



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS *IN VIVO* DEL EFECTO INMUNOSUPRESOR DE CÉLULAS
ESTROMALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TUMORES MALIGNOS DE
CUELLO UTERINO A TRAVÉS DE LA VÍA CD73**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CESAR ANTONIO MONTORO BARENAS

Tutor principal de tesis: Dra. María de Lourdes Mora García
FES Zaragoza, UNAM

Comité tutorial: Dr. Alberto Monroy García
Facultad De Medicina, UNAM
Dra. Rebeca López Marure
Instituto Nacional de Cardiología
“Ignacio Chávez”



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS *IN VIVO* DEL EFECTO INMUNOSUPRESOR DE CÉLULAS
ESTROMALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TUMORES MALIGNOS DE
CUELLO UTERINO A TRAVÉS DE LA VÍA CD73**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CESAR ANTONIO MONTORO BARENAS

Tutor principal de tesis: Dra. María de Lourdes Mora García
FES Zaragoza, UNAM

Comité tutorial: Dr. Alberto Monroy García
Facultad De Medicina, UNAM
Dra. Rebeca López Marure
Instituto Nacional de Cardiología
“Ignacio Chávez”

Copia del Oficio de Empaste

UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno. **MONTORO BARENAS CÉSAR ANTONIO** con número de cuenta **104004388** con la tesis titulada "Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCÍA**:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Vocal: DR. BENNY WEISS STEIDER
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarte un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de septiembre de 2016.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Unidad de Posgrado : Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas Edificio D, 1er. Piso, Circuito de Posgrados Cd. Universitaria
Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel. 5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx>

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por enriquecer mi formación profesional y la realización de esta tesis

A la beca CONACyT No.- 385727. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave del proyecto IN217013 “Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73”, y proyecto IN226516 “Estudio de la participación de la vía CD73-adenosina en la evasión y supresión de la respuesta inmune por células tumorales de cancer cérvico-uterino”. Asimismo, este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento otorgado por el Fondo de Investigación en Salud del IMSS al proyecto titulado: “Estudio de la expresión de moléculas de la vía adenosinérgica como marcadores de progresión asociados a inmunosupresión y evasión del reconocimiento inmune en cáncer cérvico-uterino. Registro FIS-1383 y CONACYT No:240635. Y a la beca CONACyT.

A los miembros del comité tutor.

El trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la tutoría principal de la Dra. Maria de Lourdes Mora García y la dirección tutorial del Dr. Alberto Monroy Garcia y la Dra. Rebeca Lopez Marure, por la guía y consejos en la realización y culminación de esta tesis.

Agradecimientos Personales.

A mi madre quien incansablemente me da su apoyo y reconocimiento en su muy particular manera de hacer las cosas, por motivarme a seguir mis sueños y mis deseos sin importar cuales sean estos.

A mi padre por apoyarme para llegar tan lejos como he llegado y alcanzar metas y lugares que jamas pensé en llegar.

A mi hermano por siempre estar presente en los malos y buenos momentos y por darme la fuerza para siempre seguir adelante.

A mi abuelita y mis tias que siempre me apoyan y ayudan a llegar cada día mas lejos.

A mis amigos de la prepa y la facultad que a pesar de los años y la distancia seguimos en contacto y seguimos siendo buenos amigos, no los menciono por miedo a que se me escape algún nombre pero ustdes saben quienes son y que a pesar de muchas cosas seremos amigos por mucho tiempo mas, los quiero y muchas gracias por todo su apoyo brindado.

A Julian Jimenez por acompañarme a lo largo de estos dos años de maestria, ayudarme y apoyarme en todo momento, por motivarme y alentarme a llegar cada vez mas lejos y saber que soy capaz de hacer muchas cosas que yo consideraba imposibles, te amo y aun nos quedan muchas cosas por vivir juntos.

Al Dr. Alberto Monroy García y a la Dra. María de Lourdes Mora García por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y enseñarme a realizar un buen trabajo siempre, en especial quiero agradecer al Dr. Jorge Hernández Montes ya que siempre estuvo dispuesto para aclarar o ampliar cualquier duda, por sus comentarios y apoyo en la realización de este trabajo, por

siempre ofrecer un ambiente agradable y ameno dentro del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio de inmunobiología: Azucena, Gabriela, Estrella, Luis, Vianey, Angeles, Berenice, Erick, Ana y Alejandro, quienes siempre mostraron una sonrisa y me brindaron ayuda cuando la necesite en el proceso de este trabajo, junto con un ambiente amigable y siempre me recibieron con una sonrisa para apoyarme en cualquier problema en las técnicas empleadas.

A los integrantes del laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO Rosario, Brenice y Toño quienes me apoyaron y me enseñaron tantas cosas siempre en un ambiente cordial y amable.

A mis sinodales Dr. Juan José Montesinos Montesinos, Dr. Benny Weiss Steider, Dra. Rebeca López Marure, Dr. Hugo López Muñoz, y Dr. Alberto Monroy García, ya que sus consejos y observaciones realizadas de manera tan acertada enriquecieron este trabajo.

“Que hablen bien o mal, lo importante es que hablen de mí, aunque confieso que me gusta que hablen mal porque eso significa que las cosas me van muy bien. De los mediocres no habla nadie, y cuando lo hacen sólo dicen maravillas”.

Salvador Dalí.

“... and when you feel that everything is lost, you need to know there's no life without tears, tell me black or white, what color is your life, try to ask your heart who you really are...”

Kamil Varen.

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	5
1. Marco teórico	7
1.1. El cáncer cérvico-uterino	7
1.1.1. El virus del papiloma humano (VPH)	7
1.1.2. La infección por el VPH	10
1.2. La respuesta inmune anti-tumoral	11
1.2.1. La respuesta anti-tumoral mediada por los linfocitos T	12
1.3. Las células estromales mesenquimales (MSC's)	15
1.3.1. Las MSC's y su relación con el sistema inmune	17
1.3.2. Las MSC's y su participación en el microambiente tumoral	18
1.3.3. Las MSC's y su inmunosupresión hacia los linfocitos T	20
1.3.4. Las MSC's y la secreción de factores solubles inmunosupresores	22
1.3.5. Las MSC's y la expresión de la CD73	24
1.4. La vía adenosinérgica	26
1.4.1. La adenosina y sus interacciones con el sistema inmune	28
1.4.2. La adenosina y su relación con el cáncer	29
1.4.3. La molécula CD73	32
1.4.4. La molécula CD73 y su relación con los tumores	33
1.4.5. El bloqueo de la vía adenosinérgica	35
2. Antecedentes	38
3. Hipótesis	39
4. Objetivo General	39
4.1. Objetivos particulares:	39
5. Materiales y métodos	40
5.1. Cultivos celulares	40
5.2. Desregulación de la molécula CD73	40
5.3. Cepa de ratones	41
5.4. Inmunización	41
5.5. Inoculación de células para la inducción de tumores	42
5.6. Aplicación del APCP (α,β-Methyleneadenosina 5'-diphosphate)	42

5.7.	Medición de tumores	43
5.8.	Obtención de sueros de los distintos tratamientos para determinar la concentración de la IL-10.....	43
5.9.	Determinación de moléculas H-2D ^b y H-2K ^b en las células tumorales cultivadas.....	44
5.10.	Obtención de LTCD8+ para ensayos de citotoxicidad	45
5.11.	Cuantificación de mRNA por RT-PCR en tiempo real.....	46
5.12.	Análisis estadístico	47
6.	Resultados.....	48
6.1.	Las MSC's-CaCu y las MSC's-CN favorecen el crecimiento tumoral en condiciones normales y de inmunoprotección en ratones de la cepa C57BL/6 a través de la vía CD73-adenosina.....	48
6.2	La co-inoculación de las MSC's con las células tumorales TC-1 en ratones C57BL/6, induce una disminución en la expresión de las moléculas H-2D ^b y H-2K ^b en las células tumorales.....	54
6.3	La co-inoculación de las MSC's-CaCu con las células tumorales TC-1 incrementa los niveles de la IL-10 en plasmas de ratones C57BL/6	57
6.4	La inoculación de las MSC's-CaCu en ratones C57BL/6 favorece la evasión del reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1	60
6.5	Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles incrementados del mRNA de IL-10 y CD73 pero reducidos de la molécula H-2D ^b	63
7.	Discusión	68
8.	Conclusiones.....	77
9.	Perspectivas.....	78
10.	Literatura citada	79

Lista de figuras y cuadros

Figura. 1 Ciclo de vida del VPH.....	9
Figura. 2 Los tipos mas comunes del VPH que se encuentran en las lesiones cancerosas en el mundo.	10
Figura. 3 La inhibición de la expresión del MHC de clase I sobre las células tumorales permite al tumor escapar al reconocimiento de los LTC.....	13
Figura. 4. Los criterios para definir a las MSC's.....	17
Figura. 5 Las interacciones de las MSC's con algunas de las células del sistema inmune.	20
Figura. 6 Los efectos de los factores producidos por las MSC's sobre células del sistema inmune.....	22
Figura. 7 La actividad de una MSC.....	25
Figura. 8 La vía adenosinérgica.	28
Figura. 9 La participación de la vía adenosinérgica en el microambiente tumoral. ...	31
Figura. 10 Las MSC's-CaCu y MSC's-CN inhiben la protección inmune antitumoral	51
Figura 11. Las MSC's-CaCu y MSC's-CN favorecen el crecimiento tumoral.....	52
Figura 12. Las MSC's-CaCu y MSC's-CaCu CD73 Desfavorecen el crecimiento tumoral mediante la expresión de CD73.....	53
Figura. 13 La co-inoculación de las MSC's con las células tumorales TC-1 en los ratones C57BL/6, induce disminución en la expresión de las moléculas H-2D ^b y H-2K ^b en las células tumorales.	56
Figura. 14 La co-inoculación de las MSC's-CaCu y las TC-1 incrementa los niveles de la IL-10 en plasmas de ratones C57BL/6.....	59
Figura. 15 La inoculación de las MSC's-CaCu en los ratones C57BL/6 favorece la evasión del reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1.	62
Figura. 16 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles reducidos de la molécula H-2D ^b	65
Figura. 17 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles elevados de la CD73.....	66
Figura. 18 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles elevados de la IL-10.....	67
Tabla 1. Los factores solubles secretados por los diferentes tipos de MSC's.....	23
Tabla 2 La representación de tipos de tumores que expresan la CD73.....	34
Tabla 3 Esquema de inducción de tumores.....	42
Tabla 4 Secuencia de primers utilizados para el qRT-PCR.	47

Abreviaturas

ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APCP	Adenosina 5' α,β metileno monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CaCu	Cáncer cérvico-uterino
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenasa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MSC's	Células estromales mesenquimales.
MSC's-CaCu	Células estromales mesenquimales derivadas de cáncer cérvico-uterino
MSC's-CaCu CD73 Des	Células estromales mesenquimales derivadas de cáncer cérvico-uterino desreguladas de la molécula CD73
MSC's-CN	Células estromales mesenquimales derivadas de tejido normal de Cervix
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
qRT-PCR	Racción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa inversa cuantitativa.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Célula T reguladora
VPH	Virus del papiloma humano

Resumen

Según la organización mundial de la salud (OMS), el cáncer cérvico uterino (CaCu) es una de las principales causas de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con 300,000 muertes al año. El CaCu es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres Mexicanas con cáncer (INEGI, 2010). Cada año se diagnostican alrededor de 11,000 casos nuevos de CaCu invasor.

El microambiente tumoral, referido como “estroma del tumor”, está compuesto por elementos estromales que proveen las señales necesarias para el crecimiento y sobrevivencia del tumor. Entre los componentes celulares en el microambiente tumoral se encuentran varias células no inmunes, tales como las células estromales mesenquimales (MSC's) que se han convertido en jugadores críticos en el crecimiento tumoral, neovascularización, invasión y metástasis; debido a que estas células tienen la capacidad de migrar al sitio del tumor para favorecer el implantey crecimiento de tumores malignos, todo esto lo pueden realizar mediante la producción de factores solubles como la adenosina vía la molécula CD73 y citocinas inmunosupresoras como IL-10. Por otra parte, se ha reportado que el péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV-16, es capaz de proteger a ratones C57BL/6 ante el desarrollo tumoral con células TC-1 (E6/E7 HPV-16+).

En este trabajo, se analizó la capacidad inmunosupresora de MSC's derivadas de tumores de CaCu (MSC's-CaCu) en un modelo tumoral *in vivo* con células TC-1 y protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF. Se estudió y evaluó el crecimiento tumoral, la expresión de las moléculas MHC-I tanto en proteína como en el mRNA de las células tumorales, también la IL-10 en concentraciones séricas por un ELISA, como niveles del mRNA en las células tumorales y se evaluo la cantidad de mRNA de la CD73 en las células tumorales de los distintos tratamientos.

La inoculación de las MSC's-CaCu favoreció el crecimiento tumoral en ratones con y sin protección inmunológica, en comparación con aquellos a los cuales no se les administraron. Asimismo, se encontraron niveles elevados de la IL-10 en suero y disminución en la expresión de la molécula H-2D^b en las células tumorales de los ratones tratados con las MSC's-CaCu. El tratamiento con el inhibidor específico de CD73 (APCP), o la inoculación de las MSC's-CaCu desreguladas de la expresión de la CD73, disminuyó el crecimiento tumoral en los ratones y revertió el incremento en la producción de la IL-10, así como la disminución de las moléculas H-2D^b en las células tumorales.

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que las MSC's-CaCu, a través de la vía CD73, poseen actividad protumoral al favorecer la evasión y supresión de la respuesta inmune antitumoral. Por tanto, se hace necesario establecer estrategias terapéuticas para controlar la actividad de la CD73 en tumores.

Abstract

According to the World Health Organization (WHO), cervical cancer (CeCa) is a leading cause of female cancer mortality worldwide with 300,000 deaths annually. The cervical cancer is a major public health problem because it is one of the leading causes of death among Mexican women with cancer (INEGI, 2010). Each year about 11,000 new cases of invasive cervical cancer are diagnosed.

The tumor microenvironment, referred to as "tumor stroma" is composed of elements that provide the stromal signals required for growth and survival of the tumor. Among the cellular components in the tumor microenvironment are several nonimmune cells such as mesenchymal stromal cells (MSCs) that have become "players" critical in tumor growth, neovascularization, invasion and metastasis; because these cells have the ability to migrate to the tumor site to promote growth of malignant tumors implantey, all this can be made by producing soluble factors such as adenosine and cytokines immunosuppressant as IL-10. On the other hand, it has been reported that the RAHYNIVTF peptide derived from the protein E7 of HPV-16, is able to protect C57BL/6 mice from tumor growth induced by TC-1 (E6 / E7 HPV-16 +) cells.

In this work, the immunosuppressive capacity of MSCs derived from CeCa (MSCs-CeCa) was analyzed in a tumor mice model by using TC-1 cells and immunoprotection with the antigenic RAHYNIVTF peptide. We study and evaluate tumor growth, expression of MHC-I molecules both protein and mRNA of tumor cells, also of IL-10 in serum by ELISA as mRNA levels in tumor cells and assessed the amount of mRNA of CD73 in tumor cells of different treatments.

We obtained that MSCs-CeCa favored tumor growth in mice with and without immunoprotection as compared to those which were not administered them. Also, high levels of IL-10 in serum and decreased expression of H-2D^b molecule in tumor cells of mice treated with MSCs-CeCa found. The treatment with the specific

inhibitor of CD73 (APCP), or inoculating the MSCs-CeCa deregulated expression of CD73, decreased tumor growth in mice and reversed the increase in production of IL-10, and decreasing the H-2D^b molecules in tumor cells.

These results allow us to suggest that MSC-CeCa cells, through the CD73 pathway, showed protumoral activity, because they favour tumor immune evasion and suppress antitumor immune response. In consequence, therapeutic strategies to antagonize CD73 activity in tumors are required.

1. Marco teórico

1.1. El cáncer cérvico-uterino

Según la organización mundial de la salud (OMS), el cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con 300,000 muertes al año. El CaCu es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres Mexicanas con cáncer (INEGI, 2010). Cada año se diagnostican alrededor de 11,000 casos nuevos de CaCu invasor. La mayoría de las pacientes ingresan con enfermedad avanzada y con un mal pronóstico.

1.1.1. El virus del papiloma humano (VPH)

El CaCu se encuentra fuertemente asociado (cerca al 100%) con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo (Walboomers et al, 1999). Sin embargo, otros factores como los ambientales y propios del hospedero, contribuyen al proceso carcinogénico además del VPH (Visser J et al, 2007). Los VPH pertenecen a la familia Papillomaviridae, están compuestos por DNA y tienen tropismo por el epitelio cutáneo y el epitelio de la mucosa. Esta familia consta de más de 120 tipos de VPH diferentes, de los cuales aproximadamente 40 se transmiten por medio de relaciones sexuales (Johansson et al, 2013).

La familia de los VPH se puede dividir en diferentes tipos virales que en función de su tropismo se clasifican en cutáneos y mucosales. Los cutáneos se detectan primordialmente en las verrugas cutáneas. En relación con su potencial oncogénico, los VPH mucosales se clasifican en tipos de alto, probable y de bajo riesgo oncogénico (Castellsague et al, 2007). Doce tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) están definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de alto riesgo carcinogénico y dos tipos adicionales (68, 73) se clasifican como posiblemente cancerígeno (Doorbar et al, 2012).

Los tipos de VPH-16 y -18, se encuentran aproximadamente en el 70% de todos los casos de CaCu (Fig.2). En etapas iniciales, el tipo 16 se ha detectado en aproximadamente el 24% de las mujeres con infección por este virus; mientras que el tipo 18 se ha detectado en aproximadamente el 9% (Crosbie et al, 2013).

El VPH sólo infecta a células epiteliales y depende de la vía de diferenciación de las mismas para completar su ciclo de vida. La infección por el VPH se da probablemente por microabrasiones en la capa basal del epitelio; la internalización infecciosa toma varias horas, después de lo cual el DNA viral se libera de la cápside y se transporta en el núcleo como material genético libre. La diferenciación de las células que están destinadas para la madurez y la senescencia, se da en la capa suprabasal y por lo tanto no expresan la maquinaria replicativa que el virus necesita; para eludir este problema, el VPH codifica dos proteínas E6 y E7 que en conjunto promueven la proliferación celular, prolongan la progresión del ciclo celular y previenen la apoptosis (Crosbie et al, 2013; Hellner et al, 2009). Para completar el ciclo infeccioso del virus, las células deben someterse a la diferenciación terminal, un requisito previo esencial para el ensamblaje y la liberación del virión. Sin embargo en algunas infecciones por el VPH de alto riesgo las proteínas E6 y E7 son tan eficaces en el bloqueo de los reguladores negativos del ciclo celular que las células infectadas nunca maduran (Fig.1) (Crosbie et al, 2013; Johansson et al, 2013).

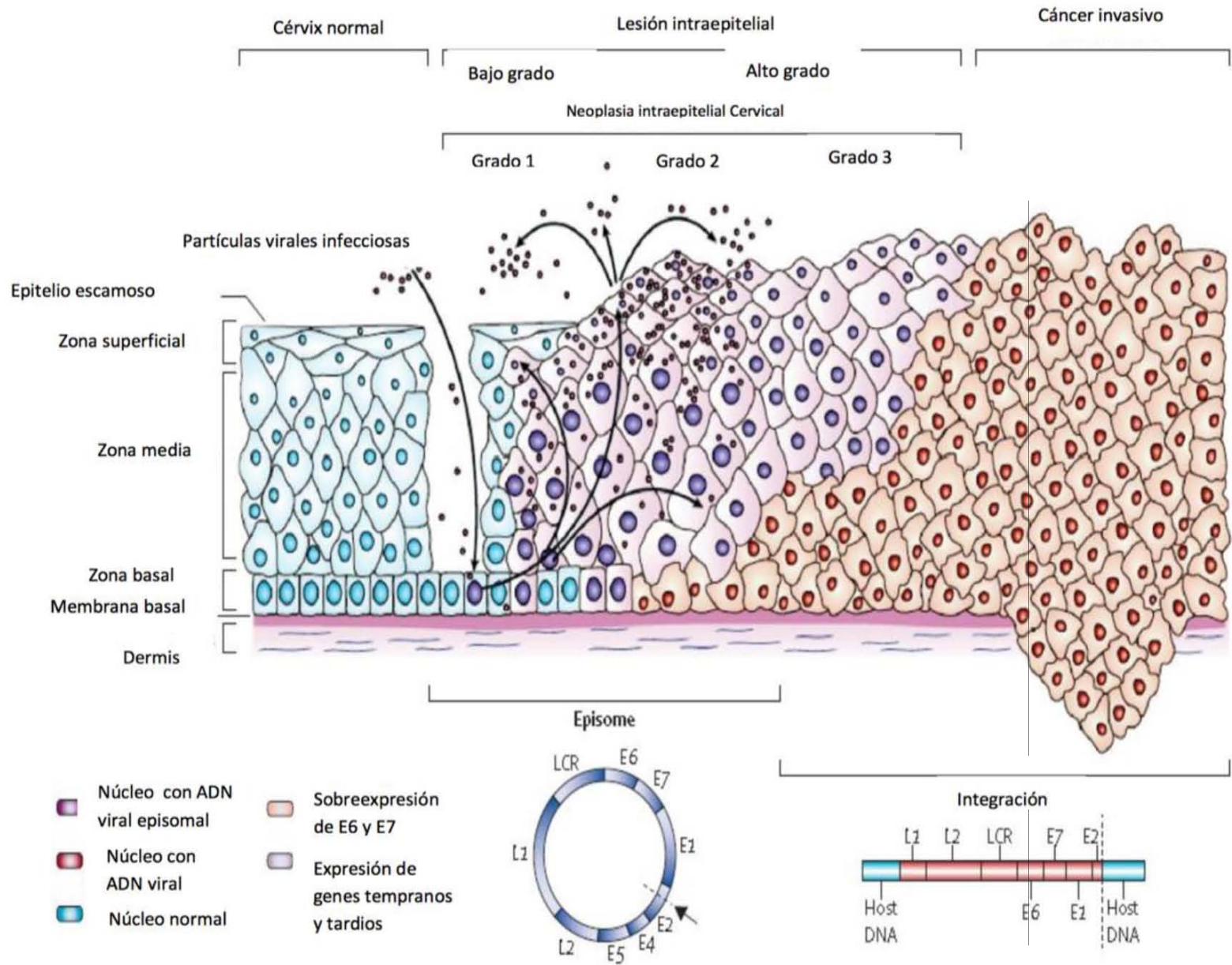


Fig.1 El ciclo de vida del VPH.

Donde se puede observar que los viriones entran a través de microabrasiones e infectan células basales; también se observan los diferentes estadios de la enfermedad con lesiones de bajo y alto grado y el estadio de cáncer avanzado; junto con la intervención del VPH en cada una de estas etapas (tomada de Crosbie et al, 2013)

1.1.2. La infección por el VPH

En general se acepta que la infección por el VPH juega un papel crucial en el desarrollo de las lesiones cervicales y se estima que aproximadamente el 99% de los tumores de cuello uterino están asociados (Fig.2). La contribución de la infección por el VPH en el CaCu depende del tipo de VPH y el período de la replicación viral en las células epiteliales (Chagas et al, 2013; yang et al, 2013).

A nivel mundial los tipos más comunes del VPH en CaCu son: 16 (57%), 18 (16%), 58 (5%), 33 (5%), 45 (5%), 31 (4%), 52 (3%) y 35 (2%) (Crosbie et al, 2013).

	Lesión de alto riesgo		Cáncer Cervical	
	Tipo 16	Tipo 18	Tipo 16	Tipo 18
Europa	54.4 (5.6)	7.7(1.1)	66.7 (2.0)	16.4 (4.6)
Norte América	56.8 (3.1)	9.6 (2.7)	61.2 (3.2)	19.6 (4.3)
Centro y Sudamerica	52.8 (8.1)	9.4(3.5)	59.5 (2.8)	12.7 (4.5)
Centro y Oriente de Asia	68.4 (16.4)	6.3 (5.0)	73.0 (4.6)	15.1 (3.7)
Este de Asia	37.9 (7.1)	7.4 (1.9)	61.7 (5.9)	15.8 (2.6)
Oceania	53.9 (3.5)	9.6 (1.7)	62.6 (5.4)	21.2 (4.2)
Africa	30.3 (5.2)	9.2 (2.8)	53.1 (4.4)	19.8 (4.1)

Figura. 2 Los tipos mas comunes del VPH que se encuentran en las lesiones cancerosas en el mundo.

Donde se puede observar que el tipo 16 y 18 son de los tipos del VPH más comunes en el mundo. (tomada de Crosbie et al, 2013).

La persistencia del VPH en el tracto genital se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por los linfocitos T efectores antígeno-específicos, su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de los pacientes con el CaCu avanzado (Adurthi et al 2008; Welters et al, 2008).

Los VPH de alto riesgo han desarrollado varios mecanismos que reducen la función del sistema inmune y provocan una regulación a la baja en la expresión de citocinas proinflamatorias, mientras que las citocinas anti-inflamatorias que

impiden la migración de las células inmunitarias al sitio de la infección son reguladas positivamente como por ejemplo la interleucina 10 (IL-10) (Crosbie et al, 2013).

1.2. La respuesta inmune anti-tumoral

El desarrollo del CaCu se ha asociado con la falla en la respuesta inmune mediada por los linfocitos T citotóxicos (LTC) y los linfocitos T auxiliares tipo Th1, así como a la presencia de células inmunosupresoras que se encuentran infiltradas en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado, generando tolerancia inmunológica hacia el tumor (Visser et al, 2007).

