



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES  
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TUMORES DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO  
EN LA INDUCCIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA DE CÉLULAS  
TUMORALES CERVICALES**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**CARRERA MARTÍNEZ MONSERRAT**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM**

**DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO, 2018**



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.



Lic. Ivonne Ramirez 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 06 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CARRERA MARTÍNEZ MONSERRAT** con número de cuenta **408042552**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TUMORES DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN LA INDUCCIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA DE CÉLULAS TUMORALES CERVICALES**", realizada bajo la dirección del **DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**:

Presidente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE  
Vocal: DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA  
Secretario: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS  
Suplente: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ  
Suplente: DR. BENNY WEISS STEIDER

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 15 de enero de 2018



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A CONACyT por el apoyo recibido con la beca de maestría.

A mi tutor principal, Dr. Alberto Monroy García por brindarme todo el apoyo necesario y guiarme con paciencia a lo largo de mi desarrollo profesional.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Benny Weiss Steider y Dr. Juan José Montesinos Montesinos y mis sinodales Dra. Rebeca López Marure, Dra. Adriana Gutiérrez Hoya, Dr. Hugo López Muñoz por sus aportes a mi proyecto, y la asesoría oportuna.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer del Hospital de Oncología del CMNSXXI IMSS. La investigación se llevó a cabo gracias a los siguientes financiamientos: Fondo de Investigación en Salud (FIS-IMSS) No:-1314 y 1383; CONACYT No: 240635; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) No: IN2265-16. Asimismo, se contó con el apoyo complementario como Becaria de Investigación con número de folio 2017-48 proporcionado por el Instituto Mexicano del Seguro Social en el periodo marzo 2017- febrero 2018.

Al Centro de Instrumentos de Citometría de Flujo de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, especialmente a la M. en C. Jessica Lakshmi Prieto Chávez por su valiosa asesoría

Agradezco a mis padres y abuelos quienes me han enseñado que la educación es una importante fuente de progreso y su ejemplo de perseverancia es mi inspiración para alcanzar mis metas y superar obstáculos.

A Willy por estar siempre a mi lado, ser paciente y enseñarme tantas cosas bonitas de la vida que me hacen una mujer muy feliz.

A mis amigos de antaño Karen, Monse, Marlene, Atziri, Carlos, Torci y Mouse por sus consejos, las experiencias y los momentos increíbles.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología y Cáncer, especialmente a la Dra. Rosario García Rocha y a la T.I. María del Carmen Fuentes Castañeda por ser mis guías, mentoras y consejeras.

A mis compañeros del Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales por apoyarme siempre con su equipo, y especialmente a Victor Adrián Cortés Morales por su asesoría y amistad.

Al Laboratorio de Oncología Molecular por el acceso a sus equipos.

A todos los miembros de la UIMEO por permitirme formar parte de la familia en especial a Paty, Damián, Alicia y Galo.

A mis padres y en memoria de mis abuelitos

## ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Lista de abreviaturas	III
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Cáncer cervicouterino (CaCu)	3
La infección por Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo Oncogénico (VPH-AR): un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu	3
Estadios del CaCu	4
Programas de detección del CaCu	5
Recurrencia	6
Metástasis	6
La metástasis en el CaCu	6
La Transición Eitelio Mesénquima (TEM)	8
Microambiente tumoral	10
Componentes del microambiente tumoral	11
Microambiente tumoral y TEM	12
Células Estromales Mesenquimales (MSC)	12
Células Estromales Mesenquimales Asociadas a tumor (T-MSC)	13
El TGF- $\beta$ en la inducción de la TEM	14
Antecedentes y planteamiento del problema	17

