



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIÓLOGO



ÁREA DE INVESTIGACIÓN: BIÓLOGÍA DEL DESARROLLO

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA LABORATORIO DE
INMUNOBIOLOGÍA

“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES
MESENQUIMALES SOBRE LA INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN
UN MODELO TUMORAL MURINO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

CORTÉZ ESCANDÓN RAISA PAMELA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCIA

ASESOR INTERNO: DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA

MÉXICO, D.F. 2016





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.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS, con el apoyo financiero del proyecto: Análisis de la participación de las células estromales mesenquimales derivadas de tumores de cáncer cérvico-uterino en el reconocimiento inmune de células tumorales cervicales. Financiado por: FIS/IMSS/PROT/MD13/1258. Periodo: 2014-2015.

Asimismo se contó con el apoyo del Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza. Investigación realizada gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM**, clave del proyecto IN217013: Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivados de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73. Periodo 2013-2015.

“Nunca consideres el estudio como una obligación,
si no como una oportunidad para penetrar en el bello
y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein.

Tan buenos momentos
tanto andar como el quijote contra del viento
tanto miedo de vivir en la aventura
de tratar de ser feliz con mi locura
tantos amigos tantas cervezas
tantos bagartos tantas princesas
las razones que me hacen aguantar!
Tantos kilometros yo recorri por vos
¿será que todavía me hace feliz?
Hay tantas cosas que se pueden complicar
pero antes muerto que dejar de soñar

Agradecimientos

Agradezco al laboratorio de Inmunobiología de las FES Zaragoza, UNAM donde se me brindo todo el apoyo para poder concluir este proyecto en especial al Dr. Alberto Monroy García y a la Dra. Maria de Lourdes Mora García porque sin todo su apoyo esto no sería posible, porque no solo son grandes seres humanos, si no también son profesores que inspiran esa pasión que sienten por la investigación y te inspiran a siempre querer conocer más. Por todas sus enseñanzas, por su paciencia, sus consejos y su guía, por eso y más gracias.

Gracias al Dr. Jorge Hernández Montes por el apoyo que me brindo para realizar las pruebas, por todo ese conocimiento que siempre está dispuesto a compartir gracias

A todos aquellos compañeros con los que tuve el honor de compartir este laboratorio: Francisco, Selene, Arturo, Luis, Vianey y Azucena gracias por todo el apoyo, por compartir conmigo todas las técnicas de laboratorio, por hacer de esa estancia siempre agradable. De todos he aprendido algo gracias por enriquecer mi vida.

A mis amigos incondicionales que hicieron de mi vida en la FES Zaragoza una experiencia inolvidable: Eduardo, Lagartin, Nuria, Rodrigo, Mariana, Rafael, Gerardo, Ernesto y a todos aquellos que dejaron huellas en mi vida muchas gracias por estar a lo largo de este camino.

A mis sinodales que hicieron que este trabajo fuera mejor con cada uno de sus consejos y observaciones, permitiéndome aprender siempre de ellos.

Dr. Benny Weiss Steider, Dr. Alberto Monroy Garcia. Dra. Maria de Lourdes Mora García, Dra. Rosalva Rangel Corona y Biól. Carlos Martínez Montoya.

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a mis hermanos Vladimir y Perla por siempre estar ahí para mí, pero sobre todo a mi madre porque sin ella nada seria posible. Gracias por ser siempre mi apoyo.

A todos y cada uno de los miembros de la familia Escandón Ruedas por darme la mejor infancia que se puede tener, porque he tenido más momentos de felicidad que de tristeza, porque aun sin merecerlo han estado ahí para mí de manera incondicional, por cada fiesta, por cada pastel, por cada vez que me brindaron su apoyo, gracias. Porque con ustedes he entendido los valores de unidad, de amor y de complicidad, porque no seremos la mejor familia, pero si somos una gran familia.

A ti Luis agradezco a la vida que te pusiera en mi camino, gracias por ser mi compañero incondicional por todo el apoyo y por todo lo que me das, gracias por los momentos de locura y por enseñarme que es un amor verdadero.

ÍNDICE

1. Abreviaturas utilizadas.....	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción.....	4
4. Marco Teórico.....	6
4.1. Sistema inmune.....	6
4.1.1. Inmunidad innata.....	7
4.1.2. Inmunidad adaptativa.....	8
4.1.2.1. Inmunidad celular.....	8
4.1.2.2. Inmunidad humoral.....	9
4.1.2.2.1. Anticuerpos.....	10
4.1.2.2.2. Anticuerpos y el sistema de complemento.....	13
4.2. Evasión del sistema inmune.....	15
4.3. Virus del papiloma humano.....	17
4.4. Cáncer cérvico-uterino.....	18
4.5. Microambiente tumoral.....	20
4.6. Células estromales mesenquimales.....	22
5. Planteamiento del problema y justificación.....	24
6. Hipótesis.....	25
7. Objetivos.....	25
7.1. Objetivo general.....	25
7.2. Objetivos particulares.....	25
8. Material y métodos.....	26
8.1. Cultivos celulares.....	26
8.2. Ratones.....	26
8.3. Inmunización.....	27
8.4. Inoculación de células TC-1 para inducir tumores.....	27
8.5. Medición de tumores.....	28
8.6. Recolección de sueros.....	28
8.7. Detección de anticuerpos anti-células tumorales TC-1 en suero de ratón.....	28
8.8. Citotoxicidad de células TC-1 mediada por anticuerpos y complemento.....	29
9. Resultados.....	30
10. Análisis de resultados.....	41
11. Conclusión.....	45
12. Perspectivas.....	46
13. Bibliografía.....	47

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTES

Cáncer cérvico-uterino.....	CaCu
Células Estromales Mesenquimales.....	CEMs
Células Estromales Mesenquimales de cáncer cérvico-uterino.....	CEMs-CaCu
Células Estromales Mesenquimales de tejido cervical normal.....	CEMs-CxN
Células Estromales Mesenquimales Médula ósea normal.....	CEMs-MON
Células presentadoras de antígenos.....	CPA
Complejo principal de histocompatibilidad.....	MHC
Factor de Crecimiento Tumoral beta.....	TGF- β
Factor de Necrosis Tumoral alfa.....	TNF- α
Inmunoglobulina.....	Ig
Interleucina.....	IL
Interferón gamma.....	IFN- γ
Neoplasia Intraepitelial Cervical.....	NIC
Linfocitos T citotóxicos.....	CTL
Linfocitos T cooperadores.....	Th
Región Larga de Control.....	RLC
Virus del papiloma humano.....	VPH

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la tercera causa de muerte en mujeres a nivel mundial. (Globocan, 2012). Descubierta por Harald zur Hausen y Lutz Gissman entre 1981 y 1984, el Virus de Papiloma Humano (VPH) es el principal agente etiológico de CaCu, y está asociado al 99% de las neoplasias genitales. (Moody, 2010, Kanodia, 2007, National Cancer Institute, 2011). Las células epiteliales del cuello uterino infectadas por VPH de alto riesgo generan mecanismos inmunosupresores y evasores de la respuesta inmune, además de favorecer el reclutamiento de células no tumorales que dan soporte y promueven la progresión del tumor. Un ejemplo de éstas son las células progenitoras no hematopoyéticas denominadas Células Estromales Mesenquimales (CEMs), las cuales se caracterizan por tener una morfología fibroblastoide, y capacidad de diferenciación a varios linajes celulares. Estudios recientes han mostrado que las CEMs presentes en el microambiente tumoral, tienen la capacidad de inhibir la función efectora de linfocitos T, favoreciendo así el crecimiento tumoral (Hanchen Li, 2007; Dvorak, 2011, Poggi *et al* 2014, Locatelli *et al*, 2007).

Aunque también es conocido que las CEMs inhiben la activación de linfocitos B, existe poca información sobre el efecto de las CEMs en la inducción de anticuerpos que reconozcan y eliminen a células tumorales. En el presente estudio se analizó el efecto de CEMs provenientes de diversos tejidos (tejido cervical normal, de tumores de CaCu, y de Medula Ósea Normal) sobre la inducción de anticuerpos con actividad citotóxica contra células tumorales TC-1 (Positivas a la expresión de las proteínas E6 y E7 de VPH-16) en un modelo tumoral de ratones de la cepa C57BL/6, con y sin previa protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH-16.

Los grupos de ratones fueron monitoreados durante 40 días para evaluar el crecimiento tumoral y la presencia de anticuerpos específicos contra células tumorales TC-1. Los ratones que recibieron células tumorales TC-1 y fueron co-inoculados con las diferentes CEMs, en ausencia de protección inmunológica, no mostraron diferencias significativas en el crecimiento tumoral, respecto al grupo de ratones tratados con solo las células TC-1. Sin embargo, el efecto protector del crecimiento tumoral dado por el péptido RAHYNIVTF, fue revertido en los grupos de ratones que recibieron simultáneamente CEMs. De manera interesante, los ratones que fueron co-inoculados con CEMs-CaCu y TC-1 presentaron el crecimiento tumoral más grande (4.0cm^3). La producción de anticuerpos con actividad citotóxica contra células tumorales TC-1 en ratones sin inmunizar o inmunizados fue mayor en los ratones tratados con TC-1 o con TC-1 más CEMsCxN o CEMs-MO. De manera importante, los ratones que fueron inoculados con CEMs-CaCu mostraron inhibición en la producción de anticuerpos

con actividad citotóxica contra las células tumorales TC-1, particularmente en aquellos que fueron previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF. Se concluye que la inoculación de CEMs-CaCu en condiciones de activación de la respuesta inmune a través de la inmunización previa, favoreció la capacidad inmunosupresora de las mismas. Lo cual será importante considerar en la reactivación de la respuesta inmune antitumoral al desarrollar protocolos de terapia antitumor.

INTRODUCCIÓN:

Denominado como un problema no solo de salud sino también como un problema social, el Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en mujeres por tumores malignos en México, donde cobra la vida de alrededor de 4 mil mujeres de manera anual. El CaCu es prevenible, incluso, tratable si se detecta a tiempo, sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos en cuanto al diagnóstico, esta enfermedad silenciosa es detectada en etapas avanzadas y el tratamiento requiere de una intervención quirúrgica, complementada con radioterapia o quimioterapia, así como la prescripción de medicamentos, que cada vez son más y más caros, y es difícil ofrecerlo a la población abierta (INEGI 2012, Incan, 2015).

Por tanto nuevas investigaciones han sido encaminadas en el desarrollo de nuevas ideas de tratamientos y objetivos terapéuticos basados y dirigidos no solo a las células cancerígenas, sino también al ambiente que las rodea. El comportamiento de los tumores no está enteramente determinado por células tumorales. Se ha demostrado que una gran variedad de células no tumorales dentro del microambiente tumoral afectan el comportamiento del tumor (Mantovani A, 2010, Coussens LM, 2002, Park YJ, *et al.*, 2013). El microambiente tumoral representa el sitio donde el tumor intenta sobrevivir y escapar del sistema inmune donde la proliferación de las células tumorales puede desviar la respuesta inmune induciendo la generación de células supresoras y células reguladoras las cuales pueden limitar la eficacia de los linfocitos efectores en la eliminación de células neoplásicas (Mantovani A, 2010; Whiteside TL, 2008).

Las Células Estromales Mesenquimales (CEMs) son un importante componente del microambiente tumoral, sin embargo estudios previos han producido resultados controversiales con respecto a si promueven, inhiben, soportan o facilitan la progresión y el crecimiento del tumoral. Esto es gracias a las características de la membrana de las CEMs que expresan un numero amplio de receptores de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias, así como tienen plasticidad específicamente en diferentes microambientes o bajo condiciones de inducción diferentes. (Nuschke A. 2013; Jones BJ, *et al.*, 2008; Kunz-Schughart LA, 2002.)

Además de existir CEMs de médula ósea, existen células con similares características residentes en prácticamente en todos los órganos humanos. Y estudios han revelado que estas CEMs son reclutadas en los tumores lo que ha llevado a poner un gran interés en la función que tiene las CEMs en los tumores (Gottschling S, *et al.*, 2013; Contreras, 2010; Teo GS, *et al.*, 2012).

Siguiendo esa dirección, resulta importante determinar el impacto que tienen las CEMs en el desarrollo tumoral, asimismo conocer el papel inmunosupresor que ejercen en los tumores, con dicho fin en el presente estudio se analizó la capacidad de las CEMs humanas derivadas de Médula Ósea, Cervix Normal y CaCu (CEMs-CxN, CEMs-CaCu y CEMs-MON) para promover el crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H-2D^b) inducido células tumorales TC-1 (células derivadas de carcinoma de pulmón de ratón de la cepa C57BL/6) en presencia y ausencia de protección inmunológica (inmunización otorgada mediante 3 dosis del péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH-16), así como la influencia inmunosupresora que las distintas estirpes de CEMs tienen en la generación y funcionalidad de anticuerpos específicos hacia las células tumorales TC-1.

MARCO TEORICO:

Sistema Inmune

El cuerpo humano está compuesto por distintos órganos y sistemas, cada uno con funciones específicas, que mantienen al cuerpo en perfecto balance. Sin embargo, nuestro entorno contiene una enorme variedad de agentes infecciosos, como virus, bacterias y sustancias capaces de ingresar al organismo, producir enfermedad y si se multiplican sin control, provocar la muerte (Male, D. *et al.*, 2013). Oponer resistencia a la enfermedad es un proceso fundamental para la supervivencia, esta resistencia es mediada por una serie de células, tejidos y moléculas encargadas de controlar, proteger y eliminar microorganismos, reaccionando a los componentes de los microbios, así como a las macromoléculas producto de células dañadas, como proteínas y polisacáridos y pequeñas sustancias químicas que son reconocidos como extraños, impidiendo su diseminación y evitando una repercusión fisiológica o patológica. Esta respuesta global es coordinada por el sistema inmune (Abbas A.K., *et al.* 2012; Male, D. *et al.* 2013; Parham, 2009).

Se puede considerar que el sistema inmune posee una serie de propiedades fundamentales que lo diferencian de todas las otras defensas del cuerpo:

- **Especificidad;** es decir, la propiedad de reconocer y distinguir un número grande de moléculas blanco distintas y responder (o no hacerlo) a cada una de ellas de manera individual, siendo capaz de discernir las diferencias sutiles en la estructura de dos epítomos
- **Diversidad;** esta propiedad permite a los linfocitos el reconocer un número elevado de antígenos.
- **Memoria;** esto es, la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas con un agente patógeno, aumentando la capacidad de combatir infecciones repetidas por el mismo organismo.
- **Expansión clonal;** designa a un aumento en la cantidad de células específicas para el mismo antígeno.
- **Especialización;** genera respuestas que son óptimas para la defensa contra diferentes tipos de microbios.
- **Contención y homeostasis;** permite al sistema inmunitario recuperarse de una respuesta de modo que pueda responder de forma eficaz a los antígenos con los que se encuentre de nuevo.
- **Falta de reactividad a lo propio;** efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, de manera que puede estar pacíficamente con todas las múltiples proteínas y otras materias orgánicas que constituyen al huésped (Abbas A.K,*et al.* 2012; Roitt *et al.*, 2004).

Este proceso de defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones de la inmunidad innata y por las reacciones tardías de la inmunidad adaptativa (Figura 1) (Abbas A.K, *et al.*, 2012).

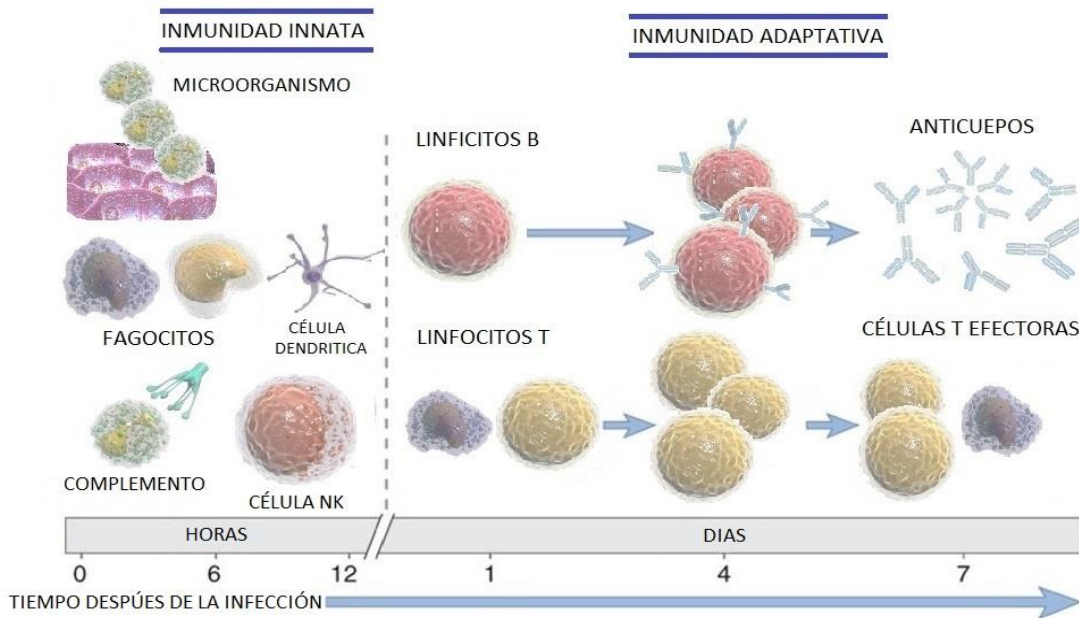


Figura 1. Esquema de las reacciones del sistema inmune (Adaptado de Abbas A.K, *et al.* 2012)

Inmunidad Innata

La inmunidad innata o inmunidad natural constituye la primera línea de defensa y consta de mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que existen antes incluso de la infección y pueden responder con rapidez a ella (Abbas A.K., *et al.* 2012).

El sistema inmune innato se compone básicamente por barreras físicas y químicas, tales como los epitelios y sustancias producidas en la superficie de los epitelios. Las células fagocitarias (como macrófagos y neutrófilos) y células citolíticas naturales (células NK) son un componente fundamental en este sistema; además de diversas proteínas sanguíneas, como son las citocinas que regulan y coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular, constituyendo de esta manera a la defensa inicial frente a las infecciones (Figura 1) (Abbas A.K., *et al.*, 2012, Male, D. *et al.*, 2013).