El microambiente tumoral, referido como “estroma del tumor”, está compuesto por elementos estromales (tejido conectivo, vasos sanguíneos y células inflamatorias) que proveen las señales necesarias para el crecimiento y supervivencia del tumor (Albini y Sporn, 2007). Entre los componentes celulares en el microambiente tumoral se encuentran varias células no inmunes, tales como las células estromales mesenquimales (MSC's), que tienen un papel importante en el crecimiento tumoral, neovascularización, invasión y metástasis (Tchou et al, 2013; Bernardo y Fibbe, 2013).

El procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) es crítico para la vigilancia inmune y los defectos en la presentación de antígenos en esta ruta son un medio común para las células carcinogénicas de evadir el reconocimiento por células T (Wang et al, 2013).

1.2.1. La respuesta anti-tumoral mediada por los linfocitos T

Un mecanismo de escape de la vigilancia inmune del huésped, a menudo relacionado con los tumores, es una alteración en la expresión de las moléculas del MHC-I en células tumorales. Por lo tanto, una pérdida completa o parcial de las moléculas del MHC-I da como resultado una resistencia a los LTC, pero que a su vez hacen que las células tumorales sean susceptibles a las células Natural Killer (NK). Se ha informado de la pérdida total o parcial de la expresión de las moléculas del MHC-I en diferentes tipos de tumores humanos (Rodríguez et al, 2012; Hage et al, 2013). La baja expresión de las moléculas de MHC-I ha sido un hallazgo frecuente e importante en el CaCu (Brestovac, et al, 2013).

La inmunorreacción en sí puede intervenir en la selección de células tumorales con una menor expresión de MHC-I al eliminar de manera preferente aquellas con una expresión normal de MHC. La menor expresión de las moléculas del MHC-I se puede acompañar de un crecimiento tumoral progresivo y por lo tanto su ausencia en un tumor es una indicación de un mal pronóstico (Fig.3) (Goldsby, et al, 2004).

La activación de la célula T requiere una señal activadora emitida por el reconocimiento de un complejo péptido-molécula MHC por la célula T receptora, además de una señal coestimuladora transmitida por la interacción de B7 en células presentadoras de antígeno con CD28 en células T. Se necesitan ambas señales para inducir la producción de la IL-2 y la proliferación de células T. La inmunogenicidad deficiente de muchas células tumorales puede deberse, en gran medida, a la falta de moléculas coestimuladoras. Sin números suficientes de células presentadoras de antígeno en la proximidad inmediata de un tumor, las células T reciben sólo una señal activadora parcial, lo que puede tener como efecto anergia clonal (Fig.3) (Goldsby, et al, 2004).

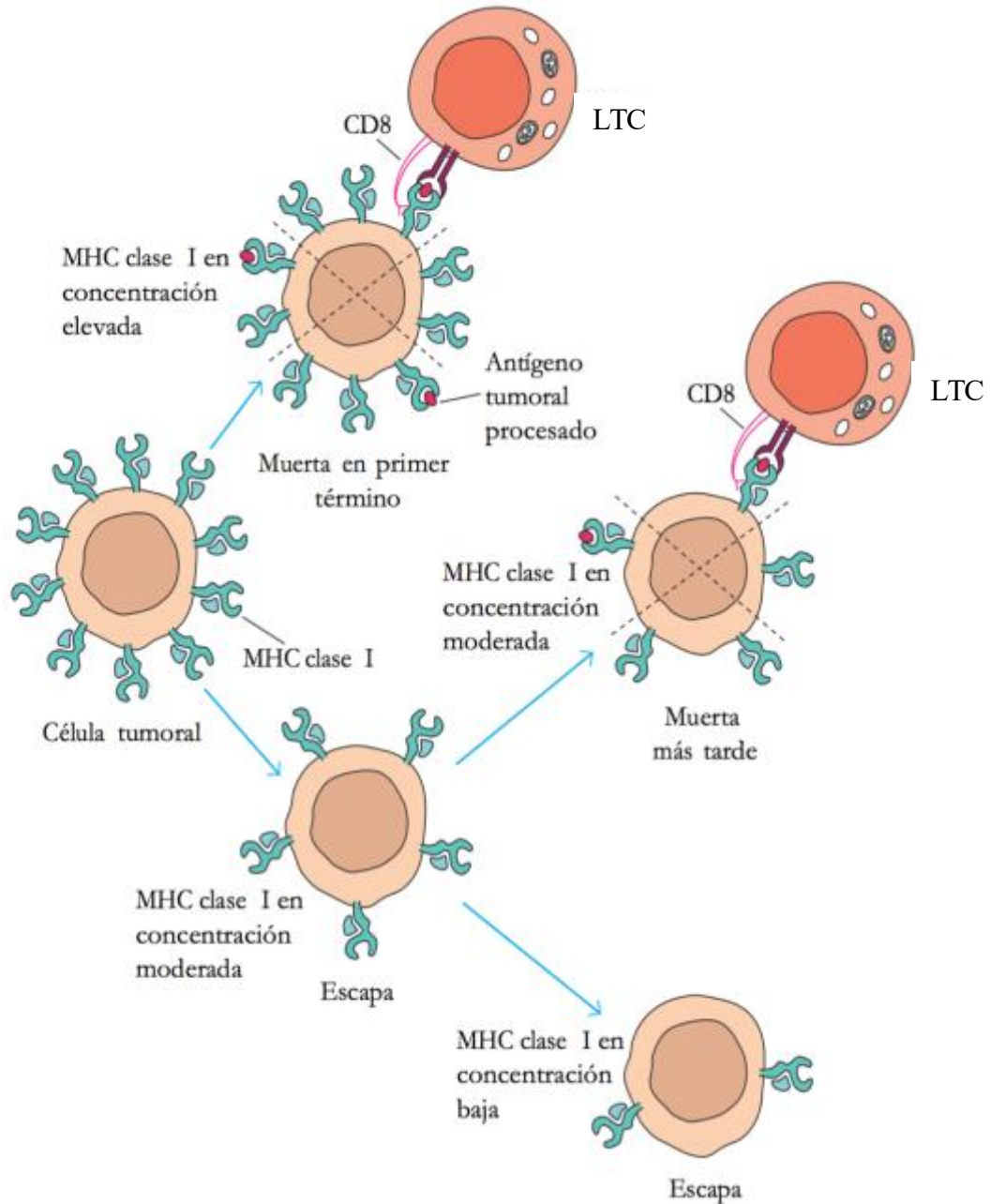


Figura. 3 La inhibición de la expresión del MHC de clase I sobre las células tumorales permite al tumor escapar al reconocimiento de los LTC.

Donde se observa que las células tumorales que tienen una alta expresión de MHC-I son eliminadas por los LTC-CD8+ y las que expresan pocas moléculas MHC-I escapan de esta eliminación. Es posible que este proceso participe en la selección de células tumorales con baja expresión de MHC-I (Tomada de Goldsby, et al, 2004).

Existen antígenos tumorales los cuales se han identificado en dos tipos: 1) antígenos de trasplante específicos de tumor (TSTA) y antígenos del trasplante relacionados con tumor (TATA). Los TSTA son únicos de las células tumorales y no aparecen en células normales del cuerpo; pueden ser resultado de mutaciones en las células tumorales que generan proteínas celulares alteradas; el procesamiento citosólico de estas proteínas originaría péptidos novedosos que se presentan con las moléculas MHC-I, lo que induciría una reacción celular por LTC específicos del tumor (Goldsby, et al, 2004).

Los antígenos relacionados con el tumor, que no son únicos de las células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmunitario es inmaduro y no puede reaccionar, pero que habitualmente no se expresan en el adulto, pueden ser también proteínas que se expresan casi siempre en concentraciones extremadamente bajas en células normales, pero que lo hacen a niveles mucho más elevados en las tumorales (Goldsby, et al, 2004).

Se puede decir que los antígenos tumorales reconocidos por las células T humanas corresponden a una de cuatro categorías: 1) antígenos codificados por genes que se expresan de modo exclusivo en los tumores, 2) antígenos codificados por formas variantes de genes normales que se han transformado por mutación, 3) antígenos que normalmente sólo se expresan durante las etapas de diferenciación o que sólo son expresados por ciertos linajes de diferenciación, y 4) antígenos que se sobreexpresan en algunos tumores específicos (Goldsby, et al, 2004).

En su inmensa mayoría, los antígenos considerados tumorales no son únicos de las células de tumores, ya que también se encuentran en células normales. Estos antígenos de trasplante relacionados con tumores pueden ser proteínas que suelen expresarse sólo en células fetales, pero no en células normales del adulto, o son proteínas expresadas a niveles bajos por las células normales, pero a niveles mucho más elevados por las células tumorales (Goldsby, et al, 2004).

1.3. Las células estromales mesenquimales (MSC's).

Algunos estudios han sugerido que las MSC's contribuyen a la formación del estroma tumoral y proveen un microambiente favorable para el desarrollo de las células tumorales, debido a que estas células tienen la capacidad de migrar al sitio del tumor para favorecer el implante, crecimiento y metástasis de tumores malignos (Yen BL y Yen ML 2008).

Las células estromales se comunican con las células tumorales teniendo contacto directo célula-célula y a través de mecanismos de señalización parácrina, mediadas por la secreción de los factores solubles como lo son las citocinas y factores de crecimiento. Estas interacciones regulan el crecimiento tumoral, la invasión, la metástasis y la angiogénesis (Suzuki et al. 2011).

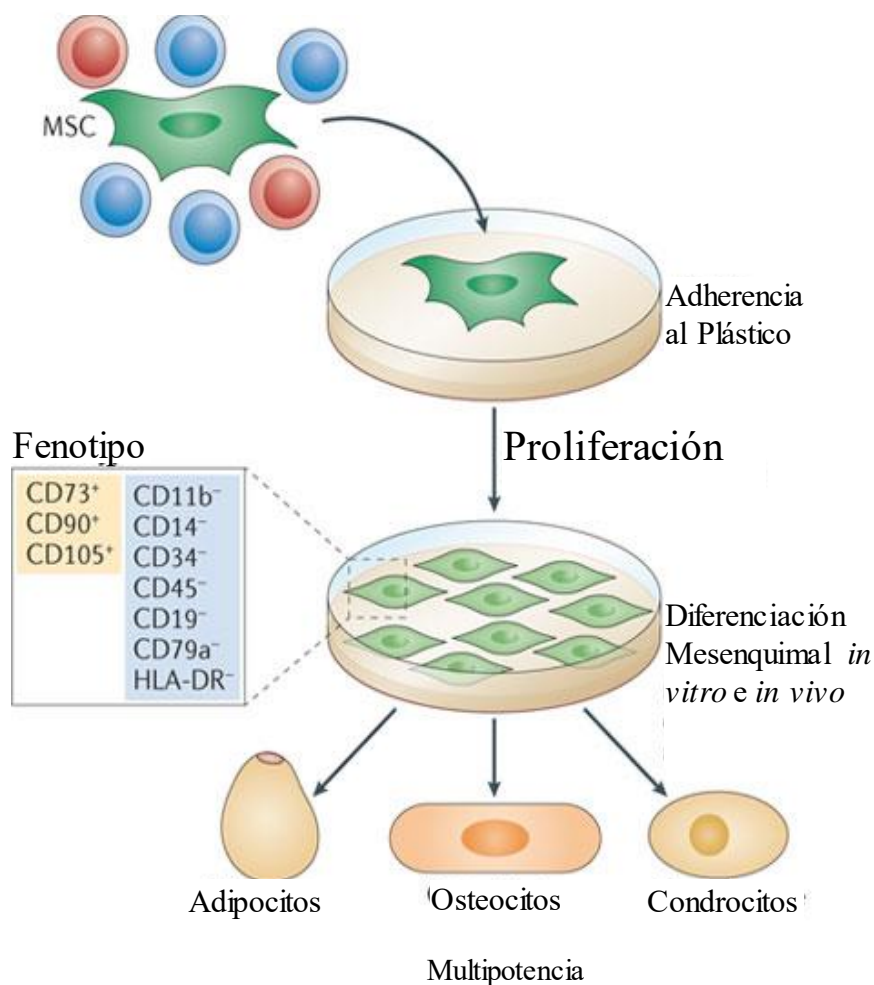
Las MSC's fueron caracterizadas inicialmente entre las décadas de los años 60's y 70's con los trabajos realizados por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al, 1974; Hung et al, 2004; Takeuchi et al, 2007). Las MSC's representan una población heterogénea de células multipotentes de morfología fibroblastoide, con propiedades benéficas en los procesos regenerativos e inmunomodulatorios (Giordano et al, 2007).

Las MSC's expresan moléculas MHC-I, pero no expresan las moléculas MHC II, B7-2, CD 40 o CD40L. Además secretan citocinas y moléculas reguladoras que juegan un papel importante en la proliferación y maduración de células madre hematopoyéticas (Fig.4) (Locatelli et al, 2007; Aggarwal y Pittenger 2005).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios fundamentales para definir a las MSC's: primero, adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo; segundo, expresión de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, la capacidad de diferenciación *in vitro* a osteocitos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Fig. 4) (Páez et al, 2007; Duffy et al, 2011; Dominici et al, 2006).

En las últimas dos décadas las MSC's han llamado considerablemente la atención por su uso potencial como agentes regenerativos en una serie de enfermedades agudas y crónicas (Duffy et al, 2011).

Se ha demostrado que las MSC's tienen una gran capacidad para ejercer sus efectos antiinflamatorios en una serie de modelos *in vivo* incluyendo la enfermedad ingerto contra hospedero (EICH), encefalomiелitis autoinmune y enfermedades de las vías respiratorias. Dados todos estos datos que apoyan el papel antiinflamatorio y pro-reparador de las MSC's, éstas se han utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias (English, 2013; Kim et al, 2011). Se ha observado que cuando las MSC's son trasplantadas o inyectadas, tienen la capacidad de migrar a una variedad de órganos y tejidos, esta capacidad se ve incrementada en sitios de inflamación y ciertas patologías debido a su capacidad de reparación y remodelación de tejidos (Chapel et al, 2003; Albarenque et al, 2011).



Nature Reviews | Immunology

Figura. 4. Los criterios para definir a las MSC's.

Se enlistan los 3 criterios dictados por la ISCT para definir a una MSC's. (Tomada de Le Blanc et al, 2012)

1.3.1. Las MSC's y su relación con el sistema inmune

Las MSC's regulan la proliferación, activación y función de linfocitos T efectores, células dendríticas (CD), macrófagos, linfocitos B, células NK, células NKT y neutrófilos. La supresión inducida por MSC's a células T se ha reportado en los linfocitos T CD4⁺ cooperadoras (LT CD4⁺) y T CD8⁺ citotóxicas (LT CD8⁺) y se cree que es dependiente del contacto célula-célula así como también de mecanismos parácrinos. Se ha demostrado que el PD-1 (muerte programada-1) y

sus ligandos PD-L1 (ligando de muerte programada-1) y PD-L2 (ligando de muerte programada-1) son los responsables de la inhibición de la proliferación de los linfocitos T (Fig.5) (Gazdic et al, 2015).

Diversos estudios demuestran que las MSC's inhiben la maduración de células dendríticas, así como la activación de linfocitos T y células NK. Varios factores han sido asociados con estas propiedades inmunomoduladoras como es el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), la prostaglandina E2 (PGE-2), la IL-10, la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y el interferón gamma (IFN- γ) (Fig.5) (Tse et al, 2003; Waterman et al, 2010; Kim et al, 2011).

Las CD inmaduras se obstaculizan para su maduración y la activación de linfocitos T en presencia de MSC's. Se demostró que éstas actúan por medio de IL-6. Sin embargo en condiciones de co-cultivo se reportó que la síntesis de PGE2 y no de la IL-6, juega un papel importante en la inhibición mediada por MSC's en la maduración de las CD, así como también pueden inducir un fenotipo tolerogénico de las CD que es resultado de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y la disminución de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), IFN- γ e IL-12 (Fig.5) (Gazdic et al, 2015).

El efecto inhibitorio de las MSC's se asocia con la baja expresión de los receptores activadores de las células NK y esto se da principalmente por PGE-2, IDO y TGF- β 1 (Fig.5) (Gazdic et al, 2015).

1.3.2. Las MSC's y su participación en el microambiente tumoral

Es muy controversial el efecto de las MSC's en el crecimiento tumoral, existen diversos estudios que pueden ser contradictorios donde se dice que apoyan el crecimiento tumoral y otros donde se dice que lo inhiben. El motivo de esto es desconocido aún, pero se le adjudica a las diferencias en los modelos tumorales,

la heterogeneidad de las MSC's, las dosis, u otros factores desconocidos (Zhang et al, 2015).

Los efectos de las MSC's se deben principalmente a los factores solubles dentro del microambiente del tumor o a la modulación de las células de la respuesta inmune.

Los efectos inmunomoduladores se han explorado más profundamente y se ha encontrado que las MSC's derivadas de médula ósea pueden conducir a respuestas inmunes dependiendo del microambiente en el que se encuentren (Zhang et al, 2015). Las MSC's inhiben la producción del IFN- γ , así como aumentan la población de linfocitos T reguladores (Treg) en modelos de trasplante y disminuyen la población de células efectora (Fig.5) (Cortinovis et al, 2015).

En los tumores, se ha demostrado que existen mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral similares a los producidos en heridas que proveen las condiciones propicias para el arribo de las MSC's. Algunos estudios han mostrado que las MSC's favorecen el implante y crecimiento tumoral, debido a sus propiedades inmunomodulatorias, inmunoregulatoras y pro-angiogénicas (Yen y Yen, 2008; Karnoub et al, 2007; Djouad et al, 2003; Lin et al. 2013; Bernardo y Fibbe, 2013; Gomez, 2013).

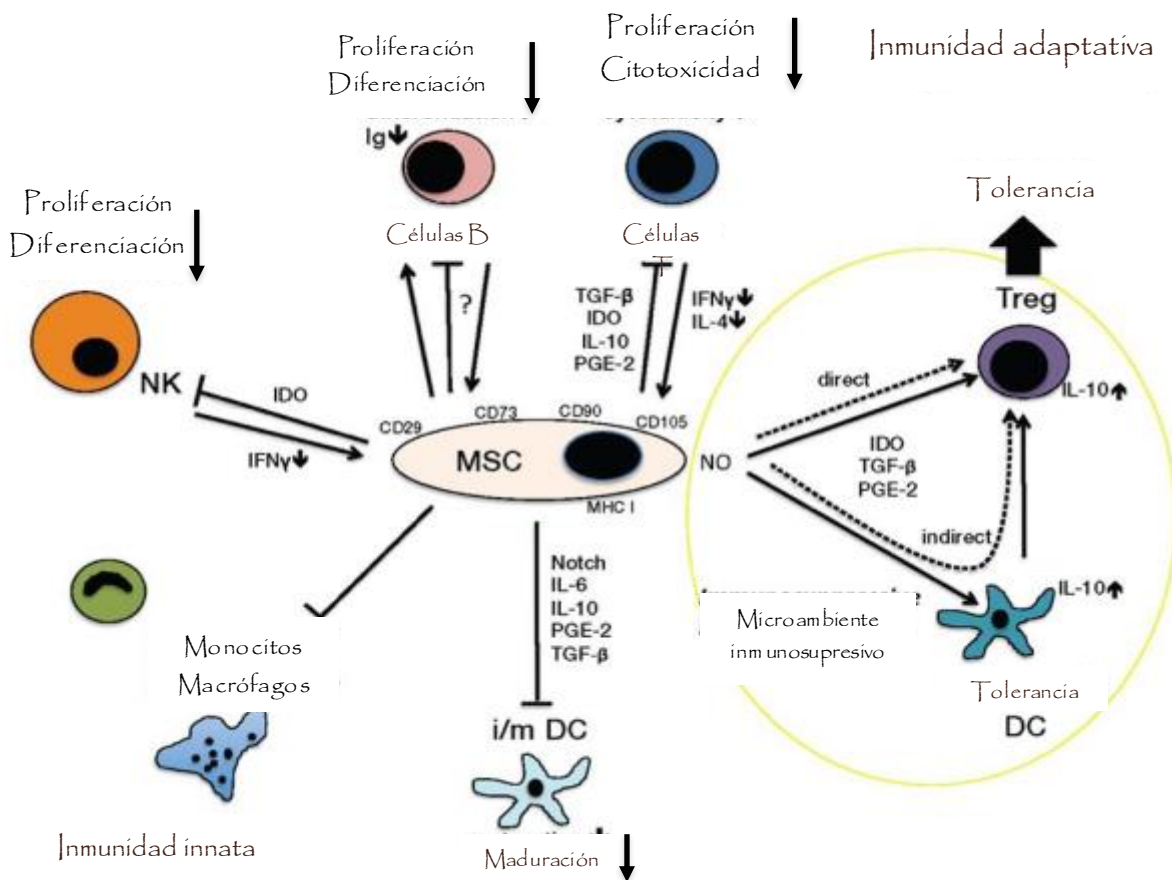


Figura. 5 Las interacciones de las MSC's con algunas de las células del sistema inmune.

Se muestran los factores solubles que intervienen en la inmunoregulación por parte de las células MSC's sobre las células de la respuesta inmune como células NK, macrófagos, linfocitos T y B, CD y Treg. (Tomada de Plock et al, 2013)

1.3.3. Las MSC's y su inmunosupresión hacia los linfocitos T

Se ha reportado que las MSC's aisladas de diversas fuentes suprimen la proliferación de los LT CD4+ y LT CD8+ de manera dependiente de la concentración; se ha reportado que tanto en el contacto célula-célula como en la liberación de factores solubles juegan un papel importante en la supresión de los LT (Fig.6) (Di Nicola et al, 2002; Tse et al, 2003; Duffy et al, 2011; Bernardo y Fibbe, 2013). Curiosamente, el mecanismo de inmunosupresión mediada por las MSC's varía entre las distintas especies, la supresión de los LT inducida por las MSC's humanas o de mono es mediada por la IDO, mientras que en las mismas

condiciones de cultivo las derivadas de ratón utilizan óxido nítrico (NO) para atenuar la proliferación y activación de células T (Fig.6) (Gazdic et al, 2015).

El efecto inmunosupresor sobre las células T comprende la activación, proliferación, diferenciación y función por el cambio de perfil de citocinas. La información sobre el efecto de las MSC's sobre las células T es poca, sobre todo en las etapas de activación/diferenciación y los datos sobre células T naiv son contradictorios (Zhang et al, 2015).

Se ha comprobado que las MSC's pueden reducir en co-cultivo los porcentajes de los LT CD4+ y LT CD8+ que expresan la IL-17 y la IL-9 y las células CD4+ productoras de la IL-6 (Zhang et al, 2015). Las propiedades de modulación inmune de las MSC's parece ser bastante complejas, ya que se ha visto que esta modulación es atribuible a la secreción de factores solubles, pero también depende del contacto con las células de la respuesta inmune (Di Nicola et al, 2002; Waterman et al, 2010).

La generación de citocinas anti-inflamatorias por parte del tumor junto con varios tipos de células reguladoras como lo son las Treg o las células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) promueven la inmunosupresión de la respuesta anti-tumoral por parte de células NK y LT CD8+, así como mejoran la angiogénesis y la promoción de la supervivencia celular y progresión tumoral (Fig.6) (Young et al, 2014).

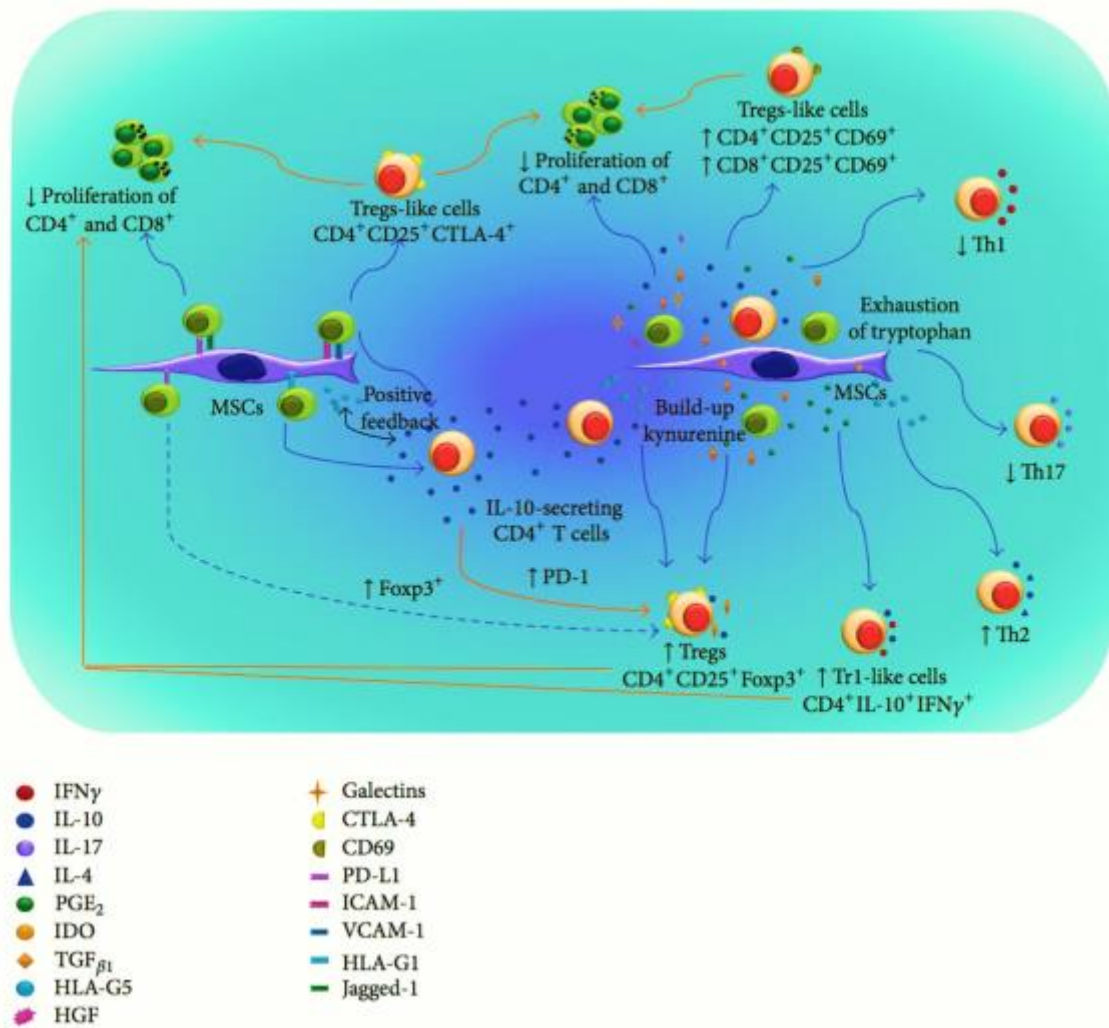


Figura. 6 Los efectos de los factores producidos por las MSC's sobre células del sistema inmune.