Hipótesis	18
Objetivos	18
Estrategia experimental	18
Metodología	20
Resultados	25
Discusión	37
Conclusiones	41
Perspectivas	41
Literatura Citada	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estadios del CaCu	7
Figura 2	Características de la TEM	9
Figura 3	Microambiente tumoral	11
Figura 4	Características de las MSC	13
Figura 5	TGF- $\beta$ induce TEM a través de “Factores de transcripción maestros de la TEM”	16
Figura 6	Ensayo de cierre de herida en células tumorales de CaCu	26
Figura 7	Efecto del TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de cadherina-E y vimentina en células tumorales de CaCu	28
Figura 8	Medios condicionados de MSC inducen incremento en la concentración de TGF- $\beta$ en cultivos de células tumorales de CaCu	29
Figura 9	Incremento en la capacidad migratoria de las células SiHa en presencia de medios condicionados de MSC.	30
Figura 10	Incremento en la capacidad migratoria de las células ROVA en presencia de medios condicionados de MSC	32
Figura 11	Inducción de la expresión de Snail 1 y Twist 1 en la línea celular SiHa con medios condicionados de MSC	33
Figura 12	Las MSC inducen cambios en la expresión de Snail 1 y Twist 1 en la línea celular de CaCu ROVA.	34
Figura 13	Los medios condicionados de MSC inducen incremento en la expresión de vimentina en células tumorales de CaCu	36

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Estadios del CaCu de acuerdo a la FIGO	4
Tabla 2 Mezcla de reacción para la retrotranscripción.	23
Tabla 3 Programa para RT-PCR	24
Tabla 4 Secuencias de oligonucleótidos para amplificar genes involucrados en la TEM mediante qRT-PCR	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Actina de Músculo Liso
<b>anti-TGF-<math>\beta</math></b>	Anticuerpo neutralizante para TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 y - $\beta$ 3.
<b>CaCu</b>	Cáncer Cervicouterino
<b>CD</b>	Grupo de Diferenciación
<b>DE</b>	Desviación Estándar
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DOC</b>	Detección Oportuna del Cáncer
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.
<b>FIGO</b>	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
<b>hAD-MSC</b>	MSC de tejido Adiposo humano
<b>HGF</b>	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
<b>VPH</b>	Virus de Papiloma Humano
<b>VPH-AR</b>	Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>ISCT</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
<b>ISSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón-gamma
<b>MAT</b>	Microambiente Tumoral
<b>MEC</b>	Matriz Extra Celular
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MMP</b>	Metaloproteasas de Matriz
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>MSC</b>	Células Estromales Mesenquimales
<b>MSC-CaCu</b>	Células Estromales Mesenquimales derivadas de Cáncer Cervicouterino
<b>MSC-CN</b>	Células Estromales Mesenquimales derivadas de Cérvix Normal
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
<b>N-MSC</b>	Células Estromales Mesenquimales Normales
<b>NPM</b>	Nicho Pre- Metastásico
<b>Pap</b>	Prueba de Papanicolaou
<b>PBS</b>	Solución salina Amortiguadora de Fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PSF</b>	Factores estabilizadores de fenotipo
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa Cuantitativa
<b>rh-TGF-<math>\beta</math>1</b>	Proteína Recombinante Humana del Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ 1
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RT</b>	Transcripción Reversa.
<b>SDF-1</b>	Factor-1 Derivado de Células Estromales
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino.
<b>TEM</b>	Transición Epitelio-Mesénquima
<b>TF</b>	Factor de Transcripción
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante beta
<b>T-MSC</b>	Células Estromales Mesenquimales Asociadas a Tumor

**TNF- $\alpha$**   
**VEGF**

Factor de Necrosis Tumoral alfa  
Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, debido a su alta incidencia y mortalidad debida principalmente al desarrollo de metástasis. Un proceso biológico relacionado con la metástasis es la transición epitelio-mesenquima (TEM) en el cual las células epiteliales del tumor adquieren características mesenquimales que les permiten migrar para invadir órganos distantes. Diversos estímulos extracelulares pueden activar las cascadas de señalización involucradas en la TEM durante la progresión tumoral, incluyendo factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , que puede ser secretado por las células tumorales o por las células del estroma tumoral como las células estromales mesenquimales (MSC). En este estudio se analizó el efecto de sobrenadantes de MSC derivados de tumores de CaCu (MSC-CaCu) y de cérvix normal (MSC-CN) sobre la inducción de cambios asociados a la TEM como el aumento en la expresión de los genes maestros de la TEM Snail 1 y Twist 1, aumento en la expresión de vimentina y aumento en la migración de las células tumorales de CaCu.