Una vez que el patógeno ha sido reconocido, la segunda parte de la respuesta implica la puesta en marcha de mecanismos efectores destructivos que acaban con él y lo eliminan (Parham, 2009).

Inmunidad Adaptativa

Por su parte la inmunidad adaptativa es un proceso que se desarrolla más tarde y se basa en la activación de células, teniendo como característica una especificidad extraordinaria para macromoléculas diferentes y su capacidad para recordar y responder con mayor intensidad tras exposiciones repetidas ante el mismo microorganismo (Abbas A.K, *et al.* 2012).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas: la inmunidad humoral y la inmunidad celular, las cuales están mediadas por un grupo especializado de leucocitos, los linfocitos, que desempeñan funciones protectoras muy diferentes. La inmunidad humoral cuenta con moléculas presentes en la sangre llamadas anticuerpos que son producidos por unas células denominadas linfocitos B. Mientras que la inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T (Figura 1) (Abbas A.K, *et al.*, 2012; Male, D., *et al.* 2013).

Inmunidad Celular

La respuesta inmunitaria celular consiste en el desarrollo de linfocitos T efectores a partir de células vírgenes en los órganos linfáticos periféricos. La fase efectora es iniciada con el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T. Los linfocitos T reconocen los antígenos protéicos de los microbios que se muestran en las superficies de las células infectadas en forma de péptidos unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Hacia el final de su proliferación, los linfocitos T activados adquieren la capacidad de reconocer de manera específica al antígeno específico sin la necesidad de requerir de señales co-estimuladoras. Después de diferenciarse en los tejidos linfáticos secundarios, los linfocitos T efectores experimentan cambios en los tipos y la abundancia de las proteínas presentes en la superficie celular (Abbas A.K, *et al.*, 2012).

Los linfocitos T constan de poblaciones con funciones diferentes, entre la cuales están los linfocitos T citotóxicos y los T cooperadores (Th) (Figura 1). Los linfocitos CD8+ activados proliferan y se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL), utilizan sus receptores para reconocer a péptidos antigénicos unidos a moléculas MHC clase I dispuestos en la membrana de las células blanco, como son las células infectadas por virus, o las células tumorales. La unión directa de los CTLs con las

células blanco, genera poros en su membrana mediante la liberación de proteínas llamadas perforinas, o mediante la unión de las moléculas de superficie de Fas y FasL, induciendo apoptosis y muerte de la célula blanco. Por otro lado, los linfocitos TCD4+ maduros son heterogéneos en cuanto a las moléculas de superficie celular que expresan, las citocinas que secretan y los efectos funcionales que tienen sobre otras células del sistema inmunitario. Existen 2 tipos de células cooperadoras llamadas Th1 y Th2. Una respuesta sesgada hacia los linfocitos Th1 corresponde a los que se ha descrito como inmunidad mediada por células. En contraste una respuesta Th2 se dirige hacia la generación de anticuerpos para constituir a la inmunidad humoral (Abbas A.K, *et al.*, 2012; Parham, 2006).

Los linfocitos Th1 son células que se activan por las citocinas IL-12 e IFN- γ secretadas por las células dendríticas. La IL-2 secretada por los linfocitos Th1 estimula la proliferación de linfocitos T. Además permite la activación de linfocitos T, B y células NK (Janeway 2008).

La principal función de los linfocitos Th2 es la activación y expansión clonal de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas, en especial de isotipo IgM, IgA e IgE. La IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 son factores de crecimiento para células B, en tanto, la IL-10 inhibe la activación de los macrófagos. La IL-4, IL-10 y TGF- β secretados por los linfocitos Th2 promueven las respuestas mediadas por anticuerpos, no solo mediante la estimulación de la producción de los anticuerpos y el cambio de isotipo, si no también mediante la disminución simultánea de la actividad de las células de la vía Th1 (Figura 1) (Gómez-Lucía, *et al.*, 2007, Janeway 2008).

Inmunidad Humoral

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas, esto es gracias a la participación de moléculas denominadas inmunoglobulinas o anticuerpos que son producidos por los linfocitos B, que al ser secretados pueden unirse a éstos para facilitar su eliminación (Roitt., *et al.*, 2004; Abbas A.K., *et al.*, 2012).

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y emergen como células maduras vírgenes y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos en los órganos linfáticos secundarios, donde son activados por células presentadoras de antígenos (CPA) como son las células dendríticas, en presencia de citocinas producidas por los linfocitos Th. Una vez que célula B virgen encuentra un antígeno es activada, esto emprende una fuerte regulación de proliferación y un programa de diferenciación hacia células efectoras plasmáticas

productoras de anticuerpos antígeno-específicos. Los anticuerpos en el plasma celular son secretados por largo tiempo. Éstos son solubles e idénticos a las versiones que se unen a la membrana de las células B maduras cuando éstas salen de la médula ósea. En este primer encuentro con el antígeno, la respuesta primaria de los anticuerpos es generada, una exposición a una subsecuente infección conduce a la activación de linfocitos B de memoria induciendo una respuesta secundaria más grande y rápida de anticuerpos, con una alta afinidad por el antígeno de destino; este proceso es explotado en la vacunación profiláctica (Yoshida, *et al.*, 2010; Batista, F. D., & Harwood, N. E. 2009; Stanley, 2006).

Anticuerpos.

Los anticuerpos son glicoproteínas en forma de Y producidas por las células plasmáticas y pertenecen a una familia de proteínas denominadas gammaglobulinas. Los anticuerpos están constituidos por 4 cadenas peptídicas: 2 cadenas ligeras (L) idénticas y 2 cadenas pesadas más grandes (H). Cada cadena L está unida a una cadena H mediante puentes disulfuro. (Figura 2)

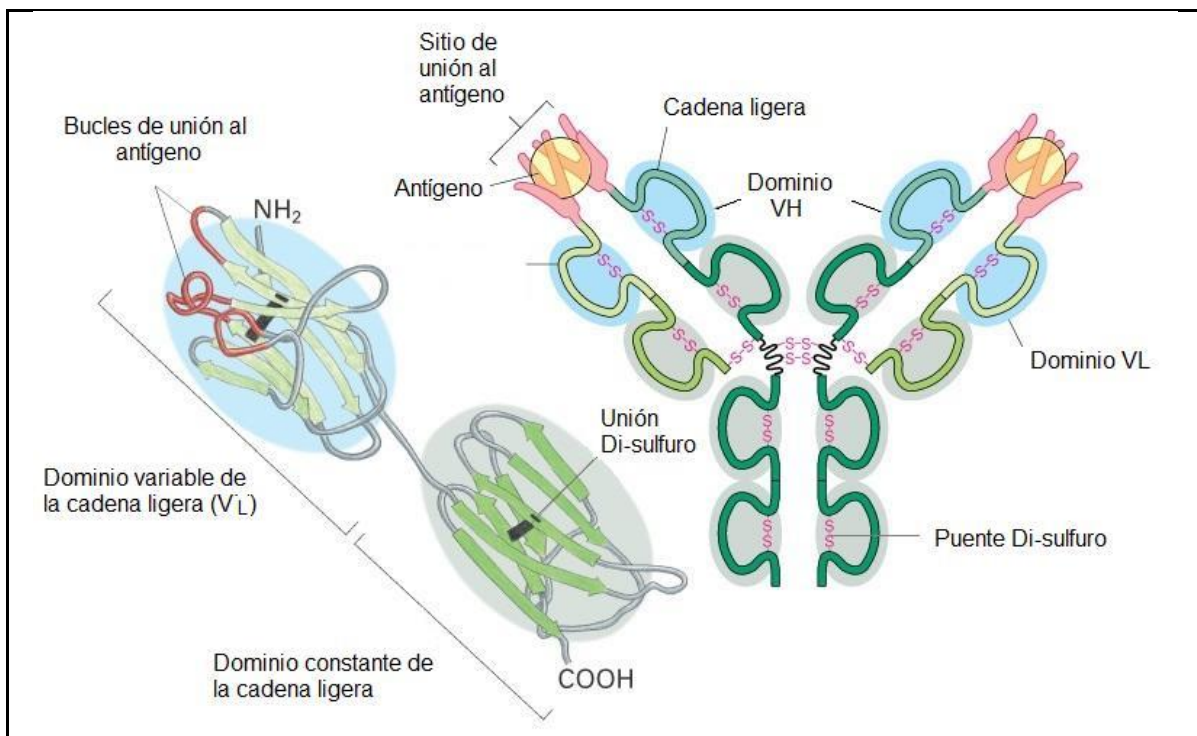


Figura 2. Estructura de las Inmunoglobulinas o anticuerpos donde se muestran la Fracción variable de la cadena ligera (VL), la Fracción variable de la cadena pesada (VH), los Dominios de la cadena pesada en los que se concentran las funciones de reconocimiento antigénico (CH1, CH2), la Fracción de unión antigénica (Fab) y la Fracción cristalizante (Fc) conformada por CH2, CH3 de ambas cadenas pesadas y la bisagra (Tomado y Adaptado de Alberts B, 2013).

Las inmunoglobulinas o anticuerpos tienen la propiedad de unirse específicamente al antígeno que indujo su formación. Tras la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), las sustancias extrañas (o antígenos) son destruidas por las inmunoglobulinas a través de mecanismos, que pueden ser diferentes según el tipo de inmunoglobulina que participa (Abbas, *et al.*, 2012).

Los anticuerpos en sí mismos no son tóxicos ni destructivos para los patógenos; su misión consiste simplemente en unirse con firmeza a ellos. Estos anticuerpos reconocen específicamente los antígenos dirigen su acción para su eliminación por diversos mecanismos efectores. Una forma en la que los anticuerpos reducen las infecciones consiste en su estrecha unión con un sitio del patógeno para inhibir su desarrollo, su replicación o su interacción con las células humanas. Este mecanismo se llama neutralización. Pero los anticuerpos también actúan como adaptadores moleculares que se unen a los patógenos con sus brazos de unión al antígeno y a los receptores de las células fagocitarias con sus regiones Fc. A este proceso se le llama opsonización. Mientras que el complemento es un medio general para etiquetar casi cualquier componente de la superficie de un microorganismo; además de ayudar a los macrófagos residentes a fagocitar patógenos (Figura 3) (Parham, 2009).

En el humano existen cinco isótopos de inmunoglobulinas (IgM, IgA, IgG, IgE, IgD), los cuales tienen propiedades distintas: la IgM es del isotipo predominante en las respuestas primarias, mientras que en las respuestas secundarias se encuentran mayoritariamente IgG con IgA e IgE. En cualquier respuesta de anticuerpos el primer anticuerpo que se produce es de la clase IgM, activando principalmente el sistema de complemento. En una fase posterior de la respuesta inmunitaria, el anticuerpo dominante transportado por la sangre es la molécula IgG, mientras los anticuerpos de la clase IgA es predominante en secreciones corporales y mucosas (Parham, 2009).

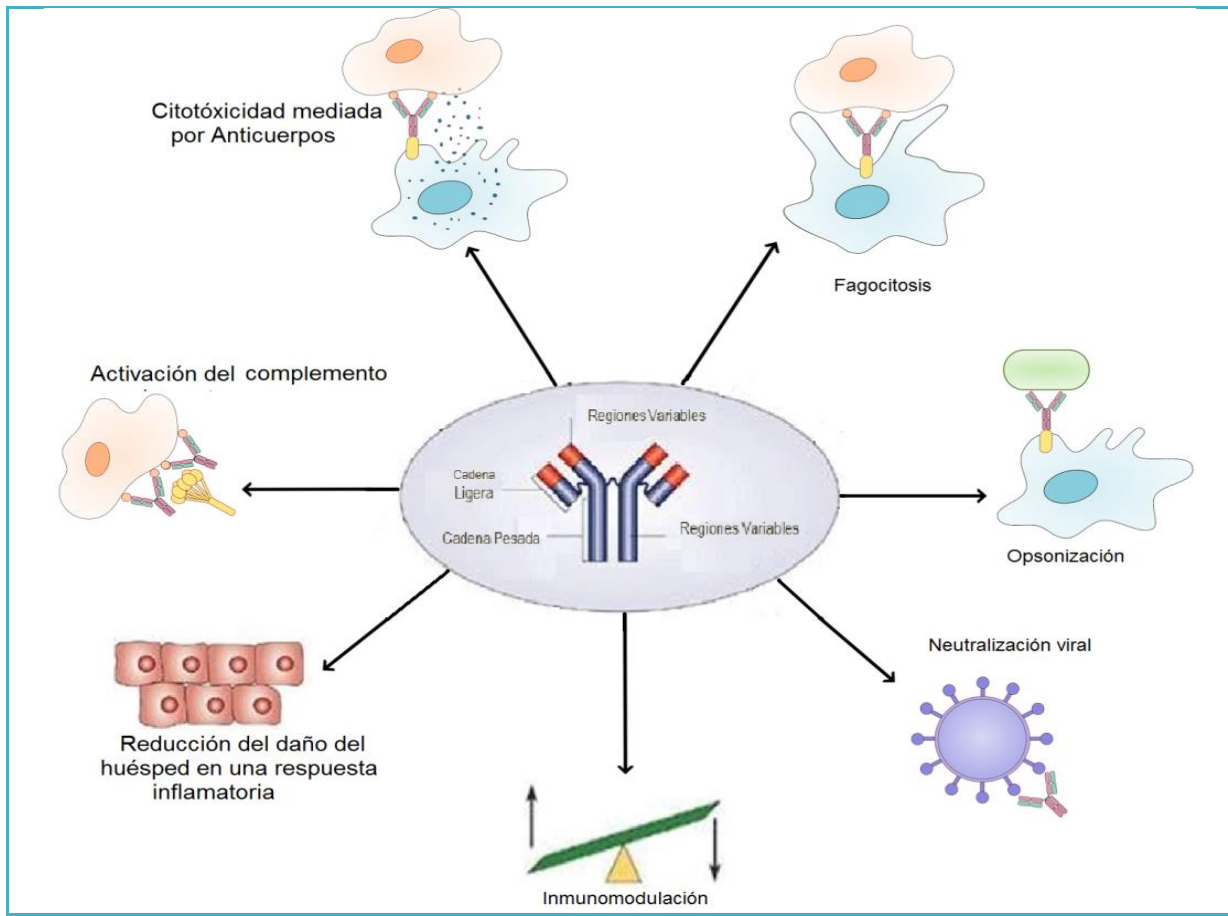


Figura 3. Funciones de los anticuerpos. La neutralización de toxinas y virus, la activación de complemento y las funciones antimicrobianas directas así como la generación de antioxidantes es independiente de otros componentes del sistema inmune, mientras la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la opsonización dependiente de otros células y mediadores del huésped. Son algunas de las funciones que realizan los anticuerpos (Tomado y adaptado de Spasevska, I., 2014).

Los anticuerpos desempeñan un papel significativo en la prevención de las infecciones virales, mientras que la respuesta mediada por células es una defensa importante en la eliminación de células infectadas por el virus. No todos los anticuerpos que se unen a los antígenos virales neutralizan la infección de los virus. Típicamente los anticuerpos que se unen a antígenos virales de superficie son capaces de bloquear la adhesión y entrada lo cual impide la diseminación de una célula a otra.

Anticuerpos y el Sistema de Complemento

La destrucción de patógenos dirigida por la opsonización de anticuerpos, es reforzada por los efectos de un conjunto de proteínas que no diferencian entre antígenos, estas proteínas se conocen en conjunto con el nombre de complemento (Parham, 2009). El complemento actúa como un sistema de supervivencia rápida y eficiente que tiene diferentes efectos en las células alteradas hospederas, para la eliminación de residuos y microbios infecciosos, se organiza una respuesta inmune y se envían señales de daño, el complemento contribuye a la sustentabilidad de la homeostasis (Ricklin D, *et al.*, 2010).

El sistema del complemento está constituido por más de 30 glucoproteínas séricas o unidas a membrana de la superficie celular que actúan en secuencia e interaccionan con otras moléculas. La actividad de estas proteínas en una reacción en cadena da lugar a una serie de respuestas biológicas, dirigidas fundamentalmente hacia una eliminación directa (lisis) o indirecta (fagocitosis) de los microorganismos, la inflamación y la eliminación de los inmunocomplejos de la sangre (Carroll, M. C., & Iseman, D. E. 2012; Carroll, M.C., 2008).

Las principales funciones efectoras del sistema del complemento en la inmunidad innata y en la inmunidad humoral específica son: inducir la fagocitosis de microorganismos sobre los que el complemento está activado; estimular la inflamación; e inducir la lisis de estos microorganismos. Además, los productos de la activación del complemento proporcionan segundas señales para la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. La fagocitosis, la inflamación y la estimulación de la inmunidad humoral están mediadas por la unión de fragmentos proteolíticos de proteínas del complemento a diversos receptores de superficie, mientras que la citólisis está mediada por el complejo de ataque a membrana "CAM" (Figura 4) (Abbas A.K, *et al.*, 2012; Dunkelberger, 2010; Wagner, 2009).

El sistema tiene tres vías de activación distintas:

- Vía clásica. Está acoplada a la inmunidad específica a través de los anticuerpos.
- Vía alternativa. Iniciada por sustancias de diversa naturaleza química localizadas sobre la superficie de microorganismos (Estado activo permanente de C3 genera C3b).
- Vía de la lectina MBL (*mannose-binding lectin*). Iniciada por la unión de la lectina a manosa presente en proteínas y polisacáridos microbianos.