Se ven los diversos efectos que son dados por los factores solubles como la IL-10, la PGE₂, el TGF- β y otros sobre distintas células del sistema inmune. (Tomada de Castro et al, 2015)

Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), Molecula de adhesión intracelular (ICAM-1), molecula de adhesión de células vasculares (VCAM).

1.3.4. Las MSC's y la secreción de factores solubles inmunosupresores

En varios estudios se han utilizado las MSC's humanas para evaluar sus efectos en el crecimiento de los tumores en modelos de ratón, debido a que éstas no son rechazadas por el sistema inmune del huésped y por su capacidad inmunosupresora (Suzuki et al, 2011). Dicho efecto inmunosupresor se ha

atribuido a dos factores: al contacto célula-célula y a la secreción de los factores solubles inmunosupresores tal como el HGF, PGE2, TGF- β ,IDO, NO e IL-10 (Fig.7, Tabla 1) (Ucelli et al, 2007).

Varios grupos de investigación han dilucidado un papel importante de varias citocinas o factores de crecimiento como TGF- β , HGF, PGE2 y HO-1 para la supresión de LT CD4+ y LT CD8+; el TGF- β bloquea la expresión de las células T e induce una detención del ciclo celular en la fase G1, ya que es un potente inhibidor de la activación inducida por IL-2. A través de la secreción de la PGE2, las MSC's atenúan la producción de la IL-2 e inhiben la proliferación, activación y expansión de células T (Fig.7) (Gazdic et al, 2015).

Tipos de MSC's	Moléculas involucradas en la inmunosupresión de las MSC's
Médula ósea	IDO, TGF- β , HGF, IL-10, HLA-G, PDL-1, PGE2
Placenta	IDO, TGF- β , IL-10, HLA-G, PDL-1
Sangre de cordón umbilical	IDO, TGF- β , HGF, HLA-G, PDL-1, PGE2
Cordón umbilical.	IDO, TGF- β , HGF, HLA-G, PDL-1, PGE2, IL-10
Tejido adiposo	IDO, TGF- β , HGF, HLA-G, IL-10, PGE2
Gelatina de Wharton	IDO, TGF- β , HGF, HLA-G, IL-10, PGE2

Tabla 1. Los factores solubles secretados por los diferentes tipos de MSC's.

Se pueden observar distintas fuentes de MSC's así como sus distintos factores solubles que secretan (tomada de Castro et al, 2015).

Se ha visto que la producción de la PGE2 por las MSC's y su consiguiente supresión de células T se revierte después de que las MSC's son estimuladas con TNF- α o IFN- γ . Las MSC's también producen y/o expresan la IL-10, galectina-1 semaforina 3 A y la galectina-3 que se conocen como unas importantes moléculas inmunosupresoras que participan en la inmunosupresión de los linfocitos T. Las MSC's producen bajos niveles de la IL-10 cuando se cultivan solas, sin embargo, después de co-cultivos con LTC, las MSC's producen IL-10 (Fig.7, Tabla 1) (Gazdic et al, 2015).

Se hace importante resaltar que toda esta producción de las citocinas anti-inflamatorias disminuye si se estimula a las MSC's con altos niveles de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ , lo que sugiere que el nivel y la concentración de mediadores inflamatorios son críticos en la obtención de la función inmunosupresora de MSC's (Fig.7) (Gazdic et al, 2015).

1.3.5. Las MSC's y la expresión de la CD73

Una de las moléculas que expresan las MSC's es la ectoenzima CD73, conocida como 5'-ectonucleotidasa, la cual es una glicoproteína de 70 Kilodaltones (kDa) que se encuentra anclada a la membrana y está vinculada a proteínas glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Su función es hidrolizar los nucleótidos de monofosfato de adenosina (AMP) para convertirlos en adenosina (Colgan et al, 2006). Estructuralmente, la CD73 es un dímero anclado a la membrana plasmática a través de un residuo de serina C-terminal, Ser523, ligada a GPI, sin segmentos de proteínas de membrana (Antonioli et al, 2013).

El equilibrio entre la adenosina y el ATP es fundamental en la homeostasis inmune, debido a que por un lado el ATP es una señal de peligro liberada por las células dañadas y muertas, el cual induce la activación de la respuesta inmune, mientras que la adenosina se encarga de suprimir dicha respuesta (Beavis, 2012).

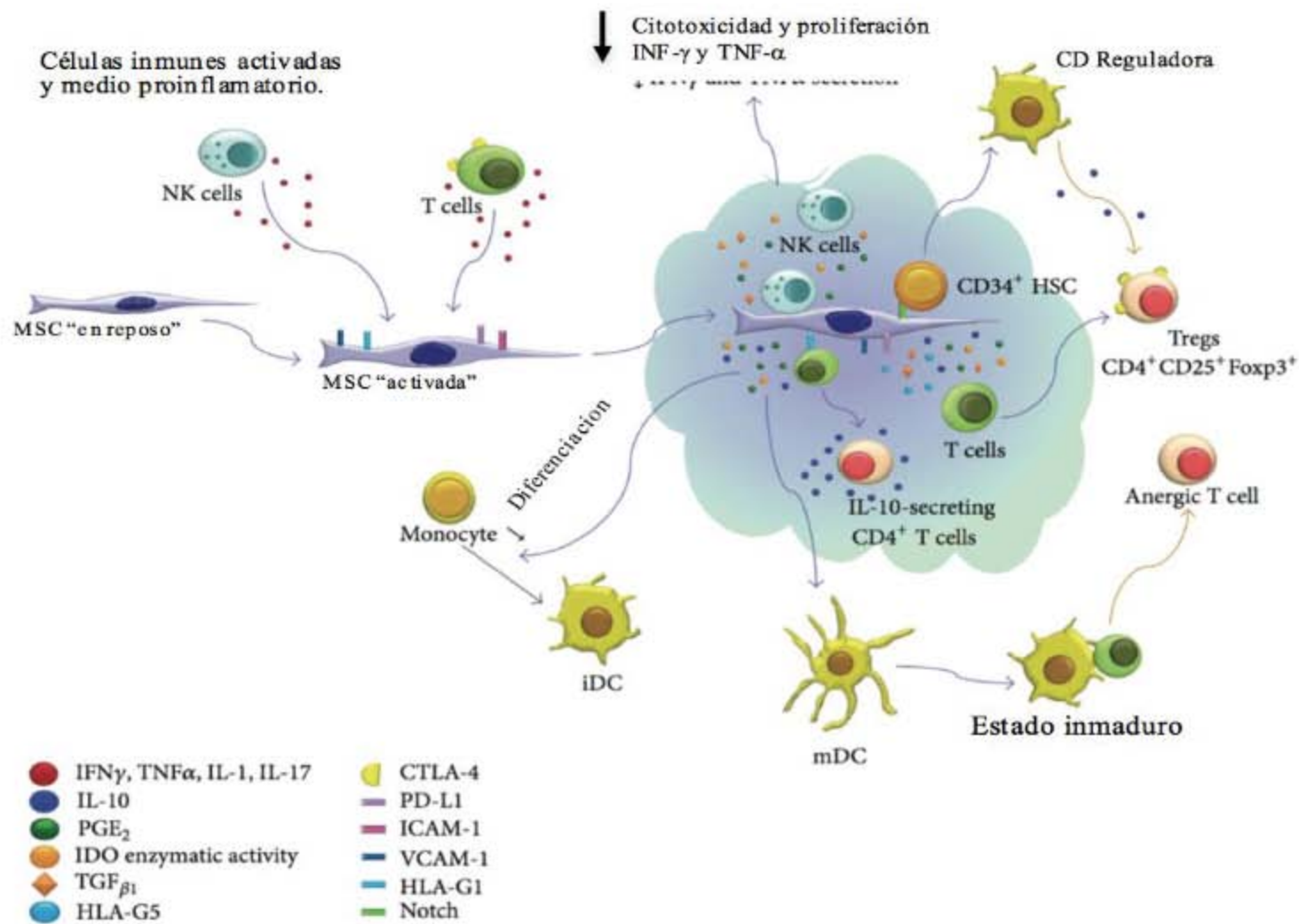


Figura. 7 La actividad de una MSC.

Se muestra como las MSC pueden ser activadas y esta activación lleva a la regulación de las diversas células del sistema inmune. (Tomada de Castro et al, 2015)

1.4. La vía adenosinérgica

Recientemente se ha postulado que las MSC's generan adenosina a partir de nucleótidos extracelulares catalizados por las ectonucleotidasas CD39 y CD73, en donde la CD39 (ENTPD1 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1), hidroliza el ATP y el ADP a sus respectivos nucleósidos (Robson et al., 2005), mientras que la CD73 degrada el AMP a adenosina (Saldanha-Araujo et al, 2011).

La vía adenosinérgica ha llamado la atención como una diana terapéutica para la activación inmune. La adenosina se genera en respuesta a los estímulos proinflamatorios, tales como estrés celular iniciado por la hipoxia o isquemia. La liberación del ATP extracelular sufre conversión por la CD39 al AMP y éste es catalizado por la CD73 y convertido en adenosina. Muchos estudios han evidenciado el papel de la adenosina en el escape del tumor. La adenosina interacciona con 4 subtipos de receptores acoplados a proteína G (A1, A2A, A2B y A3), cada receptor tiene afinidad variable para la adenosina, esto es un indicativo de los diferentes niveles de respuesta que estos receptores pueden desencadenar al ser activados (Fig.8) (Young et al, 2014).

La interacción de la adenosina con los receptores A1 y A3 disminuye el AMP cíclico (cAMP), mientras que la interacción con los receptores A2A y A2B induce un incremento en el cAMP de los LT CD4+ y CD8+ para producir un efecto inhibitorio. Asimismo, los estudios con agonistas y antagonistas selectivos, han revelado un papel dominante del receptor A2A en la supresión de respuestas mediadas por células T (Fig.6). La estimulación de los receptores A2A en las células T inhibe su proliferación, la citotoxicidad y la producción de citocinas pro-inflamatorias. También se ha demostrado que la adenosina inhibe la maduración y la producción de citoquinas pro-inflamatorias por las CD, y en consecuencia disminuye su capacidad para inducir respuestas Th1 en LT (Fig.8,9) (Beavis, 2012).

Las CD39 y CD73 tienen un papel importante en la regulación de la función de varios tipos de células inmunes, incluyendo a los linfocitos, neutrófilos, monocitos /macrófagos, CD (Antonioli et al, 2013). Además de sus funciones inmunorreguladoras, la vía adenosinérgica contribuye directamente a la modulación del crecimiento de las células de cáncer, la diferenciación, invasión, migración y metástasis (Fig.9) (Antonioli et al, 2013).

El equilibrio entre la adenosina y el ATP es crucial para la respuesta inmune ya que el ATP es una señal de peligro liberado por células dañadas. El ATP se libera ya sea por lisis celular o por mecanismos no líticos incluyendo: (I) la exocitosis de vesículas que contienen ATP, (II) a través de canales de nucleótidos-permeable, (III) a través de vesículas de transporte que entregan las proteínas a la membrana celular, y (IV) a través de los lisosomas (Antonioli et al, 2013).

La gama de células inmunes que expresan los receptores de adenosina; y por lo tanto potencialmente afectados por los efectos inmunomoduladores de la adenosina incluyen los linfocitos T, células NK, células NKT, macrófagos, CD, neutrófilos, mastocitos y células B. La adenosina ejerce efectos inmunosupresores potentes tanto en LT CD4+ y CD8+. Linfocitos T de ratón y humanos expresan receptores A2A, A2B y A3, y esta expresión está regulada positivamente a la estimulación con mitógenos o a través del receptor de células T (TCR). La estimulación de los receptores A2A en las células T inhibe su proliferación, la citotoxicidad y la producción de citocinas proinflamatorias (Fig.9) (Antonioli et al, 2013).

El complejo de las CD39 / CD73 participa en el proceso del escape tumor, mediante la inhibición de la activación, expansión clonal, y homing de las células T específicas de tumor (Fig.8) (Antonioli et al, 2013).

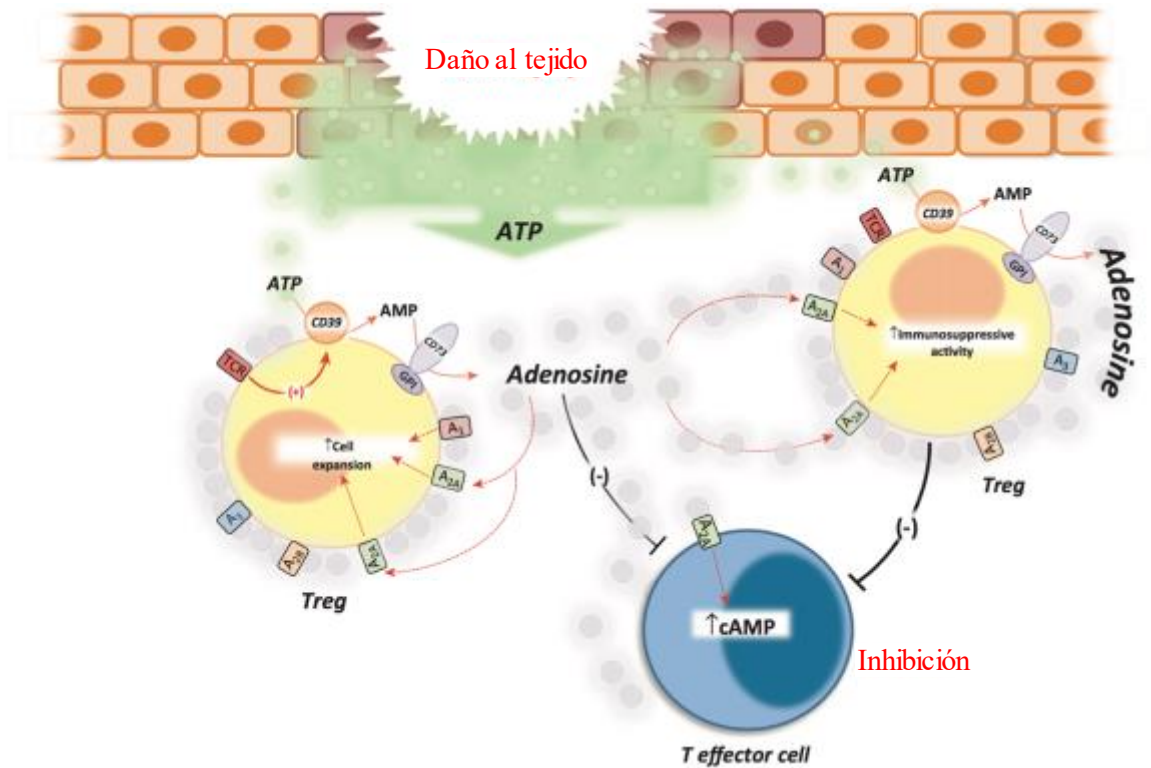


Figura. 8 La vía adenosinérgica.

Se muestra la vía adenosinérgica con sus diferentes moléculas y receptores, así como el efecto que tiene sobre células T. (Tomada de Antonioli et al, 2013)

1.4.1. La adenosina y sus interacciones con el sistema inmune

La expresión de las CD39 y CD73 en las células Th17 está estrechamente regulada por los factores que inducen la diferenciación Th17, es decir, IL-6 y TGF- β . En particular, la IL-6, a través de la estimulación del factor de transcripción Stat3, y TGF- β , resulta esencial para el aumento de la expresión de las ectonucleotidasas durante la diferenciación de células Th17 (Antonioli et al, 2013).

La adenosina desactiva funciones efectoras citotóxicas de las células tanto NK y LT CD8+ predominantemente a través de la señalización del receptor de la adenosina A2A, lo que permite la evasión y el escape del sistema inmune por parte del tumor (Young et al, 2014; Beavis, 2012).

La producción de la adenosina por las Treg es importante para la supresión de la respuestas de las células T *in vitro* e *in vivo* de una manera dependiente del receptor A2A. Curiosamente, la adenosina también modula la diferenciación de los LT CD4+. La producción mediada por los Treg de la adenosina evita el desarrollo de respuesta TH17 dentro del microambiente del tumor (Beavis, 2012).

La adenosina también se ha demostrado que inhibe la acción y la producción de citocinas proinflamatorias, la maduración de CD, y en consecuencia deteriora su capacidad para inducir respuestas Th1 (Fig.9) (Beavis, 2012).

La liberación de citoquinas y factores moduladores inmunes, tales como factor de crecimiento vascular (VEGF), IL6, IL10 y TGF- β , por distintos tipos de células supresoras aumenta la supervivencia del tumor a través de la angiogénesis aumentada e inmunovigilancia inhibida, y por lo tanto la mayoría de la evidencia sugiere que la adenosina es favorable para la supervivencia de las células tumorales (Fig.9) (Young et al, 2014).

1.4.2. La adenosina y su relación con el cáncer

En el contexto del cáncer, estudios hechos por Sitkovsky y sus colegas han demostrado que la acumulación de la adenosina extracelular en los tumores suprime la respuesta inmune antitumoral, esencialmente a través de la activación de los receptores de la adenosina A2A. Los niveles extracelulares de la adenosina son generalmente constantes en la mayoría de los tejidos, pero puede aumentar rápidamente en respuesta a la hipoxia y la inflamación crónica. El proceso de la acumulación de la adenosina extracelular en los tumores sólidos ha sido revisado recientemente, la acumulación de la adenosina extracelular en los tumores genera un microambiente inmunosupresor que mejora eficazmente el escape del tumor (Stagg et al, 2011).

La adenosina presente en el microambiente tumoral es mediada esencialmente por la expresión de las CD39 y CD73. Estas moléculas son expresadas por células endoteliales y linfocitos, así como por las propias células tumorales (Fig.9) (Young et al, 2014).

Se ha reportado que la adenosina presente en el microambiente tumoral puede provenir de varias fuentes tales como:

- a) La hipoxia celular en la cual se inhibe la adenosina cinasa, lo que causa un incremento del AMP extracelular y por tanto un incremento de la adenosina. Cuando este sustrato interacciona con la CD73 dispuesto en células que expresan esta ectonucleotidasa, como ocurre en las células Treg, células dendríticas foliculares, células epiteliales y MSC's entre otras.
- b) Se ha descrito que algunas de las células tumorales también pueden producir adenosina.
- c) Los nucleótidos liberados por las células T durante la activación y la presentación de antígenos pueden ser fuentes de la adenosina (Fig.9) (Deaglio et al, 2007).

La reducción de la adenosina dentro del microambiente del tumor mejora las funciones efectoras de las células inmunes infiltradas. La expresión baja de los LT CD8+ específicos de antígenos tumorales es evidente en ratones deficientes de la CD73. En contraste, la supresión de CD39 reduce la inmunosupresión por Treg, lo que permite el aumento de la infiltración de las células NK y la actividad citotóxica en el microambiente tumoral (Fig.8 y 9) (Young et al, 2014).

Desarrollo y propagación de la neoplasia

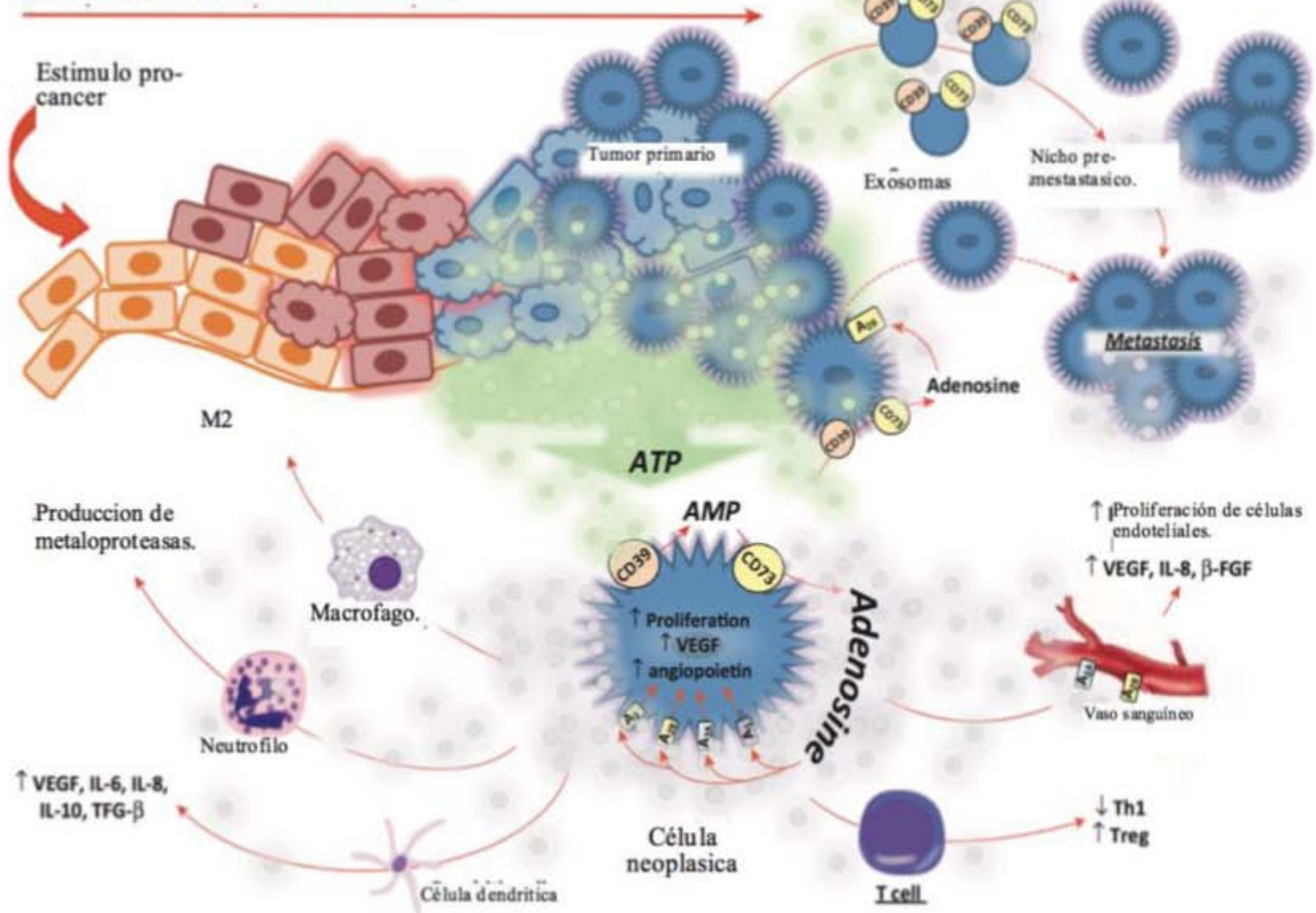


Figura. 9 La participación de la vía adenosinergica en el microambiente tumoral.

Se observa la vía adenosinergica en el microambiente tumoral, así como las diversas moléculas que participan en en ésta, junto con los efectos que tiene sobre las distintas células del sistema inmune. (Tomada de Antonioli et al, 2013)

1.4.3. La molécula CD73

La CD73 se expresa en el 70% de las células B, el 10% de las células T CD4+, el 80% de las células T CD8+ naiv y el 30% de las células T CD8+ de memoria circulantes (Young et al, 2014).

Las células T positivas para la CD73 sólo se encuentran dentro de las población CD28+ y en subpoblación de células naiv en un 75% y en un 30% de células de memoria (Resta et al, 1997).

La CD73 se expresa en los linfocitos, las células endoteliales y epiteliales y desempeña un papel fisiológico en la homeostasis endotelial, esta ectoenzima actúa como una molécula de señalización en los linfocitos T y como una molécula de adhesión que se requiere en la unión de linfocitos al endotelio (Beavis, 2012). La CD73 también se expresa en los siguientes sitios: venas hepáticas, mucosa de células de transición, los enterocitos yeyuno e íleon, y grandes células de la placenta, glándulas endometriales, de mama y vesícula biliar (Resta et al, 1997).

Se cree que las acciones biológicas de la CD73 son una consecuencia (al menos en gran parte) de su actividad fosforeguladora enzimática de nucleótidos extracelulares (Jin et al, 2010).

