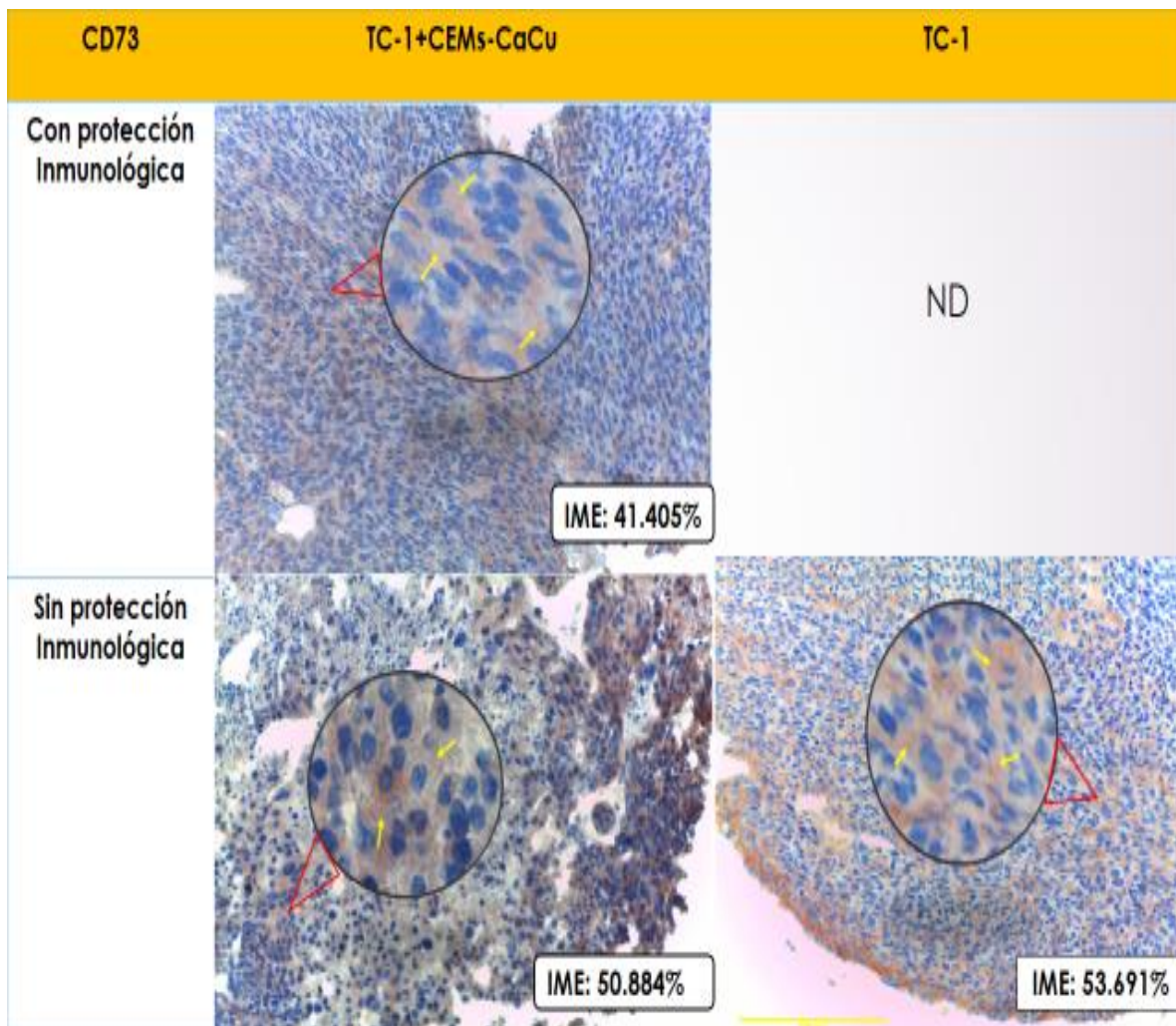


Figura 16. Análisis de la expresión de CD73 a nivel membrana en tumores inducidos en ratones de la cepa C57BL/6 mediante la inoculación de células tumorales TC-1 o TC-1+CEMs-CaCu. Se muestra la expresión de CD73 en tejidos tumorales de ratones con o sin protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, y que posteriormente fueron tratados con células tumorales TC-1 o con células tumorales TC-1 + CEMs-CaCu. Los valores mostrados representan la Intensidad Media de Expresión (IME) de CD73 determinada mediante análisis de imágenes de las microfotografías a 40X. Se muestra la tinción específica de la ectonucleotidasa CD73 en color marrón en la membrana de las células del tejido tumoral, indicada por las flechas color amarillo.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las células estromales mesenquimales (CEMs) son células multipotentes con una alta capacidad inmodulatoria mediada por factores solubles tales como TGF- β , 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), y moléculas en la superficie de la célula tales como PD-L1 y CTLA-4 que correlacionan con el incremento en la producción de factores inmunosupresores como IL-10, PGE2 y TGF- β (Sattler et al., 2011). Previos reportes han mostrado resultados controversiales con respecto al papel de CEMs en tumores sólidos. Ciertos estudios han demostrado que las CEMs inhiben la proliferación tumoral y promueven la apoptosis de las células tumorales (Sun et al., 2014); mientras que otras investigaciones han revelado que las CEMs promueven la transición epitelio-mesénquima (EMT) durante la progresión tumoral, así como el crecimiento y el proceso de metástasis del tumor a través de la activación de metaloproteinasas de la matriz y la neoangiogénesis, o mediante la prevención del reconocimiento de células tumorales por el sistema inmune (Karnoub et al., 2007; Djouad et al., 2003; Ramasamy et al., 2007). Sin embargo el papel de las CEMs en el microambiente tumoral aún es incierto.

En el presente estudio se analizó la capacidad inmunosupresora de CEMs derivadas de tumores de Cáncer Cérvico Uterino humano (CEMs-CaCu) sobre linfocitos T, a través de la vía adenosinérgica CD73-adenosina, en un modelo de crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-Db), los cuales fueron tratados con células tumorales TC-1 del mismo haplotipo de histocompatibilidad clase I (H2-Db) y positivas a E6/E7 de VPH 16, con o sin previa protección inmunológica con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH 16. En los ratones inmunizados se analizaron las poblaciones de linfocitos T efectores a nivel de periferia (bazo) y se comprobó la presencia de la molécula CD73 en tejido tumoral tanto a nivel de ARN mensajero (ARNm) como de proteína, y se determinaron los niveles de adenosina sérica en los diferentes grupos de tratamiento.