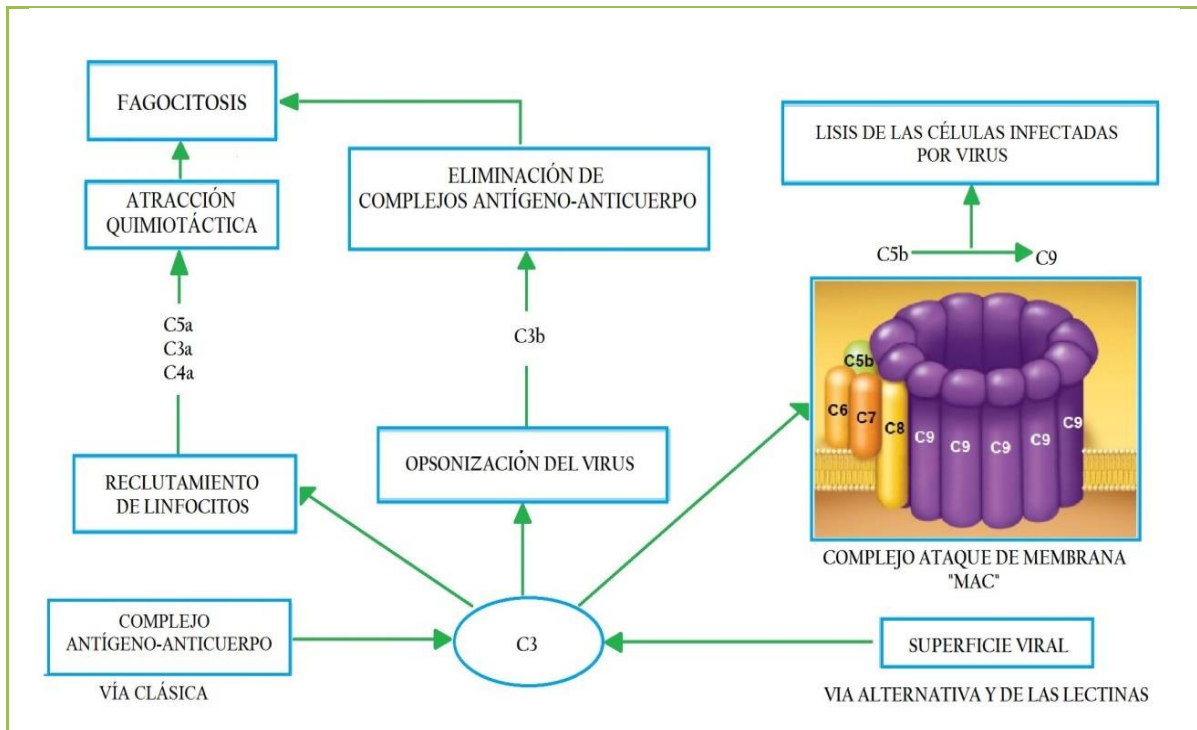


Figura 4. Vías de la cascada de complemento la mayoría de las proteínas del complemento se designan con una C seguida de un número. Cuando una proteasa escinde a una proteína del complemento se forman 2 fragmentos a los que se denomina "a" y "b" (Tomado y adaptado de S. Smith. 2002).

La detección viral puede activar las 3 vías de la cascada del complemento, aunque solo los virus envueltos son los afectados adversamente por este sistema. La cascada del complemento se inicia cuando el anticuerpo se une a múltiples sitios de una superficie celular. La IgM es el isotipo más eficaz para activar el complemento. Los otros isotipos que activan el sistema de complemento son IgG1 e IgG3 (Heyman, B. 2013, Parham, 2009). La cascada de activación del complemento que finaliza con la formación del complejo ataque a membrana, el cual se inserta en las membranas lipídicas de las bacterias, de las células eucariontes o de los virus causando lisis osmótica (S. Smith, *et al.*, 2002). La activación del complemento en un momento inadecuado puede ser peligrosa para la célula huésped y, por lo tanto, esta cuidadosamente regulada, sin embargo existen ciertos virus que desarrollan distintas estrategias para evitar su destrucción por el sistema inmune (Blom, A. M, *et al.*, 2009; Lambris, J. D. *et al.*, 2008).

Evasión del Sistema Inmune

La respuesta inmunitaria contra cualquier patógeno implica interacciones moleculares y celulares complejas y muchas veces las defensas contra el cuerpo pueden fallar debido a deficiencias del sistema inmune o puede ser ocasionado por que los patógenos desarrollan maneras de eludir o alterar la respuesta inmunitaria, utilizando estrategias en cualquier etapa de la interacción patógeno-huésped para su propio beneficio. Es por eso que cuando el patógeno integra su ADN a las cadenas de ADN del hospedero, bloquean o se apoderan de la maquinaria apoptótica, liberando factores solubles para conducir a una proliferación exacerbada, evitando así que las células cumplan con su ciclo y mueran, convirtiéndolas en células inmortales (Dunn, 2002; Parham, 2006).

La habilidad del sistema inmune para identificar y destruir cualquier célula inmortal o célula tumoral naciente, es una función vital en la defensa contra el cáncer. El sistema inmune tiene 3 roles primarios en la prevención de tumores:

1. Protege al sistema inmune de los tumores inducidos por virus mediante la eliminación o supresión de las infecciones virales.
2. La oportuna eliminación de patógenos y la pronta disminución de la inflamación que previene el establecimiento de algún microambiente inflamatorio que conduzca a una tumorigenesis.
3. Y por último el sistema inmune puede identificar específicamente y eliminar células tumorales basándose en la expresión específica de antígenos tumorales o moléculas que son inducidas por un estrés celular. A este tercer proceso se conoce como Inmunoedición del cáncer, por medio del cual el sistema identifica células cancerosas y pre-cancerosas eliminándolas antes de que causen daño (Figura 5) (Swann, 2007).

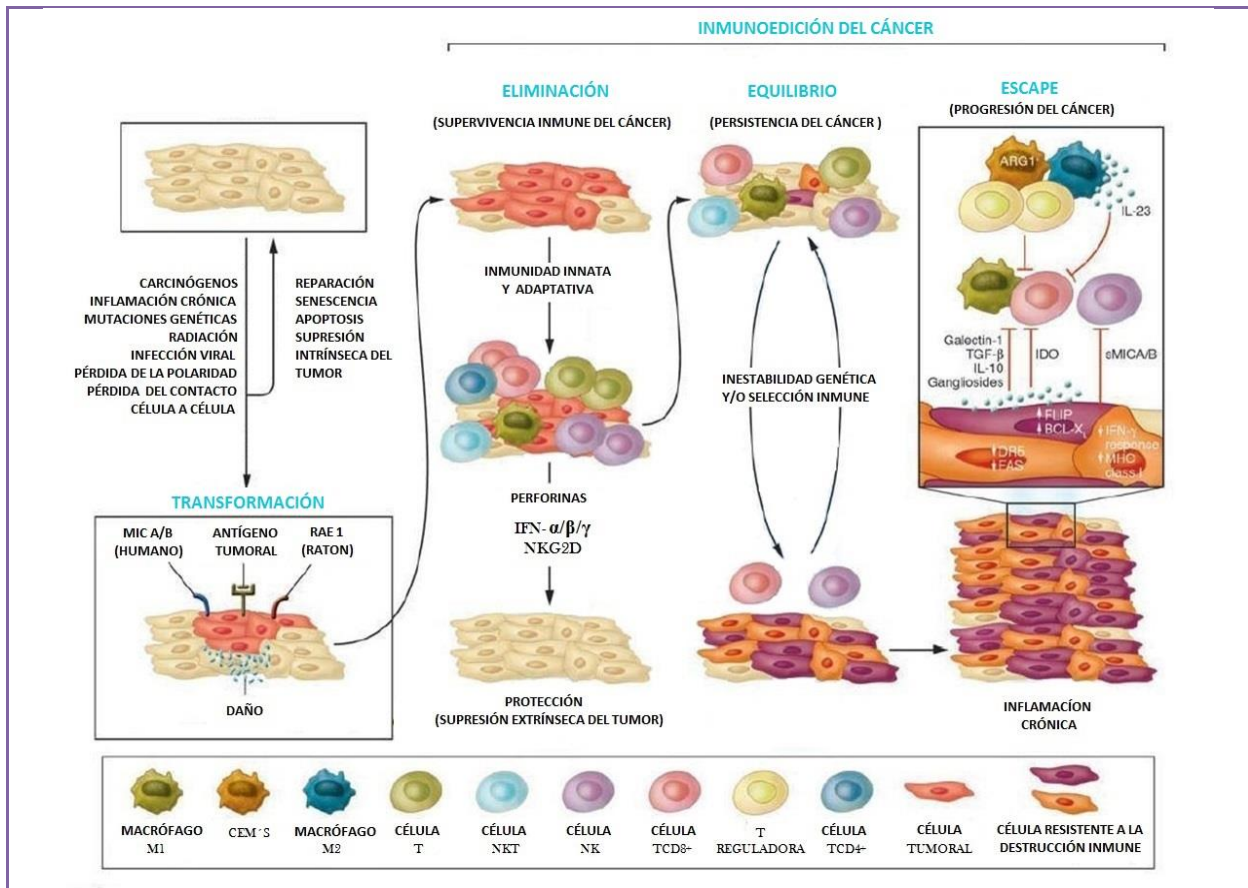


Figura 5. Inmunoedición del cáncer. Se divide en 3 fases: Eliminación, en el cual el sistema inmune detecta y elimina células tumorales que se han desarrollado de manera completa, sin embargo, cuando alguna de las células tumorales no es eliminada el proceso entran en una fase de Equilibrio donde las células permanecen latentes, siguen evolucionando y acumulando mutaciones en el ADN dando como resultado células capaces de resistir, evitar y suprimir al sistema inmune. Posteriormente estas células llegan a la fase de Escape donde adoptan un gran número de mecanismos inmunosupresores tumorales o atenuando las respuestas antitumorales lo que conduce a un crecimiento y establecimiento tumoral (Adaptado de Swann 2007).

Cuando la fase de eliminación dentro de la inmunoedición del cáncer es incompleta y se llega a la fase de equilibrio, es ahí, donde las células latentes siguen acumulando cambios, este es el caso de ciertos virus que se esconden del sistema inmunitario, replicándose completamente dentro del huésped sin producir lisis. Inclusive algunos producen antígenos del propio huésped en un proceso denominado mimetismo molecular (Swann, 2007). Este proceso puede ser definido también como carcinogénesis viral directa ya que el proceso carcinogénico depende directamente de la expresión de los oncogenes virales que son los que contribuyen directamente a la transformación celular, manteniendo en las células un fenotipo tumoral provocando una inmunosupresión dificultando su eliminación (Hamid NA, 2009; Moore, 2010).

La infección genital por virus del papiloma humano (VPH) tanto de bajo como de alto riesgo, es un ejemplo claro de ello, debido a que al inducir falla en la respuesta inmune, se facilita la persistencia viral, permitiendo tolerancia al ambiente y la progresión hacia el desarrollo de CaCu (Stanley, 2006).

Virus Del Papiloma Humano (VPH)

El VPH representa un grupo de pequeños virus de ADN recientemente reconocido como parte de la familia *Papilloviridae* (Lizano *et al.*, 2009).

Son virus pequeños de doble cadena circular de ADN no envueltos, y tienen aproximadamente 8 kb. El ADN se encuentra dentro de una cápside icosaédrica de 55 nm de diámetro. Su genoma se puede dividir en tres zonas: La región larga de control (RLC), la cual contiene promotores que inician la replicación y controlan la transcripción. La región temprana (E) contiene 7 marcos de lectura abierta que codifican para proteínas no estructurales (E1 a E7), cuya función es controlar la replicación del ADN e inducir la transformación maligna de la célula huésped; y la región tardía (L) contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside: L1 y L2 (Figura 6) (Horvat, 2010; Moody, 2010; Lizano *et al.*, 2009. Muñoz, 2006; Münger, 2002; Torres, 2011).

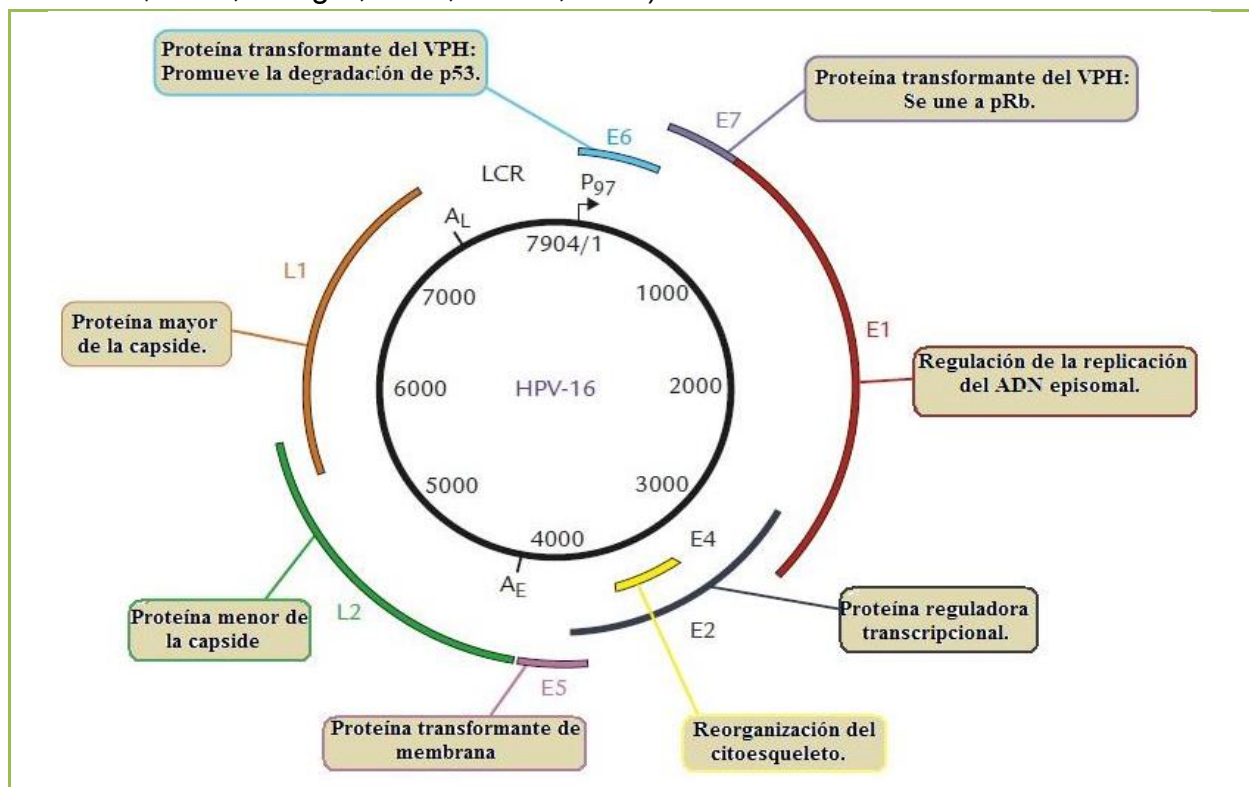


Figura 6. Esquema representativo de la organización de las proteínas tempranas (E) y tardías (L) del virus del papiloma humano (VPH) (Adaptado de Lin K, 2010).

Los VPHs están agrupados en una amplia familia compuesta por cerca de 120 genotipos, y aproximadamente solo la tercera parte de ellos infectan el epitelio escamoso (Stanley, 2006).

Los tipos de VPH se clasifican en bajo y alto riesgo de acuerdo con el tipo de lesión que producen. Se denominan de bajo riesgo aquellos tipos virales encontrados en las verrugas benignas, además de causar la verruga genital externa, infectan el tejido cervical produciendo una lesión intraepitelial benigna o condiloma como el VPH-6,-11,-40,-42,-44,-54,-61,-70,-72,-81. Los VPH de alto riesgo, son aquellos que están asociados con la generación de tumores invasivos y cáncer cervical. Entre los principales se encuentran VPH -16, -18, -31, -33, y -45 (Woodman, 2007; Tindle, 2002; Muñoz, N., 2003; de Villiers, 2000a). Se ha encontrado que la infección persistente por estos últimos, es un factor indispensable en el desarrollo del CaCu debido a que aproximadamente el 99% de los cánceres de cuello uterino presentan infección por algunos de ellos (Moody, 2010).

Alrededor del 90% de las infecciones por VPH se resuelven con el tiempo, sin embargo el 10% de ellas integran el ADN del VPH de alto riesgo dentro de la célula huésped, lo que posteriormente se desarrolla en CaCu (Hamid NA, 2009; Moore, 2010).

Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu)

La historia natural del CaCu implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anomalías histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical, NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada), NIC III (displasia severa/carcinoma *in situ*) y finalmente un cáncer invasor (Woodman, 2007).

Para entender como una infección de VPH puede desarrollar CaCu es necesario observar el ciclo de vida del VPH. La infección de VPH requiere de una "apertura" en el epitelio estratificado, lo que puede ocurrir a través de una microlesión que expone las capas basales para la entrada viral. El ciclo replicativo del VPH está atado al programa de diferenciación de queratinocitos. Comenzando así la infección de las células de la membrana basal (Figura 7). La naturaleza del receptor para la fijación viral no se conoce, pero se ha postulado la participación de proteoglicanos de heparan sulfato y en algunos casos la integrina- $\alpha 6$ como receptores de las células epiteliales para VPH (Giroglou *et al.*, 2001; Doorbar, 2006).