Los medios condicionados de MSC-CaCu y MSC-CN indujeron la producción de TGF- $\beta$  en el cultivo de las células tumorales SiHa y ROVA. Además, se observaron cambios fenotípicos y funcionales asociados a la TEM, tales como la inducción en la expresión de Snail 1 y Twist 1, aumento en el nivel de vimentina y aumento en la capacidad migratoria en células tumorales de CaCu, los cuales fueron inhibidos en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-TGF- $\beta$ 1. Lo cual sugiere que la presencia de MSC en el microambiente tumoral del CaCu, puede participar de manera importante en la inducción de la TEM en las células tumorales y promover su capacidad metastásica a través de la producción de factores solubles como el TGF- $\beta$ .

## ABSTRACT

Cervical cancer (CeCa) represents a serious public health problem worldwide, due to its high incidence and mortality as consequence of metastasis development. A biological process related to metastasis is the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in which tumor epithelial cells acquire mesenchymal features that allow them to migrate and invade distant organs. Various extracellular stimuli can activate the signaling cascades involved in TEM during tumor progression, including growth factors such as TGF- $\beta$ , which can be secreted by tumor cells or by tumor stromal cells such as mesenchymal stromal cells (MSC). In this study we analyzed the effect of conditioned media of MSCs derived from cervical cancer (MSC-CaCu) and normal cervix (MSC-CN) on the induction of phenotypic changes EMT related such increase in expression of TEM master genes Snail 1 and Twist 1, increase in expression of vimentin and increase of migration in CeCa tumor cells.

The conditioned media of MSC-CaCu and MSC-CN induced the production of TGF- $\beta$  in the culture of SiHa and ROVA tumor cells. In addition, phenotypic and functional changes associated with TEM were observed in these cell lines, such as induction in the expression of Snail 1 and Twist 1, an increase in the level of vimentin and an increase in the migratory capacity of CaCu tumor cells were observed. Interestingly, these changes were inhibited in presence of anti-TGF- $\beta$ 1 neutralizing antibodies. This results suggests that the presence of MSCs in the tumoral microenvironment of CaCu can play an important role in the induction of TEM in tumor cells and promote their metastatic capacity through the production of soluble factors such as TGF- $\beta$ .

## **Introducción**

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. Una característica que define al cáncer es la rápida división de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos mediante un proceso que se denomina “metástasis” (OMS, 2017).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos (Ferlay J., 2012) y en 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones (GBD, 2015).

### **Cáncer cervicouterino (CaCu)**

Con respecto al cáncer en mujeres, el CaCu posee el tercer lugar a nivel mundial en incidencia y mortalidad con 527,624 casos nuevos y 265,672 defunciones reportadas en 2012. En México dicha neoplasia ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad con 13,960 nuevos casos y 4,769 defunciones reportadas en 2012 (globocan.iarc.fr), lo que representa un grave problema para el sistema de salud pública. En términos sociales, el impacto representa una gran pérdida de años de vida productiva que contribuye al deterioro económico del país y a la ruptura de su tejido social (SSA, 2002).

### **La infección por Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo Oncogénico (VPH-AR): un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu**

Desde la década de los 70's Harald Zur Hausen determinó que la infección persistente en el epitelio cervical por el virus de papiloma humano (VPH), está asociada al desarrollo de CaCu (Zur Hausen H., 1977). Los VPH son d-DNA virus y pertenecen a la familia *papoviridae* la cual cuenta con 200 tipos diferentes, de los cuales 30 son de alto riesgo oncogénico incluyendo a los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. A nivel mundial las infecciones más comunes son causadas por el VPH 16 (50%) y 18 (20%) y pueden causar lesiones pre cancerosas (Muñoz N *et al.*, 2003).

La infección se presenta en cerca del 100% de los casos de CaCu (Forman D *et al.*, 2012) por lo que se considera el principal factor causal de dicha neoplasia (Duarte-Franco & Franco, 2004). La mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y no son clínicamente evidentes, ya que del 70 al 90% de las mujeres infectadas resuelven la infección entre 12 y 30 meses (Evander M *et al.*, 1995) y se estima que sólo un 1% de mujeres infectadas desarrolla CaCu (Tindle R, 2002).