Se sabe que la CD73 está anclada en la membrana a través de GPI en lugar de una secuencia que abarca la membrana convencional de aminoácidos hidrófobos. Esto se determinó primero por la susceptibilidad de liberación a partir de membranas de la CD73 y células enteras por tratamiento con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) y más tarde por análisis estructurales definitivos (Resta et al, 1997).

Además está asociada en el control de una variedad de respuestas fisiológicas, incluyendo el transporte de fluidos e iones epiteliales, lesiones de los tejidos, la función plaquetaria, fuga vascular y restricción de la migración de linfocitos a los ganglios linfáticos, entre otros. También se ha demostrado que participa en la interacción célula-célula y célula-matriz, está implícita en la resistencia a las drogas y la promoción de los tumores, suprime las respuestas pro-inflamatorias en células endoteliales humanas. Asimismo, se expresa ampliamente en muchas líneas celulares tumorales y su expresión se encuentra incrementada en diversos tipos de carcinomas, incluidos los de colon, pulmón, páncreas y ovario; participa en la neovascularización tumoral, invasión, migración, adhesión y metástasis (Massaia et al, 1990; Dianzani et al, 1993; Resta and Thompson, 1997; Colgan et al, 2006; Lennon et al, 1998; Takedachi et al, 2008; Madara et al, 1993; Airas et al, 1995.)

La CD73 se ha postulado que tiene un papel muy importante en la adhesión de los linfocitos, esto se ha visto con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti CD73, y se puede ver que compromete las funciones del TCR (Resta et al, 1997).

1.4.4. La molécula CD73 y su relación con los tumores

La CD73 se encuentra en una variedad de tejidos, incluyendo colon, cerebro, riñón, hígado, pulmón, corazón, en los leucocitos derivados de la sangre periférica, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo y la médula ósea, así como en el endotelio (Antonioli, et al 2013).

También se ha asociado a la adenosina con la promoción de la migración celular *in vitro* a través del receptor de la adenosina A2B (Young et al, 2014).

Debido a que la adenosina es un metabolito, la genética sólo puede utilizarse para estudiar la vía adenosinérgica por la orientación de los genes que codifican para la sCD39 y la CD73 (que generan adenosina), o los receptores para la adenosina (que consumen adenosina). Las investigaciones iniciales determinaron que la deficiencia

de la CD39 o la CD73 mejoraron la inmunidad antitumoral y la supervivencia al reducir significativamente el crecimiento del tumor y la metástasis (Young et al, 2014).

Curiosamente, la CD73 se expresa altamente en muchos tumores sólidos humanos y su expresión y actividad elevadas se asocian con la metástasis tumoral y con menor

tiempo de supervivencia de los pacientes, lo que indica que la CD73 está cercanamente involucrado en la progresión del cáncer gracias a las propiedades inmunomoduladoras dadas por la adenosina. Por esto es de gran importancia evaluar el papel de CD73 en la inmunidad del cáncer (Tabla 2) (Jin et al, 2010).

Enfermedad	Número de pacientes con expresión de CD73 en tumores.	Expresión.
Cáncer de vejiga	2/2	Líneas celulares
Leucemia	97/299	Células CD19+ de neuroblastoma
Glioma	1/1	Línea celular U138MG
Glioblastoma	158/165	Muestras primarias de tejido
Melanoma	7/7	Líneas celulares
Cáncer de ovario	33/36	Muestras primarias de pacientes
Cáncer de tiroides.	3/3	Muestras primarias de pacientes
Cáncer esofágico.	4/4	Líneas celulares
Cáncer gástrico	15	Muestras primarias de pacientes
Cáncer de colon	38	Muestras primarias de pacientes
Cáncer de próstata	½	Líneas celulares LNCaP y PC-3
Cáncer de mama	5/9 y 13/30	Líneas celulares. Muestras primarias de pacientes.
Cáncer de cabeza y cuello	33	Muestras primarias de pacientes
Exosomas de cáncer	3/3	Líneas celulares.

Tabla 2 La representación de tipos de tumores que expresan la CD73

Se enlistan el tipo de cáncer que se han estudiado y la expresión de la molécula CD73 en pacientes (Tomada de Beavis et al, 2012).

La expresión de la molécula CD73 en tumores ejerce una presión selectiva sobre el sistema inmune, debido a que los tumores positivos a la CD73 están mejor equipados para suprimir la respuesta inmune antitumoral. El microambiente tumoral contiene factores que regulan la expresión de la CD73, esta expresión mediada por el TGF- β y es revertida por las citocinas de tipo Th1, sugiriendo una relación recíproca entre la respuesta antitumoral y las citocinas pro-inflamatorias que inhiben la expresión de la CD73 (Spychala et al, 2004; Regateiro et al, 2011).

1.4.5. El bloqueo de la vía adenosinérgica

El bloqueo de la actividad enzimática de la CD39 puede conducir a un aumento en los niveles del ATP extracelular, lo que permite co-activar los inflamosomas y la promoción de la inmunidad tumoral. Inmunoterapias de anticuerpos dirigidos contra la CD73 demostraron propiedades antitumorales similares a las obtenidas con el bloqueo de la CD39 (Young et al, 2014).

El receptor A2A media la respuesta a través de un mecanismo dependiente de perforina mediada por los linfocitos, mientras que la progresión metastásica fue inhibida a través de la adenosina por el receptor A2B independiente de las células NK y funciones de los LT CD8+ (Young et al, 2014). El bloqueo tanto de la CD73 como del receptor A2A en diferentes líneas tumorales desencadenó en la proliferación de las células T (Jin et al, 2010).

Curiosamente, se ha reportado que las células T humanas inmortalizadas (Jurkat) que expresan la CD73, carecen de actividad enzimática aun co-activadas con anti-CD73. Estos resultados plantean la posibilidad de que un ligando fisiológico para la CD73 puede estar implicado en la activación de las células T, aunque esto aún debe ser demostrado (Young et al, 2014).

De hecho, se ha encontrado que la desregulación de la CD73 por los siRNA en células de tumores da pie a la actividad de células T antitumorales y se observó una mayor supervivencia a largo plazo en ratones con tumor (Jin et al, 2010). Recientemente, el uso de mAB anti CD73 de humano ha demostrado reducir la metástasis espontánea de xenoinjertos de cáncer de mama humano, independiente del crecimiento del tumor primario (Young et al, 2014).

Debido a la amplia expresión de la CD73, incluyendo en las células endoteliales, la administración de anti-CD73 mAb puede llevar el riesgo de toxicidad sistémica, aunque esto no ha sido reportado en los ratones que se han tratado con anti-CD73. Debido a la multifuncionalidad de la CD73 (promoción de tumor asociado a la angiogénesis, la adhesión celular y la migración), parece ser un objetivo terapéutico (Young et al, 2014).

Tratando de replicar las respuestas antitumorales obtenidas mediante la desregulación de la CD73 y la CD39, a través de la orientación farmacológica ocupando bloqueadores específicos de la CD73 y la CD39 identificados en la progresión del cáncer. Pequeñas moléculas bloqueadoras como lo es el APCP bloqueador de CD73 (α,β -Methyleneadenosina 5'-diphosphate) y POM-1 (polyoxometalate-1) bloqueador de CD39, que derogue directamente las funciones catalíticas de la CD73 y la CD39, respectivamente, inhiben el crecimiento tumoral y la metástasis (Young et al, 2014).

Recientemente se han ideado algunos sistemas para contrarrestar el efecto inmunosupresor de adenosina en tumores, por ejemplo, el uso del APCP, inhibidor específico de la CD73 o el bloqueo de su expresión mediante siRNA. Se ha demostrado que la expresión de la CD73 en células no hematopoyéticas y hematopoyéticas restringe significativamente la inmunidad antitumoral mediada por los LT CD8+. Se vio que la inhibición de la CD73 puede suprimir eficazmente el crecimiento del tumor, así como el potencial metastásico de

las células tumorales (Stagg et al, 2011).

Es de destacar que solamente la inhibición de la CD73 no logra curar el cáncer a pesar de aumentar la supervivencia y la inhibición del crecimiento tumoral. Esto es probablemente debido al número insuficiente de las células T antitumorales efectoras en el microambiente tumoral, que no sólo son incapaces de controlar el cáncer, sino que también son influenciadas fácilmente por otros mecanismos inmunosupresores. Curiosamente, la inhibición de la CD73 mejora notablemente las células T efectoras antitumorales. Por lo tanto, la estrategia óptima para contrarrestar los efectos inmunosupresores de la vía adenosinérgica CD73 en el microambiente tumoral es complementaria a otros enfoques dirigidos a mejorar el desarrollo y la función de las células T antitumorales (Jin et al, 2010).

2. Antecedentes

Nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar MSC's de tejidos normales de cuello uterino (MSC's-CN) y de tumores avanzados de CaCu (MSC's-CaCu) (Montesinos JJ et al, 2013). En un estudio reciente se encontro que la expresión y actividad funcional de CD73 es significativamente mayor en las MSC's-CaCu que en las MSC's-CN y la adenosina producida por estas MSC's inhibe fuertemente la proliferación de linfocitos T; asimismo, la adición del APCP a las MSC's inhibe fuertemente la generación de adenosina (Morales, 2014).

Por otra parte, en un estudio previo de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 con protección inmunológica contra el reto tumoral, a través de la administración del péptido inmunogénico RAHYNIFTV de la proteína E7 de VPH-16 y de la inoculación simultánea de células tumorales TC-1 con MSC's-CaCu, inhibió la protección inmune mediada por linfocitos T citotóxicos, e indujo una disminución en la expresión de moléculas H-2D^b en los tumores (Montoro, 2014).

En un experimento similar, el suministro de cafeína (un bloqueador de receptores para adenosina) a los ratones, inhibió de manera importante la supresión de los linfocitos T citotóxicos ejercida por las MSC's y restableció la función inmunoprotectora de los linfocitos T efectores (Navarro, 2013), lo cual nos permite sugerir que las MSC's-CaCu a través de la generación de adenosina pueden ejercer un fuerte efecto inmunosupresor sobre la actividad efectora de los LTT CD8+ *in vivo* y favorecer la evasión de la respuesta inmune antitumoral.

En consecuencia, en el presente estudio se plantea analizar si el bloqueo de la actividad funcional de la CD73 con el APCP inhibe el efecto inmunosupresor de las MSC's-CaCu en este modelo experimental, lo cual será de gran importancia para establecer estrategias que favorezcan una mejor respuesta inmune antitumoral en pacientes con CaCu.

3. Hipótesis

En el modelo experimental de reto tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 previamente inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH-16), con células tumorales TC-1, se espera que el suministro del APCP inhiba de manera importante el efecto inmunosupresor de las MSC's-CaCu.

4. Objetivo General

Analizar la capacidad inmunosupresora de las MSC's-CaCu a través de la vía CD73-adenosina en un modelo de protección inmunológica ante el reto tumoral.

4.1. Objetivos particulares:

- I. Analizar el efecto de las MSC's-CaCu, MSC's-CaCu CD73 Des y MSC's-CN sobre el crecimiento tumoral inducido por las células tumorales TC-1, en ratones C57BL/6 inmunizados o no con el péptido RAHYNIVTF.
- II. Analizar el efecto del APCP sobre el crecimiento tumoral inducido por células tumorales TC-1 en presencia de las MSC's-CaCu, MSC's-CaCu CD73 Des y MSC's-CN en ratones C57BL/6 inmunizados o no con el péptido RAHYNIVTF.
- III. Analizar la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en las células de los tumores de los distintos tratamientos
- IV. Determinar la concentración de IL-10 en los sueros de los ratones de los distintos tratamientos
- V. Ver el efecto citotóxico de los LT CD8⁺ provenientes de ratones inmunizados contra las células tumorales provenientes de los distintos tratamientos.
- VI. Cuantificar el mRNA de IL-10, H-2D^b y CD73 mediante qRT-PCR en las células provenientes de los tumores.

5. Materiales y métodos

5.1. Cultivos celulares

Para la inducción de tumores se utilizaron las células tumorales TC-1 derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6, las cuales expresan de manera permanente los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 junto con el gen Ras además de ser histocompatibles a este modelo de ratón por presentar moléculas H-2D^b (Lin et al, 1996). Estas células se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, USA) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 10%. También se emplearon estirpes de MSC's (humanas), las cuales se obtuvieron de cérvix normal (MSC's-CN) y cáncer cérvico uterino (MSC's-CaCu). Estas estirpes celulares fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación médica en enfermedades oncológicas, CMN SXXI. Todas las estirpes de MSC's utilizadas en este trabajo se caracterizaron por nuestro grupo de investigación con base en los parámetros morfológicos, fenotípicos y de diferenciación establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Montesinos et al, 2013). Posteriormente las MSC's se cultivaron con medio de cultivo consistente en DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con SFB al 15%. Antes de ser inoculadas, todas las células se cultivaron en condiciones de esterilidad y fueron mantenidas bajo condiciones reguladas en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C con 5% de CO₂ y humedad saturante.

5.2. Desregulación de la molécula CD73

A una parte de las MSC's-CaCu se les desreguló de la expresión de la molécula CD73 (MSC's-CaCu Des) por siRNA: para ello se utilizó el vector lentiviral pGIPZ (Gene de acceso: NM_011851 de Open Biosystem, USA). Las construcciones específicas para inhibir CD73 de manera estable fueron RMM4431-98751230 y RMM4431-98762273. Para el control de expresión se utilizó un vector trans-

lentiviral GIPZ (Open Biosystem, TLP4615). Esto se realizó haciendo un cambio de medio en los cultivos, aparte se preparó en 100 μ l total de medio sin suero DNA de CD73 y el reactivo TurboFect (Thermo Scientific, USA) colocando 20 μ g de DNA y 20 μ g de TurboFect, se incubó a temperatura ambiente por 20 min y posteriormente se le añade a la caja y se evalúa a las 48 horas.

5.3. Cepa de ratones

Se emplearon 17 tratamientos cada uno de 6 ratones hembra de la cepa C57BL/6 (Haplotipo H-2D^b) de 6-8 semanas de edad, se mantuvieron en condiciones estándar de Bioterio, con alimento y agua conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001.

5.4. Inmunización

Para inducir protección inmunológica en los ratones C57BL/6, se emplearon dos grupos con 4 tratamientos cada grupo, cada tratamiento con 6 ratones y se inmunizó con tres dosis del péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH16) (Thik peptides) de 100 μ g cada una, vía cavidad peritoneal. El péptido aplicado se disolvió en PBS (Solución Salina de Fosfatos) y se emulsionó con adyuvante completo de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1 para la primera dosis. En las dosis subsecuentes se utilizaron 100 μ g de péptido emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1, el tiempo transcurrido entre cada inmunización fue de aproximadamente de 10-12 días. El volumen total de antígeno y adyuvante fue de 100 μ l.

5.5. Inoculación de células para la inducción de tumores

Los 2 grupos que recibieron protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF y los otros dos sin protección inmunológica, se les administraron 10 días después de la última inmunización 1×10^5 células tumorales TC-1 en el dorso y las MSC's vía caudal simultáneamente (en proporción 1:1), teniendo los siguientes tratamientos: 1) TC-1+MSC's-CaCu; 2) TC-1+MSC's-CaCu CD73 Des (desreguladas de la molécula CD73); 3) TC-1+MSC's-CN; 4) TC-1+0 como se indica en la Tabla 3.

5.6. Aplicación del APCP (α,β -Methyleneadenosina 5'-diphosphate)

Para analizar la participación de la CD73 en el crecimiento tumoral, dos grupos, uno inmunizado y otro sin inmunizar, fueron tratados de manera simultánea por vía intravenosa e *in situ* (en el sitio del tumor), con el inhibidor específico de CD73 APCP administrado de 20mg/Kg de peso, cada 3 días las dos primeras dosis vía intravenosa y las tres siguientes *in situ* haciendo un total de 5 dosis a partir del día 15 de crecimiento tumoral (Tabla 3).

Grupo	Inmunizados	Sin inmunizar
Sin APCP	TC-1+0 TC-1+MSC's-CaCu TC-1+MSC's-CN TC-1+MSC's-CaCu CD73 Des	TC-1+0 TC-1+MSC's-CaCu TC-1+MSC's-CN TC-1+MSC's-CaCu CD73 Des
Con APCP	TC-1+0 TC-1+MSC's-CaCu TC-1+MSC's-CN TC-1+MSC's-CaCu CD73 Des	TC-1+0 TC-1+MSC's-CaCu TC-1+MSC's-CN TC-1+MSC's-CaCu CD73 Des

Tabla 3 Esquema de inducción de tumores.

Se les dio a los tratamientos un refuerzo de células de TC-1 10 días después de la primera dosis.

5.7. Medición de tumores

El crecimiento tumoral fue monitoreado cada 3 días, y el volumen tumoral se calculó usando la fórmula $v = (r1 * r2^2) / 2$ donde r1 y r2 son los valores obtenidos a partir de la medición perpendicular del tumor (Paz de la Rosa *et al*, 2009). Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor fue aproximadamente de 2000 mm³.

5.8. Obtención de sueros de los distintos tratamientos para determinar la concentración de la IL-10

Durante el crecimiento tumoral de los ratones se llevaron a cabo 3 sacrificios (un ratón por grupo) a los días 10, 20 y 30 después de inoculadas las células tumorales, esto se realizó por la técnica de exanginación para obtener toda la sangre de los ratones y poderla analizar por la técnica de un Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la IL-10 esto se realizó con un kit (murine IL-10 Development Kit, Pepro Tech., USA). Este ensayo consiste en la técnica del sándwich de un inmunoensayo enzimático.

En una placa de ELISA de 96 pozos (Costar, USA), se colocaron por triplicado 100 µl de un anticuerpo monoclonal específico para IL-10 a una concentración de 2.0 µg/mL y se dejó incubando durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se lavó 4 veces con 300 µl de una solución de lavado (PSB-Tween-20 0.05%) y se bloquearon los espacios vacíos con una solución de bloqueo (BSA-PBS 1%) por 1h. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar 4 veces con 300 µl de solución de lavado (PBS Tween-20 0.05%) y se añadió 100 µl de una muestra

estándar en diferentes concentraciones según lo recomendado por el proveedor (5000-39.06) en unos pozos y en otros la muestra problema diluida en PBS 1:10 (tomando 10 μ l de suero problema y añadiendo 90 μ l de PBS) y se incubó por 2h. Una vez transcurrido el tiempo se lavó 4 veces la placa con 300 μ l de solución de lavado (PBS Tween-20 0.05%) y posteriormente se adicionó 100 μ l de un anticuerpo específico para IL-10 y ligado a la enzima peroxidasa a una concentración de 0.5 μ g/mL dejándolo incubar por 2h (este anticuerpo fue diluido en una solución de PBS-0.05% tween-20 y 0.1% BSA). Después se realizaron 4 lavados a la placa con 300 μ l de solución de lavado (PBS Tween-20 0.05%) para remover el anticuerpo ligado a enzima que no se unió; luego se adicionó una solución de avidin-HRP conjugada 1:2000 colocando 100 μ l por pozo y se incubó por 30min (esta avidin-HRP fue diluida en una solución de PBS-0.05% tween-20 y 0.1% BSA). Pasando esto se lavó 4 veces la placa con 300 μ l de solución de lavado (PBS Tween-20 0.05%) y se añadió 100 μ l de substrato ABTS (2,2'azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, SIGMA, USA) a temperatura ambiente; se monitoreó el desarrollo de color cada 15 min durante 1 h. La intensidad del color verde fue determinada en un lector de placas de ELISA (Molecular Device Emax) a una longitud de onda de 405 nm con una corrección a 650 nm.

5.9. Determinación de moléculas H-2D^b y H-2K^b en las células tumorales cultivadas

Al término de la cinética de crecimiento tumoral se llevó a cabo la obtención de tumores para realizar cultivos para determinar la expresión de moléculas del MHC-I.

Los ratones fueron sacrificados y se obtuvo su tumor para ser cortados en pequeños fragmentos (explantes), estos explantes fueron sembrados en platos de cultivo de 100 mm x 20 mm (Corning, USA) mediante adherencia empleando una pequeña cantidad de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% durante aproximadamente 1 h. Una vez adheridos los explantes se adicionó una cantidad suficiente (para cubrir los explantes) de medio de cultivo RPMI1640 suplementado

con SFB al 10% y medio de cultivo DMEM bajo en glucosa más 15% de SFB en proporciones 3:2. Una vez observado el crecimiento celular en la periferia del explante, se realizaron cambios parciales de medio de cultivo cada tercer día retirando 5 mL y añadiendo 5 mL de medio fresco.

Cuando se obtuvo una población importante ($> 500,000$) de células alrededor del explante, las células fueron cosechadas para determinar la expresión de moléculas H-2D^b y H-2K^b en la membrana celular mediante citometría de flujo. Esto se realizó con 5×10^5 células; se incubaron con 50 μ l de un anticuerpo monoclonal anti-H-2D^b/H-2K^b (0.5mg/mL Novus Biologicals) diluido 1:50 en PBS incubando por 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 2000 RPM a 5°C durante 5min, para eliminar el sobrenadante. Las células se lavaron con PBS-2%SFB dos veces y se adicionó 1 μ l del anticuerpo secundario cabra anti-ratón marcado con FITC IgG-Fab (Sigma, USA). Las células se incubaron a 4°C por 20 min. Posteriormente se lavaron y se procedió a leerlas en un citómetro de flujo (FACS-Aria BD. USA).

5.10. Obtención de LTCD8+ para ensayos de citotoxicidad

Para analizar la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+, se contó con un grupo de 6 ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, se sacrificaron los ratones después de 3 inmunizaciones y se obtuvo el bazo para macerarlo con ayuda de una organza y un émbolo, después de esto se trató con 3mL de buffer de lisis de eritrocitos, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. Las células obtenidas de este proceso se sometieron al proceso de obtención de LT CD8+.

Para la obtención de la población de LT CD8+ del bazo, se utilizó un kit de selección de CD8+ (Mouse CD8+ T Cell Enrichment Kit, Easy Sep, Stem Cell Technologies, USA), donde se indica que con una población de 5×10^7 células en un volumen no mayor a 2ml se agregó 100 μ l de cocktail y se incubó por 15 min a 4°C, posterior a esto se agregó 200 μ l de Biotin Selection Cocktail y se dejó incubar en refrigerador a 4°C por 15 min, después se agregan 200 μ l de Magnetic

Nanoparticles y se incubó por 5 min a 4°C, se completó la suspensión a un volumen total de 2.5 mL con suero normal de rata, después se colocó en un magneto por 5min, después de esto se colectó la fracción flotante, como se indica en el protocolo de usuario.

Una vez obtenidos los LT CD8+ se hicieron co-cultivos con las células obtenidas de los explantes de los distintos tratamientos en proporción 1:5 (200,000:1,000,000 TC-1:LTCD8) durante 4h, las células blanco se marcaron con CFSE, y se evaluó la viabilidad mediante el reactivo de viabilidad 7-AAD (7-amino-actinomycin D), mediante un citómetro de flujo (FACS-Aria BD, USA).

La citotoxicidad fue calculada con la fórmula ((Muerte experimental - Muerte espontánea) / (Muerte total – Muerte espontánea)) × 100

5.11. Cuantificación de mRNA por RT-PCR en tiempo real

Para realizar la cuantificación de mRNA, de los distintos tratamientos se obtuvieron las células de los explantes y se obtuvo el RNA implementando la técnica de trizol como se describe en el protocolo de usuario (Invitrogen, California, USA). El RNA se disolvió en 15 µl de agua libre de RNAsas (Invitrogen). Para la obtención de cDNA se utilizaron 500 ng de RNA por cada 20 µl de la reacción de retrotranscripción (RT), empleando para ello el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, California, USA). Los productos obtenidos de la reacción de retrotranscripción de las líneas celulares fueron analizados para la expresión de: IL-10, H-2D^b y CD73, por PCR en tiempo real, para esto se utilizó el gen GAPDH como control interno en todos los ensayos (las secuencias de los oligos se muestran en la tabla 4). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), el termociclado de cada reacción fue elaborado en un volumen final de 10 µl siguiendo el protocolo de *LightCycler 480 Probe Master* (Roche Diagnostic, USA).

Gen	Sentido 5'-3'	Temperatura de alineamiento (°C)
H-2D^b	5' – AGGGCTGGATTGAGA– 3'	55.6
IL-10	5' – CAGAGCCACATGCTCCTAGA – 3'	56.4
CD73	5' – GCCCGCTCTTTACCAAG – 3'	56.2
GAPDH	5' – CGTACCAGTGCAAAGACCCTA – 3'	56.7

Tabla 4 Secuencia de primers utilizados para el qRT-PCR.

5.12. Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el programa GraphPad Prism 5.0 y se realizó una ANOVA de dos colas con un post test de Bonferroni para la cinética de crecimiento tumoral. Para los datos obtenidos del ELISA de IL-10 se usó una ANOVA de dos colas con un post test Bonferroni, para el análisis de los datos de la expresión de moléculas MHC I se usó una ANOVA de 1 cola con un post test Tukey y para el análisis de mRNA se usó una prueba ANOVA de 1 cola con un post test Tukey.