En nuestro modelo experimental se encontró que la inoculación de células tumorales TC-1 de manera simultánea con CEMs-CaCu en ratones de la cepa C57BL/6 no inmunizados, no modificó el crecimiento tumoral en relación con aquel observado en ratones donde sólo se inocularon las células tumorales TC-1; sin embargo, cuando las CEMs-CaCu y células TC-1 se aplicaron a ratones previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, la respuesta protectora ejercida por el péptido para inhibir el crecimiento tumoral en los ratones inoculados únicamente con las células tumorales TC-1, fue revertida cuando las CEMs-CaCu fueron co-inoculadas a los ratones; sugiriendo fuertemente que la presencia de las CEMs en los animales inmunizados participa en la supresión de la respuesta inmune antitumoral, y favorece en consecuencia el crecimiento del tumor. El papel funcional de CEM's, obtenidas de diferentes fuentes, para favorecer el crecimiento tumoral ha sido reportado por varios autores utilizando diferentes modelos de tumor alogénicos y xenogénicos. Por ejemplo, Karnoub et al., 2007, quien al emplear un modelo xenogénico, co-inyectó cuatro diferentes líneas celulares de cáncer de mama con CEMs de médula ósea humana en ratones, observó que en por lo menos uno de los cuatro grupos coinyectados, el crecimiento tumoral fue más acelerado gracias a la presencia de CEMs. En otro estudio, en donde se transplantaron células de melanoma B16 junto con CEMs de médula ósea en ratones alogénicos, se favoreció el

crecimiento tumoral al inhibir la respuesta inmune de los animales, (Djuand et al., 2003). El mismo efecto fue observado en un estudio realizado con CEMs de tejido adiposo, en donde se encontró que estas CEMs promovieron el crecimiento tumoral de células A375 de melanoma en ratones, a través de la inhibición de la apoptosis y de la respuesta a fármacos en las células tumorales, así como en la producción de factores inmunosupresores solubles (Kurcerova et al., 2010). Por otro lado, en estudios hechos con CEMs de médula ósea que fueron estimuladas por citocinas proinflamatorias, tales como IFN- γ Y TNF- α , se favoreció la expresión de altos niveles de VEGF y de angiogénesis en el microambiente tumoral, cuando dichas CEMs fueron inoculadas con células tumorales de cáncer de colon C26 en ratones hembra BALB/c (Liu et al., 2011). En un estudio más reciente realizado por Zhu et al., (2012), con líneas celulares de cáncer de colon y de cáncer gástrico humano mezcladas con exosomas de CEMs de médula ósea, inyectadas vía subcutánea en ratones desnudos, mostró un aumento en la incidencia y crecimiento del tumor. Por otro lado, Ljujic et al., 2013, al inyectar CEMs de humano en ratones BALB/c portadores de carcinoma mamario, obtuvo mayor crecimiento del tumor y nódulos metastásicos. De igual manera en un estudio *in vivo* realizado en nuestro grupo de trabajo se encontró que la co-inoculación de CEMs de cáncer cervico uterino junto con células tumorales TC-1 ayudó a incrementar el volumen tumoral y disminuir la población de linfocitos T citotóxicos (Don, 2010; Contreras, 2011).

Por otra parte, la supresión de la respuesta inmune específica antitumoral en nuestro modelo experimental fue evidenciada a través del análisis de las poblaciones de linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF, ya que con ayuda de moléculas pentaméricas, se pudo detectar una importante reducción en el porcentaje de células T CD8+ antígeno específicas en los ratones que previamente fueron inmunizados con el péptido y posteriormente fueron inoculados con las células tumorales TC-1 y CEMs, específicamente después de los 20 días de haber sido inoculadas, coincidiendo también con un incremento en el tamaño tumoral. La disminución en la población de linfocitos T CD8+ antígeno específicos en los ratones co-inoculados con TC-1 y CEMs puede relacionarse con las actividades inmunoregulatorias de ambos tipos celulares al inhibir las funciones de diferentes tipos de células inmunes efectoras. Por ejemplo, en varios estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha reportado que CEMs de tejido humano (Di Nicola et al., 2002; Saldanha-Araujo, 2011) y murinos (Djuad et al., 2003; Krampera et al., 2003; Sattler et al., 2011) son capaces de suprimir la proliferación y activación de linfocitos T citotóxicos (CTL), células B, natural killer (NK), células dendríticas, o de incrementar la población de células T reguladoras que contribuyen a la progresión del tumor (Houthijzen et al., 2012). En otro estudio realizado con CEMs humanas, se encontró que al ser inyectadas en ratones BALB/c con carcinoma mamario además de promover el crecimiento y la metástasis tumoral, también se observó una menor actividad citotóxica de esplenocitos, células natural killer (NK) y células T CD8+ *in vitro* (Ljujic et al., 2013). Nuestro grupo de investigación también ha encontrado que CEMs-CaCu inducen desregulación en la expresión de las moléculas del complejo clase I de histocompatibilidad (HLA-A, B, C) en células tumorales Caski de cáncer cervico-uterino a través de la liberación de factores solubles como IL-10 (Montesinos et al., 2013).

Recientemente se ha postulado que la producción de adenosina a través de la fosfohidrólisis de ATP hacia adenosina (Ado), por las ectoenzimas CD39 y CD73, constituye un vía de inmunosupresión en el microambiente tumoral para favorecer la evasión de la respuesta inmune (Hoskin et al., 2008). La