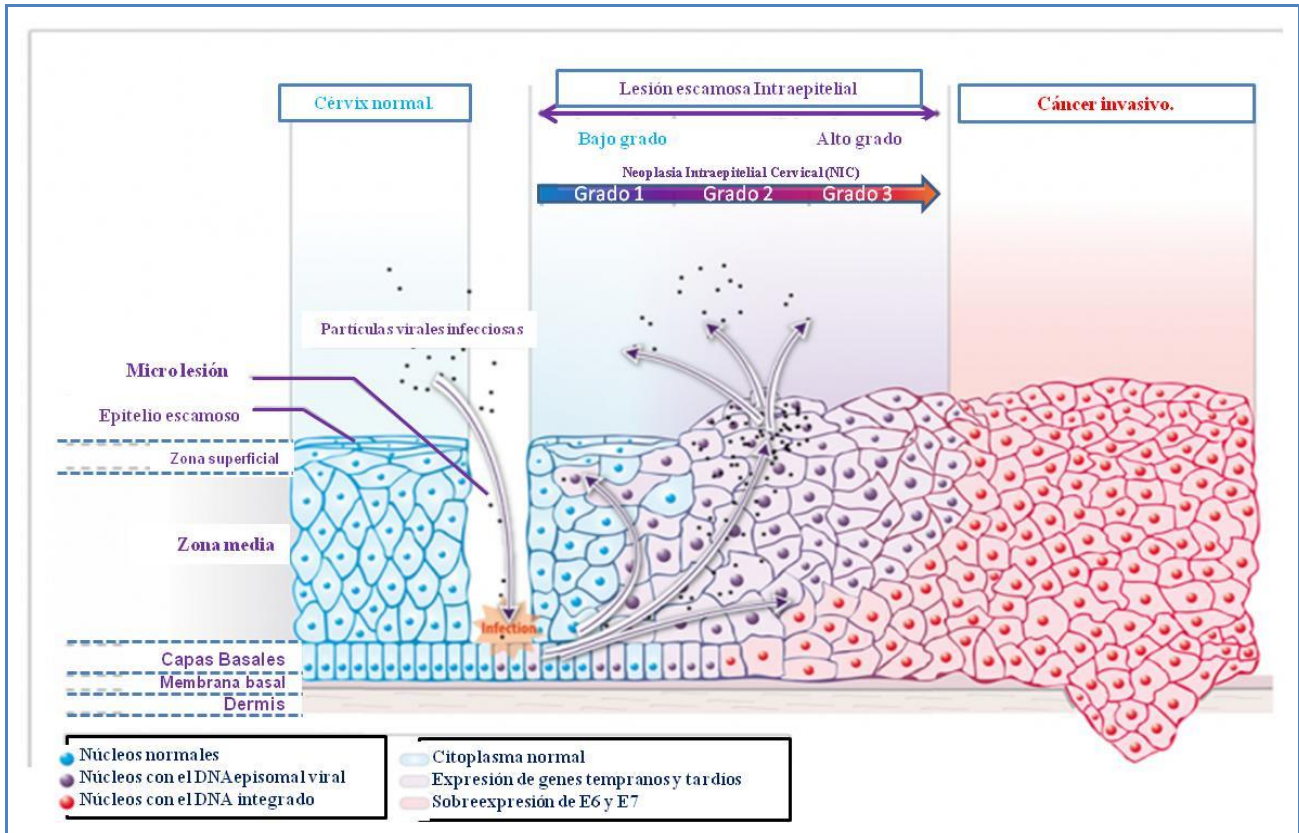


Figura 7. Ciclo de vida del virus del papiloma humano. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S (Adaptado de Woodman, 2007).

Para soportar la replicación del ADN del Papillomavirus, el virus codifica dos proteínas E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se enlaza a secuencias en el origen viral de replicación, la proteína dimérica E2 inicia y se une a la RLC para comenzar la transcripción viral, mientras que la proteína E1 es una enzima replicativa de ADN que ensambla un complejo dihexamérico. Mientras que todas las demás enzimas de replicación y proteínas son suplidas por el hospedero (Chow L., *et al*, 2010). Además la proteína E2 tiene la capacidad de regular la transcripción de las proteínas E6 y E7 las cuales tienen propiedades transformantes, teniendo así un efecto indirecto en la proliferación celular. Las funciones de E4 y E5 aún no son completamente entendidas; sin embargo, se ha propuesto que ambas pueden estar involucradas en la regulación de las funciones virales tardías. Las proteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas. La proteína E6 se enlaza a la proteína supresora de tumor p53 como parte de un complejo trimérico con la ubiquitina ligasa celular; mientras que la proteína E7 se une al retinoblastoma que forma parte de una familia de supresores de tumor, o bien con otras proteínas involucradas en la regulación del

ciclo celular (Chow L., *et al*, 2010, Hamid, *et al.*, 2009; Woodman, 2007; Longwort and Laimins 2004).

Los oncogenes virales retrasan el proceso de diferenciación epitelial y estimulan la proliferación celular, usualmente incrementando el grosor de las capas de la zona media. Por último las proteínas de la cápside L1 y L2 son sintetizadas y ensambladas en las capas superficiales del epitelio cervical, es decir en células bien diferenciadas (Figura 7) (Woodman, 2007).

De esta manera el ciclo viral se halla estrechamente vinculado con el grado de diferenciación de la célula epitelial (queratinocito) de tal forma que a nivel de células basales (las únicas con capacidad proliferativa) se expresan los genes tempranos y a medida que la célula madura, se diferencia y asciende hacia las capas superficiales se intensifica la replicación viral (Lizano, 2009).

Sin embargo, las células cancerosas no sólo son capaces de evadir al sistema inmunitario, para “seguir vivas y crecer” estas células cuentan también con la capacidad de influir en las células normales, en las moléculas y en los vasos sanguíneos que las rodean; es decir influyen en su microambiente.

Microambiente Tumoral

En un microambiente celular normal, el estroma se encarga de dar soporte a los tejidos, regulando el crecimiento celular, determinando factores de crecimiento, producción de citocinas y el reclutamiento de células inmunes cuando es necesario. Los elementos estromales incluyen vasos sanguíneos y linfáticos, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos. Aunque estas células *per se* no son consideradas malignas, tienen un rol en el soporte en el crecimiento del tumoral, desarrollo del cáncer, determinación el potencial metastásico y la posible determinación del lugar de metástasis (Li, 2007; Hall, 2007).

Es por eso que las interacciones entre el estroma y el tumor son críticas para su supervivencia. Las células estromales proveen soporte estructural a las células malignas, modulan el microambiente tumoral e influyen en su biología volviéndolas incluso en más agresivas. En respuesta el tumor provee de factores de crecimiento, citocinas y señales celulares que continuamente inician nuevas reacciones estromales y recluyen nuevas células dentro del microambiente para promover soporte al crecimiento tumoral (Figura 8.) (Junttila, 2013; Hanahan, D. 2012).

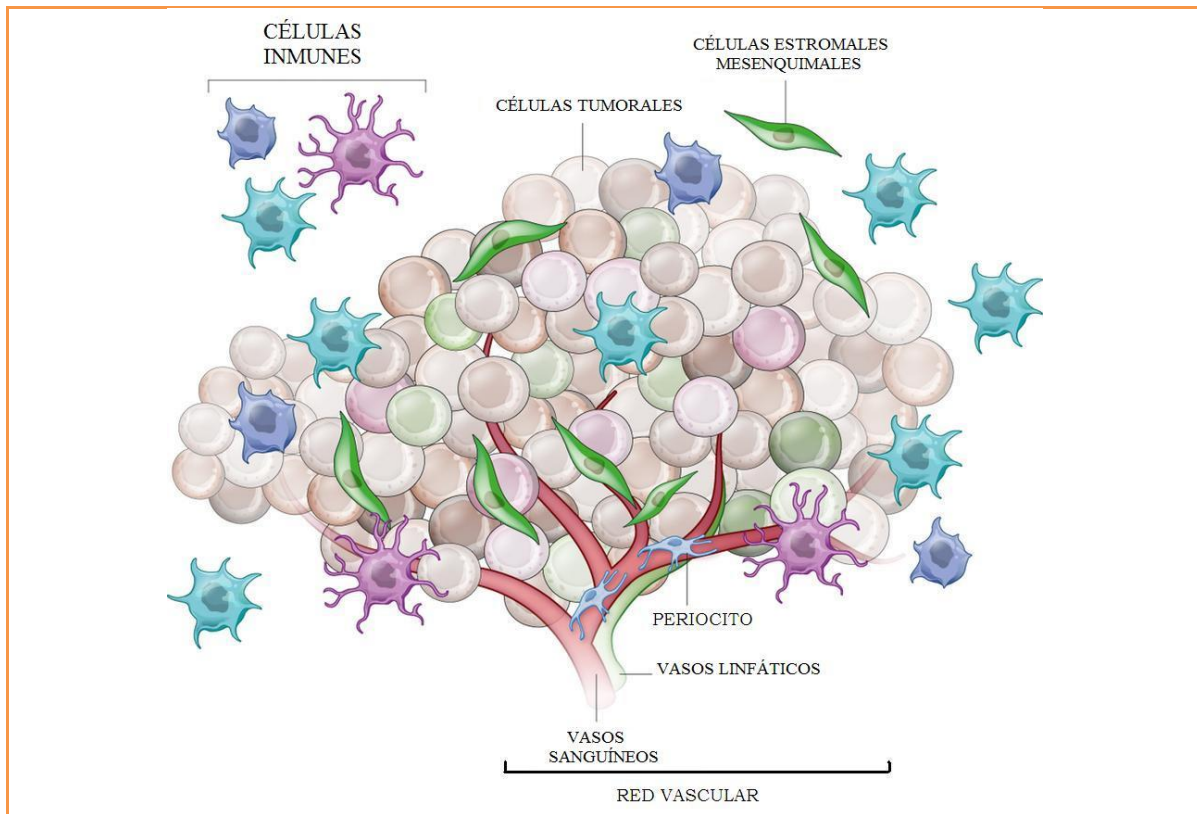


Figura 8. Microambiente tumoral. La presencia de células tumorales y su interacción con los diversos tipos de células del microambiente pueden convertir este entorno en uno que sustentan la progresión del cáncer, lo que implican el reclutamiento de Células Estromales Mesenquimales (CEMs), la migración de las células inmunes, remodelación de la matriz y finalmente, el desarrollo de las redes vasculares (Adaptado de Junttila, 2013).

Al igual que los tejidos normales, los tumores están compuestos por dos discretos pero interactuantes compartimentos, el parénquima y el estroma. En tumores sólidos, las células tumorales por sí mismas conforman el parénquima, mientras que el estroma consiste en un conjunto de células no tumorales y elementos de tejido como: fibroblastos, células epiteliales, musculares, adipocíticas, vasculares y células progenitoras como las CEMs (Figura 8) (Dvorak, 2011; Liotta, 2001; Li, 2007.).

Recientemente se ha estipulado que las CEMs, dispuestas en el nicho tumoral, pueden ser uno de los candidatos importantes en generar directa e indirectamente supresión de la respuesta inmune (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008).

Células Estromales Mesenquimales (CEMs)

Las células estromales de médula ósea adulta son parte importante en la homeóstasis de las células hematopoyéticas, pero también se pueden diferenciar en algunos tipos de células somáticas. Esa capacidad específica de generar múltiples linajes mesenquimales, derivadas de progenitores estromales de médula ósea han sido designadas como CEMs. Las CEMs son células progenitoras no hematopoyéticas capaces de diferenciarse en linajes condrocitos, osteocitos, tenocitos y fibroblastos. Estas células expresan inmunofenotípicamente numerosos marcadores CD45, CD34, CD13, CD44, CD73, CD90, CD166, CD80, CD86, HLA clase I^{LOW}, CD105, CD29 (Nauta, 2007; Hoogdujin, 2010) (Figura 9).

Las CEMs expresan Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (MHC-I) pero no expresan moléculas CPH-II, B7-1, B7-2, CD40, o CD40L. Además, estas células secretan citocinas y moléculas reguladoras que juegan un papel importante en la proliferación y maduración de células madre hematopoyéticas, y representan una población heterogénea de células multipotentes de morfología fibroblastoide, con propiedades benéficas en los procesos regenerativos e inmunomodulatorios (Giordano *et al.*, 2007; Aggarwal *et al.*, 2005; Locatelli *et al.*, 2007).

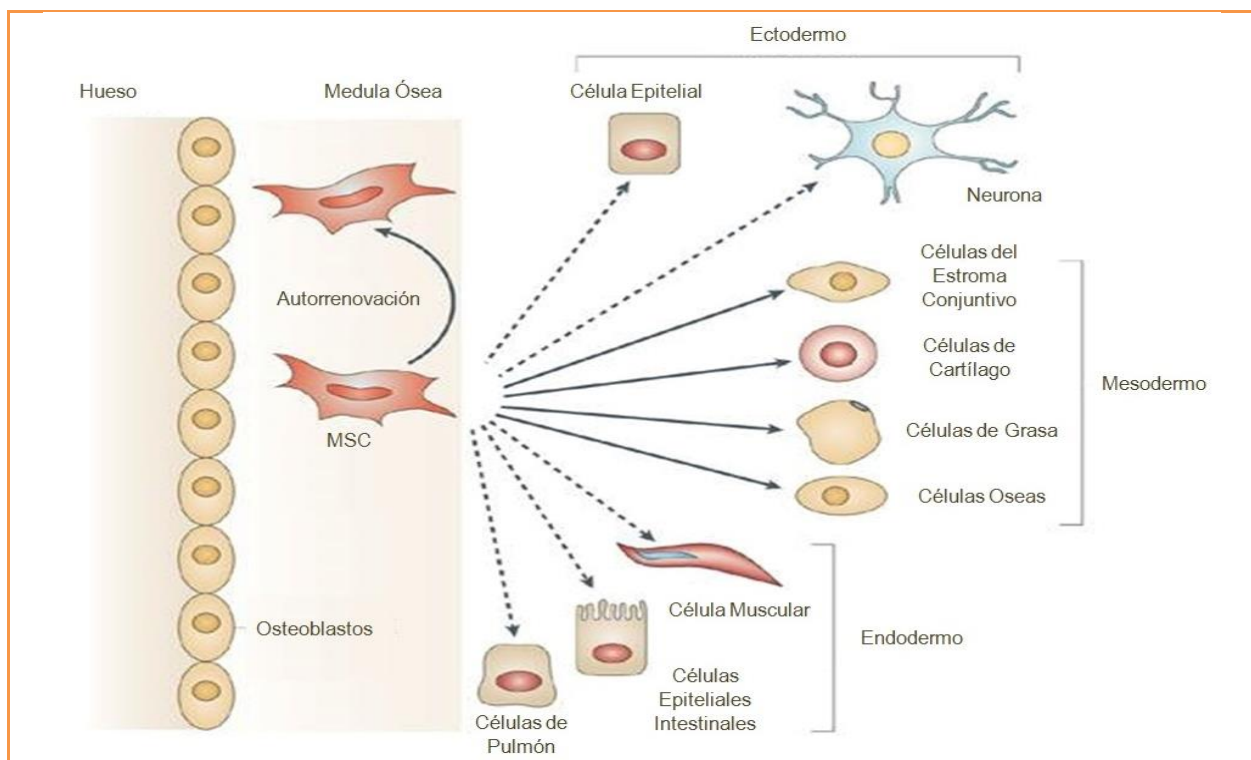


Figura 9. Las Células Estromales Mesenquimales se auto-renuevan en la médula ósea y se diferencian en células de diversos linajes de manera *in vivo* (Adaptado de Uccelli, 2008)

Se sabe que las CEMs tienen capacidad de migrar hacia los tejidos dañados dando un efecto regenerativo. Basada en esos hechos, las CEMs son consideradas como una estrategia promisoriosa de ingeniería tisular y como terapia génica, sin embargo también se ha reportado que estas células poseen propiedades inmunoregulatorias, ya que *in vivo* inhiben la proliferación de linfocitos T, disminuyen la respuesta de las células T de memoria, inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias después de una estimulación mitógena, inhiben la generación y la función de las células presentadoras de antígeno (Hoogdujin, 2010; Krampera, 2006; Nauta, 2007; Corcione, 2011).

Por otro lado, las CEM's presentan tropismo y una gran capacidad para migrar al sitio de la lesión, mediado por la presencia de factores solubles secretados en el foco de la inflamación o en el sitio del desarrollo tumoral en donde se da lugar al incremento en la neovascularización y crecimiento tumoral (Karp & Leng, 2009; Suzuki *et al.*, 2010). La interacción y establecimiento de CEMs en tumores malignos fue mostrada inicialmente por Studeny *et al* (2002) en un modelo *in vivo* de ratones, al inyectar CEMs humanas marcadas con proteína verde fluorescente y mostrar su migración hacia tumores de melanoma implantados. Asimismo, Djouad *et al.*, 2003, mostró en un modelo de ratón alogénico, que el co-transplante de CEMs con células de melanoma, favorece el implante y crecimiento del tumor. Otros autores como Karnoub *et al.*, 2007, han mostrado en un modelo de xenotransplante, que cuando CEMs de médula ósea humana son mezcladas con células tumorales, se incrementa el potencial metastásico de varias líneas celulares de cáncer de mama cuando son insertadas subcutáneamente en ratones. Estos fenómenos se han atribuido a las características inherentes de estas células estromales: a sus propiedades inmunosupresoras y a su habilidad para migrar al sitio de la lesión vía secreción de quimiocinas por ejemplo CC L5/RANTES (Karnoub *et al.*, 2007). Por otra parte, se sabe que el desarrollo de las células B ocurre en la médula ósea y es estrictamente dependiente de una interacción cercana entre los progenitores de células B con células estromales, sin embargo se ha encontrado que las CEMs inhiben la producción de anticuerpos de las células B, deteniendo a las células B en la fase G₀ evitando a la maduración en células plasmáticas afectando significativamente la producción de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA (Corcione, 2011; Comoli, 2007; Asari, 2010). No obstante, se desconoce el papel de las CEMs sobre la inducción de anticuerpos durante el desarrollo tumoral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El CaCues un problema de salud a nivel mundial, cada año aproximadamente 527,459 mujeres son diagnosticadas con CaCu en el mundo (Globocan, 2012). En México, el 13% de las defunciones en mujeres por tumores malignos corresponden a CaCu. (INEGI 2013). Los VPH de alto riesgo son los agentes causantes de cerca del 99% de los CaCu (Moody, 2010). Los VPH infectan el epitelio cervical sin entrar en la circulación, por lo que las partículas no son expuestas de manera eficaz al sistema inmune. Como resultado, la vigilancia inmunológica típica, que involucra el tráfico de células especializadas desde el sitio de la infección hasta órganos linfoides secundarios, se encuentra limitada (Kanodia, 2007). Además de ello, se ha encontrado que dentro del microambiente tumoral, la presencia de células inmunosupresoras tiene un papel importante en inhibir la respuesta inmune y favorecer el crecimiento tumoral. Entre estas células se encuentran las CEMs (Hanchen Li, *et al.*, 2007; Dvorak *et al.*, 2011), quienes suprimen las funciones de las células T y la actividad presentadora de antígenos por las células dendríticas (Hoogdujin *et al.*, 2010; Krampera *et al.*, 2006). Asimismo, se ha encontrado que las CEMs también son capaces de inhibir la producción de anticuerpos, al evitar la maduración de células B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Corcione *et al.*, 2011; Comoli *et al.*, 2007; Asari *et al.*, 2010).