6. Resultados

6.1. Las MSC's-CaCu y las MSC's-CN favorecen el crecimiento tumoral en condiciones normales y de inmunoprotección en ratones de la cepa C57BL/6 a través de la vía CD73-adenosina

Se emplearon 2 grupos de ratones (Inmunizados y no inmunizados con el péptido RAHYNIVTF) y cada grupo se dividió en 4 subgrupos de acuerdo a los siguientes tratamientos (TC-1+0, TC-1+MSC's-CaCu, TC-1+MSC's-CaCu CD73 Des y TC-1+MSC's-CN). Los ratones que recibieron inmunización previa con el péptido y solo recibieron células tumorales, fueron protegidos ante el reto tumoral, ya que después de los 34 días no se detectó crecimiento tumoral en la zona de inoculación de las células TC-1 (Fig. 10A-B). Sin embargo, el grupo de ratones que recibió las células TC-1+MSC's-CaCu mostró un crecimiento tumoral de 1.51 cm³ (Fig. 10A) y en los que recibieron TC-1+MSC's-CN el crecimiento fue de 1.1 cm³ (Fig. 10B).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha reportado que la expresión de la ecto-nucleotidasa CD73 en MSC's-CaCu inhibe *in vitro* la actividad efectora de linfocitos T citotóxicos a través de la producción de grandes cantidades de adenosina (Morles, 2014; Santos, 2014). En consecuencia, con la finalidad de determinar si el crecimiento tumoral promovido por la inoculación de las MSC's-CaCu y MSC's-CN en los ratones C57BL/6 dependía de la expresión de la CD73, a algunos subgrupos de ratones se les aplicaron 5 dosis de 20mg/Kg de peso del APCP, cada tres días durante el periodo de crecimiento tumoral, las dos primeras aplicaciones fueron aplicadas vía caudal y las 3 restantes se aplicaron *in situ* en el tumor (Tabla 3). De manera interesante, el tratamiento con APCP en ratones que recibieron TC-1+MSC's-CaCu redujeron significativamente ($p < 0.01$) el crecimiento tumoral de 1.5 cm³ a 1.1 cm³ (Fig. 10A), mientras que aquellos que recibieron TC-1+MSC's-CN y fueron tratados con APCP, inesperadamente mostraron un mayor

crecimiento tumoral ($p > 0.001$) de 1.1 cm^3 a 1.5 cm^3 (Fig. 10B). Es de notar que en ambos subgrupos, los ratones tratados con solo células TC-1+ APCP mostraron un ligero, pero perceptible crecimiento tumoral en el sitio de la inoculación de las células tumorales (Fig. 10A-B).

Por otra parte, en el grupo de ratones que no recibieron inmunización con el péptido RAHYNIVTF, se observó que el subgrupo que recibió las células tumorales TC-1, como era de esperarse, mostró crecimiento tumoral, cuyo volumen promedio fue de 0.88 cm^3 después del día 34 de seguimiento. No obstante, el subgrupo de ratones que fue inoculado con las células TC-1+MSC's-CaCu mostró un crecimiento tumoral de 2.00 cm^3 , el cual fue significativamente mayor ($P < 0.001$) respecto al grupo que recibió solo células tumorales (Figura 11A). Mientras que el subgrupo de ratones que fue inoculado con las TC-1+MSC's-CN presentó un crecimiento tumoral promedio de 1.4 cm^3 , el cual también fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el subgrupo que solo fue inoculado con células las TC-1 (Fig. 11B). Es importante hacer notar que el tratamiento con el APCP produjo una reducción importante en el crecimiento tumoral de los ratones que fueron tratados con las TC-1+MSC's-CaCu de 2 cm^3 a 1.3 cm^3 (Figura 11A), mientras que en ratones que recibieron el tratamiento con TC-1+MSC's-CN incrementó el volumen tumoral de manera significativa ($p < 0.001$) de 1.4 cm^3 a 2 cm^3 (Fig. 11B).

Por otro lado, para confirmar que CD73 expresado en las MSC's-CaCu participa de manera importante en la capacidad de estas células para favorecer el crecimiento tumoral, se generaron MSC's-CaCu desreguladas en la expresión de la molécula CD73 (MSC's-CaCu CD73 Des) mediante la transfección de las MSC's-CaCu con un siRNA interferente para dicha molécula. De manera interesante se observó que al inocular las MSC's-CaCu CD73 Des y TC-1 a los ratones C57BL/6 no inmunizados, el crecimiento tumoral fue de aproximadamente

0.25 cm³, el cual fue significativamente inferior ($p < 0.001$) al tamaño tumoral mostrado por los ratones a los cuales sólo se les aplicaron las MSC's-CaCu+TC-1 y el APCP, o simplemente las células tumorales TC-1 (Fig.12A). De igual manera, en ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, el tratamiento con las MSC's-CaCu CD73 Des y las células TC-1, produjo tumores con un tamaño de 0.7 cm³, los cuales fueron significativamente menores ($p < 0.001$) que en los mostrados por los ratones tratados con las MSC's-CaCu+TC-1 y el APCP (Fig. 12B).

Estos resultados nos permiten sugerir que las MSC's-CaCu a través de la expresión y actividad funcional de la CD73 pueden participar tanto en la supresión como en la evasión de la respuesta inmune antitumoral.

Volumen del tumor

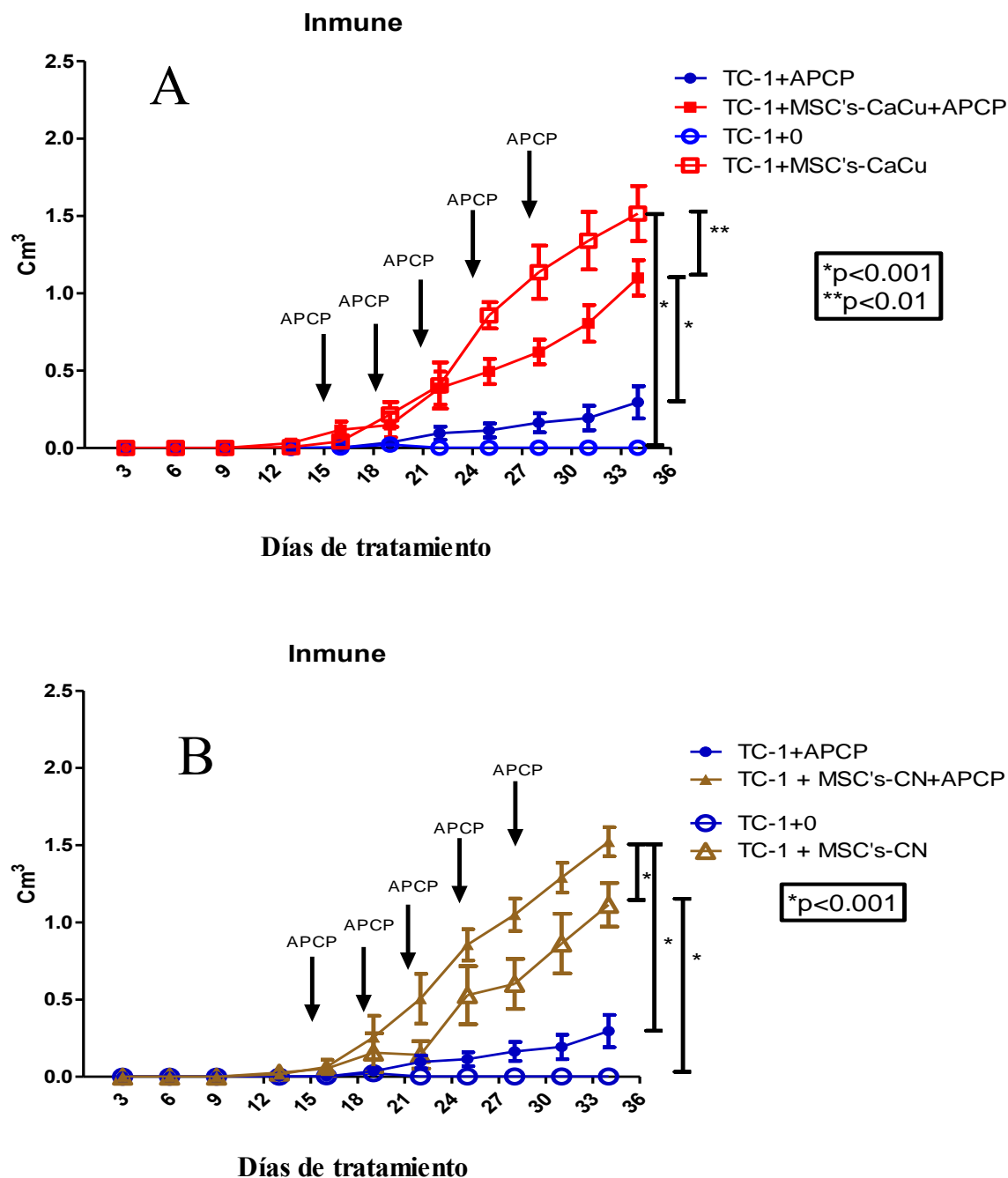


Figura. 10 Las MSC's-CaCu y MSC's-CN inhiben la protección inmune antitumoral

Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inmunizados previamente con 3 dosis de 100ug del péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV-16. Diez días posteriores a la tercera inmunización, subgrupos de 6 ratones fueron inoculados con 10^5 células TC-1, o co-inoculados con 10^5 células TC-1 (vía subdérmica en el dorso) y 10^5 MSC's-CaCu (A) o MSC's-CN (B) (vía intravenosa caudal). Algunos subgrupos fueron tratados con (20mg/Kg) del APCP, un inhibidor específico para la CD73. $*p < 0.001$ $**p < 0.01$, indican diferencias estadísticas entre los subgrupos.

Volumen del tumor

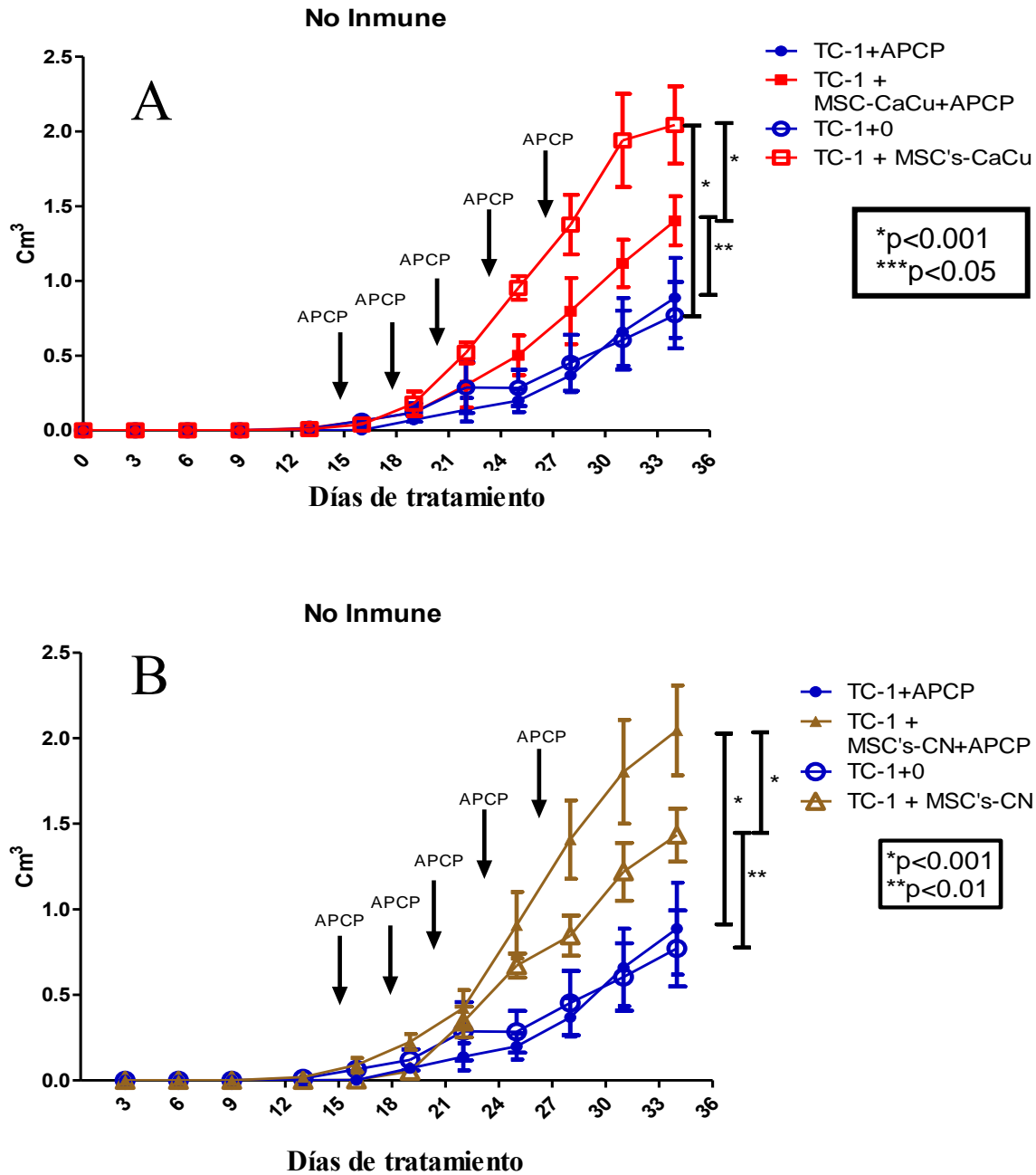


Figura 11. Las MSC's-CaCu y MSC's-CN favorecen el crecimiento tumoral.

Ratones de la cepa C57BL/6 previamente inmunizados o no con el péptido RAHYNIVTF, fueron inoculados con 10^5 células TC-1, o co-inoculados con 10^5 células TC-1 (vía subdérmica dorsal) y 10^5 MSC's-CaCu (A) o MSC-CN's (B) (vía intravenosa caudal). Algunos subgrupos fueron tratados con 20mg/Kg del APCP, un inhibidor específico para la CD73. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$, indican diferencias estadísticas entre los subgrupos.

Volumen del tumor

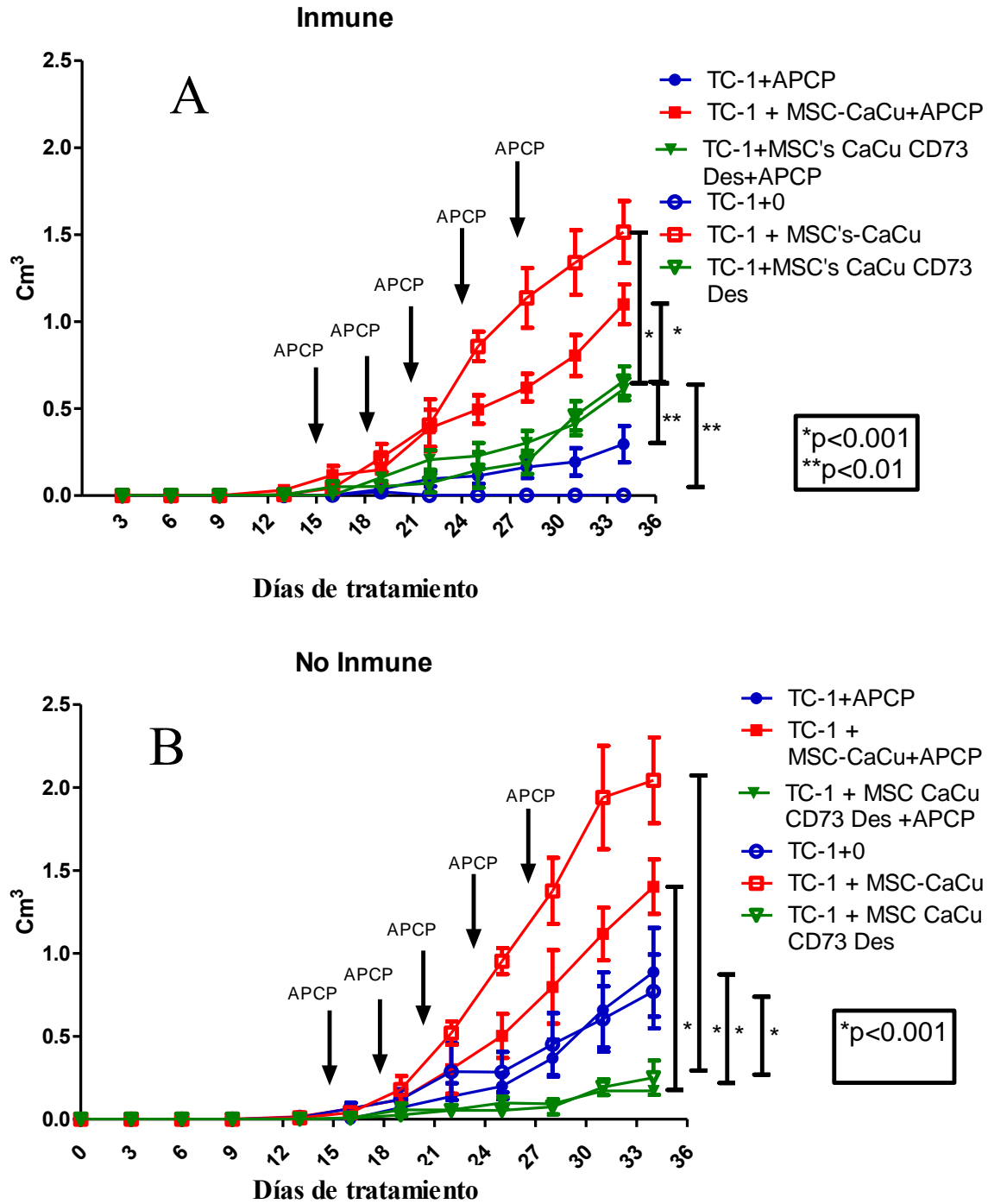


Figura 12. Las MSC's-CaCu y MSC's-CaCu CD73 Des favorecen el crecimiento tumoral mediante la expresión de CD73.

Ratones de la cepa C57BL/6 previamente inmunizados (A) o no (B) con el péptido RAHYNIVTF, fueron inoculados con 10^5 células TC-1, o co-inoculados con 10^5 células TC-1 (vía subdérmica en el dorso) y 10^5 MSC's-CaCu o MSC's-CaCu desreguladas en la expresión de CD73 (MSC's-CaCu Des) (vía intravenosa caudal). Algunos subgrupos fueron tratados con 20mg/Kg del APCP, un inhibidor específico para la CD73. *p<0.001 **p<0.01, indican diferencias estadísticas entre los subgrupos.

6.2 La co-inoculación de las MSC's con las células tumorales TC-1 en ratones C57BL/6, induce una disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en las células tumorales

En estudios previos, hemos observado que la co-inoculación de las MSC's-CaCu con las células tumorales TC-1 en los ratones C57BL/6 induce una disminución en la expresión de moléculas del MHC-I en las células tumorales (Montoro, 2014). Con la finalidad de analizar si en los tumores inducidos en los ratones que fueron tratados con el APCP o las MSC's-CaCu desreguladas para la CD73, también se observaba ese fenómeno, se obtuvieron los tumores de los distintos tratamientos y se realizaron cultivos para analizar por citometría de flujo la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en las células tumorales.

En el caso de los tratamientos que recibieron la protección inmunológica con la administración o no del APCP, se encontró que las células TC-1 provenientes de tumores de ratones a los cuales se les administraron estas células tumorales y contaron con las 5 dosis de APCP, mostraron una disminución de 23-28% en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en comparación con la línea celular TC-1 en cultivo. Mientras que las células TC-1, derivadas de los tumores de los ratones a los cuales se les co-inocularon las MSC's-CaCu y las TC-1, presentaron una disminución de 79% en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b respecto a la línea TC-1 en cultivo (Fig.13A)

Para el caso de las células provenientes de los tumores de los ratones a los cuales se les administraron las MSC's-CN, se encontró que las células tumorales TC-1 presentaron disminución de la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en aproximadamente 45% (Fig.13A); mientras aquellas derivadas de ratones a los cuales se les administró el APCP además de las MSC's-CN y las TC-1 la disminución de la expresión de estas moléculas fue de 58% (Fig.13A).

Por otro lado en los grupos de ratones que no fueron inmunizados, se pudo observar un comportamiento similar. Las células TC-1 obtenidas de los tumores de los ratones tratados sólo con estas células presentaron una disminución de 7.8% y 15.2% en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en ratones no tratados o tratados con APCP respectivamente (Fig.13B). De manera importante, a los ratones a los cuales se les administraron células MSC's-CaCu se observó una disminución de 60% y de 34% de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en ausencia o presencia del tratamiento con el APCP, respecto a la expresión basal de la línea celular TC-1 en cultivo (Fig.13B). Para las células TC-1 provenientes de los subgrupos de ratones a los cuales se les administraron las MSC's-CN se observó una disminución de estas moléculas aproximadamente de un 43% (Fig.13B) y nuevamente se encontró en las células provenientes de los tratamientos con las MSC's-CN y el APCP una disminución en la expresión de estas moléculas del MHC-I del 62%, muy parecida a la del grupo donde se les administraron las MSC-CaCu (Fig.13B).

Con respecto a las células provenientes de los tumores de los ratones a los cuales se les administraron las MSC's-CaCu CD73 Des, tanto inmunes como no inmunes, mostraron una menor disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b, la cual fue comparable con la expresión mostrada en ratones que recibieron las células TC-1 y tratamiento con el APCP. Las células TC-1 mostraron disminución del 29% en ratones inmunes tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des; 22% en los ratones inmunes tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des +APCP; 24% en los ratones no inmunes tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des; y 38% en los ratones no inmunes tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des +APCP (Fig.13A-B).

Todos estos resultados nos confirman que la presencia de las MSC's en este modelo tumoral provoca una fuerte disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en ratones inmunes o no, y que la inhibición de la actividad o expresión de la CD73 atenúa dicho fenómeno.

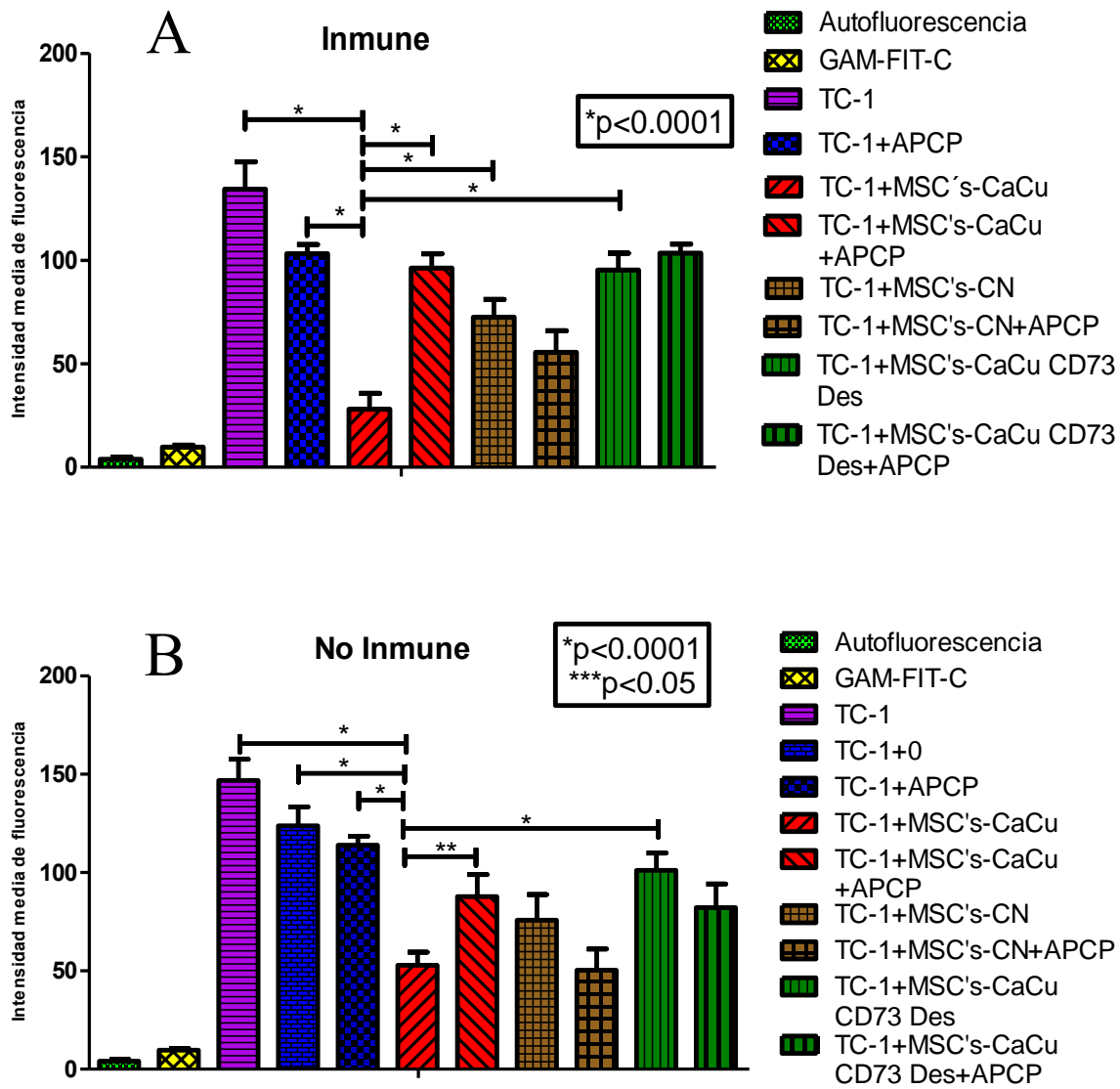


Figura. 13 La co-inoculación de las MSC's con las células tumorales TC-1 en los ratones C57BL/6, induce disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b en las células tumorales.