actividad funcional de la ectonucleotidasa CD73 en las CEMs para generar adenosina es de gran importancia en nuestro estudio, debido a que las CEMs a través de la producción de adenosina, son capaces de inhibir la proliferación y actividad citotóxica de linfocitos T al interactuar con receptores de alta afinidad para este nucleósido, como es el receptor A2A de alta afinidad, favoreciendo el crecimiento y metástasis tumoral (Otha et al., 2006; Yen and Yen, 2008; Jin et al., 2010). De hecho, nuestro grupo de investigación ha determinado que cuando CEMs-CaCu son cultivadas *in vitro* en presencia de adenosina monofosfato (AMP), estas células son capaces de generar adenosina, la cual inhibe la proliferación y función efectora de LTC específicos a péptidos antigénicos (Pérez-Saldaña, 2012; Navarro, 2013, Morales-Ramirez 2014), lo cual nos permite sugerir que uno de los mecanismos que utilizan las CEMs-CaCu para inhibir la respuesta citotóxica específica es mediante la producción de Ado. En el presente estudio también analizamos mediante cromatografía de UPLC las concentraciones de Ado en los sueros de los animales tratados tanto con células tumorales TC-1, como con células TC-1 y CEMs-CaCu, de manera interesante se encontró que en aquellos ratones que se les dio protección inmune con el péptido RAHYNIVTF, se generaron menores concentraciones de adenosina (2-5 ng/mL), en comparación con aquellos ratones que no fueron inmunizados con el péptido, en donde se detectaron concentraciones de adenosina de 47-95 ng/mL de suero. Según Hoskin et al., (2010), la Ado está presente a concentraciones inmunosupresivas en el microambiente de tumores sólidos, por lo tanto es un factor importante en la evasión inmune por células tumorales además de tener la capacidad de modular el crecimiento tumoral. De hecho, se ha demostrado que la producción de Ado por CD73 en el microambiente del tumor, mejora la adhesión de células tumorales a la matriz extracelular y aumenta la migración *in vitro* (Beavis et al., 2013). Asimismo, en varios estudios se ha comprobado que la adenosina extracelular inhibe la activación de linfocitos T y su actividad efectora antitumoral, mediante la interacción con receptores de alta afinidad A2A, al incrementar los niveles de AMPc (Hoskin et al., 2008; Xu et al., 2013). Jin et al., (2010) encontró que la adenosina generada por CD73 de tumores inhibe tanto la fase de activación como la fase efectora de la respuesta de células T CD8+ antitumorales, y promueve la apoptosis de células T. La Ado es identificada como un potente supresor inmunológico universal (Xu et al., 2013). Se ha reportado que la Ado en el microambiente tumoral puede provenir de varias fuentes tales como: a) la hipoxia celular en la cual se inhibe la adenosina cinasa, lo que causa un incremento de AMP extracelular y por tanto un incremento de Ado, cuando este sustrato interacciona con CD73 sobre células que expresan esta ectonucleotidasa, como ocurre en linfocitos Tregs, células dendríticas foliculares y células epiteliales, entre otras (Kobie et al., 2006; Deaglio et al., 2007); b) se ha descrito que algunas células tumorales también pueden producir Ado (Dzhandzhugazyan et al., 1998, Scussel, 2012); c) nucleótidos liberados por Linfocitos T durante la activación y presentación de antígenos, pueden ser fuentes de la misma (Takayama et al., 1988). En otros estudios se ha demostrado que en un ambiente inflamatorio proporcionado por linfocitos T activados, las células estromales mesenquimales (CEMs) incrementan la expresión de CD39 y CD73 y por tanto la producción de adenosina (Saldanha-Araujo et al., 2011). Por otro lado, se ha reportado que en líneas celulares de cáncer de ovario humano encontraron una reducción en los niveles de adenosina mediante la adición de anticuerpos contra CD39 y CD73, favoreciendo la proliferación de células T CD4+ y aumento de la citotoxicidad de células T aloreactivas (Häusler et al., 2014). Por tanto, adenosina acumulada en los tejidos tumorales, debido a la actividad funcional de CD73, ejerce un efecto inmunosupresor además de promover el crecimiento tumoral y la metástasis (Hoskin et al., 2008; Satler, 2011). Tomando en consideración

que en los ratones que mostraron tener un mayor crecimiento tumoral, se encontraron las cantidades más altas de adenosina en suero, se procedió a analizar si en los tejidos tumorales de estos animales la expresión de CD73 se encontraba incrementada. En nuestro modelo experimental se encontró que los ratones pertenecientes a los grupos que no tuvieron protección inmunológica, mostraron altos índices de expresión de la proteína CD73 en los tejidos tumorales, en comparación con el mostrado por los tumores de los ratones que fueron inmunizados y tratados con las células tumorales TC-1+CEMs-CaCu. De manera interesante, también se encontró que la expresión de ARN mensajero para CD73, correlacionó con lo encontrado en la expresión de la proteína en los tejidos tumorales de estos ratones.

Sugiriendo entonces, que aun cuando la inmunización con el péptido RAHYNIVTF protegió a los ratones del crecimiento tumoral cuando éstos fueron retados con las células tumorales TC-1, la coinoculación de las CEMs-CaCu con las células tumorales TC-1 en los ratones inmunizados, ayudó a generar un microambiente tumoral inmunosupresor y además resistente a la respuesta inmune mediada por las poblaciones de linfocitos T citotóxicos, probablemente a través de la producción de diversos factores inmunosupresores entre los cuales destacan: factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α); interferón gamma (IFN- γ); factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-6, IL-8, IL-1, angiopoyetina y factor derivado de células estromales-1 (sdf-1), y prostaglandina E2 (PGE2) (Tse et al., 2003; Shi et al., 2010; Sun et al., 2014). Además se ha propuesto que varios de estos factores están asociados con un incremento en la expresión del Factor inductor de hipoxia (HIF-1 α), el cual se sabe induce la expresión de CD73, especialmente en tumores malignos, tal como fue demostrado por Lu et al., (2013), quien encontró que en muestras de tejidos de tumores de pacientes con carcinoma gástrico, la expresión de CD73 se correlacionaba estrechamente con la expresión de HIF-1 α . Por tanto, será interesante analizar en estudios posteriores, si la mayor expresión de CD73 en los tumores analizados en nuestro modelo experimental también correlaciona con mayores niveles de expresión de HIF-1 α .

Por otra parte, varios estudios han demostrado una alta actividad de CD73 en diferentes tipos tumorales incluyendo: cáncer de mama (Spychala et al., 2004); de próstata (Hastie et al., 2005); de vejiga (Stella et al., 2009); de leucemia (Mikhailov et al., 2008), entre otros, con resultados diversos. Por ejemplo un análisis específico de Western blot y Northern blot en nueve líneas celulares de cáncer de mama humano reveló una alta expresión de CD73 en los niveles de ARN mensajero (ARNm) (Spychala et al., 2004). En otro estudio, las células de cáncer de mama 4T1.2 y E0771, en contraste con una variante no metastásica de 4T1.2 (67NR), expresaron altos niveles de CD73 (Stagg et al., 2010). También Häusler et al., (2011) en un estudio de inmunohistoquímica *ex situ*, las tinciones de tejido de cáncer de ovario (Ovca) mostraron fuertemente una mayor expresión ectonucleotidasas en comparación con las muestras de tejido benigno. De igual manera Loi et al., (2013), mostró resultados similares en cáncer de mama. Así mismo, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, se logró detectar la expresión de esta ectoenzima en la membrana celular de varias líneas celulares de CaCu, así como su actividad biológica para convertir AMP a Adenosina (Ávila-Ibarra, 2011, Torres-Pineda 2015).