Nuestro grupo de investigación ha obtenido y caracterizado CEMs provenientes de tejidos normales de cuello uterino (CEMs-CxN) y de tumores avanzados de CaCu (CEMs-CaCu). En estudios previos hemos encontrado que la inoculación simultánea de CEMs-CaCu y células tumorales TC-1 en ratones de la cepa C57BL/6 incrementan el tamaño tumoral y revierten el efecto protector antitumoral en ratones previamente inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, inhibiendo la respuesta de linfocitos T (Conteras 2012). Sin embargo, se desconoce si las CEMs tienen efecto supresor sobre la inducción de anticuerpos, tal como aquellos que se producen contra las células tumorales. Por tanto, en el presente trabajo se analizará el efecto de CEMs provenientes de diversos tejidos (MON, CxN y de tumores de CaCu), sobre la inducción de anticuerpos contra células tumorales en un modelo tumoral empleando ratones de la cepa C57BL/6 y células tumorales TC-1 como inductoras de tumores. Los resultados de este estudio serán de gran importancia para conocer la actividad inmunosupresora de CEMs derivadas de tejido tumoral y poder establecer estrategias terapéuticas que permitan contrarrestar la supresión inmunológica ejercida por las CEMs y mejorar la respuesta inmune antitumoral.

HIPÓTESIS

Las CEMs se caracterizan por inhibir la activación y función efectora de una amplia variedad de células del sistema inmune, tales como los linfocitos T y B que son importantes en la respuesta inmune antitumoral. Nuestro grupo de investigación ha obtenido y caracterizado CEMs de tumores de CaCu (CEMs-CaCu), y en estudios previos hemos observado que la inoculación simultánea de CEMs-CaCu y células tumorales TC-1 en ratones de la cepa C57BL/6 favorecen el crecimiento tumoral, y revierten la actividad antitumoral mediada por linfocitos T. Sin embargo, se desconoce el papel de las CEMs en la inducción de anticuerpos que reconozcan y eliminen a las células tumorales. En consecuencia, se espera que en un modelo tumoral *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6, al inocular CEMs-CaCu y células tumorales TC-1 se observe una disminución en la inducción de anticuerpos que reconozcan a células tumorales TC-1.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de CEMs derivadas de CaCu (CEMs-CaCu) en la inducción de anticuerpos específicos anti-tumor en un modelo de ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Inocular ratones de la cepa C57BL/6 con células tumorales TC-1 en presencia y ausencia de protección inmunológica y de CEMs.
- Evaluar las cinéticas de crecimiento tumoral en los ratones inoculados.
- Determinar la presencia de anticuerpos específicos anti-células tumorales TC-1 en los sueros de los ratones tratados.
- Determinar la actividad citotóxica de los anticuerpos sobre las células tumorales TC-1.

MATERIALES Y MÉTODOS:

CULTIVOS CELULARES.

Se emplearon células TC-1 derivadas de carcinoma de pulmón de ratón de la cepa C57BL/6, las cuales expresan de manera permanente genes de E6 y E7 del VPH-16 junto con el gen Ras, además de ser histocompatibles a este modelo de ratón por presentar moléculas H-2D (Lin *et al* 1996). Estas células fueron cultivadas con medio de cultivo RPMI (Gibco BRL, Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino SFB (Gibco BRL, Life Technologies) al 10%, e incubadas a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

También se utilizaron estirpes de CEMs (humanas), obtenidas de cérvix normal (CEMs-CxN) y de CaCu (CEMs-CaCu). Como estándar de oro, se emplearon CEMs obtenidas de médula ósea normal (CEMs-MON). Todas las estirpes celulares fueron obtenidas y caracterizadas previamente por nuestro grupo de investigación con base en los parámetros morfológicos, fenotípicos y de diferenciación establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Montesinos MJJ, *et al.*, 2013), los cuales consisten en: presentar una morfología fibroblastoide, su capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteocitos, su adherencia celular al sustrato de cultivo, baja expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR), y cuentan con un fenotipo característico (CD73, CD90 y CD105). Las CEMs fueron cultivadas con medio de cultivo consistente en DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 15%. Antes de ser inoculadas, todas las células se cultivaron en condiciones de esterilidad y mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5% de CO₂ y humedad saturante.

RATONES.

Se emplearon 10 grupos de 6 ratones c/u de la cepa C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio (NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 agosto 2001). Los grupos de ratones fueron tratados de la siguiente manera:

1. Sin inmunizar
 - a. Pre-inmune
 - b. Inoculados con células TC-1
 - c. Inoculados con células TC-1 y CEMs de CaCu
 - d. Inoculados con células TC-1 y CEMs de MON
 - e. Inoculados con células TC-1 y CEMs de CxN
2. Inmunizados
 - a. Solo inmunizado
 - b. Inoculados con células TC-1
 - c. Inoculados con células TC-1 y CEMs de CaCu
 - d. Inoculados con células TC-1 y CEMs de MON
 - e. Inoculados con células TC-1 y CEMs de CxN

INMUNIZACIÓN.

4 grupos de ratones fueron inmunizados con 3 dosis (100 µg/dosis) del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH-16, Invitrogen, CA, USA) vía cavidad peritoneal. El péptido fue disuelto en PBS (solución salina de fosfatos). Para la primer dosis el péptido fue emulsionado con Adyuvante Completo de Freud (Sigma, USA) a una proporción 1:1; mientras que para las dosis complementarias, se utilizó Adyuvante Incompleto de Freund en la misma proporción. El tiempo entre cada inmunización fue de 10 días.

INOCULACIÓN DE CÉLULAS TC-1 PARA INDUCIR TUMORES.

Para generar tumores en los ratones de la cepa C57BL/6, se les inocularon 10^5 células TC-1 en la parte dorsal y 10^5 CEMs a través de la vena caudal al día de inicio (día 0), de acuerdo a la siguiente tabla. Después de 10 días, a todos los ratones que recibieron células tumorales, se les aplicó un refuerzo de 10^5 células TC-1 en el mismo sitio de la inoculación.

Tratamiento. Células.	Sin inmunizar	Inmunizados
	TC-1	TC-1
(-)	0:0	0:0
(+)	100 000:0	100 000:0
CEMs CxN	100 000: 100 000	100 000: 100 000
CEMs MO	100 000: 100 000	100 000: 100 000
CEMs CaCu	100 000: 100 000	100 000: 100 000

MEDICIÓN DE TUMORES

El tamaño de los tumores fue evaluado cada tercer día, después de la aplicación del refuerzo de células tumorales. El volumen del tumor se calculó mediante la siguiente fórmula: $v=(r1*r2^2)/2$, en donde: r1= largo del tumor; r2 es el ancho del tumor. Las medidas fueron realizadas con ayuda de un vernier de acuerdo a lo reportado por Paz de la Rosa, *et al.*, 2009.

RECOLECCIÓN DE SUEROS.

Los sueros fueron recolectados a los días 10, 20, 30 y 40 posteriores a los tratamientos, mediante exanguinación a través de la vena axilar, previa aplicación de anestesia a los ratones. Una vez formado el coágulo, las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos para obtener la fracción líquida. Los sueros fueron fraccionados y almacenados en ultra congelación para su posterior análisis de detección de anticuerpos.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CÉLULAS TUMORALES TC-1 EN SUERO DE RATÓN.

Para llevar a cabo la detección de anticuerpos anti-células tumorales TC-1 en los sueros de los animales tratados, 2×10^4 células TC-1 fueron colocadas por triplicado en placas de ELISA (placa de 96 pozos fondo plano de alta afinidad de poliestireno no estériles sin tapa, Costar 9018) e incubados durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se procedió a fijarlas en paraformaldehído al 2% durante 1 hora, se realizaron 4 lavados con 300 μ L de una solución formada con PBS y SFB al 2% por cada pozo. Posteriormente los pozos fueron cubiertos con 300 μ L de solución bloqueadora compuesta por TBS-Tween 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, e incubados durante 1 hora a 37°C. Después de este tiempo, los pozos se lavaron 4 veces PBS y SFB al 2% (300 μ L de solución por cada pozo). Como control positivo en el ensayo, se adicionaron tres pozos con 100 μ L del anticuerpo monoclonal AntiH2-Db derivado del sobrenadante del hibridoma (281485 ATCC, USA). En seguida, se agregaron 10 μ L de los sueros de ratones tratados y diluidos a una proporción de 1:1000 en solución de PBS y SFB al 2% y se colocaron 100 μ L de cada dilución en los pozos correspondientes, con la finalidad de determinar el reconocimiento específico de anticuerpos hacia las células TC-1. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se hicieron 4 lavados con 300 μ L de PBS y SFB al 2% por cada pozo. Para revelar el reconocimiento de los anticuerpos específicos, se utilizó un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (AP-Rabbit-AntiMouse Ig G, A, M. de Sigma

USA), el cual se diluyó 1:5000 en solución de PBS y SFB al 2% y se colocaron 100 µL de esta solución en cada pozo. Después de incubar a 37°C durante 1 hora, se realizaron 6 lavados con 300 µL de PBS y SFB al 2% por cada pozo, y al final se adicionaron 100 µL de una solución de sustrato de fosfatasa alcalina a una concentración de 0.6g de sustrato/100mL de dietalonamina ajustada (Sigma USA).

Después de incubar la placa a 37°C durante 30-60 minutos, la reactividad enzimática de la fosfatasa fue determinada mediante el desarrollo de color amarillo detectado en un lector de placas de ELISA (Molecular Devices) a una longitud de onda de 405 nm; los ensayos fueron hechos por triplicado.

CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS TC-1 MEDIADA POR ANTICUERPOS Y COMPLEMENTO

Para inducir citotoxicidad a través de la fijación de complemento, se utilizaron 500,000 (5×10^5) células TC-1, las cuales fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C en presencia de 5µM de 5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) diluido en PBS. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a lavar las células 2 veces con una solución de PBS-SFB al 3%. Posteriormente las células marcadas fueron preincubadas durante 30 minutos con una solución de PBS-SFB al 10% para bloquear receptores inespecíficos, pasado este tiempo se realizaron 2 lavados con una solución de PBS-SFB al 3%. Después de los lavados, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 5°C con una solución de PBS-SFB 10%, suplementada con 10µL de suero de ratón que fueron sometidos a los diferentes tratamientos. Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces con la solución de PBS-SFB al 3%. Como control positivo en el ensayo, se utilizaron células TC-1 incubadas en presencia del anticuerpo monoclonal Anti H2-Db, derivado del sobrenadante del hibridoma (281485 ATCC, USA); y como control negativo se utilizaron TC-1 incubadas con PBS-SFB 3%. A continuación las células fueron incubadas durante 2 horas en presencia de 25µg/mL de complemento de conejo (Rabbit complement, Pel-Freez Biologicals, USA). Después de lavar las células 2 veces con PBS-SFB 3%, se adicionaron 100uL de Ioduro de propidio 1ug/mL y se procedió a incubar durante 30 min a 5°C. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con PBS-SFB 3% y fijadas en paraformaldehído al 4% para leer la fluorescencia de 10 000 eventos en un citómetro de flujo (FACScalibur Becton Dickinson, USA). El porcentaje de células que presentaron doble tinción (CFSE y ioduro de propidio) correspondió al porcentaje de células lisadas mediante la fijación de complemento.

RESULTADOS:

Efecto de CEMs en el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 con y sin protección inmunológica.

Varios estudios han demostrado que CEMs obtenidas de diferentes fuentes, tales como médula ósea o de diferentes tumores, cuando son inoculadas de manera simultánea con células tumorales, favorecen el crecimiento de tumores (Djouad *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2009). En este estudio se analizó el papel CEMs-MON, CEMs-CxN, y de CEMs-CaCu en el desarrollo de tumores inducidos en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-Db) a través de la inoculación de células tumorales TC-1 positivas a la expresión de las proteínas E6/E7 de VPH-16. Por otro lado, tomando en consideración que en estudios previos reportamos que la inmunización con el péptido RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16 protege a los ratones C57BL/6 del desarrollo de tumores inducidos por las células tumorales TC-1 (Paz de la Rosa *et al.*, 2009; Monroy *et al.*, 2014), en este estudio también se analizó el papel de las diferentes CEMs en el crecimiento tumoral en ratones previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF.

Al analizar el crecimiento tumoral durante 40 días en el grupo de ratones que no recibieron inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF, se observó que las curvas de crecimiento de los ratones que fueron inoculados con las células TC-1 y las diferentes estirpes de CEMs, no mostraron diferencias significativas respecto a los ratones que sólo recibieron células tumorales TC-1 ($P > 0.05$). Sin embargo, al finalizar el tiempo de seguimiento, se observó que el tamaño promedio de los tumores en los ratones que recibieron tratamiento con las células TC-1 y CEMs-CaCu o CEMs-CxN fue mayor ($1.8-2.2\text{cm}^3$), aunque no significativamente, que el tamaño promedio de los tumores desarrollados en los animales que fueron inoculados solo con células TC-1 o TC1 y CEMs-MON ($1.2-1.8\text{cm}^3$) (Figura 10).

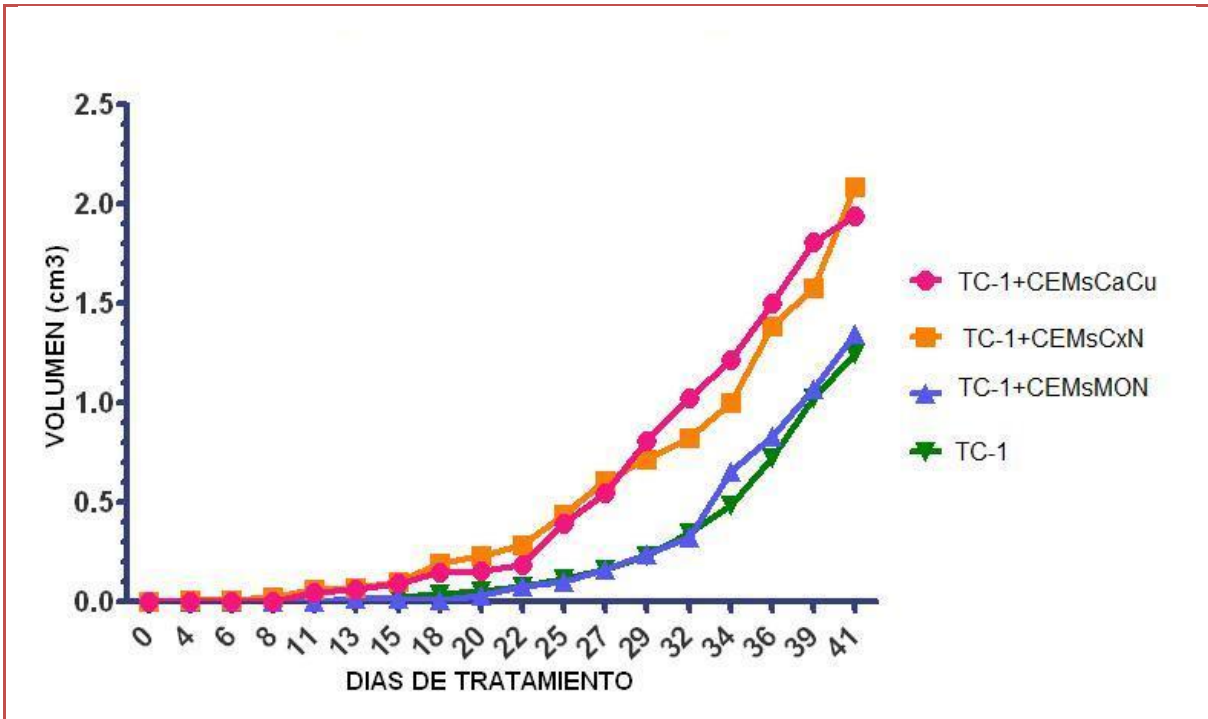


Figura 10. Efecto de CEMs en el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6. Ratones C57BL/6 fueron inoculados, vía subdérmica, con 10^5 células tumorales TC-1 solas, o de manera simultánea, vía intravenosa, con 10^5 CEMs derivadas de cérvix normal (CEMs-CxN), de cáncer cérvico-uterino (CEMs-CaCu), o de médula ósea (CEMs-MON). El crecimiento tumoral fue evaluado cada tercer día como descrito en materiales y métodos.

Mientras que al evaluar el efecto de las CEMs sobre el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, se observó que la protección inmunológica antitumoral llevada a cabo por el péptido fue revertida en los grupos de ratones que recibieron de manera simultánea las células tumorales TC-1 y las diferentes CEMs, de hecho a partir del día 15 se pudo detectar el crecimiento tumoral en estos grupos de ratones (Figura 11). Es importante destacar que al evaluar el crecimiento tumoral durante 40 días, el grupo de ratones que recibió TC-1 y CEMs-CaCu presentó el mayor crecimiento tumoral (3.5-4.0 cm³); mientras que los ratones que recibieron CEMs-CxN mostraron un crecimiento tumoral de 1.7-2.3 cm³, el cual fue muy parecido al evaluado en los ratones que no recibieron protección inmunológica y que también recibieron CEMs-CxN. Por otro lado, el grupo de ratones que fue co-inoculado con TC-1 y CEMs-MON, mostró un crecimiento tumoral de 0.5-0.8 cm³ (Figura 11).