Grupos de ratones (n=5) inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF (A), o no inmunizados (B), fueron inoculados con las MSC's-CaCu, MSC-CN's o MSC's-CaCuCD73 Des y las células tumorales TC-1, y algunos tratados simultáneamente con el APCP. Los tumores inducidos en los ratones fueron cultivados *in vitro* para determinar la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b. *p<0.0001, ***p<0.05, expresan diferencias significativas entre los tratamientos.

6.3 La co-inoculación de las MSC's-CaCu con las células tumorales TC-1 incrementa los niveles de la IL-10 en plasmas de ratones C57BL/6

En trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo se ha determinado la producción de perfil de citocinas en este modelo tumoral encontrando un aumento en el perfil de citocinas Th2 (Don, 2012), de igual manera se ha reportado que las MSC's en cultivo pueden generar cantidades considerables de la IL-10 (Montesinos et al 2013) y junto con esto se ha reportado que en cultivos de tumores de ratones tratados con las MSC's-CaCu se encuentra en una alta concentración esta citocina (Montoro, 2014). Para determinar si en ratones C57BL/6 tratados con las MSC's y las células TC-1 se inducía la producción de la IL-10, se procedió a analizar la presencia y concentración de esta citocina en el suero de los ratones con los distintos tratamientos mediante un ELISA.

En los ratones que contaron con la protección inmunológica y solamente se les administraron las células tumorales TC-1 y a los que se les administraron las TC-1 y el APCP, se pudo observar que a los 20 y 30 días de tratamiento la concentración de la IL-10 fue de 210 y 312.5 pg/ml respectivamente (Fig.14). En el caso de los ratones a los cuales se les co-inocularon las MSC's-CaCu a los 10, 20 y 30 días se encontró muy elevada dando valores de 1142, 656, 345.70 pg/ml respectivamente (Fig.14A). En contraste, los ratones tratados con las MSC's-CaCu+APCP mostraron concentraciones de 435.47, 198 pg/ml a los 20 y 30 días respectivamente (Fig.14A).

En lo que respecta a los grupos de ratones inmunes tratados con las MSC's-CN, se encontraron concentraciones de 456 y 247.56 pg/ml de la IL-10 a los 20 y 30 días de tratamiento; mientras que la aplicación de APCP a estos ratones indujo un ligero incremento de la IL-10 a los 30 días de tratamiento, siendo este de 440 (Fig.14A).

Para el caso de ratones tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des y las MSC's-CaCu CD73 Des+APCP, se encontraron niveles bajos de esta citocina siendo estos de 210 y 132 pg/ml respectivamente (Fig.14A).

En ratones que no recibieron protección inmunológica previa a los tratamientos, la aplicación de las MSC's-CaCu en ausencia del APCP indujo una producción de 826 y 637 pg/ml de la IL-10 a los 20 y 30 días; mientras que en aquellos ratones a los cuales se les administró el APCP, los niveles de la IL-10 se redujeron a 283 y 168 pg/ml a los 20 o 30 días (Fig. 14B). Por otra parte, los grupos de ratones tratados con las MSC's-CN a los 20 y 30 días mostraron concentraciones de 270 y 273 pg/ml; mientras que en los ratones tratados con las MSC's-CN+APCP los niveles de la IL-10 se incrementaron a 451 y 212 pg/ml respectivamente (Fig.14B). Por su parte, los ratones tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des mostraron los valores más bajos de la IL-10 en suero, siendo de 224 y 184 pg/ml a los 20 y 30 días. Los niveles de la IL-10 no cambiaron significativamente en los ratones que recibieron las MSC's-CaCu CD73 Des+APCP, en los cuales se detectaron 287 y 145 pg/ml respectivamente (Fig.14B).

Todos estos resultados nos confirman que las MSC's-CaCu elevan los niveles de la IL-10 en el modelo tumoral de los ratones C57BL/6 en condiciones de protección inmune o no. Sin embargo, la disminución de la actividad de CD73 o su inhibición en la expresión, reduce significativamente la producción de IL-10 en estos animales. Sugiriendo que la expresión de la CD73 en las MSC's, favorece la disminución en la expresión de moléculas de las moléculas H-2D^b y H-2K^b a través de la producción de la IL-10.

Concentraciones de IL-10

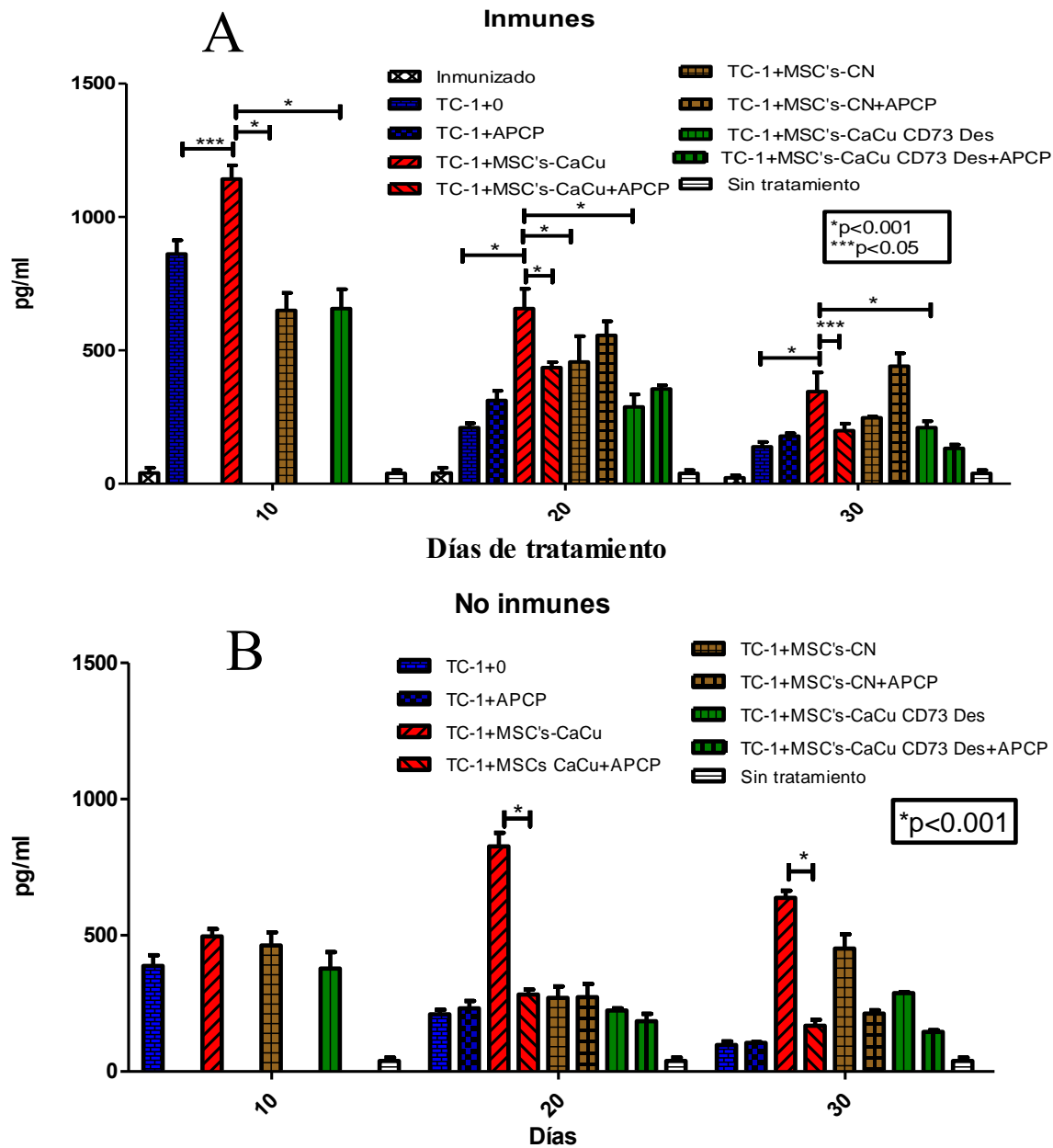


Figura. 14 La co-inoculación de células tumorales TC-1 incrementa los niveles de la IL-10 en plasmas de ratones C57BL/6.

Grupos de ratones (n=5) inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF (A), o no inmunizados (B), fueron inoculados con las MSC's-CaCu, MSC's-CN o MSC's-CaCu CD73 Des y la células tumorales TC-1, y algunos tratados simultáneamente con el APCP, posteriormente fueron sangrados en los días 20 y 30 para evaluar los niveles de la IL-10 mediante un ELISA. *p<0.001, ***p<0.05 expresa diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

6.4 La inoculación de las MSC's-CaCu en ratones C57BL/6 favorece la evasión del reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1

En este estudio encontramos que la co-inoculación de las MSC's y las células tumorales TC-1 en el modelo de ratón C57BL/6, influye de manera importante en la reducción en la expresión de las moléculas H-2D^b y H-2K^b, lo cual nos permite sugerir que este mecanismo favorece la evasión del reconocimiento inmune antitumoral. Para corroborar esta hipótesis, nosotros analizamos *in vitro* si células tumorales obtenidas de tumores provenientes de ratones tratados con las MSC's y las TC-1 evaden el reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos CD8+. Con base en lo reportado en estudios previos (Monroy et al, 2014), se obtuvieron los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos capaces de lisar a las células tumorales TC-1, y se procedió a retarlos contra las células TC-1 obtenidas de los tumores de los ratones tratados con las MSC's y las células tumorales TC-1.

En el ensayo de citotoxicidad encontramos que las células TC-1 provenientes de tumores de ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF y posteriormente tratados con las TC-1+APCP mostraron un porcentaje de lisis (células doble positiva a la doble tinsion señalada en la metodología) del 68%; mientras que las células TC-1 derivadas de ratones tratados con las MSC's-CaCu la lisis disminuyó notablemente hasta un 12%, no obstante las células obtenidas de ratones tratados con las MSC's-CaCu y el APCP fueron lisadas en un 36% (Fig. 15A). Resultados similares se observaron en células tumorales obtenidas de ratones tratados con las MSC's-CN o MSC's-CN+APCP (Fig. 15A). De manera interesante, las células tumorales TC-1 derivadas de ratones tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des solas o con aplicación del APCP, mostraron los porcentajes de lisis cercanos al 70% (Fig. 15A).

Al analizar la actividad citotóxica de los LT CD8+ sobre las células TC-1 provenientes de los ratones que no recibieron inmunización previa mostraron resultados similares al grupo anterior. Las células tumorales derivadas de los

ratones tratados con las células TC-1 y las TC-1+APCP mostraron una lisis del 73% y 84% respectivamente (Fig.15B); mientras que la lisis de las células obtenidas de los tumores de ratones tratados con las MSC's-CaCu fue de 16% y de 44% en las que además se aplicó el APCP. Por su parte, las células TC-1 obtenidas de los ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC-CN's+APCP la lisis fue del 41% en ambos casos. De manera interesante en las células TC-1 derivadas de los tumores de los ratones tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des y las MSC's-CaCu CD73 Des+APCP, la lisis observada fue del 79% y 59%, respectivamente (Fig. 15B).

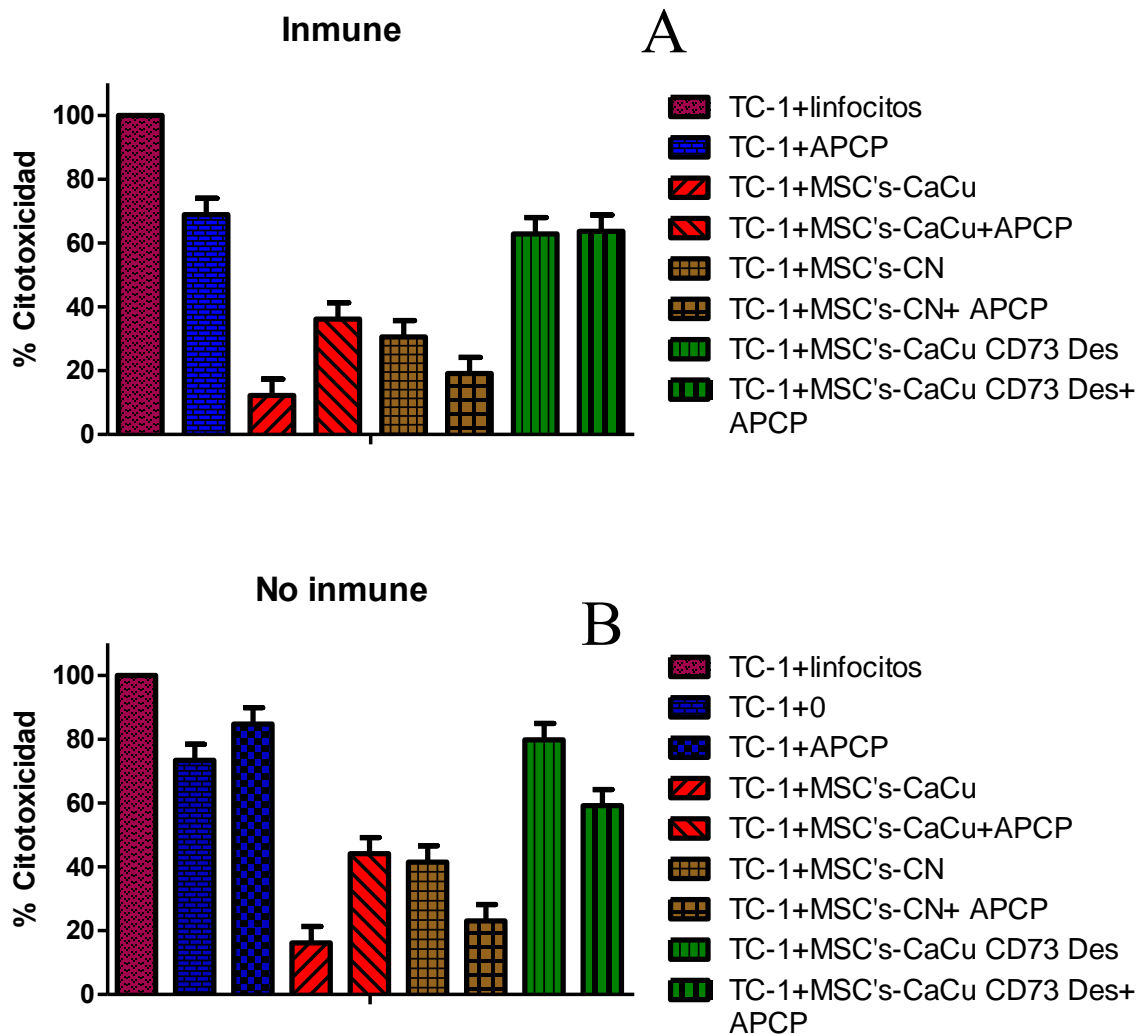


Figura. 15 La inoculación de las MSC's-CaCu en los ratones C57BL/6 favorece la evasión del reconocimiento inmune de las células tumorales TC-1.

Grupos de ratones (n=5) inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF (A), o no inmunizados (B), fueron inoculados con las MSC's-CaCu, MSC's-CN o MSC's-CaCu CD73 Des y las células tumorales TC-1, y algunos tratados simultáneamente con APCP, posteriormente los tumores fueron obtenidos y cultivados *in vitro*. Las células tumorales fueron retadas en ensayos de citotoxicidad contra los linfocitos T CD8+ obtenidos de los ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF. Este es un ensayo representativo.

6.5 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles incrementados del mRNA de IL-10 y CD73 pero reducidos de la molécula H-2D^b

Con la finalidad de confirmar la expresión de la IL-10, la molécula H-2D^b y la CD73 en las células tumorales TC-1 obtenidas de tumores de los ratones tratados con las MSC's y las TC-1, se procedió a realizar ensayos de la RT-PCR.

Tomando como base la expresión basal (1.00) de la molécula H-2D^b en las células TC-1 obtenidas de los tumores de los ratones sin tratamiento adicional alguno, se encontró que en los ratones inmunizados las células tumorales de ratones tratados con las TC-1+APCP expresaron 0.44; de los que recibieron tratamiento con las MSC's-CaCu fue del 0.36, y del 0.18 de los que fueron tratados con las MSC's-CaCu+APCP. La expresión del mRNA en las células tumorales de los ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC's-CN+APCP fue del 0.80 y 0.52 respectivamente; y del 0.36 y 0.48 para los que recibieron tratamiento con las MSC's-CaCu CD73 Des y las MSC's-CaCu CD73 Des +APCP (Fig. 16A).

En los ratones no inmunizados, la expresión del mRNA de la molécula H-2D^b en las células tumorales de los ratones tratados con las TC-1+APCP fue del 0.73; los que recibieron las MSC's-CaCu fue del 0.36, y de 0.47 para los que recibieron las MSC's-CaCu+APCP. En las células TC-1 derivadas de ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC's-CN+APCP la expresión relativa del mRNA de la molécula H-2D^b fue del 0.51 y 0.49 respectivamente; y para el caso de los grupos tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des y las MSC's-CaCu CD73 Des+APCP se encontraron expresiones de 0.33 y 0.53 respectivamente (Fig. 16B).

En relación a la expresión del mRNA para la CD73, en ratones inmunizados y que recibieron tratamiento con las TC-1+APCP la expresión fue del 3.53, mientras que los que recibieron las MSC's-CaCu se encontró una alta expresión de este mRNA en comparación con el control, siendo ésta del 7.08 y para el caso del grupo con las MSC's-CaCu+APCP este mRNA fue mucho menor muy similar al grupo con las

TC-1+APCP, siendo este del 3.31. En el caso de los subgrupos de ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC's-CN+APCP la expresión relativa del mRNA de la CD73 fue del 5.69 y 3 respectivamente; mientras que en los subgrupos de ratones tratados con la MSC's-CaCu CD73 Des y la MSC's-CaCu CD73 Des +APCP la expresión de CD73 fue de 2.86 y 2.64 (Fig. 17A).

En los grupos de ratones que no fueron inmunizados, la expresión del mRNA de la CD73 para los ratones tratados con las TC-1+APCP fue de 1.52; para los tratados con las MSC's-CaCu fue del 3.55; mientras que para los tratados con las MSC's-CaCu+APCP la expresión fue del 1.89. En los subgrupos de ratones tratados con MSC's-CN y MSC's-CN+APCP la expresión de CD73 fue de 3.04 y 0.65 respectivamente; mientras que en los ratones tratados con MSC's-CaCu CD73 Des y MSC's-CaCu CD73 Des +APCP se encontraron expresiones de 0.75 y 1.19, respectivamente (Fig. 17B).

Por otro lado al analizar la expresión del mRNA de la IL-10 en las células tumorales provenientes de los tumores de los ratones inmunizados y tratados con las TC-1+APCP la expresión fue del 6.17; en los que recibieron las MSC's-CaCu fue del 7.82, y en los tratados con las MSC's-CaCu+APCP se encontró una expresión del 3.06. Para el caso de los subgrupos de ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC's-CN+APCP se encontraron expresiones del 5.19 y 4.76, respectivamente; mientras que en los subgrupos tratados con las MSC's-CaCu CD73 Des y las MSC's-CaCu CD73 Des+APCP se encontraron expresiones de 2.52 y 2.49, respectivamente (Fig. 18A).

Finalmente en el grupo de ratones no inmunizados y tratados con las TC-1+APCP la expresión de la IL-10 fue del 2.42; para el caso del grupo que se le administraron las MSC's-CaCu se encontró una expresión del 6.96 y para el caso del subgrupo tratado con las MSC's-CaCu+APCP la expresión fue del 3.26. En los ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC's-CN+APCP, la expresión de la IL-10 fue del 3.01 y 2.18; mientras que en los ratones tratados con las MSC-CaCu CD73 Des y las MSC's-CaCu CD73 Des+APCP la expresión fue del 1.55 y 2.04, respectivamente (Fig. 18B).

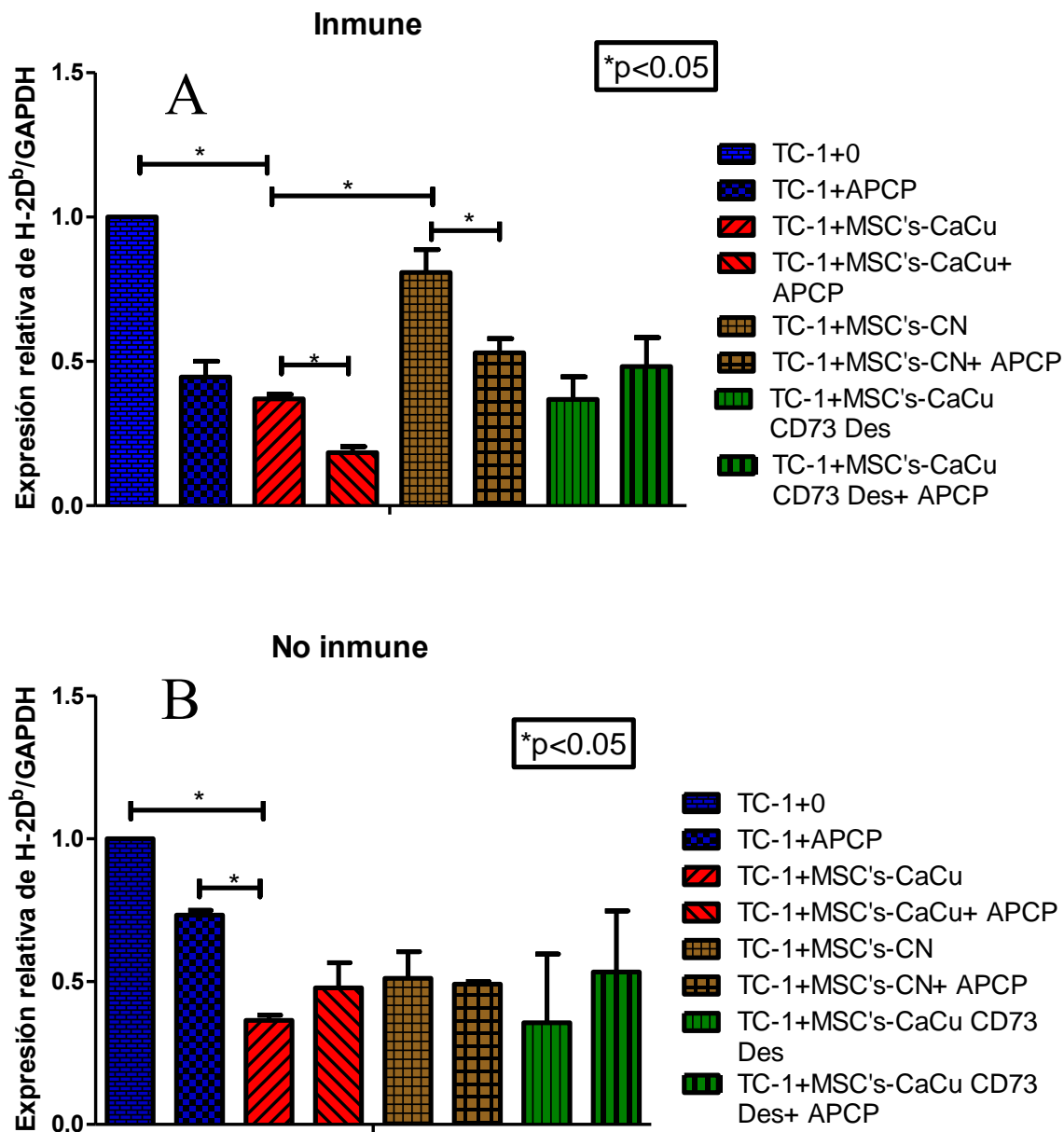


Figura. 16 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles reducidos de la molécula H-2D^b.