Todos estos reportes han llevado a proponer que CD73 puede implementarse como indicador pronóstico independiente en el desarrollo de varios tipos de cáncer. Por ejemplo, en un estudio realizado por el grupo de Yang et al. (2013), mostraron que la sobreexpresión de CD73 en cáncer de próstata está asociada con metástasis en los ganglios linfáticos. En estudios más recientes,

muestran que la expresión de CD73 está asociada con la progresión del tumor y la supervivencia del paciente con cáncer de vesícula (Xiong et al., 2014) y que promueve metástasis tumoral por múltiples mecanismos, incluyendo supresión de la función de células NK (Beavis et al., 2013).

Por otra parte, también se ha propuesto que CD73 pueda ser un blanco inmunoterapéutico, como lo mostrado recientemente en un modelo *in vivo* de ratones C57BL/6 inoculados con células B16-F10 de melanoma, los cuales fueron tratados con APCP, un inhibidor específico de CD73, en donde encontraron una regresión del tumor asociada con un aumento del porcentaje de células T CD8 + que infiltran el tumor (Forte et al., 2012).

Finalmente, los datos reportados sobre el impacto de la expresión de CD39 y CD73 en el pronóstico de los pacientes con cáncer, son un tanto discordantes y sugiere que el efecto puede depender de la respectiva malignidad. Sin embargo, todos estos hallazgos nos indican que la actividad de CD73 representa un punto de control clave en la generación de adenosina inmunosupresora y que los receptores de adenosina y la adenosina misma, juegan un papel crítico en la promoción de la diferenciación tanto de células tumorales como de las células que constituyen el microambiente tumoral incluyendo a las CEMs que expresan esta molécula y poseen múltiples mecanismos que favorecen la supresión y evasión de la respuesta inmune.

11. CONCLUSIONES

- ▶ Ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF y retados con células tumorales TC-1 no mostraron crecimiento tumoral.
- ▶ La inoculación de CEMs-CaCu de manera simultánea con las células tumorales TC-1 en los ratones de la cepa C57BL/6, no modificó la cinética de crecimiento tumoral en relación con aquel observado en ratones inoculados únicamente con células TC-1. Sin embargo, en ratones con protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, revierte dicha protección y favorece el crecimiento tumoral.
- ▶ La inoculación de CEMs-CaCu a ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF indujo una disminución importante en la población de linfocitos T CD8+ específicos al péptido.
- ▶ Ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF y retados con células tumorales TC-1 o TC-1 y CEMs-CaCu, presentaron menor concentración de adenosina sérica que los ratones que no fueron inmunizados y también fueron retados de la misma manera.
- ▶ Ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF y retados con células tumorales TC-1 y CEMs-CaCu, mostraron menor expresión de CD73 en los tejidos tumorales, tanto a nivel de ARN como de proteína, que los ratones que no fueron inmunizados y fueron retados con células tumorales TC-1 o TC-1 y CEMs-CaCu.
- ▶ Finalmente, las CEMs-CaCu juegan un papel importante en la supresión inmune de la respuesta inmune antitumoral, al suprimir la población de linfocitos TCD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF, en el modelo tumoral de ratones C57BL/6 con células tumorales TC-1 y CEMs-CaCu; en donde la vía-CD73/adenosina puede jugar un papel importante en dicho proceso.

12. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, será de gran importancia en próximos estudios:

Confirmar la participación de la vía CD73/ adenosina en la supresión de la respuesta antitumoral, en el modelo de estudio utilizado, a través de la inhibición de la expresión de CD73 en CEMs-CaCu y células tumorales TC-1, ya sea con siRNAs de interferencia o con inhibidores específicos de la actividad CD73, o mediante el uso de agentes bloqueadores de los receptores para adenosina, con la finalidad de bloquear el efecto inhibitorio de adenosina.

Evaluar *in situ* y de manera sistémica en los animales, la presencia de citocinas inmunosupresoras tales como IL-10 y TGF- β que se asocian con la inmunosupresión en tumores de CaCu.

Analizar en muestras tumorales de pacientes con Ca Cu la expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica, tales como CD39, CD73, receptores para adenosina, y citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β .

13. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Abbas Lichtman A. 2006. Inmunología Celular y Molecular. 6ta ed., Ed. Elsevier, Madrid, 189-193pp.
- ❖ Abdul N, Brown C and Gaston K. 2009. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1700-1717.
- ❖ Aggarwal S and Pitternger M. 2005. Human mesenchymal as a target for hemovention. *Nat Rev Cancer.* 7: 139-147.
- ❖ Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, JM, Gou X, Franklin WA, Bridges JP, Schaack JB, Colgan SP and White CW. 2009. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 alpha in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 10684-10689.
- ❖ Albin A, Sporn MB. 2007. The tumor microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 7: 139-147.
- ❖ Aliagas E, Vidal A, Texido L, Ponce J, Condom E and Martín-Satué M. 2014. High expression of Ecto-Nucleotidase CD39 and CD73 in Human Endometrial tumors. *Hindawi Publishing C*, vol. 2014, Article ID 509027, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/509027
- ❖ Androphy E. 1994. Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Oncogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 103(2): 248-256.
- ❖ Airas L, Hellman J and Salmi M. 1995. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73, *J Exp Med.* 182: 1603-1608.
- ❖ Arévalo J, Páez D, Rodríguez V. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Publicación científica en Ciencias Biomédicas.* 5: 177-184.
- ❖ Avila-Ibarra LR. 2011. Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa o CD73 (EC 3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico uterino. Tesis de Licenciatura. Fes Zaragoza, UNAM.
- ❖ Avila Ibarra LR. 2014. Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) como mecanismo inmunosupresor de células tumorales de cáncer de cuello uterino. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- ❖ Barry F, Murphy J. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Biochem Cell Biol.* 36(4): 568-584.
- ❖ Baseman JG and Koutsky LA. 2005. The epidemiology of human Papillomavirus infections. *Virology* 32: S16-S24.
- ❖ Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T cell unresponsiveness. *Blood.* 105(5): 2214-2219.
- ❖ Batista Duharte A. 2003. Función del Sistema Inmune en la defensa contra tumores malignos. *Medisan.* 7(2): 75-88.
- ❖ Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, Dwyer K, Stagg J, Smyth M and Darcy PK. 2013. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *PNAS Immunology.* 36(110): 14711-16.
- ❖ Beristain A. 2004. Identificación de péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo HPV-18, específicos para los alelos de histocompatibilidad HLA-A2 y HLA-B35 de pacientes con cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura, FES Zaragoza UNAM.