### Estadios del CaCu

La edad promedio de las mujeres que desarrollan CaCu oscila entre los 45-50 años, sin embargo, puede afectar a mujeres desde 20 años de edad o incluso menores (Parkin D *et al.*, 1999). Esta enfermedad tiene una historia natural de larga evolución con base en una infección persistente por VPH que inicia con cambios en el epitelio cervical, los cuales aumentan gradualmente hasta que se transforma en carcinoma invasor (Castellanos-Morales M, 2003) en un término de 15 a 20 años (Doorbar J *et al.*, 2012). La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) estableció los siguientes estadios del CaCu (Pecorelli S, 2009) (TABLA 1):

**TABLA 1.** Estadios del CaCu de acuerdo a la FIGO

<b>ESTADIO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR</b>
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>IA1</b>	Confinado al cérvix, diagnosticado sólo con microscopía con una invasión <3 mm de profundidad, <7 mm
<b>IA2</b>	Confinado al cérvix, diagnosticado sólo con microscopía con una invasión >3 y <5 mm de profundidad con extensión lateral <7mm
<b>IB1</b>	Lesión clínicamente visible o mayor a IA2 ó <4 cm
<b>IB2</b>	Lesión clínicamente visible > 4 cm en la dimensión más grande
<b>IIA1</b>	Se involucran los dos tercios superiores de la vagina, sin invasión parametrial <4 cm en la dimensión más grande
<b>IIA2</b>	Lesión >4 cm en la dimensión más grande

<b>IIB</b>	Invade parametrios parcialmente
<b>IIIA</b>	Invade 1/3 inferior de la vagina sin llegar a pared pélvica
<b>IIIB</b>	Invade pared pélvica / hidronefrosis / IRC
<b>IVA</b>	Invade mucosa de vejiga o recto
<b>IVB</b>	Metástasis a distancia

### **Programas de detección del CaCu**

El CaCu es absolutamente prevenible y su tratamiento es relativamente fácil cuando el diagnóstico es oportuno. La experiencia de países desarrollados ha permitido demostrar que la mejor opción para disminuir la mortalidad por CaCu es la detección y el tratamiento temprano de lesiones precursoras y lesiones malignas, lo cual se logra mediante la implementación de programas de detección oportuna de CaCu (Hidalgo-Martínez A, 2006).

Desde 1974 se implementaron en México programas nacionales de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), enfocados en la detección de CaCu mediante la prueba de Papanicolaou (Pap). Actualmente, la operación del Programa de Acción para la Prevención y Control del Cáncer Cérvico Uterino, se basa en la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994 para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del Cáncer Cérvico Uterino (SSA, 2002). Sin embargo, hasta la fecha dicha neoplasia sigue siendo una de las principales causas de muerte para las mujeres mexicanas ya que ha sido difícil establecer y mantener un programa de tamizaje efectivo.

En lugar de ser una herramienta para la DOC, el Pap frecuentemente detecta lesiones cervicales en etapas muy avanzadas en el 80% de los casos y a pesar de recibir tratamiento, en el 70% de estos casos se desarrolla persistencia o recurrencia de la enfermedad. En el más drástico de los escenarios se encuentran del 8 al 17% de los pacientes que son clasificados en fase metastásica (IVA o IVB) al diagnóstico inicial (Coronel-Martínez J, *et al.*, 2014) (Figura1 A).