Grupos de ratones (n=5) inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF (A), o no inmunizados (B), fueron inoculados con las MSC's-CaCu, MSC's-CN o las MSC's-CaCu CD73 Des y las células tumorales TC-1, y algunos tratados simultáneamente con el APCP, posteriormente los tumores fueron obtenidos y cultivados *in vitro*. El mRNA fue extraído de las células tumorales y retotranscrito a cDNA para determinar mediante PCR la expresión de la molécula H-2D^b *p<0.05% expresa diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

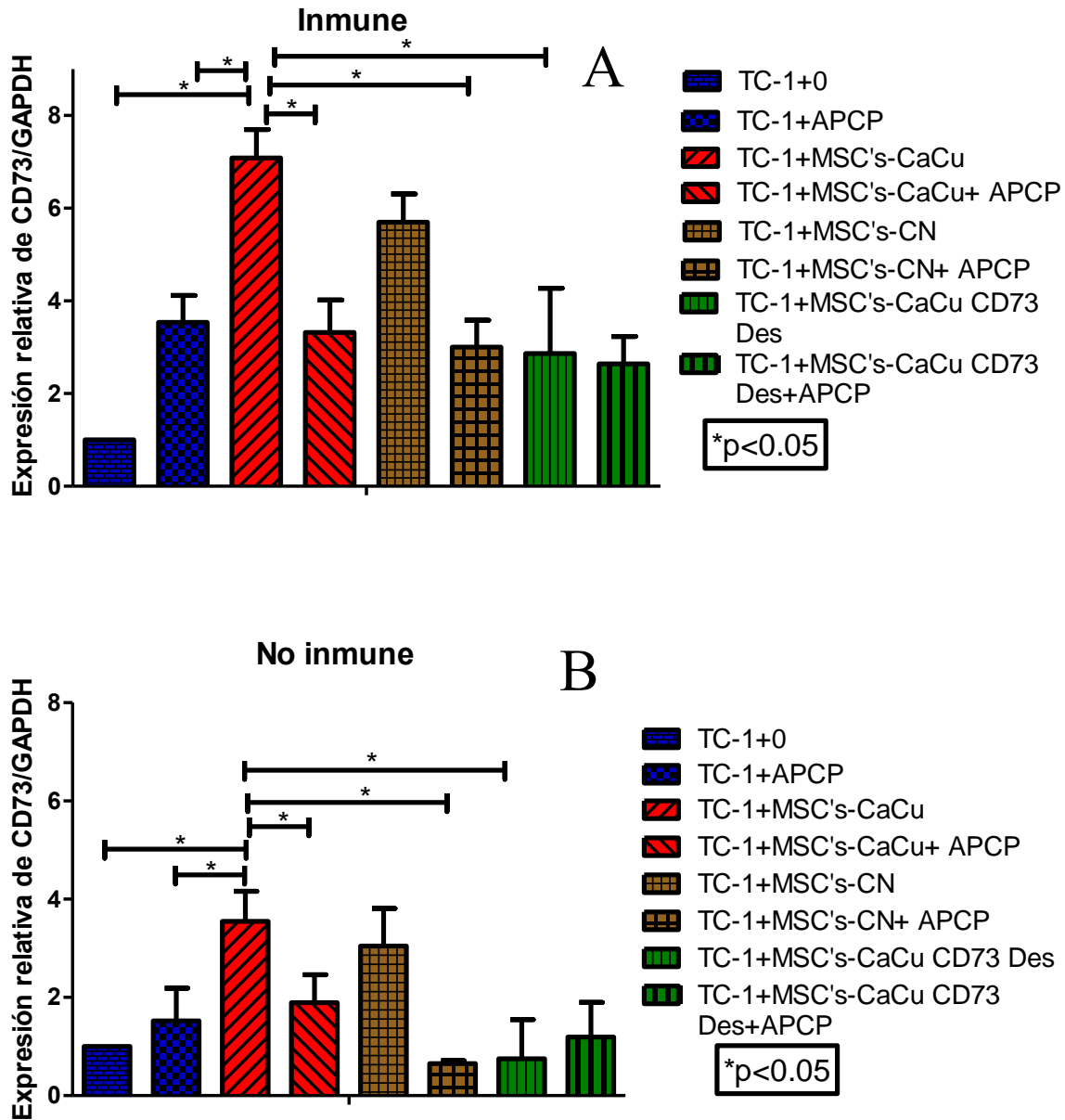


Figura. 17 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles elevados de la CD73.

Grupos de ratones (n=5) inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF (A), o no inmunizados (B), fueron inoculados con las MSC's-CaCu, MSC's-CN o MSC's-CaCu CD73 Des y las células tumorales TC-1, y algunos tratados simultáneamente con el APCP, posteriormente los tumores fueron obtenidos y cultivados *in vitro*. El mRNA fue extraído de las células tumorales y retotranscrito a cDNA para determinar mediante PCR la expresión de la CD73. *p<0.05% expresa diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

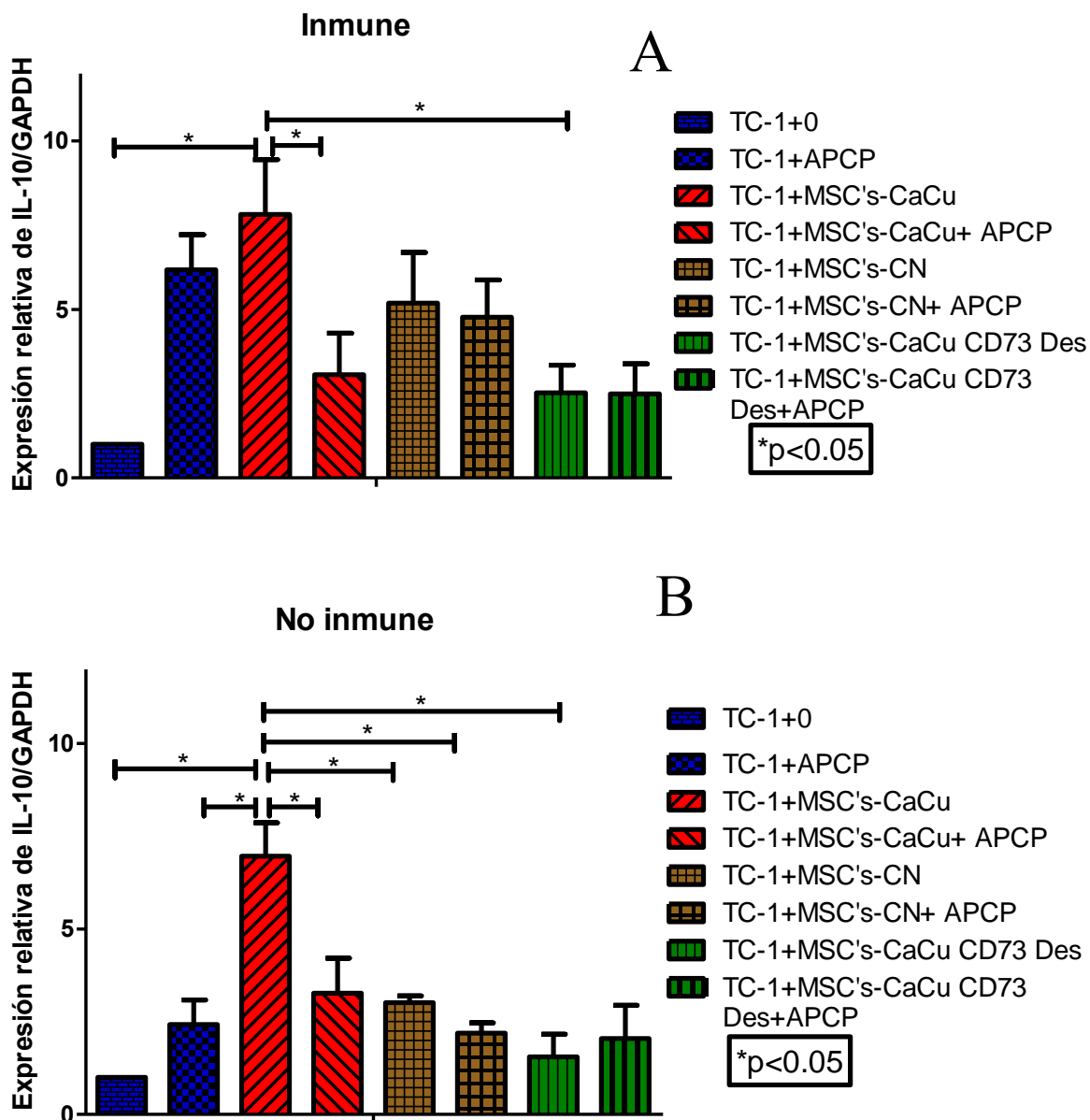


Figura. 18 Las células tumorales TC-1 derivadas de los ratones tratados con las MSC's mostraron niveles elevados de la IL-10.

Grupos de ratones (n=5) inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF (A), o no inmunizados (B), fueron inoculados con las MSC's-CaCu, MSC's-CN o MSC's-CaCu CD73 Des y las células tumorales TC-1, y algunos tratados simultáneamente con el APCP, posteriormente los tumores fueron obtenidos y cultivados *in vitro*. El mRNA fue extraído de las células tumorales y retotranscrito a cDNA para determinar mediante una PCR la expresión de la IL-10. *p<0.05% expresa diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

7. Discusión

En los últimos años, las MSC's han sido objeto de diversos estudios para dilucidar su participación en el microambiente tumoral. En ensayos experimentales realizados en modelos *in vivo*, empleando las MSC's derivadas de médula ósea se ha demostrado que las MSC aumentan la metastasis de las células tumorales de cáncer de mama o de carcinoma de colon, cuando son inoculadas de manera conjunta en ratones (Karnoub et al, 2007; Zhu et al, 2006). Por otro lado, también se ha demostrado que las MSC al ser inyectadas promueven la producción de citocinas que inducen el crecimiento tumoral y la neovascularización en modelos de ratón singénicos (Roorda et al, 2009; Atsuta et al, 2013; Gomez, 2013; Keramidas et al, 2013). Asimismo, las MSC ejercen un efecto inmunosupresivo como resultado de la interacción con las células del sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo (Apparailly *et al*, 2008; Stagg, 2008); sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ejercen dichos efectos no han sido completamente esclarecidos.

En el presente estudio, se analizó la capacidad inmunosupresora de las MSC's-CaCu y las MSC's-CN a través de la vía CD73-adenosina. Para ello se utilizó un modelo de tumor inducido con las células TC-1 (E6/E7 VPH-16+) en ratones de la cepa C57BL/6, tanto en condiciones normales como con previa protección inmunológica mediante la inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 del VPH-16.

Este estudio nos reveló lo siguiente:

- 1) La inoculación simultánea de las diferentes las MSC's indujo un mayor crecimiento tumoral en los ratones C57BL/6 en condiciones normales, y de manera interesante, suprimieron la protección inmunológica en los ratones inmunizados con el péptido antigénico

2) El tratamiento de los ratones con el APCP, así como la administración de las MSC's desreguladas en la expresión de CD73 con siRNA, redujeron de manera significativa el crecimiento tumoral en los ratones C57BL/6 en ambas condiciones de tratamiento

3) Las células tumorales obtenidas del cultivo de los tumores de ratones inmunizados o no inmunizados, tratados con las MSC's, mostraron una disminución importante en la expresión de las moléculas H-2D^b/K^b con respecto a la expresada de manera basal por la línea celular TC-1. En contraste, las células de los tumores de los ratones tratados con el APCP o con las MSC's-CaCu desreguladas en CD73, no mostraron fuerte reducción en la expresión de moléculas H-2D^b/K^b

4) El suero de ratones inmunizados o no inmunizados, tratados con las MSC's, mostró un incremento importante en la concentración de la IL-10 respecto a ratones sin tratamiento alguno, mientras que en los sueros de ratones tratados con el APCP o con las MSC's-CaCu desreguladas de la CD73, el nivel de la IL-10 fue reducido

5) Las células tumorales derivadas de tumores de ratones tratados con las MSC's-CaCu fueron protegidas ante la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF; no obstante, las células tumorales derivadas de los ratones tratados con el APCP o con las MSC's-CaCu desreguladas de la CD73 mostraron una mayor lisis

6) La expresión de mRNA de la CD73 fue mayor en las células tumorales provenientes de los tumores de los ratones tratados con las MSC's-CaCu respecto a las derivadas de tumores de ratones tratados con el APCP o con las MSC's-CaCu desreguladas en CD73.

En el modelo experimental de ratón de la cepa C57BL/6 que fue utilizado en el presente estudio, se encontró que la co-inoculación de la MSC's con las células tumorales TC-1, en efecto produjo un mayor crecimiento tumoral respecto a los ratones que solamente recibieron las células tumorales TC-1; y por otro lado, en los ratones que fueron previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, la

presencia de las MSC's fue capaz de inhibir la protección inmunológica antitumoral, sugiriendo entonces un efecto pro-tumoral ejercido por las MSC's.

Dicho efecto, como era de esperarse, está asociado principalmente con las propiedades inmunoregulatoras de las MSC's, la cual puede ocurrir a través del contacto celular con células de la respuesta inmune innata o adaptativa, o por la secreción de diversos factores solubles como son: TGF- β , PGE2,IDO, HGF, IL-10 y HLA-G5, que inhiben su función efectora (Castro, et al, 2015).

Por otro lado, algunos autores han considerado que los factores proinflamatorios presentes en el microambiente donde se desarrolla el tumor pueden activar a las MSC's e inducirlas a generar las condiciones propicias para el crecimiento tumoral, por ejemplo, se ha demostrado que las MSC's derivadas de la médula ósea tienen la capacidad de iniciar un cáncer gástrico, al ser reclutadas en el sitio de inflamación crónica inducido por la infección de la *Helicobacter pilori* en el estómago (Houghton *et al*, 2004; Kidd *et al*, 2008).

En el caso particular de nuestro estudio, pensamos que la producción de los factores proinflamatorios inducida a través de la inmunización en los ratones tratados de manera simultánea con las MSC's (particularmente las MSC's-CaCu) y las TC-1, pudo favorecer el crecimiento tumoral. Esta aseveración también se basa en el hecho de un estudio previo (Don, 2011), en donde se detectó 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 las MSC's-CaCu y las células TC-1, el patrón de citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5) y TGF- β se incrementó 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 pudo haber participado en la activación de las MSC's-CaCu para ejercer sus funciones inmunosupresoras, y revertir en consecuencia la

protección inmune dada por la inmunización con el péptido antigénico RAHYNIVTF.

Por otro lado, en los últimos años se ha documentado ampliamente que la vía adenosinérgica tiene un papel importante en el desarrollo del tumor, en donde la producción de adenosina extracelular mediante la fosfohidrólisis del ATP ejercido por las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en el microambiente tumoral hipóxico, da por resultado la supresión de la respuesta inmune antitumoral, lo que contribuye a la evasión inmune de las células tumorales (Stagg et al, 2010; Antonioli et al, 2013). En consecuencia, tomando en consideración que las MSC's se caracterizan por presentar altos niveles de expresión de la CD73 en la membrana celular, se procedió a analizar si la participación de la vía CD73 era importante en el desarrollo tumoral de nuestro modelo de estudio. Para ello, se tomó en cuenta que en estudios previos en tumores de ratón inducidos con las células tumorales provenientes de cáncer de ovario, colon, linfoma, mama y melanoma, el tratamiento con el APCP produce una reducción importante en el crecimiento tumoral, similar al inducido mediante el uso de anti-CD73 (Zhang, 2012, Stagg et al, 2011).

En efecto, en nuestro estudio observamos que la inoculación de 5 dosis del APCP en los grupos de ratones a los cuales se les administraron las MSC's-CaCu, el crecimiento tumoral fue significativamente menor que en los grupos de ratones donde no se administró el APCP, sugiriendo que la vía CD73-adenosina pudiera tener un papel importante en favorecer el crecimiento tumoral. No obstante, para confirmar el efecto de la CD73 en nuestro modelo de estudio, algunos grupos de ratones fueron tratados con las MSC's-CaCu desregulados en la expresión de la CD73 a través de la transfección con siRNA para esta molécula, y pudimos observar que los ratones a los cuales se les administraron las MSC's tuvieron un crecimiento tumoral significativamente menor que el de los ratones inoculados únicamente con las células tumorales TC-1. Estos resultados fueron comparables con los publicados por Zhang *et al*, 2012 y Stagg *et al*, 2011 donde

administraron células tumorales desreguladas en la expresión de CD73.

Por otro lado, es importante mencionar que cuando se administró el APCP al grupo de ratones tratados con las MSC's-CN, se encontró un mayor crecimiento tumoral respecto al grupo de ratones que solo recibieron las MSC's-CN. Dicho comportamiento puede estar asociado con el patrón de citocinas producido por cada tipo de las MSC's acorde con el tipo histológico del cual derivan y como éstas pueden ser activadas ante la respuesta inmune a patógenos, inflamación e inmunosupresión (Castro, et al. 2015). Con base en estos parámetros, se han distinguido 2 tipos de las MSC's: 1) MSC's de fenotipo pro-inflamatorio, las cuales producen factores proinflamatorios tales como $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ y puede mejorar la respuesta de células T mediante la secreción de quimiocinas; 2) Las MSC's de fenotipo anti-inflamatorio e inmunosupresor, las cuales producen citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) y Th3 ($TGF-\beta$), así como factores supresores como IDO y su activación depende más bien de la estimulación a través de los receptores tipo toll expresados en la superficie (Gazdic et al, 2015). Por lo que la administración del APCP en ratones tratados con las MSC's-CN, pudo probablemente activar a estas MSC's hacia un fenotipo más inmunosupresor, resultando en un mayor crecimiento tumoral.

Las MSC's se caracterizan por presentar tropismo hacia los tumores, debido a la presencia de una gran cantidad de receptores para quimiocinas en su superficie celular (Zhang et al, 2015). Dentro del microambiente tumoral, las MSC's producen la IL-10 y otros factores inmunosupresores como la PGE2 o el $TGF-\beta$ 1 que inducen un ambiente tolerogénico en el sitio del tumor (Gazdic et al, 2015). También se ha reportado que en las MSC's humanas y murinas la activación del TLR3 aumenta la secreción de la IL-10 y regula a la baja de la expresión de las citocinas tipo Th1, además de estimular la expresión y secreción del HLA-G5 (Castro et al, 2015). Por tanto, conociendo el papel inmunosupresor y pro-tumoral de la IL-10 en el cáncer (Yue et al, 1997; Song et al, 2012; Nuta & Fibbe,

2007) en este estudio se procedió a analizar si el crecimiento tumoral promovido por las MSC's estaba asociado a una mayor producción de la IL-10.

De acuerdo con nuestros resultados, las mayores concentraciones de la IL-10 murina detectada en los sueros de ratones se encontraron en aquellos que recibieron las MSC's-CaCu y desarrollaron tumores de mayor tamaño independientemente de haber recibido o no protección inmune previamente. Además la disminución de la actividad de la CD73 mediante la aplicación del inhibidor APCP, o la aplicación de las MSC's-CaCu desreguladas de la CD73, se asoció con una menor cantidad de la IL-10 detectada en los sueros de los ratones, lo cual sugiere que la expresión de la CD73 en las MSC's-CaCu puede tener un papel importante para inducir la producción de la IL-10 por las células tumorales.

Esta hipótesis fue confirmada al analizar la expresión del mRNA para la IL-10 en las células derivadas de los tumores de los ratones que recibieron dichos tratamientos. En efecto, se encontró que las células derivadas de los tumores de ratones tratados con MSC's-CaCu presentaron los niveles más altos del mRNA para la IL-10. En contraste, se encontró que las células tumorales derivadas de los ratones tratados con las MSC's-CN y las MSC's-CN+APCP mostraron niveles bajos del mRNA de esta citocinas.

En este contexto, es factible que el acondicionamiento de las MSC's-CaCu en el microambiente tumoral del cual derivaron, modificaron su capacidad para liberar factores inmunosupresores tales como laIDO, que actúa acumulando metabólicos tóxicos del triptófano (Ghannam et al, 2010; Meisel et al, 2004; Maby-El et al, 2009; Ryan et al, 2007); la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS), que tiene un papel importante en la inhibición de los linfocitos T (Sato et al, 2007); la PGE₂, que actúa inhibiendo la mitogenesis y la producción de la IL-2 (Aggarwal y Pittenger, 2005), además de estimular la producción de la IL-10 de manera indirecta por las mismas células tumorales, tal como lo reportaron Bernardo y Fibbe, 2013, al cocultivar las MSC's provenientes de la médula ósea normal con las células

cancerígenas, encontraron un incremento en la concentración de la IL-10 en los sobrenadantes, respecto al cultivo individual de cada tipo celular.

Por otra parte, las MSC's pueden inducir cambios en la maduración y la función de las células presentadoras de antígenos (CPA) a través de la reducción de la expresión de moléculas del MHC I y II, así como en la expresión de moléculas coestimuladoras, para dar lugar a CPA que no pueden apoyar la respuesta inmune específica mediada por linfocitos T auxiliares y citotóxicos (Apparailly et al, 2008). La regulación a la baja de las moléculas del MHC I es un evento muy frecuentemente encontrado en las células tumorales, lo cual les permite escapar del reconocimiento inmune (Romero et al, 2005).

Los defectos en la expresión de las moléculas del MHC I pueden ser ocasionados por múltiples mecanismos, que pueden ser intrínsecos, tales como aquellos que incluyen la deficiente expresión y/o función de los componentes de la maquinaria del procesamiento de antígenos (Koopman et al, 1999; Brady et al, 2000); o aquellos extrínsecos, en los cuales las condiciones del microambiente tumoral pueden influenciar para su desregulación, tal como la presencia de citocinas inmunoregulatoras como la IL-10 y el TGF- β , que tienen efectos sobre la disminución de la expresión de las moléculas del MHC I (Matsuda et al, 1994; Ma & Niederkorn, 1995).

En nuestro estudio encontramos que las células tumorales obtenidas de los cultivos de los tumores presentaron una disminución importante en la expresión de las moléculas H-2D^b en relación a la expresión basal de la línea celular TC-1, independientemente de la inoculación conjunta con las MSC's, o de la protección inmune dada por la inoculación con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF; sin embargo, es importante destacar que la mayor disminución de la expresión de las moléculas H-2D^b fue encontrada en las células derivadas de tumores de los ratones que recibieron las MSC's-CaCu, y ésta se vió recuperada en el grupo de ratones tratados con el APCP y en el grupo de los ratones tratados con las MSC's-CaCu desregulados de la molécula CD73.

Cabe mencionar que la disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b en las células tumorales se asoció de manera importante con el mayor concentración de la IL-10 en los ratones tratados con las MSC's-CaCu. Es bien conocido que esta citocina tiene la capacidad de inhibir las funciones efectoras de las células Th1 y que tiene efecto inhibitor sobre la expresión de las moléculas que participan en la vía del procesamiento y presentación de antígenos en las células presentadoras de antígeno (Moore et al., 2001; Dennis et al 2013; Liu et al, 2013; Urosevic et al, 2001; Matsuda et al. 1994; Lui et al, 2012). Además, altas concentraciones de la IL-10 se correlacionan con disminución de la expresión de las moléculas del MHC I y II en distintos tipos celulares (Breitbart et al, 2014; Luheshi et al, 2014; Liu et al, 2013), y en las células tumorales de melanoma favorece la evasión del reconocimiento inmune (Yue et al, 1997; Xue et al, 2013).

Tomando en consideración que los LT CD8⁺ reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas del MHC I y por lo tanto dicha expresión antigénica es esencial para la destrucción de las células infectadas por virus y células tumorales (Duffy et al, 2011; Kim et al, 2011; Liu et al, 2013), en el presente estudio obtuvimos los LT CD8⁺ de ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF y los retamos contra células tumorales de los ratones tratados con las MSC's-CaCu con la finalidad de indagar si la disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b en estas células tumorales afectaba el reconocimiento inmune mediado por estas células efectoras.

De manera interesante se encontró que las células obtenidas de los tumores provenientes de ratones tratados con las MSC's-CaCu presentaron menor porcentaje de células muertas respecto a las células tumorales derivadas de ratones tratados con las MSC's-CN o de aquellos ratones tratados con el APCP o con las MSC's-CaCu desreguladas en la expresión de la CD73, sugiriendo entonces que la aplicación de la MSC's-CaCu en el modelo tumoral estudiado provee una función protumoral, y que la mayor expresión y actividad funcional de la CD73 en las MSC's-CaCu respecto a la MSC's-CN, puede constituir una ventaja importante para favorecer el crecimiento del tumor, ayudando por un lado a la

evasión de la respuesta inmune antitumoral a través de la disminución en la expresión de moléculas de MHC-I; y por otro, a crear un microambiente de tolerancia e inmunosupresión a través de la producción de citocinas inmunosupresoras tales como la IL-10.

Si bien, la CD73 es una molécula importante en modular procesos inflamatorios y su ausencia en ratones deficientes de la CD73 produce enfermedades inflamatorias severas (Zhang, 2012), la sobre-expresión de la CD73 en las células tumorales o células supresoras asociadas a los tumores, tales como las MSC's y las Tregs, puede ser importante para soportar el crecimiento tumoral. En consecuencia, resulta importante considerar a la CD73 como blanco terapéutico en tumores donde su expresión es predominante respecto a la expresada en los tejidos normales.

8. Conclusiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- Las MSC's-CaCu y las MSC's-CN promovieron un mayor crecimiento tumoral en los ratones C57BL/6 inoculados con las células tumorales TC-1 y su actividad biológica fue capaz de revertir la protección inmune antitumoral en animales que fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF.
- El tratamiento de los ratones con el APCP, así como la administración de las MSC's desreguladas en la expresión de CD73 con siRNA, redujeron de manera significativa el crecimiento tumoral en los ratones C57BL/6.
- La administración de las MSC's-CaCu en el modelo tumoral estudiado se asoció con un aumento en la concentración de la IL-10 en suero y la disminución en la expresión de las moléculas H-2D^b, a nivel del mRNA y la proteína, en las células tumorales.
- La disminución en la expresión de moléculas H-2D^b en las células tumorales de ratones tratados con MSC's-CaCu, se asoció con una mayor protección ante el reconocimiento y lisis mediada por linfocitos T citotóxicos.

Los resultados en el presente trabajo permiten sugerir que la actividad promotora del crecimiento tumoral e inmunosupresora ejercida por las MSC's-CaCu en el modelo tumoral estudiado, depende en gran medida de la expresión de la CD73 en estas MSC's.