- ❖ Blay J, White T and Hoskin D. 1997. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res.* 57: 2602-2605.
- ❖ Bosch F, Lorincz A, Munoz N, Meijer C, Shah K. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin Pathol.* 55(4): 244-265.
- ❖ Bosch FX, Catellsagué X and de Sanjosé S. 2008. HPV and cervical cancer: screening or vaccination. *Cancer Res.* 98: 15-21.
- ❖ Bossis I, Roden R, Gambhira R, Yang R, Tagaya M, Howley P, Meneses P. 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *Virology.* 79: 6723-6731.
- ❖ Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Gñenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garido F and Stern PL. 2000. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 55: 401-411.
- ❖ Burk R, Chen Z and Van Doorslaer K. 2009. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 12:281-290.
- ❖ Calixto Gómez M. 2005. Vacunas contra el papiloma humano. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá.
- ❖ Cárcamo I, Trigueros C, 2008. Células madre mesenquimales y trasplante hematopoyético. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 30, 3-6.
- ❖ Chapel A, Bertho J, Bensidhoum M, Fouillard L, Young R, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin N, Gourmelon P, Thierry D. 2003. Mesenchymal stem cells home to injure tissues when coinjected with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *Gene Med.* 5(12): 1028-1038.
- ❖ Chen S and Fukuda M. 2006. Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis. *Methods Enzymol* 416: 71-80.
- ❖ Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R and Burk R. 2007. Human Papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolates from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology.* 360 (2): 447-453.
- ❖ Cid-Arregui A. 2009. Therapeutic Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *The Open Virology Journal.* 3: 67-83.
- ❖ Clark AN, Youkey R, Liu X, Jia L, Blatt R, Day YJ, Gail W, Sullivan GW, Joel Linden J and Amy L. Tucker AL. 2007. A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ Res.* 101: 1130-1138.
- ❖ Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PTH, Ferrecio C, Hieu NT, Mato E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, MDI, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJLM and Franceschi S. 2005. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 366: 991-998.
- ❖ Colgan S, Eltzhig H, Eckle T and Thompson L. 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling.* 2: 351-360.
- ❖ Contreras LS. 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.

- ❖ Cuiffo BG and Karnoub AE. 2012. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Ad and Migr.* 6(3): 220-230.
- ❖ Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cell in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10(9): 942-949.
- ❖ Cunha RA, Almeida T and Ribeiro JA. 2001. Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats. *Neurochem.* 76: 372-382.
- ❖ Dachuan J, Jie F, Wang L, Thompson FL, Liu A, Benjamin JD, Shin T, Curiel TJ and ZHnag B. 2010. CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *Cancer Res.* 70: 6407-6411.
- ❖ Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB and Robson SC. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cell mediate immune suppression. *Exp Med.* 204: 1257-1265.
- ❖ De Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H, Zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324(1): 17-27.
- ❖ Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini Z, Spotoletti P, Falzatti F, Tabilio A. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulatory cells. *Ex Hematol.* 36(3): 309-318.
- ❖ Dias D, Van Doren J, Schlottmann S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, Boerckel P, Kessler J, Antonello J, Green T, Brown M, Smith J, Chirmule N, Barr E, Jansen K and Esser M. 2005. Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16 and 18. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 12(8): 959-969.
- ❖ Djurdjic F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgense C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favor tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 102: 3837-3844.
- ❖ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 8(4): 315-317.
- ❖ Don C. 2010. Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- ❖ Dong H, Streome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F and Flies DB, 2002, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Med.* 8: 793-800.
- ❖ Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Clin Virol.* 32: 7-15.
- ❖ Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* 110: 525-541.
- ❖ Dunwiddie TV and Masino SA. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Neurosciencen.* 24: 31-55.

- ❖ El-Tayeb A, Iqbal J, Behrenswerth A, Romio M, Schneider M, Zimmermann H, Schrader J and Muller CE. 2009. Nucleoside-5'- monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *Med Chem.* 52: 7669-7677.
- ❖ Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA and Enjyoji K. 2003. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *Exp Med.* 198: 783-796.
- ❖ Eltzschig, HK. 2009. Adenosine: An old drug newly discovered. *Anesthesiology.* 111: 904-915.
- ❖ Eltzschig HK. 2010. Adenosine: An old newly discovered. *Anesthesiology.* 111 (4): 904-915.
- ❖ Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J and Flament S. 2009. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER alpha mediates etanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol.* 21: 977-981.
- ❖ Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, Rowe M, Jones M, Gileadi U, Cerundolo V and Man S. 2001. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *Immunol.* 167: 5420- 5428.
- ❖ Fainboim L y Geffner J. 2005. Introducción a la inmunología humana, 5ta ed., Ed. Medica Panamericana, Argentina, 484pp.
- ❖ Fernández E, González A, Lorenzo S, Linfocitos T y B. Clasificación Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales, recuperado 13 Febrero 2009, de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1252689>.
- ❖ Feoktistov I, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D and Biaggioni I. 2004. Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype. *Hypertension.* 44: 649-654.
- ❖ Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock I, Maiolino P, Arra C, Cicala C, Pinto A and Morello S. 2012. Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J Immunol.* 189(5): 2226-2233.
- ❖ Franco E. 1995. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 779-780.
- ❖ Franco R. 2008. Café y cáncer. *Med Clin.* 131(16): 633-635.
- ❖ Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J, 2010, Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties, *Blood Journal.* 114(13): 2632-2638.
- ❖ Fredholm BB, Ap IJ, Jacobson KA, Klotz KN and Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol.* 53: 527-552.
- ❖ Fredholm BB, Chern Y, Franco R and Sitkovsky M. 2007. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol.* 83: 263-276.
- ❖ Friedenstein A, Chailakhyan R, Latsinik N, Panasyuk A and Keiliss-Borok I. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplant.* 17: 331-340.
- ❖ García P. 2007. Qué hay en el horizonte sobre el virus del papiloma humano, vacunas y el control del cáncer cervical. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 24, 272-279.