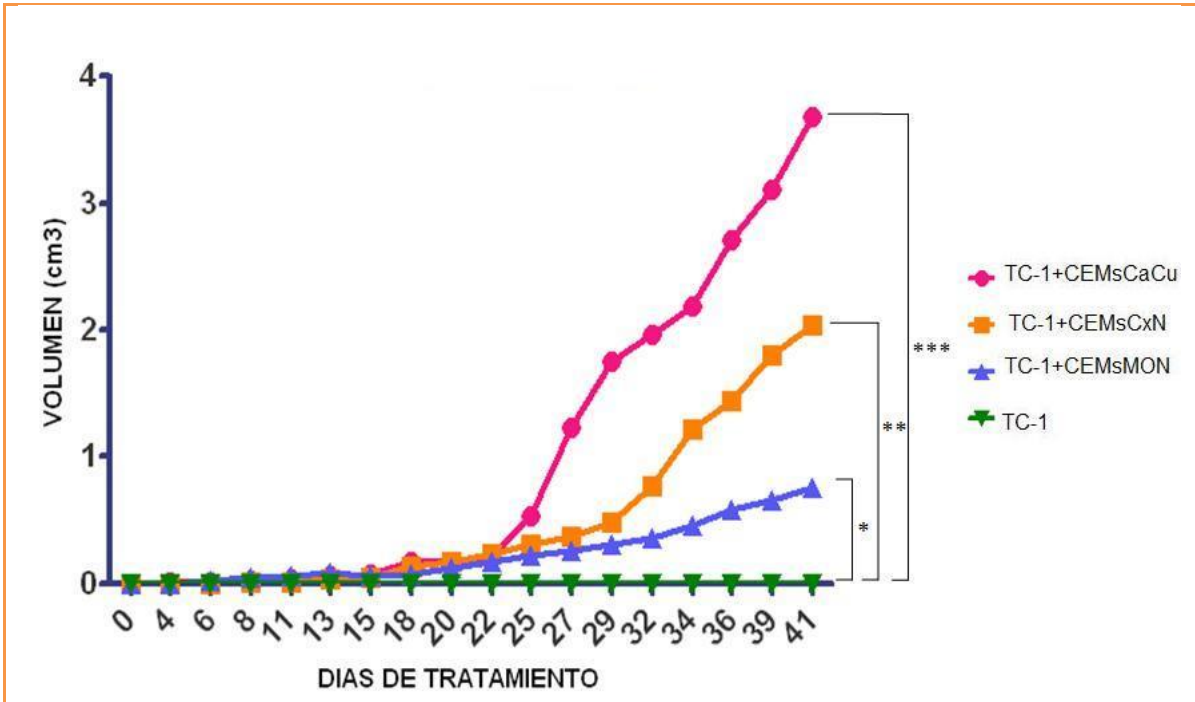


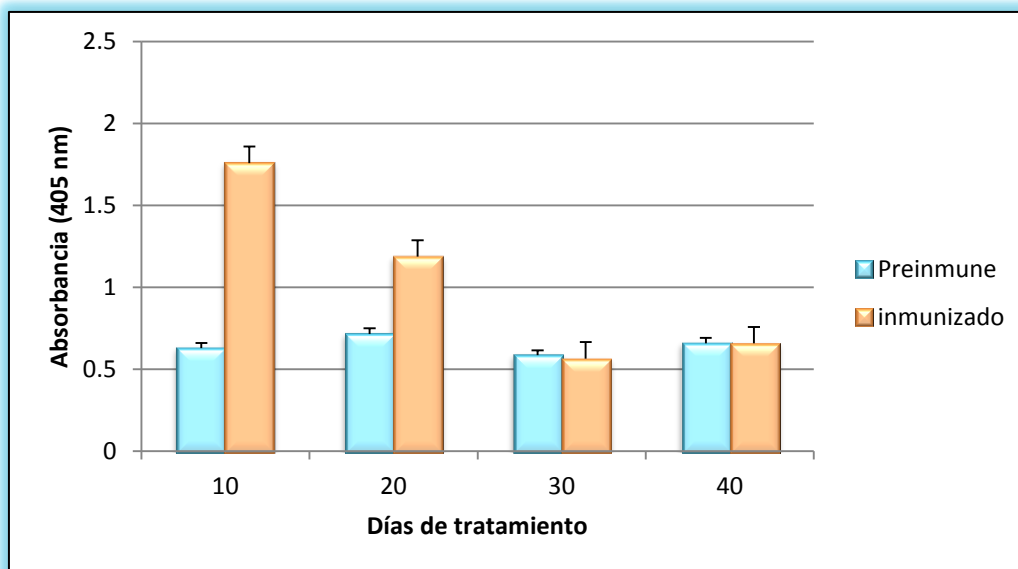
Figura 11. Efecto de CEMs en el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 con protección inmunológica antitumoral. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH-16), posteriormente fueron inoculados con 10^5 células tumorales TC-1 solas, o de manera simultánea, vía intravenosa, con 10^5 CEMs derivadas de cérvix normal (CEMs-CxN), de cáncer cérvico-uterino (CEMs-CaCu), o de médula ósea (CEMs-MON). El crecimiento tumoral fue evaluado cada tercer día como descrito en materiales y métodos. Se muestran diferencias significativas entre las curvas de crecimiento tumoral (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Efecto de Células Estromales Mesenquimales (CEMs) en la inducción de anticuerpos anti-TC1 en ratones C57BL/6 con y sin protección inmunológica.

La inmunidad humoral antitumoral, basada en la acción de los anticuerpos que pueden unirse a los antígenos asociados a tumor y eliminar a las células tumorales, es una vía importante del sistema inmune para contrarrestar la enfermedad. No obstante, Corcione *et. al*, 2011 reporta que las CEMs pueden inhibir la activación de linfocitos B y su diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por tanto, en el presente trabajo se analizó el papel de CEMs en la inducción de anticuerpos contra células tumorales TC-1, en ratones C57BL/6 con y sin previa protección inmunológica, y que fueron sometidos al reto tumoral. Para ello, después de haber aplicado los tratamientos con células tumorales y CEMs a ratones C57BL/6 con o sin previa inmunización con el péptido RAHYNIVTF, se obtuvieron muestras de suero a los 10, 20, 30 y 40 días posteriores al tratamiento. Como controles negativos, se emplearon muestras de sueros de ratones libres de tratamiento (pre-inmunes), o que sólo recibieron inmunización con el péptido RAHYNIVTF, y como control positivo se obtuvieron muestras de ratones a los cuales sólo se inocularon células tumorales TC-1. La detección de anticuerpos anti-TC1 fue llevada a cabo mediante la técnica de ELISA celular, empleando como antígeno a las células TC-1 adheridas en la placa de ELISA. Para determinar la actividad funcional de los anticuerpos específicos contra las células tumorales TC-1, se determinó su capacidad para fijar complemento e inducir citotoxicidad sobre las propias células tumorales.

Inicialmente se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra las células TC-1 en sueros de ratones preinmunes y en aquellos inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, encontrándose que los ratones preinmunes mantuvieron un nivel basal, absorbancia (Abs) de 0.64, durante los 40 días de duración del experimento, mientras que los ratones que recibieron inmunización con el péptido, mostraron una cantidad importante de anticuerpos contra las células TC-1 a los primeros 10 días (Abs=1.75), la cual disminuyó paulatinamente a 1.18 a los 20 días, y finalmente a 0.65 a los 30 y 40 días después de la inmunización (Figura 12 A). Por otra parte, al analizar la capacidad citotóxica de los anticuerpos detectados en estos grupos de ratones, se observó que el suero de los animales preinmunes, como se esperaba, no tuvo efecto citotóxico sobre las células tumorales TC-1, mientras que el suero de los animales inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, obtenido a los 10 y 20 días, presentó una discreta actividad citotóxica de 8% (Figura 12B).

A)



B)

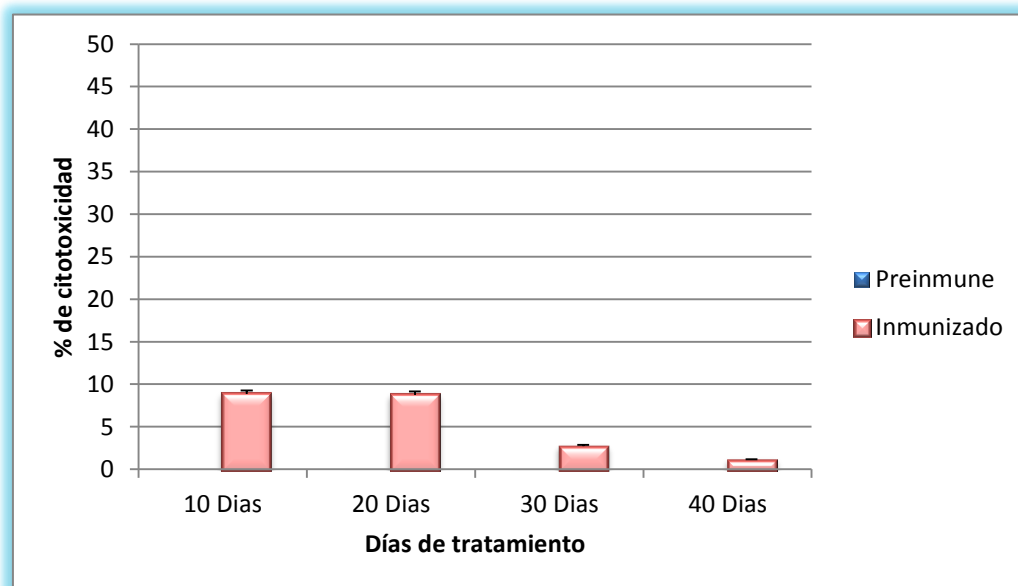
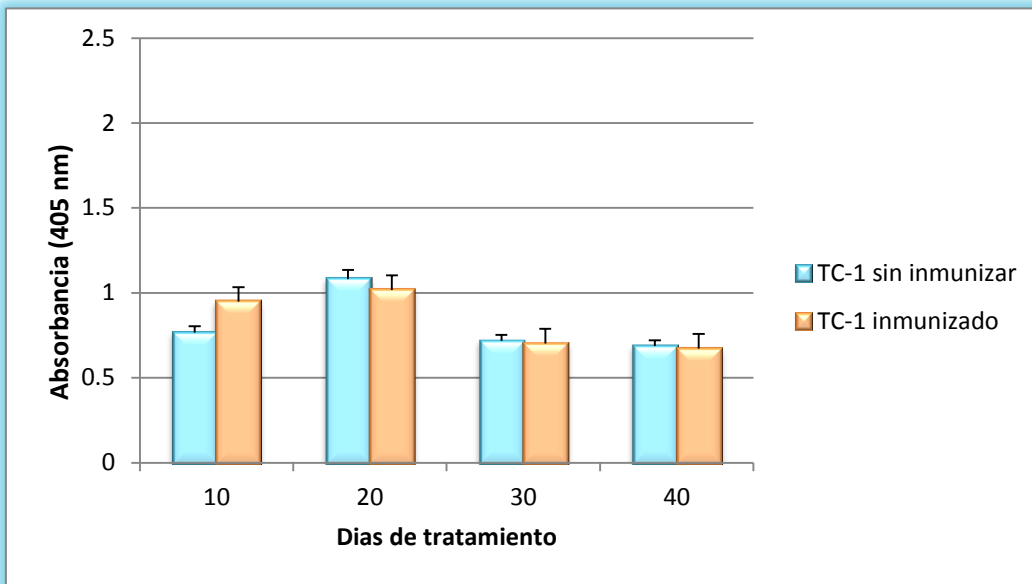


Figura 12. Detección y actividad citotóxica de anticuerpos séricos de ratones preinmunes e inmunizados con el péptido RAHNIVTF. Sueros de ratones C57BL/6 preinmunes o inmunizados con tres dosis del péptido RAHYNIVTF fueron obtenidos entre los días 10-40 días después de haber aplicado la última inmunización. **A)** La detección de anticuerpos séricos específicos contra las células tumorales TC-1 se realizó mediante la técnica de ELISA. **B)** Se muestra la actividad citotóxica mediada por complemento, de los anticuerpos séricos de los ratones de ambos grupos. En cada caso se muestra el promedio de tres ensayos +/- desviación estándar

Posteriormente, al determinar el contenido de anticuerpos específicos hacia células tumorales TC-1 en sueros de ratones inmunizados o no con el péptido RAHYNIVTF y que fueron retados con las células tumorales, en este caso como se esperaba, los sueros de ambos grupos de ratones mostraron niveles considerables de anticuerpos, particularmente durante los primeros 20 días después de la inoculación de las células tumorales, mostrando niveles de anticuerpos cercanos a 1.0 de absorbancia, y de aproximadamente 0.71 a los días 30 y 40 (Figura 13A). No obstante, al determinar la actividad citotóxica de los anticuerpos, se observó que sólo en el grupo de animales inmunizados se encontró actividad creciente, la cual fue de 5% en el día 20, hasta un 30% en el día 40 (Figura 13B).

Por otro lado y tomando en consideración que las CEMs pueden ejercer actividad inhibidora sobre la generación de anticuerpos, se procedió a analizar si las CEMs obtenidas de cérvix normal o de tumores de CaCu al ser inoculadas de manera simultánea con las células tumorales TC-1 en ratones C57BL/6 previamente inmunizados o no con el péptido RAHYNIVTF inhibían la generación de anticuerpos contra las células tumorales TC-1. En principio, se analizó el papel de CEMs-MON para analizar este efecto, ya que en la literatura son consideradas como el “estándar de oro” por su capacidad inmunosupresora demostrada en una gran cantidad de estudios (Corcione *et. al*, 2011; Comoli *et. al*, 2007; Asari *et. al*, 2010). De manera interesante se observó que la administración de CEMs-MON favoreció la generación de anticuerpos tanto en los ratones inmunizados como en aquellos que no recibieron inmunización. La detección de anticuerpos en los sueros de ratones no inmunizados mostró una absorbancia cercana a 1.0 en los primeros 30 días después de la inoculación de las células tumorales y disminuyó a 0.5 al día 40. Sin embargo en los ratones inmunizados, los niveles de anticuerpos detectados fueron de 1.2 de absorbancia a los 10 días, y sobre 1.5 en los días 20-40 después de la inoculación de las células TC-1 (Figura 14A). Al analizar la actividad funcional de los anticuerpos contenidos en los sueros de ambos grupos de ratones, se observó un incremento paulatino en su actividad citotóxica: los sueros de ratones no inmunizados mostraron 5% de citotoxicidad en los primeros 10 días y alcanzaron una actividad citotóxica hasta un 25% en aquellos obtenidos en el día 40; mientras que aquellos obtenidos de ratones inmunizados, la actividad citotóxica fue de 10% en los primeros 10 días y alcanzaron un 35% en aquellos obtenidos en el día 40 (Figura 14B).

A)



B)

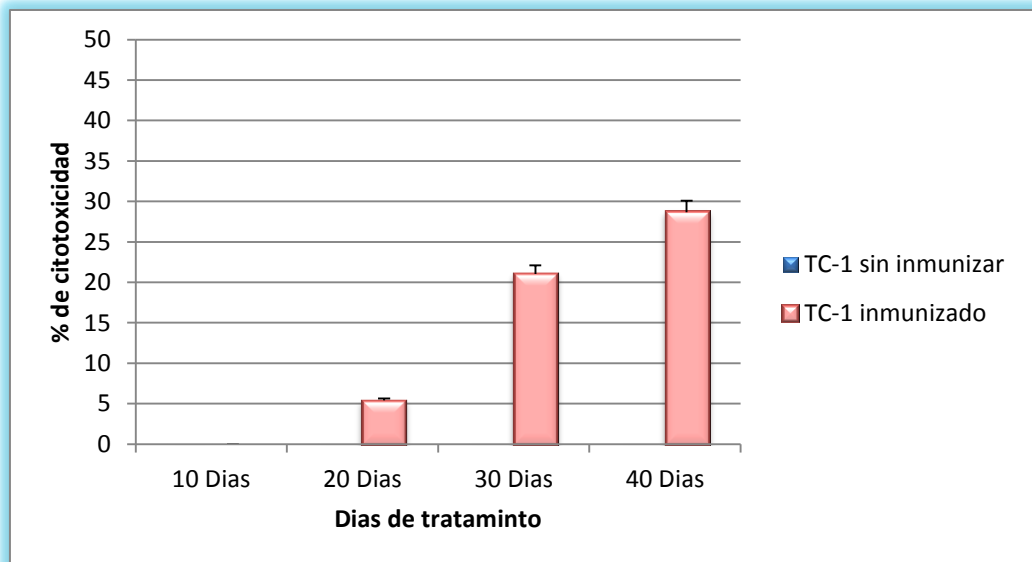
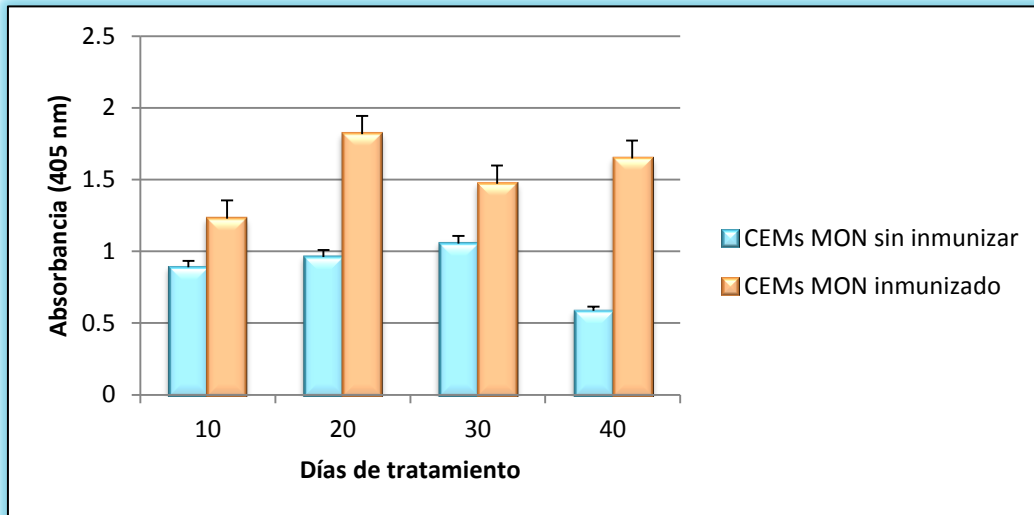


Figura 13. Detección y actividad citotóxica de anticuerpos séricos de ratones con o sin inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF y retados con células tumorales TC-1. Ratones de la cepa C57BL/6 con o sin previa inmunización con el péptido RAHYNIVTF fueron retados con células tumorales TC-1. Posteriormente se colectaron muestras séricas de ambos grupos de ratones entre los días 10-40 después de la última inoculación de las células tumorales. **A)** La detección de anticuerpos séricos específicos contra las células tumorales TC-1 se realizó mediante la técnica de ELISA. **B)** Se muestra la actividad citotóxica mediada por complemento, de los anticuerpos séricos de los ratones de ambos grupos. En cada caso se muestra el promedio de tres ensayos +/- desviación estándar.