9. Perspectivas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, será de gran importancia realizar lo siguiente:

- ✓ **Determinar las concentraciones del TGF- β en los sueros de los distintos tratamientos.**
- ✓ **Realizar la qRT-PCR para medir las cantidades de mRNA del TGF- β .**
- ✓ **Analizar el efecto de la desregulación de la molécula CD73 en las MSC derivadas de tejidos normales de cérvix en el crecimiento tumoral, expresión de las moléculas pertenecientes al MHC-I y las concentraciones de la IL-10 en suero de ratones.**
- ✓ **Realizar un perfil de citocinas para las MSC's-CaCu y las MSC's-CN.**
- ✓ **Determinar la concentración de adenosina en los distintos tratamientos de este trabajo.**

10. Literatura citada.

- Adurthi, S., S. Krishna, G. Mukherjee, U. D. Bafna, U. Devi, y R. S. Jayshree. "Regulatory T Cells in a Spectrum of Hpv-Induced Cervical Lesions: Cervicitis, Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma." *Am J Reprod Immunol* 60, no. 1 (Jul 2008): 55-65.
- Aggarwal, S., y M. F. Pittenger. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses." *Blood* 105, no. 4 (Feb 15 2005): 1815-22.
- Airas, L., J. Hellman, M. Salmi, P. Bono, T. Puurunen, D. J. Smith, S. Jalkanen. "Cd73 Is Involved in Lymphocyte Binding to the Endothelium: Characterization of Lymphocyte-Vascular Adhesion Protein 2 Identifies It as Cd73." *J Exp Med* 182, no. 5 (Nov 1 1995): 1603-8.
- Albarenque, S. M., R. M. Zwacka, y A. Mohr. "Both Human and Mouse Mesenchymal Stem Cells Promote Breast Cancer Metastasis." *Stem Cell Res* 7, no. 2 (Sep 2011): 163-71.
- Albini, A., y M. B. Sporn. "The Tumour Microenvironment as a Target for Chemoprevention." *Nat Rev Cancer* 7, no. 2 (Feb 2007): 139-47.
- Antonioli, L., P. Pacher, E. S. Vizi, G. Hasko. "Cd39 and Cd73 in Immunity and Inflammation." *Trends Mol Med* 19, no. 6 (Jun 2013): 355-67.
- Apparailly, F., C. Jorgensen, G. Lazennec. "[Multipotent Stromal Cells: Controversial Impact on Tumor Development and Metastasis]." *Med Sci (Paris)* 24, no. 4 (Apr 2008): 359-60.
- Atsuta, I., S. Liu, Y. Miura, K. Akiyama, C. Chen, Y. An, S. Shi, F. M. Chen. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Multiple Myeloma Cells Via the Fas/Fas Ligand Pathway." *Stem Cell Res Ther* 4, no. 5 (2013): 111.
- Beavis, P. A., J. Stagg, P. K. Darcy, M. J. Smyth. "Cd73: A Potent Suppressor of Antitumor Immune Responses." *Trends Immunol* 33, no. 5 (May 2012): 231-7.
- Bernardo, M. E., y W. E. Fibbe. "Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation." *Cell Stem Cell* 13, no. 4 (Oct 3 2013): 392-402.
- Brady, C. S., J. S. Bartholomew, D. J. Burt, M. F. Duggan-Keen, S. Glenville, N. Telford, A. M. Little, *et al.* "Multiple Mechanisms Underlie Hla Dysregulation in Cervical Cancer." *Tissue Antigens* 55, no. 5 (May 2000): 401-11.

- Breitbart, W., B. Rosenfeld, K. Tobias, H. Pessin, G. Y. Ku, J. Yuan, J. Wolchok. "Depression, Cytokines, and Pancreatic Cancer." *Psychooncology* 23, no. 3 (Mar 2014): 339-45.
- Brestovac, B., M. E. Wong, R. Tjendera, P. J. Costantino, C. Mamotte, C. S. Witt. "Human Papillomavirus, High-Grade Intraepithelial Neoplasia and Killer Immunoglobulin-Like Receptors: A Western Australian Cohort Study." *Infect Agent Cancer* 8, no. 1 (2013): 33.
- Castellsague, X., y F. X. Bosch. "[Advances in Cervical Cancer Prevention: Hpv Vaccines]." *Fam Hosp* 31, no. 5 (Sep-Oct 2007): 261-3.
- Castro-Manrreza, M. E., y J. J. Montesinos. "Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications." *J Immunol Res* 2015 (2015): 394917.
- Chapel, A., J. M. Bertho, M. Bensidhoum, L. Fouillard, R. G. Young, J. Frick, C. Demarquay, *et al.* "Mesenchymal Stem Cells Home to Injured Tissues When Co-Infused with Hematopoietic Cells to Treat a Radiation-Induced Multi-Organ Failure Syndrome." *J Gene Med* 5, no. 12 (Dec 2003): 1028-38.
- Colgan, S. P., H. K. Eltzschig, T. Eckle, y L. F. Thompson. "Physiological Roles for Ecto-5'-Nucleotidase (Cd73)." *Purinergic Signal* 2, no. 2 (Jun 2006): 351-60.
- Contreras Landeros S. Y. 2011. Análisis de la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino. Tesis de licenciatura.
- Cortinovic, M., F. Casiraghi, G. Remuzzi, N. Perico. "Mesenchymal Stromal Cells to Control Donor-Specific Memory T Cells in Solid Organ Transplantation." *Curr Opin Organ Transplant* 20, no. 1 (Feb 2015): 79-85.
- Crosbie, E. J., M. H. Einstein, S. Franceschi, H. C. Kitchener. "Human Papillomavirus and Cervical Cancer." *Lancet* 382, no. 9895 (Sep 7 2013): 889-99.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, *et al.* "Adenosine Generation Catalyzed by Cd39 and Cd73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression." *J Exp Med* 204, no. 6 (Jun 11 2007): 1257-65.

- Dennis, K. L., N. R. Blatner, F. Gounari, K. Khazaie. "Current Status of Interleukin-10 and Regulatory T-Cells in Cancer." *Curr Opin Oncol* 25, no. 6 (Nov 2013): 637-45.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, y A. M. Gianni. "Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli." *Blood* 99, no. 10 (May 15 2002): 3838-43.
- Dianzani, U., V. Redoglia, M. Bragardo, C. Attisano, A. Bianchi, D. Di Franco, U. Ramenghi, *et al.* "Co-Stimulatory Signal Delivered by Cd73 Molecule to Human Cd45rahicd45rolo (Naive) Cd8+ T Lymphocytes." *J Immunol* 151, no. 8 (Oct 15 1993): 3961-70.
- Djouad, F., P. Pience, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noel, C. Jorgensen. "Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells Favors Tumor Growth in Allogeneic Animals." *Blood* 102, no. 10 (Nov 15 2003): 3837-44.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, *et al.* "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8, no. 4 (2006): 315-7.
- Doorbar, J., W. Quint, L. Banks, I. G. Bravo, M. Stoler, T. R. Broker, M. A. Stanley. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine* 30 Suppl 5 (Nov 20 2012): F55-70.
- Don López C. A. 2010. Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. Tesis de licenciatura.
- Duffy, M. M., T. Ritter, R. Ceredig, M. D. Griffin. "Mesenchymal Stem Cell Effects on T-Cell Effector Pathways." *Stem Cell Res Ther* 2, no. 4 (2011): 34.
- El Hage, F., A. Durgeau, F. Mami-Chouaib. "Tap Expression Level in Tumor Cells Defines the Nature and Processing of Mhc Class I Peptides for Recognition by Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes." *Ann N Y Acad Sci* 1283 (Apr 2013): 75-80.

- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, I. V. Keiliss-Borok. "Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues. Cloning in Vitro and Retransplantation in Vivo." *Transplantation* 17, no. 4 (Apr 1974): 331-40.
- Gazdic, M., V. Volarevic, N. Arsenijevic, M. Stojkovic. "Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases." *Stem Cell Rev* 11, no. 2 (Apr 2015): 280-7.
- Ghannam, S., C. Bouffi, F. Djouad, C. Jorgensen, D. Noel. "Immunosuppression by Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms and Clinical Applications." *Stem Cell Res Ther* 1, no. 1 (2010): 2.
- Giordano, A., U. Galderisi, I. R. Marino. "From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells." *J Cell Physiol* 211, no. 1 (Apr 2007): 27-35.
- Hellner, K., J. Mar, F. Fang, J. Quackenbush, K. Munger. "Hpv16 E7 Oncogene Expression in Normal Human Epithelial Cells Causes Molecular Changes Indicative of an Epithelial to Mesenchymal Transition." *Virology* 391, no. 1 (Aug 15 2009): 57-63.
- Hung, S. C., D. M. Yang, C. F. Chang, R. J. Lin, J. S. Wang, L. Low-Tone Ho, W. K. Yang. "Immortalization without Neoplastic Transformation of Human Mesenchymal Stem Cells by Transduction with Hpv16 E6/E7 Genes." *Int J Cancer* 110, no. 3 (Jun 20 2004): 313-9.
- Jin, D., J. Fan, L. Wang, L. F. Thompson, A. Liu, B. J. Daniel, T. Shin, T. J. Curiel, B. Zhang. "Cd73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression." *Cancer Res* 70, no. 6 (Mar 15 2010): 2245-55.
- Johansson, C., y S. Schwartz. "Regulation of Human Papillomavirus Gene Expression by Splicing and Polyadenylation." *Nat Rev Microbiol* 11, no. 4 (Apr 2013): 239-51.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, *et al.* "Mesenchymal Stem Cells within Tumour Stroma Promote Breast Cancer Metastasis." *Nature* 449, no. 7162 (Oct 4 2007): 557-63.

- Keramidas, M., F. de Fraipont, A. Karageorgis, A. Moisan, V. Persoons, M. J. Richard, J. L. Coll, C. Rome. "The Dual Effect of Mesenchymal Stem Cells on Tumour Growth and Tumour Angiogenesis." *Stem Cell Res Ther* 4, no. 2 (2013): 41.
- Kim, Y. H., Y. M. Wee, M. Y. Choi, D. G. Lim, S. C. Kim, D. J. Han. "Interleukin (Il)-10 Induced by Cd11b(+) Cells and Il-10-Activated Regulatory T Cells Play a Role in Immune Modulation of Mesenchymal Stem Cells in Rat Islet Allografts." *Mol Med* 17, no. 7-8 (2011): 697-708.
- Koopman, L. A., A. R. van Der Slik, M. J. Giphart, G. J. Fleuren. "Human Leukocyte Antigen Class I Gene Mutations in Cervical Cancer." *J Natl Cancer Inst* 91, no. 19 (Oct 6 1999): 1669-77.
- Laranjeira, P., M. Pedrosa, S. Pedreiro, J. Gomes, A. Martinho, B. Antunes, T. Ribeiro, *et al.* "Effect of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells on Cytokine Production by Peripheral Blood Naive, Memory, and Effector T Cells." *Stem Cell Res Ther* 6 (2015): 3.
- Le Blanc, K., y D. Mougiakakos. "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and the Innate Immune System." *Nat Rev Immunol* 12, no. 5 (May 2012): 383-96.
- Lennon, P. F., C. T. Taylor, G. L. Stahl, S. P. Colgan. "Neutrophil-Derived 5'-Adenosine Monophosphate Promotes Endothelial Barrier Function Via Cd73-Mediated Conversion to Adenosine and Endothelial A2b Receptor Activation." *J Exp Med* 188, no. 8 (Oct 19 1998): 1433-43.
- Lin, K. Y., F. G. Guarnieri, K. F. Staveley-O'Carroll, H. I. Levitsky, J. T. August, D. M. Pardoll, T. C. Wu. "Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen." *Cancer Res* 56, no. 1 (Jan 1 1996): 21-6.
- Lin, S. Y., S. C. Dolfi, S. Amiri, J. Li, T. Budak-Alpdogan, K. C. Lee, C. Derenzo, D. Banerjee, J. Glod. "P53 Regulates the Migration of Mesenchymal Stromal Cells in Response to the Tumor Microenvironment through Both Cxcl12-Dependent and -Independent Mechanisms." *Int J Oncol* 43, no. 6 (Dec 2013): 1817-23.
- Liu, H., K. Lu, P. A. MacAry, K. L. Wong, A. Heng, T. Cao, D. M. Kemeny. "Soluble Molecules Are Key in Maintaining the Immunomodulatory Activity of Murine Mesenchymal Stromal Cells." *J Cell Sci* 125, no. Pt 1 (Jan 1 2012): 200-8.

- Liu, W. H., J. J. Liu, J. Wu, L. L. Zhang, F. Liu, L. Yin, M. M. Zhang, B. Yu. "Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells Via Interleukin-10 and the Jak1/Stat3 Signaling Pathway." *PLoS One* 8, no. 1 (2013): e55487.
- Locatelli, F., R. Maccario, F. Frassoni. "Mesenchymal Stromal Cells, from Indifferent Spectators to Principal Actors. Are We Going to Witness a Revolution in the Scenario of Allograft and Immune-Mediated Disorders?". *Haematologica* 92, no. 7 (Jul 2007): 872-7.
- Luheshi, N., G. Davies, E. Poon, K. Wiggins, M. McCourt, J. Legg. "Th1 Cytokines Are More Effective Than Th2 Cytokines at Licensing Anti-Tumour Functions in Cd40-Activated Human Macrophages in Vitro." *Eur J Immunol* 44, no. 1 (Jan 2014): 162-72.
- Ma, D., y J. Y. Niederkorn. "Transforming Growth Factor-Beta Down-Regulates Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Expression and Increases the Susceptibility of Uveal Melanoma Cells to Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis." *Immunology* 86, no. 2 (Oct 1995): 263-9.
- Maby-El Hajjami, H., P. Ame-Thomas, C. Pangault, O. Tribut, J. DeVos, R. Jean, N. Bescher, *et al.* "Functional Alteration of the Lymphoma Stromal Cell Niche by the Cytokine Context: Role of Indoleamine-2,3 Dioxygenase." *Cancer Res* 69, no. 7 (Apr 1 2009): 3228-37.
- Madara, J. L., T. W. Patapoff, B. Gillece-Castro, S. P. Colgan, C. A. Parkos, C. Delp, R. J. Mrosny. "5'-Adenosine Monophosphate Is the Neutrophil-Derived Paracrine Factor That Elicits Chloride Secretion from T84 Intestinal Epithelial Cell Monolayers." *J Clin Invest* 91, no. 5 (May 1993): 2320-5.
- Massaia, M., L. Perrin, A. Bianchi, J. Ruedi, C. Attisano, D. Altieri, G. T. Rijkers, L. F. Thompson. "Human T Cell Activation. Synergy between Cd73 (Ecto-5'-Nucleotidase) and Signals Delivered through Cd3 and Cd2 Molecules." *J Immunol* 145, no. 6 (Sep 15 1990): 1664-74.
- Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener, D. Dilloo. "Human Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Allogeneic T-Cell Responses by Indoleamine 2,3-

Dioxygenase-Mediated Tryptophan Degradation." *Blood* 103, no. 12 (Jun 15 2004): 4619-21.

Montesinos, J. J., L. Mora-Garcia Mde, H. Mayani, E. Flores-Figueroa, R. Garcia-Rocha, G. R. Fajardo-Orduna, M. E. Castro-Manrreza, B. Weiss-Steider, A. Monroy-Garcia. "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* 22, no. 18 (Sep 15 2013): 2508-19.

Montoro-Barenas C 2014, Tesis: Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino (CEM-CaCu) sobre la expresión de moléculas H-2D^b en células tumorales TC-1 en un modelo tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. Carrera de Biología FES-Zaragoza-UNAM.

Morales Ramírez Omar. 2014. Tesis: Análisis funcional de la vía CD39 y CD73 como mecanismo inmunosupresor en células estromales mesenquimales derivadas de neoplasias cervicales de pacientes con CaCu. Maestría en Ciencias Químico Biológicas, IPN.

Nauta, A. J., y W. E. Fibbe. "Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells." *Blood* 110, no. 10 (Nov 15 2007): 3499-506.

Navarro Romero Ramón Gilberto. 2013. Tesis: Análisis del papel antagonista de la cafeína en la inmunosupresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales de Cáncer Cérvico-uterino (CEM-CaCu) a través de la vía adenosinérgica. Carrera de Biología FES-Zaragoza-UNAM.

Niemela, J., T. Henttinen, G. G. Yegutkin, L. Airas, A. M. Kujari, P. Rajala, and S. Jalkanen. "Ifn-Alpha Induced Adenosine Production on the Endothelium: A Mechanism Mediated by Cd73 (Ecto-5'-Nucleotidase) up-Regulation." *J Immunol* 172, no. 3 (Feb 1 2004): 1646-53.

Paz De la Rosa, G., A. Monroy-Garcia, L. Mora-Garcia Mde, C. G. Pena, J. Hernandez-Montes, B. Weiss-Steider, M. A. Gomez-Lim. "An Hpv 16 L1-Based Chimeric Human Papilloma Virus-Like Particles Containing a String of Epitopes

- Produced in Plants Is Able to Elicit Humoral and Cytotoxic T-Cell Activity in Mice." *Virology* 6 (2009): 2.
- Páez D, Arévalo J, Rodríguez Y. 2007. Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. NOVA- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 5. 101-212.
- Plock, J. A., J. T. Schnider, M. G. Solari, X. X. Zheng, V. S. Gorantla. "Perspectives on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Vascularized Composite Allotransplantation." *Front Immunol* 4 (2013): 175.
- Regateiro, F. S., D. Howie, K. F. Nolan, E. I. Agorogiannis, D. R. Greaves, S. P. Cobbold, H. Waldmann. "Generation of Anti-Inflammatory Adenosine by Leukocytes Is Regulated by Tgf-Beta." *Eur J Immunol* 41, no. 10 (Oct 2011): 2955-65.
- Resta, R., y L. F. Thompson. "T Cell Signalling through Cd73." *Cell Signal* 9, no. 2 (Feb 1997): 131-9.
- Robson, S. C., Y. Wu, X. Sun, C. Knosalla, K. Dwyer, K. Enjoji. "Ectonucleotidases of Cd39 Family Modulate Vascular Inflammation and Thrombosis in Transplantation." *Semin Thromb Hemost* 31, no. 2 (Apr 2005): 217-33.
- Rodriguez, J. A., L. Galeano, D. M. Palacios, C. Gomez, M. L. Serrano, M. M. Bravo, A. L. Combata. "Altered Hla Class I and Hla-G Expression Is Associated with Il-10 Expression in Patients with Cervical Cancer." *Pathobiology* 79, no. 2 (2012): 72-83.
- Romero, J. M., P. Jimenez, T. Cabrera, J. M. Cozar, S. Pedrinaci, M. Tallada, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello. "Coordinated Downregulation of the Antigen Presentation Machinery and Hla Class I/Beta2-Microglobulin Complex Is Responsible for Hla-Abc Loss in Bladder Cancer." *Int J Cancer* 113, no. 4 (Feb 10 2005): 605-10.
- Roorda, B. D., A. Ter Elst, S. H. Diks, T. G. Meeuwse-de Boer, W. A. Kamps, E. S. de Bont. "Ptk787/Zk 222584 Inhibits Tumor Growth Promoting Mesenchymal Stem Cells: Kinase Activity Profiling as Powerful Tool in Functional Studies." *Cancer Biol Ther* 8, no. 13 (Jul 2009): 1239-48.

- Ryan, J. M., F. Barry, J. M. Murphy, B. P. Mahon. "Interferon-Gamma Does Not Break, but Promotes the Immunosuppressive Capacity of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Clin Exp Immunol* 149, no. 2 (Aug 2007): 353-63.
- Saldanha-Araujo, F., F. I. Ferreira, P. V. Palma, A. G. Araujo, R. H. Queiroz, D. T. Covas, M. A. Zago, R. A. Panepucci. "Mesenchymal Stromal Cells up-Regulate Cd39 and Increase Adenosine Production to Suppress Activated T-Lymphocytes." *Stem Cell Res* 7, no. 1 (Jul 2011): 66-74.
- Sato, K., K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Muroi, K. Ozawa. "Nitric Oxide Plays a Critical Role in Suppression of T-Cell Proliferation by Mesenchymal Stem Cells." *Blood* 109, no. 1 (Jan 1 2007): 228-34.
- Sitkovsky, M. V., J. Kjaergaard, D. Lukashev, A. Ohta. "Hypoxia-Adenosinergic Immunosuppression: Tumor Protection by T Regulatory Cells and Cancerous Tissue Hypoxia." *Clin Cancer Res* 14, no. 19 (Oct 1 2008): 5947-52.
- Song, S., Y. Wang, J. Wang, W. Lian, S. Liu, Z. Zhang, F. Liu, L. Wei. "Tumour-Derived Il-10 within Tumour Microenvironment Represses the Antitumour Immunity of Socs1-Silenced and Sustained Antigen Expressing Dcs." *Eur J Cancer* 48, no. 14 (Sep 2012): 2252-9.
- Spychala, J., E. Lazarowski, A. Ostapkowicz, L. H. Ayscue, A. Jin, B. S. Mitchell. "Role of Estrogen Receptor in the Regulation of Ecto-5'-Nucleotidase and Adenosine in Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 10, no. 2 (Jan 15 2004): 708-17.
- Stagg, J. "Mesenchymal Stem Cells in Cancer." *Stem Cell Rev* 4, no. 2 (Summer 2008): 119-24.
- Stagg, J., U. Divisekera, H. Duret, T. Sparwasser, M. W. Teng, P. K. Darcy, M. J. Smyth. "Cd73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis." *Cancer Res* 71, no. 8 (Apr 15 2011): 2892-900.
- Stagg, J., y M. J. Smyth. "Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in Cancer." *Oncogene* 29, no. 39 (Sep 30 2010): 5346-58.
- Suzuki, K., R. Sun, M. Origuchi, M. Kanehira, T. Takahata, J. Itoh, A. Umezawa, *et al.* "Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization." *Mol Med* 17, no. 7-8 (2011): 579-87.

- Takedachi, M., D. Qu, Y. Ebisuno, H. Oohara, M. L. Joachims, S. T. McGee, E. Maeda, *et al.* "Cd73-Generated Adenosine Restricts Lymphocyte Migration into Draining Lymph Nodes." *J Immunol* 180, no. 9 (May 1 2008): 6288-96.
- Takeuchi, M., K. Takeuchi, A. Kohara, M. Satoh, S. Shioda, Y. Ozawa, A. Ohtani, *et al.* "Chromosomal Instability in Human Mesenchymal Stem Cells Immortalized with Human Papilloma Virus E6, E7, and Htert Genes." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 43, no. 3-4 (Mar-Apr 2007): 129-38.
- Tchou, J., P. J. Zhang, Y. Bi, C. Satija, R. Marjundar, T. L. Stephen, A. Lo, *et al.* "Fibroblast Activation Protein Expression by Stromal Cells and Tumor-Associated Macrophages in Human Breast Cancer." *Hum Pathol* 44, no. 11 (Nov 2013): 2549-57.
- Thompson, L. F., H. K. Eltzschig, J. C. Ibla, C. J. Van De Wiele, R. Resta, J. C. Morote-Garcia, S. P. Colgan. "Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (Cd73) in Vascular Leakage During Hypoxia." *J Exp Med* 200, no. 11 (Dec 6 2004): 1395-405.
- Thompson, L. F., M. Takedachi, Y. Ebisuno, T. Tanaka, M. Miyasaka, J. H. Mills, M. S. Bynoe. "Regulation of Leukocyte Migration across Endothelial Barriers by Ecto-5'-Nucleotidase-Generated Adenosine." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, no. 6 (Jun 2008): 755-60.
- Uccelli, A., V. Pistoia, L. Moretta. "Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy for Immunosuppression?". *Trends Immunol* 28, no. 5 (May 2007): 219-26.
- Visser, J., H. W. Nijman, B. N. Hoogenboom, P. Jager, D. van Baarle, E. Schuurin, W. Abdulahad, *et al.* "Frequencies and Role of Regulatory T Cells in Patients with (Pre)Malignant Cervical Neoplasia." *Clin Exp Immunol* 150, no. 2 (Nov 2007): 199-209.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, *et al.* "Human Papillomavirus Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide." *J Pathol* 189, no. 1 (Sep 1999): 12-9.
- Wang, B., D. Niu, L. Lai, E. C. Ren. "P53 Increases Mhc Class I Expression by Upregulating the Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Erap1." *Nat Commun* 4 (2013): 2359.

- Waterman, R. S., S. L. Tomchuck, S. L. Henkle, A. M. Betancourt. "A New Mesenchymal Stem Cell (Msc) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory Msc1 or an Immunosuppressive Msc2 Phenotype." *PLoS One* 5, no. 4 (2010): e10088.
- Welters, M. J., G. G. Kenter, S. J. Piersma, A. P. Vloon, M. J. Lowik, D. M. Berends-van der Meer, J. W. Drijfhout, *et al.* "Induction of Tumor-Specific Cd4+ and Cd8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine." *Clin Cancer Res* 14, no. 1 (Jan 1 2008): 178-87.
- Young, A., D. Mittal, J. Stagg, and M. J. Smyth. "Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches." *Cancer Discov* 4, no. 8 (Aug 2014): 879-88.
- Yen BL y Yen ML. 2008. Mesenchymal stem cells and cancer- for better or for worse. *Journal of cancer molecules* 4:5-9.
- Yue, F. Y., R. Dummer, R. Geertsen, G. Hofbauer, E. Laine, S. Manolio, and G. Burg. "Interleukin-10 Is a Growth Factor for Human Melanoma Cells and Down-Regulates Hla Class-I, Hla Class-ii and Icam-1 Molecules." *Int J Cancer* 71, no. 4 (May 16 1997): 630-7.
- Zhang, B. "Cd73 Promotes Tumor Growth and Metastasis." *Oncoimmunology* 1, no. 1 (Jan 1 2012): 67-70.
- Zhang, L., X. S. Su, J. S. Ye, Y. Y. Wang, Z. Guan, y Y. F. Yin. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Metastatic Tumor Development in Mouse by Modulating Immune System." *Stem Cell Res Ther* 6 (2015): 45.
- Zhu, W., W. Xu, R. Jiang, H. Qian, M. Chen, J. Hu, W. Cao, C. Han, y Y. Chen. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Favor Tumor Cell Growth in Vivo." *Exp Mol Pathol* 80, no. 3 (Jun 2006): 267-74.