- ❖ Galoway D, Mc Dugall J. 1996. The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem Cancer Bio.* 7: 309-315.
- ❖ Gariglio P, Rangel L. 1992. Virus and cáncer Review Spanish. *Salud Pública Mex.* 34(3): 308-317.
- ❖ Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gavioli R, Fortini C, Leung E, Mac Lennan S and Borea P. 2004. Expression of A3 adenosine receptors in human lymphocytes: Up- regulation in T cell activation. *Mol Pharm.* 65(3): 711-719.
- ❖ Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébe C. 2012. Production of Adenosine by Ectonucleotidase: A key factor in Tumor Immunoescape. *J Biomed and Biotechnol.* 2012: 473712.
- ❖ Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck R, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75(3): 1565-1670.
- ❖ Glennie S, Soeiro I, Dyson P, Lam E and Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 105(7): 2821-2827.
- ❖ 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 la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed.* 16: 9-111.
- ❖ Gostout B, Ferber M, Thorland E, Brink A, Rapp A, Phillips L, Mc Govern R, Cheung T, Chung T, Fu W, Smith D. 2003. Preferential integration of human Papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene.* 46: 7233-7242.
- ❖ Guermopez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C and Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Immunol.* 20: 621-666.
- ❖ Guzman-Rojas L, Alcocer-Gonzales J, Madrid-Marina V. 1998. Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cáncer. Review Spanish. *Salud Pública Mex.* 40(1): 38-46.
- ❖ Haring JS, Badovinac VP, Harty J. 2006. Inflaming the CD8+ T Cells Response. *Immunity.* 25: 19-29.
- ❖ Haskó G, Linden J, Cronstein B and Pacher P. 2008. Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 7(9): 759-770.
- ❖ Hastie C, Saxton M, Akpan A, Cramer R, Masters RJ and Naaby SH. 2005. Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells. *Oncogene.* 24: 5905-5913.
- ❖ Häusler S, Montalbán I, Strohschein J, Chandran A, Engel J, Hönig A, Ossadnik M, Horn E, Fischer B, Krockenberger M, Heuer S, Seida A, Junker M, Kneitz H, Kloor D, Klotz K, Dietl J and Wischhusen J. 2011. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cell are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Can Immunol Immu.* 60: 1405-1418.
- ❖ Häusler S, Montalbán I, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Hönig A, Dietl J and Wischhusen J. 2014. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cáncer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res.* 6(2): 129-139.
- ❖ Hayes-Jordan A, Wang YX, Walker P and Cox CS. 2014. Mesenchymal stromal cell dependent regression of pulmonary metastasis from Ewing's. *Front Pediatr.* 2:44.

- ❖ Hebner C, Laimins L. 2006. Human papillomavirus: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 16(2): 83-97.
- ❖ Hernández RJ and Becker I, 2006, Linfocitos T cototóxicos en la leishmaniasis cutánea, *Salud Publica Méx,* 48(5):430-439.
- ❖ Hilders C, Ras L, Van Eendenburg J, Nooyen Y, Fleuren G. 1994. Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 15: 57(6): 805-813.
- ❖ Hochhauser E, Leshem D, Kaminski O, Cheporko Y, Vidne B and Shainberg A. 2007. The protective effect of prior ischemia reperfusion adenosine A1 or A3 receptor activation in the normal and hypertrophied heart. *Int CardioVas and Thoracic S.* 6(3): 363-368.
- ❖ Horwitz D, Zheng S, Wang J, Gray D. 2008. The real role of TGF- β in regulatory T cells physiology. *Eur J Immunol.* 36, 912-915.
- ❖ Hoskin D, Mader J, Furlong S, Conrad D and Blay J. 2008. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells. [Review]. *Int Oncol.* 32: 527-535.
- ❖ Houthuijzen JM, Daenen LG, Roodhart JM, Voest EE. 2012. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *BJ Cancer.* 106: 1901-1906.
- ❖ Huang S, Koshiba M, Apasov S and Sitkovsky M. 1997. Role of A2A adenosine receptor-mediated signaling in inhibition of Tcell activation and expansion. *Blood.* 90: 1600-1610.
- ❖ Hung S, Deng W, Yang W, Liu R, Lee C, Su T, Lin R, Yang D, Chang C, Chen W, Wei H and Gelovani J. 2005. Mesenchymal stem cells tragetin of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res.* 11(21): 7749-7756.
- ❖ Hunter MI, Monk BJ and Tewari KS. 2008. Cervical neoplasia in pregnancy. Part 1: screening and management of preinvasive disease. *Obstet Gynecol.* 199: 3-9.
- ❖ INEGI (2010). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx
- ❖ Jiang X, Zhang Y, Liu B, Zhang S, Wu Y, Yu X, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 105(10): 4120- 4126.
- ❖ Jin D, Fan J, Wang L, Thompson L, Liu A, Daniel B, Shin T, Curiel T and Zhang B. 2010. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: A novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *American Association for Cancer Research.* 6: 2245-2255.
- ❖ Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Singhs HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E and Paavonen J. 2007. Efficacy of a quadrivalent prophylactic lysate of human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet.* 369: 1693-1702.
- ❖ Joyce J, Tung J, Przysiecki C, Cook C, Lehman E, Sands J, Jansen K, Keller P. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 5810-5822.
- ❖ Joyce J, Pollard J. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9(4): 239-252.

- ❖ Karnoub A, Dash A, Annie P, Sullivan A, Brooks M, Bell G, Richardson L, Polyak K, Tubo R, Weinberg R. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 449(7762): 557-563.
- ❖ Karp JM and Leng Teo GS. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 4: 206-216.
- ❖ Khakoo A, Pati S, Anderson S, Reid W, Elshal M, Rovira I, Nguyen A, Malide D, Combs C, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers T, Stetler-Stevenson W, Frank J, Reitz M, Finkel T. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 203(5): 1235-1247.
- ❖ Kindt T, Goldsby, R, Osborne B. 2007. *Inmunología de Kuby*, 6ta ed., Ed. McGraw-Hill. Mexico, 15-20pp.
- ❖ Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ and Mosmann TR. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine. *Immunol*. 177: 6780-6786.
- ❖ Koshiba M, Kojima H, Huang S, Apasov S, Sitkovsky M. 1997. Memory of extracellular adenosine/A2a purinergic receptor mediated signalling in murine T cells. *J Biol Chem*. 272: 25881-25889.
- ❖ Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altenerova V, Altaner C. 2010. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer*. 9: 129.
- ❖ Lappas CM, Rieger JM and Linden J. 2005. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *Immunol*. 174: 1073-1080.
- ❖ Lebon G, Warne T, Edwards P, Bennett K, Langmead C, Leslie A and Tate C. 2011. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*. 474: 521-525.
- ❖ Lennon P, Taylor C, Stahl G, Colgan S. 1998. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med*. 188: 1433-1443.
- ❖ Linden J. 2001. Molecular approach to adenosine receptors: receptor mediated mechanisms of tissue protection. *Pharmacol Toxicol*. 41: 775-787.
- ❖ Lizano M, Carrillo A, Contreras A. 2009. Infección por virus del papiloma humano: *Epidemiología, Historia natural y Carcinogénesis*. *Cancerología*. 4: 205-216.
- ❖ Liu Y, Han ZP, Zhang SS, Jing YY, Bu XX, Wang CY, Sun K, Jiang GC, R Li, Gao L, Wu MC and Wei LX. 2011. Effects of inflammatory factor on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem*. 286(28): 25007-15.
- ❖ Lujic B, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, Arsenijevic N, Lukic M and Stojkovic M. 2013. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Scientific Reports*. 3: 2298.
- ❖ Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actor. Are we going a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders. *Hematol*. 92(7): 872-877.
- ❖ Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Smyth MJ, Stagg J. 2013. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(27): 11091-11096.