A)



B)

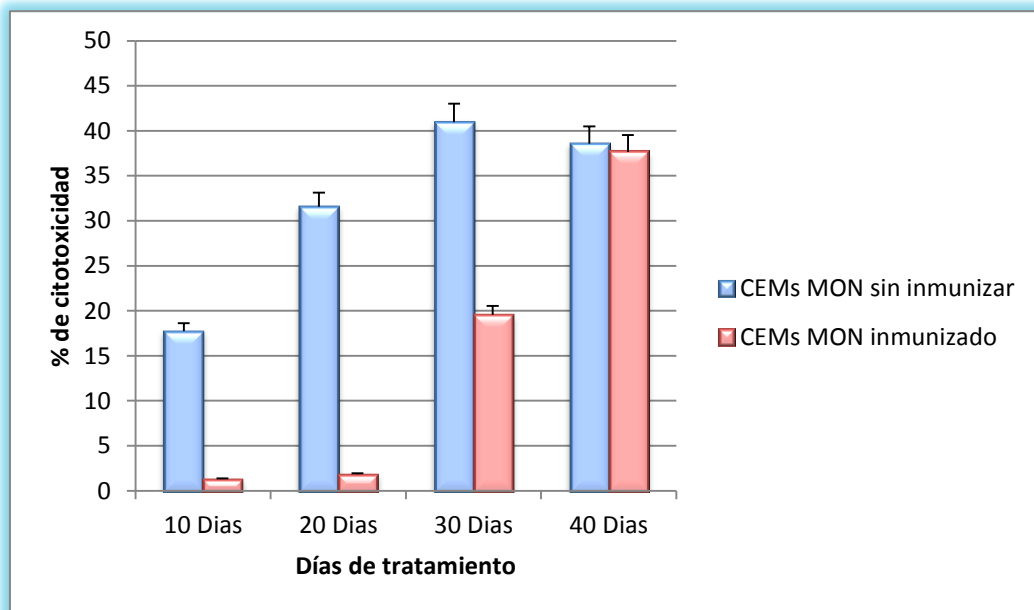
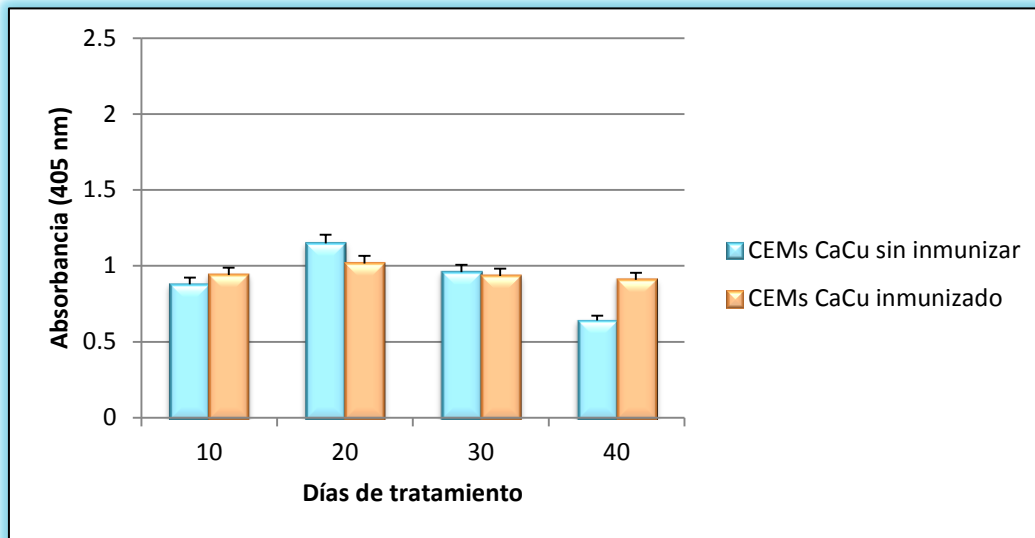


Figura 14. Detección y actividad citotóxica de anticuerpos séricos de ratones con o sin inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF y retos con células tumorales TC-1 en presencia de CEMs-MON. Ratones de la cepa C57BL/6 con o sin previa inmunización con el péptido RAHYNIVTF fueron retos con células tumorales TC-1 en presencia de células estromales mesenquimales obtenidas de médula ósea normal (CEMs-MON). Posteriormente se colectaron muestras séricas de ambos grupos de ratones entre los días 10-40 después de la última inoculación de las células tumorales. **A)** La detección de anticuerpos séricos específicos contra las células tumorales TC-1 se realizó mediante la técnica de ELISA. **B)** Se muestra la actividad citotóxica mediada por complemento, de los anticuerpos séricos de los ratones de ambos grupos. En cada caso se muestra el promedio de tres ensayos +/- desviación estándar.

Por otra parte, al analizar el efecto de la administración de las CEMs-CaCu sobre la inducción de anticuerpos anti-TC-1 en los grupos de ratones inmunizados o no con el péptido RAHYNIVTF y que fueron retados con las células tumorales TC-1, se observó que los niveles de anticuerpos en ambos grupos de ratones mostraron absorbancias cercanas a 1.0 en los sueros tomados a los diferentes tiempos (Figura 15A). No obstante la actividad citotóxica de los anticuerpos fue diferente en los sueros obtenidos de ambos grupos de ratones, mientras los sueros de ratones que no recibieron inmunización incrementaron su actividad citotóxica de 5-20% del día 10 al día 40; los sueros de los ratones que recibieron inmunización disminuyeron su actividad citotóxica desde 20% al día 10, 15% en el día 20 y 0% en los días subsecuentes (Figura 15B), sugiriendo una inhibición en la generación de anticuerpos con capacidad citotóxica en estos ratones en relación con el crecimiento del tumor.

Finalmente, al evaluar el efecto de CEMs-CxN sobre la inducción de anticuerpos en ratones con y sin previa inmunización con el péptido RAHYNIVTF, en ambos grupos de ratones se mantuvo la inducción de anticuerpos anti-TC-1 en niveles altos, particularmente en los sueros de los animales que recibieron inmunización previa. Los niveles de anticuerpos anti-TC-1 en los ratones no inmunizados mostraron absorbancias entre 0.93-1.3 durante el tiempo del experimento, mientras que los sueros de ratones inmunizados mostraron niveles superiores a 1.5 de absorbancia durante los 40 días del experimento (Figura 16A). De manera interesante, los sueros de ratones que no recibieron inmunización mostraron una importante actividad citotóxica a través de la fijación de complemento, de 15% en los sueros tomados al día 10, la cual incrementó paulatinamente hasta de 25% en aquellos sueros tomados al día 40 después de la aplicación de las células tumorales; mientras que en los sueros de ratones que recibieron inmunización, la actividad citotóxica fue menor al 10% en los primeros 30 días y de 27% en el día 40 (Figura 16B).

A)



B)

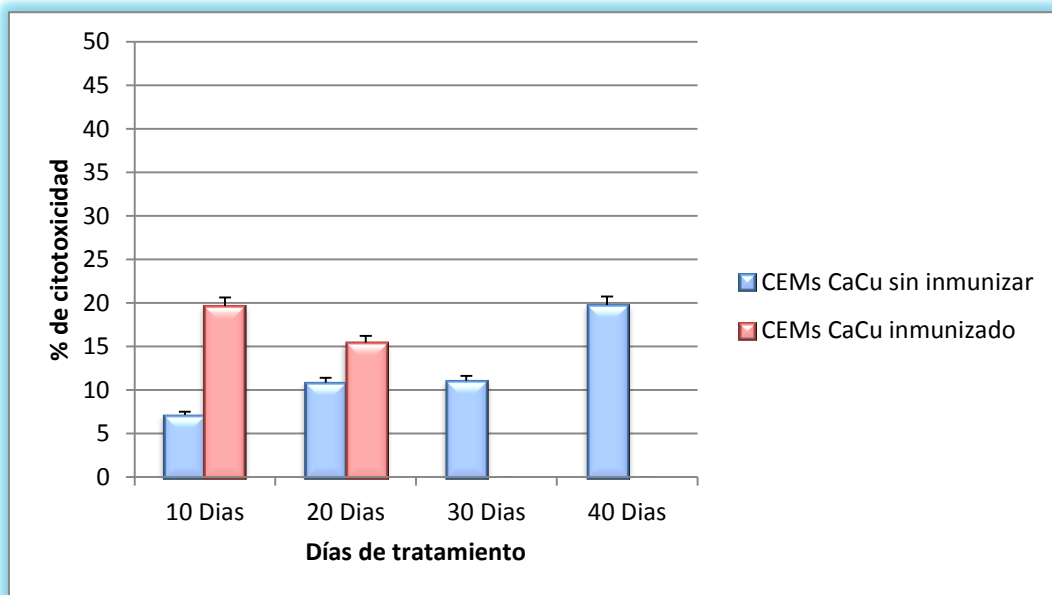
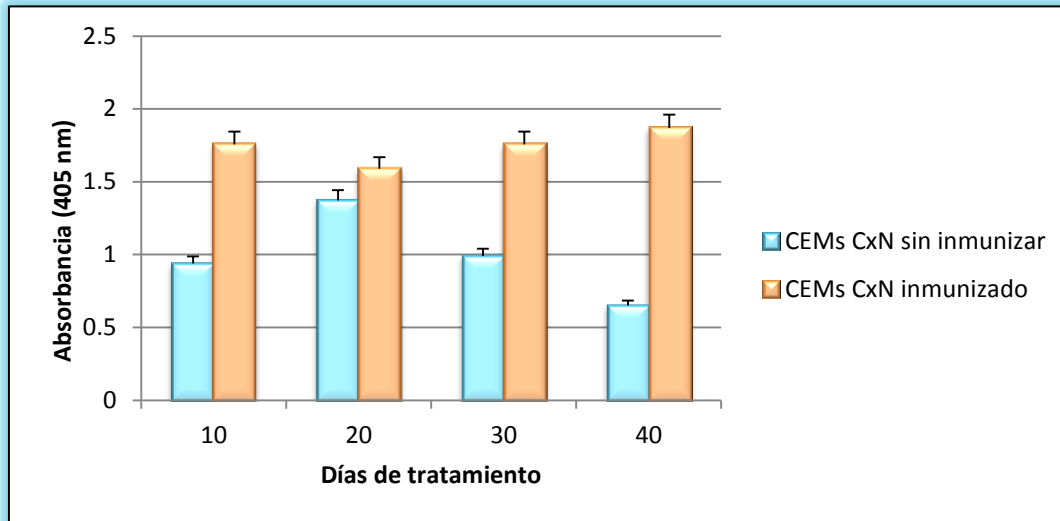


Figura 15. Detección y actividad citotóxica de anticuerpos séricos de ratones con o sin inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF y retos con células tumorales TC-1 en presencia de CEMs-CaCu. Ratones de la cepa C57BL/6 con o sin previa inmunización con el péptido RAHYNIVTF fueron retos con células tumorales TC-1 en presencia de células estromales mesenquimales obtenidas de tumores de cáncer cérvico-uterino (CEMs-CaCu). Posteriormente se colectaron muestras séricas de ambos grupos de ratones entre los días 10-40 después de la última inoculación de las células tumorales. **A)** La detección de anticuerpos séricos específicos contra las células tumorales TC-1 se realizó mediante la técnica de ELISA. **B)** Se muestra la actividad citotóxica mediada por complemento, de los anticuerpos séricos de los ratones de ambos grupos. En cada caso se muestra el promedio de tres ensayos +/- desviación estándar.

A)



B)

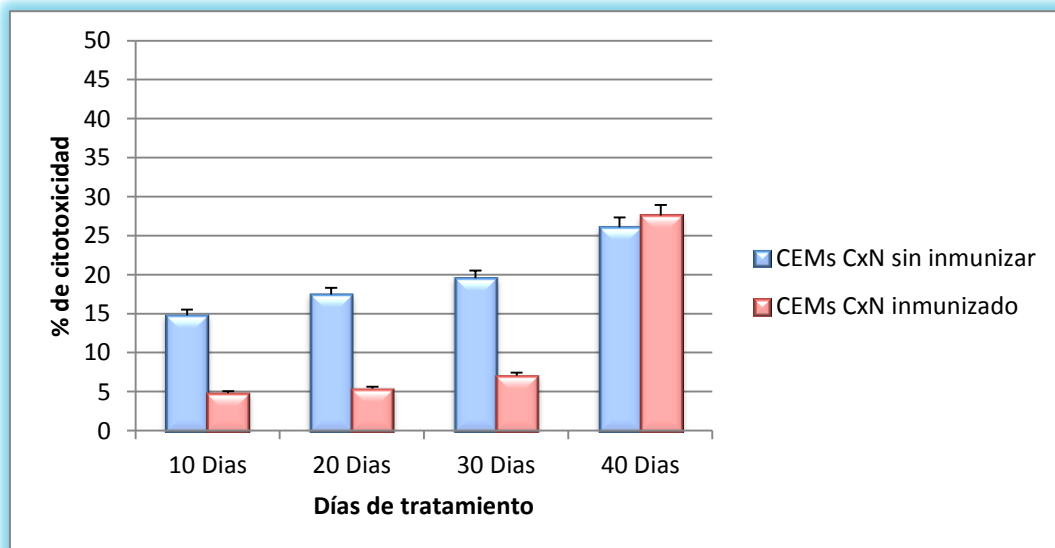


Figura 16. Detección y actividad citotóxica de anticuerpos séricos de ratones con o sin inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF y retos con células tumorales TC-1 en presencia de CEMs-CxN. Ratones de la cepa C57BL/6 con o sin previa inmunización con el péptido RAHYNIVTF fueron retos con células tumorales TC-1 en presencia de células estromales mesenquimales obtenidas de tejido cervical normal (CEMs-CxN). Posteriormente se colectaron muestras séricas de ambos grupos de ratones entre los días 10-40 después de la última inoculación de las células tumorales. **A)** La detección de anticuerpos séricos específicos contra las células tumorales TC-1 se realizó mediante la técnica de ELISA. **B)** Se muestra la actividad citotóxica mediada por complemento, de los anticuerpos séricos de los ratones de ambos grupos. En cada caso se muestra el promedio de tres ensayos +/- desviación estándar.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En los tejidos sanos el estroma funciona como una barrera contra la tumorigénesis, sin embargo la presencia de células tumorales o células transformadas inician una serie de cambios cruciales que pueden convertir este entorno en el soporte de progresión del cáncer (Junttila, 2013). La infiltración de diversos tipos celulares en el nicho tumoral, puede incluir poblaciones de células con funciones pro- o anti-tumorales (Egeblad, *et al.*, 2010). Las CEMs que forman parte del microambiente tumoral, constituyen aproximadamente el 0.01% del estroma y participan con una gran variedad de funciones biológicas, dentro de las cuales figuran: la señalización a través de diferentes factores solubles, modulación de apoptosis, soporte vascular y modulación de la respuesta inmune antitumoral (Wang *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2010; Kucerova *et al.*, 2010; Vianello *et al.*; 2010 Li *et al.*, 2011). En el presente estudio se analizó el efecto de CEMs derivadas de tumores de Cáncer Cérvico Uterino (CEMs-CaCu) en la inducción de anticuerpos específicos anti-tumor, en un modelo de ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-Db) inoculados con células tumorales TC-1 del mismo haplotipo H2-Db y positivas a la expresión de las oncoproteínas E6/E7 de VPH-16, tanto en condiciones normales como en ratones con previa protección inmunológica con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH 16. De manera comparativa, también se emplearon CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (CEMs-MON) como “estándar de oro”, y de tejido Cervical Normal (CEMs-CxN).

Este modelo tumoral *in vivo*, nos permitió revelar los siguientes hallazgos: 1) la inoculación de CEMs-CaCu y CEMs-CxN a los ratones en condiciones normales, indujo un incremento, aunque no significativo, en el crecimiento tumoral en relación al observado en ratones inoculados únicamente con células tumorales TC-1; 2) La aplicación de CEMs, particularmente CEMs-CaCu en los ratones previamente inmunizados, revirtió fuertemente el efecto protector del péptido antigénico RAHYNIVTF, ya que favoreció el crecimiento de tumores; 3) A excepción del grupo de ratones que fueron inoculados con CEMs-CaCu y células TC-1, la inmunización con el péptido RAHYNIVTF favoreció la inducción de anticuerpos IgG, IgA e IgM que reconocieron a las células tumorales TC-1 y que mostraron actividad citotóxica a través de la activación de complemento. 4) La actividad citotóxica, determinada *in vitro*, de los anticuerpos contenidos en los sueros de los ratones inmunizados y tratados con las células tumorales y las diferentes CEMs, se asoció de manera importante con el control del crecimiento tumoral observada en los ratones tratados.