- ❖ Lorusso G, Curzio Rüegg, 2008. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metástasis, *Histochem Cell Biol.* 130: 1091- 1103.
- ❖ Lowy D, Schiller J. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccine. *J. Clin. Invest.* 116(5): 1167-1173.
- ❖ Lu X-X, Chen Y-T, Feng Bing, Mao X-B, Yu B and Chu X-Y. 2013. Expression and clinical significance of CD73 and hipoxia-inducible factor-1 α in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 19(12): 1912-1918.
- ❖ Madara J, et al., 1993. 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest.* 91: 2320-2325.
- ❖ McLaughlin-Drubin E and Münger K. 2009. Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res.* 143(2): 195-208.
- ❖ McMillan N, Payne E, Frazer I and Evander M. 1999. Expression of the α 6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cell. *Virology.* 261: 271-279.
- ❖ Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll proteins signals activation of adaptative immunity. *Nature.* 388(6640): 394-397.
- ❖ Mikhailov A, Sokolovskaya A, Gennady G, Amdahl Y, Anne H, West A, Yagita H, Lahesmaa R, Linda F, Thompson N, Jalkanen S, Blokhin D and Eriksso JE. 2008. CD73 participates in celular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *Immunol.* 181: 464-475.
- ❖ Minguet S, Hube M, Rosenkranz L, Schamel WL, Reth M and Brummer T. 2005. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-Kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Immunol* 35: 31-41.
- ❖ Mirabet M, Herrera C, Cordero OJ, Mallol J, Lluís C, Franco R. 1999. Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J Cell Sci.* 112: 491-502.
- ❖ Molling J, de Grujil T, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer C, van den Eertwegh A, Scheper R, von Blomberg M, Bontkes H. 2007. CD4 (+) CD25 hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 121(8): 1749-1755.
- ❖ Moodley M. 2005. Update on pathophysiologic mechanisms of human papillomavirus. *Obstet Gynecol.* 17: 61-64.
- ❖ Montesinos J, Flores E, Castillo S, Flores P, Hernández E, Fajardo G, Orozco S, Mayani H. 2009. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and naural protein expression. *Cytotherapy.* 11(2): 163-176.
- ❖ Montesinos Juan J. 2010, *Celulas Troncales Mesenquimales*, Unidad de Investigación Médica en enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI, IMSS, *Revista de Hematología*, 11: 15-17.
- ❖ Montesinos JJ, Mora-García Mde L, Mayani H, Flores-Figueroa E, García-Rocha R, Fajardo-Orduña GR, Castro-Manrreza ME, Weiss-Steider B, Monroy-García A. 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 Dev.* 2013, 15;22(18):2508-19.

- ❖ Morales Ramírez O. 2014. 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 Maestría en Ciencias Químico Biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- ❖ Murphy M, Moncivais K and Caplan A. 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp & Mole Med.* 45: e54.
- ❖ Navarro RG. 2013. Análisis del papel antagonista de la cafeína en la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por células estromales mesenquimales de cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu) a través de la vía Adenosinérgica. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- ❖ Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65(8): 3307-3318.
- ❖ Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y and Hamada H. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11(14): 1155-1164.
- ❖ Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 2007. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 98(6): 874-881.
- ❖ Nauta A. and Fibbe WE. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 110(10): 3499-506.
- ❖ Nizar S, Copier J, Meyer B, Bodman SM, Galustian C, Kumar D and Dalglish A. 2009. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy. *Cancer.* 100: 1697-1703.
- ❖ Otha A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukasev D, Wong MKK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S and Sitkovsky M. 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 13132-13137.
- ❖ Páez D, Arévalo J, Rodríguez Y. 2007. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 5: 101-212.
- ❖ Pagliusi SR and Aguado MT. 2004. *Vaccine.* 23: 569-578.
- ❖ Patterson N, Smith J, Ozburn M. 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Virology.* 79: 6838-6847.
- ❖ Pellegatti P, Raffaghello Z, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V and Di Virgilio F. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One.* 3(7):e2599.
- ❖ Piersma S, Jordanova E, Van Poelgeest M, Kwappenberg K, Van der Hulst M, Drijfhout J, Melief C, Kenter G, Fleuren G, Offringa R, Van der Burg S. 2007. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer Res.* 67(1): 354-361.
- ❖ Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science.* 284(5411): 143-147.

- ❖ Potian J, Aviv H, Ponzio N, Harrison J, Rameshwar P. 2003. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol.* 171(7): 3426-3434.
- ❖ Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi M, Poggi A, 2007. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematol.* 92(7): 881-888.
- ❖ Quail DF, Joyce JA, 2013, Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 19(11): 1423-1437.
- ❖ Rabinovich G, Gabrilovich D and Sotomayor E. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 25: 267-296.
- ❖ Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D and Dazzi F. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Nat Publish Group.* 21: 304-310.
- ❖ 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(8): 1208-1213.
- ❖ Rasmusson I. 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312: 2169-2217.
- ❖ Reichelt ME, Willems L, Molina JG, Sun CX, Noble JC, Ashton KJ, Schnermann J, Blackburn MR and Headrick JP. 2005. Genetic deletion of the A1 Adenosine receptor limits Myocardial Ischemic tolerance. *J American Heart Ass.* 96: 363-367.
- ❖ Resta R and Thompson L. 1997. T cell signalling through CD73. *Cell Signal.* 9: 131-139.
- ❖ Rincon OL, Pareja EL, Jaramillo S and Aristizabal F. 2007. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Obstet Ginecol* 58: 2002-212.
- ❖ Robson S, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K and Enjyoji K. 2005. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost.* 31: 217-233.
- ❖ Roitt IM Delves P, Martin SJ and Burton DR. 2008. *Inmunología Fundamentos.* 11 ed. Editorial Médica Panamericana: 13-26.
- ❖ Ruddon W. 2007. *Cancer Biology.* 4^a ed. Oxford University Press. 4-5, 400-404 pp.
- ❖ Rudolf MP, Man S, Melief CJM, Sette A and Kast M. 2001. Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. *Cancer.* 7: 7885-7955.
- ❖ Ryzhov S, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I and Feoktistov I. 2004. adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A2B-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J Immunol.* 172: 7726-7773.
- ❖ Ryzhov S, Novitskiy SV, Zaynagentdinov R, Goldstein AE, Carbone DP and Biaggioni I. 2008. Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia* 10: 987-995.
- ❖ Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C and Lacopetta B, 2009, Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Oncol.* 27: 186-192.

- ❖ 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 Cell Res.* 7: 66-74.
- ❖ Salit RB, Kast WM and Velders MP. 2002. Ins and outs of clinical trials with peptide-based vaccines. *Frontiers in Bioscience.* 7: e204-e213.
- ❖ Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella E and Desechaseaux F, 2008, Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T Lymphocyte and Natural Killer function and to induce CD4+CD25FOXP3+ regulatory T cells, *Stem Cells*, 26:212-22.
- ❖ Sevigny C, et al. 2007. Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* 178: 4240-4249.
- ❖ Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC and Wacholder S. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 370: 890-907.
- ❖ Sitkovsky M. 2003. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol.* 65: 493-501.
- ❖ Sitkovsky M, Kjergaard J, Lukashev D and Otha A. 2008. Hypoxia adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res.* 14: 5947-52.
- ❖ Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson S and Otha A. 2008. Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol.* 153: S457-64.
- ❖ Szychala J. 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 87: 161-173
- ❖ Szychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue L, Jin A and Mitchell B. 2004. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer.* 10: 708-717.
- ❖ Stagg J. 2008. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev.* 4(2): 119-124.
- ❖ Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer KM and Smyth MJ. 2010. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *PNAS.* 107(4): 1547-1552.
- ❖ Stanley M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 24S1: S1/16-S1/22.
- ❖ Starcevic LS, Elferink C and Novak FR. 2001. Progressive Resistance to Apoptosis in a Cell Lineage Model of Human Proliferative Breast Disease. *Cancer* 93: 776-782.
- ❖ Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Fernandes P, Wink M, Azambuja A, Barrios C, Bueno F and Oliveira A. 2009. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol.* 1016: 021-035.
- ❖ Stern PL. 2005. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *Clinical Virology* 32S: S72-S81.
- ❖ Stites A, Terr A and Parslow T. 2000. *Inmunología básica y clínica.* 9ª ed. Editorial el manual moderno. México. Pp. 200-250.
- ❖ Sun X, Cai H, Quian H, Zhu W, Yan Y, Xu H and Xu W. 2011. Mesenchymal stem cells isolated from human uterine cervix cancer tissues. *Cell Biol Inter.* 35: 119-123.
- ❖ Sun Z, Wang S and Chunhua ZR, 2014. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology.* 7:14.

- ❖ Takedachi M, et al. 2008. CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. *J Immunol* 180: 6288-6296.
- ❖ Thiel M, Caldwell C and Sitkovsky M. 2003. The critical role of adenosine A (2A) receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious. *Microbes Infect.* 5(6)_ 515-26.
- ❖ Tindle R. 2002. Immune evasión in human papillomavirus-associated cervical cáncer. *Nature Rev.* 2:1-7.
- ❖ Thompson LF, Eltzsching HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC and Colgan SP. 2004. Crucial role for ecto-50-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hipoxia. *Med* 200: 1395-1405.
- ❖ Torres Pineda DB. 2015. Análisis de la expresión de la vía adenosinérgica (cd39/cd73/adenosina) en tumores de cáncer de cuello uterino. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- ❖ Tse W, Pendleton J, Beyer W, Egalka M and Guinan E. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplant.* 75(3): 389-397.
- ❖ Turley E, Veiseh M, Radisky D, Bissell M. 2008. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition-does celular plasticity fuel neoplastic progression?. *Nat Clin Pract Oncol.* 5(5): 280-290.
- ❖ Tuyraerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K and Bonehill A. 2007. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cáncer immunotherapy. *Cancer Immunol.* 56: 1513-1537.
- ❖ Van Leeuwen J, Samelson L. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol.* 11(3): 242-248.
- ❖ Visser J, Nijman H, Hoogenboom B, Jager P, VAN Baarle D, Schuurung E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee A, Daemen T. 2007. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 150(2): 199-209.
- ❖ Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah H, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cáncer worldwide. *J. Pathol.* 189(1): 12-19.
- ❖ Wang HY and Wang RF. 2007. Regulatory T cells and cáncer. *J Immunol.* 19: 217-223.
- ❖ Wang L, Zhou X, Zhou T. 2008. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasión, migration and adhesión of human breast cáncer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134: 365-372.
- ❖ Wu D and Meydani SN. 2008. Age-associated changes in immune and inflammatory responses. Impact of vitamin E intervention. *Leukoc Biol.* 84: 900-914.
- ❖ Xiong L, Wen Y and Yang Z. 2014. NT5E y FCGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cáncer. *Cell Tissue Res.* 355(2): 365-374.
- ❖ Xu S, Shao QQ, Sun JT, Yang N, Xie Q, Wang DH, Huang QB, Huang B, Wang XY, Li XG and Qu X. 2013. Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro Oncol.* 15(9): 1160-72.
- ❖ Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD and Ravid K. 2006.

The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. Clin Invest 116: 1913-1923.

- ❖ Yen B, Yen M. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer-for better or for worse. Cancer Mol. 4, 5-9.
- ❖ Yugawa T, Kiyono T. 2009. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Rev Med Virol. 19: 97-113.
- ❖ Zhang B. 2010. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. Cancer Res. 70 (16): 6407-6411.
- ❖ Zhang N and Bevan MJ.2012. CD8+ T Cells: Foot soldiers of the Immune system. Immunity. 35 (2): 161-168.
- ❖ Zhu W, Xu W, Jiang R, QianH, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. Exp Mol Pathol. 80(3): 267-274.
- ❖ Zhu W, Huang L, Li Y, Gu J, Yan Y, Xu X, Wang M and Xu w. 2012. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo, Cancer Letters. 315(1): 28-37.
- ❖ Zou W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. Cancer 5: 263-274.
- ❖ Zur Hausen H. de Villiers E. 1994. Human Papillomaviruses. Annu Rev Microbiol. 48, 427-447.
- ❖ Zur Hausen H. 1999. Papillomaviruses in human cancers. Proc. Assoc. Am Physician. 111: 581-587.
- ❖ <http://dimygen.webcindario.com/31.html>