En nuestro modelo experimental encontramos que el desarrollo del crecimiento tumoral fue completamente diferente en los ratones C57BL/6 tratados bajo condiciones normales que en aquellos que fueron previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF. En condiciones normales se observó que las CEMs-CxN y CEMs-CaCU incrementaron ligeramente el crecimiento tumoral al término del experimento, sin embargo, en los ratones que fueron previamente inmunizados, la inoculación simultánea de las diferentes CEMs, particularmente la de CEMs-CaCU, fue capaz de inhibir fuertemente la protección inmunológica ejercida por el péptido y favorecer en consecuencia el crecimiento tumoral. Estos resultados parecen recapitular lo reportado por diversos autores en relación a los hallazgos encontrados sobre el papel que tienen las CEMs en el crecimiento tumoral: mientras algunos autores han descrito que las CEMs pueden suprimir el crecimiento del tumor (Ohlsson *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010), otros han reportado que las CEMs contribuyen a la progresión y metástasis del mismo (Karnoub *et al.*, 2007; Djouad *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Amé-Thomas *et al.*, 2007). En este sentido, recientemente se ha postulado que la discrepancia de estos resultados parece depender de la actividad de los tumores y sus microambientes para atraer e inducir la activación de las CEMs, esencialmente a través de mecanismos que dependen de efectos combinados de diversas citocinas, las cuales incluyen a citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento entre otros, los cuales pueden modificar las vías de señalización que conducen a la activación funcional de las CEMs, y en consecuencia, dirigir las hacia fenotipos que podrían inhibir o favorecer el crecimiento y desarrollo del tumor (Liu *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha demostrado que CEMs derivadas de médula ósea tienen la capacidad de iniciar cáncer gástrico, al ser reclutadas en el sitio de inflamación crónica inducida por infección por *helicobacter pylori* en el estómago (Houghton *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2008). Lo cual sugiere que factores proinflamatorios presentes en el microambiente pueden activar a las CEMs e inducir las a generar las condiciones propicias para el crecimiento tumoral. En el caso particular de nuestro estudio, pensamos que la producción de factores proinflamatorios inducida a través de la inmunización en los ratones tratados de manera simultánea con las CEMs (particularmente las CEMs-CaCU) y TC-1, favoreció el crecimiento tumoral, ya que este caso particular, al final del experimento los tumores generados en estos ratones casi duplicó en tamaño respecto a aquel obtenido en ratones que no fueron inmunizados y que recibieron las mismas dosis de células. Esta aseveración se basa en el hecho de que en un estudio previo (Don-López A 2011), detectamos que el patrón de citocinas proinflamatorias Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) incrementó en los sueros de ratones que fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF en relación con aquellos que no recibieron inmunización. Asimismo, en los ratones previamente inmunizados que recibieron CEMs-CaCU y células TC-1, el patrón de citocinas de tipo Th2(IL-4,

IL-5) y TGF- β fue incrementado respecto al encontrado en ratones que no fueron inmunizados y que recibieron el mismo tratamiento, sugiriendo entonces que el patrón de citocinas proinflamatorias producidas por el huésped participa en la activación de las CEMs-CaCU para ejercer sus funciones inmunosupresoras. Estos resultados son comparables a los demostrados en algunos estudios en donde se ha demostrado que en un microambiente inflamatorio, en donde predominan citocinas tales como IFN γ , TNF α e IL-1 α/β , conducen a las CEMs a ejercer o mejorar sus actividades inmunosupresoras (English K 2013). En este contexto, también se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias promueven la regulación diferencial de factores inmunomoduladores en las CEMs, incluyendoIDO, PGE2, TGF- β , IL-10, TSG-6 y NO (Ren G, 2008, English K *et al.*, 2007), debido a las redes de señalización con otras células del microambiente tumoral (Bian ZY *et al.*, 2010; deBoek *et al.*, 2013).

Por otro lado, en nuestro estudio también encontramos que los niveles de anticuerpos anti-TC1 presentes en los sueros de los ratones inmunizados, mostró una tendencia a incrementarse respecto a los detectados en animales no inmunizados, particularmente en aquellos ratones que recibieron células TC-1 de manera simultánea con CEMs-MO o CEMs-CxN. Sin embargo en los ratones que recibieron TC-1 y CEMs-CaCU, los niveles de anticuerpos anti-TC-1 fueron menores. Asimismo, los anticuerpos detectados en los ratones inmunizados y que recibieron células tumorales con CEMs-Mo o CEMs-CxN, mostraron mayor capacidad para lisar a las células tumorales TC-1 *in vitro* a través de la activación de complemento, respecto a los anticuerpos detectados en los ratones tratados con CEMs-CaCU. Este fenómeno se puede deber a que la propiedad de las CEMs para inhibir la producción de anticuerpos por las células plasmáticas, sea diferente entre las CEMs utilizadas en este estudio, tal como se ha publicado en algunos estudios donde se ha demostrado que las CEMs obtenidas de diferentes fuentes pueden afectar de manera diferencial a las células B y detenerlas en fase G₀ del ciclo celular, y evitar en consecuencia su maduración hacia células plasmáticas, afectando significativamente la producción de inmunoglobulinas de tipo IgM, IgG e IgA. (Corcione, 2011; Comoli, 2007; Asari, 2010). Tomando en consideración que estos isotipos de inmunoglobulinas difieren en su capacidad para activar el sistema de complemento, en donde IgG e IgM confieren mayor activación que IgA (Abbas A 2012), la inducción diferencial de estos isotipos de anticuerpos en los ratones tratados con las diferentes CEMs, pudo ser determinante en la capacidad para lisar a las células tumorales y por tanto controlar el crecimiento tumoral. Por ejemplo, en nuestro estudio se observó que los anticuerpos detectados en los sueros de los ratones inmunizados que recibieron células tumorales TC-1 y CEMs-CaCU mostraron una disminuida capacidad para activar el complemento y lisar a las células tumorales, principalmente entre los días 30 y 40, a pesar de haber

detectado anticuerpos a un nivel comparable al obtenido en los sueros de ratones inmunizados y expuestos únicamente a las células tumorales TC-1, cuya actividad citotóxica fue considerablemente mayor. Por tanto, sería interesante determinar en estudios posteriores los niveles específicos de los isotipos de anticuerpos generados por los ratones en presencia de las diferentes CEMs, ya que en este estudio se utilizó un anticuerpo secundario que detectó a los tres isotipos juntos.

Por otra parte, en nuestro estudio también observamos que la actividad citotóxica de los anticuerpos contenidos en los sueros de los ratones inmunizados y tratados con las células tumorales y las diferentes CEMs, la cual se llevó a cabo en ensayos *in vitro* mediante la capacidad de activar complemento y lisar a las células tumorales, mostró una asociación importante con el crecimiento tumoral observado en los ratones que recibieron dichos tratamientos. En nuestro estudio encontramos que los sueros de los ratones que fueron tratados con las células TC-1 y simultáneamente con las CEMs-CxN o las CEMs-MON, mostraron mayor actividad citotóxica que la detectada por los anticuerpos contenidos en los sueros de los ratones tratados con células TC-1 y CEMs-CaCU. De hecho en este último grupo se observó que a partir del día 30 los anticuerpos contenidos en los sueros de los ratones que recibieron inmunización previa, no mostraron actividad citotóxica, lo cual se asoció fuertemente con un mayor crecimiento tumoral respecto a los ratones que recibieron CEMs-CxN y CEMs-MON. Estos resultados nos permiten sugerir que las CEMs-CaCU además de influir de manera importante en la proliferación y diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos como reportado por algunos autores (Traggiai E et al 2008), y en la inducción de anticuerpos con actividad citotóxica, es también sabido que las CEMs que derivan del microambiente tumoral presentan una mayor actividad inmunosupresora que aquellas CEMs que derivan de tejidos normales (Haddad R y Araujo F, 2014; Sun Z *et al.*, 2014).

Finalmente, con base en los resultados obtenidos, se puede destacar que bajo condiciones de activación de la respuesta inmune, inducida por la inmunización con el péptido RAHYNIVTF, las diferentes CEMs (CxN, CaCU y MON) fueron activadas de manera diferencial al ser inoculadas de manera simultánea con las células tumorales TC-1, de tal manera que CEMs derivadas de tejidos tumorales incrementaron en mayor medida su capacidad inmunosupresora, la cual influyó de manera determinante en la inhibición de la producción de anticuerpos anti-TC-1 con actividad citotóxica antitumoral, favoreciendo en consecuencia el crecimiento tumoral.

CONCLUSIONES:

1.- La inoculación de Células Estromales Mesenquimales (CEMs) obtenidas de médula ósea (CEMs-MON); cervix normal (CEMs-CxN) y de cáncer de cuello uterino (CEMs-CaCu) no modificó la cinética de crecimiento de tumores inducidos con las células tumorales TC-1 positivas a la expresión de las proteínas E6 y E7 de VPH-16 en ratones de la cepa C57BL/6.

2.- Ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH-16, fueron protegidos ante el reto tumoral de células tumorales TC-1 inoculadas a nivel dorsal.

3.- La inoculación de CEMs-CaCu a ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF:

- Promovió el fuertemente el crecimiento tumoral en ratones que fueron co-inoculados con células TC-1.
- Indujo una disminución importante en la generación de anticuerpos con actividad citotóxica contra las células tumorales TC-1.

PERSPECTIVAS:

El entendimiento de los mecanismos por los cuales las células tumorales interactúan con las CEMs en un microambiente inflamatorio para exacerbar la inmunosupresión de la respuesta antitumoral antígeno-específica, puede ser relevante para establecer protocolos y nuevas estrategias de terapia contra el cáncer

Con base en los resultados obtenidos y entendiendo que las CEMs localizadas en el microambiente tumoral favorecen el crecimiento tumoral y suprimen la respuesta inmune, es crucial determinar los mecanismos por los cuales las CEMs inhiben la activación y diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, a través de la inducción de citocinas inmunoregulatoras como IL-10, TGF- β , o factores de inmunosupresión tales como prostaglandinas,IDO, etc.

BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas, Lichtman. 2012. Inmunología Celular y Molecular. 7ª Edición. Ed. Elsevier Madrid p.p.
- A.de Boeck, P.Pauwels, K.Hensenetal.,“Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin "/>HER& signalling,” 2013; 62:550-560.
- Anandkumar A, Devaraj H. Tumour immunomodulation: mucins in resistance to initiation and maturation of immune response against tumours. Scand J Immunol 2013;78:1–7.
- Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, Mullen Y. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. Exp Hematol. 2009; 37(5):604-15.
- Bhatia A, Kumar Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. Expert Rev Clin Immunol 2014;10:41–62.
- Casadevall, A., Dadachova, E., Pirofski, L. Passive antibody therapy for infectious diseases. Nature Reviews Microbiology 2, 2004; 695-703.
- Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. APMIS. 2010; 118(6-7):422-49.
- Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, Cometa A, Cioni M, Porretti L, Barberi W, Frassoni F, Locatelli F. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. Nephrol Dial Transplant. 2008; 23(4):1196-202.
- Conti J, Thomas G. The role of tumour stroma in colorectal cancer invasion and metastasis. Cancers. 2011;3:2160–8.
- Contreras Landeros S. 2010. Tesis de Licenciatura. Analisis de la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino. FES Zaragoza. UNAM.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. Blood. 2006; 107(1):367-72.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 2002;420:860–7.
- De Villiers Ethel-Michele, Fauquet Claude, Broker Thomas R, Bernard Hans-Ulrich and zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004; 324:17-27.

- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003; 102:3837-3844.
- Don-López C. 2010. Tesis de Licenciatura. 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. FES Zaragoza. UNAM.
- D'Souza N, Burns JS, Grisendi G, Candini O, Veronesi E, Piccinno S, et al: MSC and Tumors: Homing, Differentiation, and Secretion Influence Therapeutic Potential. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2012.:10.1007.
- Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010; 20(1):34-50.
- Dunn G., Bruce A., Ikeda H., Old L., Schreiber R. Cancer immunoediting; from immune-surveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 2002; 3(11):991-998
- Dvorak, H.F., V. M. Weaver, T. D. Tlsty, and G. Bergers. Tumor microenvironment and progression, *Journal of Surgical Oncology*, 2011; 103: 468–474.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S. & Werb, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 2010; 18, 884–901.
- E. Traggiai, S. Volpi, F. Schena et al., "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients," *Stem Cells*, 2008; 26:562-569.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127:514–25.
- Esposito M, Kang Y. Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis. *Pharmacol Ther* 2014;141:222–33.
- Fenoglio D, Traverso P, Parodi A, Kalli F, Zanetti M, Filaci G. Generation of more effective cancer vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9:2543–7.
- Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*. 2006; 151(12):2321-35.
- Gottschling S, Granzow M, Kuner R, Jauch A, Herpel E, Xu EC, et al: Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer—different from others? Insights from comparative molecular and functional analyses. *Lung Cancer* 2013, 80(1):19–29
- G.Ren, L.Zhang, X.Zhaoetal., "Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide," *Cell Stem Cell*, 2008; 2:141-150.

- Hall, B., M.Andreeff., F, Marini. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol.* 2007; 180:263-83.
- Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int.* 2014;2014.
- Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21, 309–322.
- Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(10):1700-17.
- Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(12):1496-500.
- Huang WH, Chang MC, Tsai KS, Hung MC, Chen HL, Hung SC: Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene* 2013, 32(37):4343–4354.
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science.* 2004; 306(5701):1568-71.
- Instituto Nacional de Cáncer (INCAN). <http://www.incan.salud.gob.mx/>
- Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol* 2008; 36:773–841.
- Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 2013; 501(7467), 346-354.
- K. English, “Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation,” *Immunology and Cell Biology*,2013; 91:19-26.
- K. English, F. P. Barry, C. P. Field-Corbett, and B. P. Mahon, “IFN-g and TNF-a. differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells,” *Immunology Letters*, 2007; 110:91-100.
- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007; 7(1):79-89.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449: 557-563.
- Karp JM, Leng GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Stem Cell.*2009; 4: 206-16.
- Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012;72:3125–30.

- Kidd S; Spaeth E; Klopp A; Andreeff M; Hall B; Marini Fc. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy*. 2008; 10(7):657-667.
- Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, et al: Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One* 2012, 7(2):e30563.
- Kindt.T.J et al. *Inmunología de kuby*. Sexta edición. Editorial McGraw-Hill. México. 2006
- Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6(4):435-41.
- Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner C. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer*, 2010; 9:129.
- Kunz-Schughart LA, Knuechel R. Tumor-associated fibroblasts (part II): functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol* 2002;17:623–37.
- Lewin Benjamín. *Genes*. 3a Edición, Editorial Reverté, Barcelona, 1989
- Li L, Tian H, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2011; 226(7): 1860–1867.
- Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*. 2007; 101(4):805–815.
- Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2010; 109(1):4–24.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996: 56:21–26.
- Liotta LA and Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375–379.
- Liu S, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res*. 2011; 71:614-24
- Liu Y, et al. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem*. 2011; 286:25007-25015.
- Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res*. 2009; 40(6):428-34.

- Luo J, Ok Lee S, Liang L, Huang CK, Li L, Wen S, et al: Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* 2013;10.1038.
- Maccalli C, Volontè A, Cimminiello C, Parmiani G. Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review. *J Cancer* 2013.:S0959-8049(13)01009-5.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:231–7.
- Mattoli S, Bellini A, Schmidt M. The role of a human hematopoietic mesenchymal progenitor in wound healing and fibrotic diseases and implications for therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; 4:266–80.
- Montesinos JJ, et al. 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; 22:2508-2519.
- 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.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(8):550-60.
- Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(12):878-89.
- Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002; 89(2):213-28.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006; 24:S3/1-10.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, Ch, J.L.M.. Epidemiology classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England J of Med.* 2003; 348: 518-527.
- Nauta AJ, WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007; 110(10):3499-506.
- Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H: Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 2012, 79(6):290–306.
- Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis* 2013;10.

- Ohlsson L, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol*. 2003; 75(3): 248–255.
- Paraiso KH, Smalley KS. Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* 2013; 85:1033–41.
- Parham, P. *Inmunología*. 3ª edición Ed. Panamericana, Buenos Aires, 2009
- Park YJ, Song B, Kim YS, Kim EK, Lee JM, Lee GE, et al. Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2013; 73:5669–81.
- Patel S, Meyer J, Greco S, Corcoran K Bryan R, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF- β . *J Immunol*. 2010; 184(10): 5885–5894.
- Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*. 2007; 65(4):336-43.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-797
- Roitt I., Brostoff J., and Male D. *Immunology*. Mosby. 2004.
- Solomon. Berg. Martín, *Biología*. Quinta Edición, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México 2001.
- Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006; 24 (1):16-22.
- Stanley M. HPV: a master at avoiding the host defenses. *HPV Today* 2007; 11:1-16
- Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol*. 2008; 109(2):15-21.
- Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*. 2002; 62:3603-3608.
- Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol*. 7,14 (2014).
- Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med*. 2010; 17: 579- 587.
- Swann, J. B, M. J. Smyth, J. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(5):1137-1146.

- Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, San Miguel JF. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*. 2008; 93(9):1301-9.
- Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, et al: Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells* 2012, 30(11):2472–2486.
- Tian K, Yang S, Ren Q, Han Z, Lu S, Ma F, Zhang L, Han Z. “p38 MAPK contributes to the growth inhibition of leukaemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells.” *Cell Physiol Biochem*. 2010; 26(6):799-808.
- Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cáncer*. 2002; 2(1):59-65.
- Torres J Franklin. Cáncer de cuello uterino y VPH: aspectos moleculares. *Biociencias*. 2011; 6(2):91-95.
- Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2008; 8, 726-736
- Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, et al: NF-kappaB activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res* 2013, 73(1):364–372.
- Vianello F, Villanova F, Tisato V, Lymperi S, Ho K, Gomes A, Marin D, Bonnet D, Apperley J, Lam E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* 2010; 95(7): 1081–1089.
- Wang S, Qu X, Zhao RC: Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol* 2012, 5:19.
- Wang X, Zhang Z, Yao C. Survivin is upregulated in myeloma cell lines cocultured with mesenchymal stem cells. *Leuk Res*. 2010; 34(10): 1325–1329
- Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(1):43-56.
- Whiteside TL: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008, 27(45):5904–5912.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(1):11-22.
- Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. *Cancer Treat Rev* 2013.:S0305-7372(13)00205-3.

- Z.-Y.Bian, Q.-M.Fan, G.Li,W.-T.Xu, andT.-T.Tang, "Human mesenchymal stem cells promote growth of osteosarcoma: involvement of interleukin-' in the interaction between human mesenchymal stem cells and Saos-2," *Cancer Science*, 2010; 101(12):2554-2560.
- Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C, Zhao R. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1," *Leukemia*. 2009. 23(5): 925–933.