## **Recurrencia**

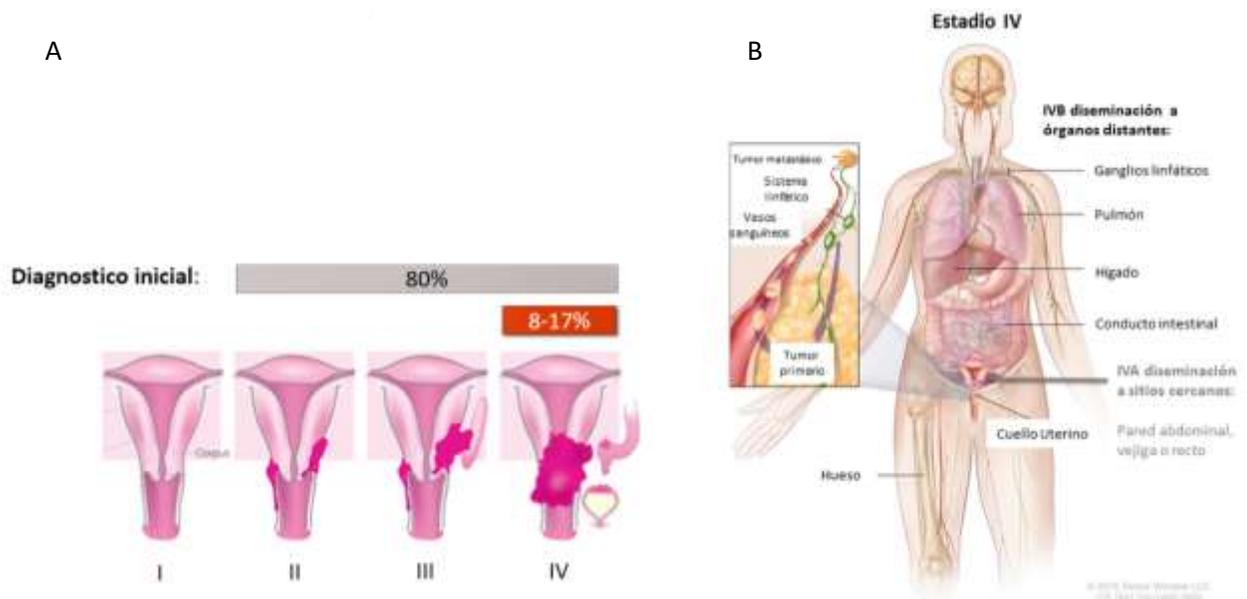
La enfermedad recurrente se define como la reaparición local del tumor o el desarrollo de metástasis a distancia, seis meses o más, después de la regresión completa de la lesión tratada; sin embargo, si se detecta dentro de los primeros seis meses después de completar el tratamiento primario, se le denomina persistencia (Choi J *et al.*, 2000). Se estima que la edad promedio de las mujeres con recurrencia es de 40-45 años. En relación con el estadio clínico inicial, la frecuencia de la enfermedad recurrente es: aproximadamente del 10% en etapa IB, 17% en etapa IIA, 23% en etapa IIB, 42% en etapa III y 74% en etapa IVA (Peiritti M *et al.*, 2012).

## **Metástasis**

La metástasis es un proceso de múltiples etapas en las que las células del tumor primario llevan a cabo invasión local, intravasación, transporte, extravasación y colonización en un sitio distante. Se estima que sólo el 0.01% de las células tumorales que entran en la circulación sistémica son capaces de formar tumores secundarios (Chambers A *et al.*, 2002).

## **La metástasis en el CaCu**

La diseminación de las células cancerosa en estadios avanzados de la enfermedad, es la principal causa de muerte en pacientes con CaCu (Barrière G. *et al.*, 2013). La metástasis se lleva a cabo a través de dos vías: a) *Linfática*: es la más común y las células se diseminan a nódulos linfáticos parametriales, paracervicales, obturadores, hipogástricos, ilíacos, sacros, inguinales, paraaórticos; y b) *Hematógena*: la diseminación ocurre en aproximadamente 21% de los casos a pulmón, 11% a nódulo linfático paraórtico, 5% a vejiga, 4% a hígado, 7% a médula ósea y 3% a nódulo linfático inguinal (Simcock B., 2007) (Figura 1 B).



**Figura 1. Estadios del CaCu. A)** El 80% de los casos al diagnóstico inicial son estadios avanzados y hasta el 17 % son estadio IV. **B)** El estadio IV de CaCu es cuando el cáncer se ha extendido más allá del cuello del útero en órganos adyacentes, como el recto o la vejiga (estadio IVA) o el cáncer se ha diseminado a lugares distantes del cuerpo, que puede incluir los huesos, los pulmones o el hígado (estadio IVB). Cuando el CaCu es diagnosticado en esta etapa es a menudo difícil de tratar, y sólo una pequeña minoría de pacientes logran curarse de la enfermedad (tomado de: [www.nih.gov](http://www.nih.gov))

Con los tratamientos actuales para el CaCu se logra remisión de hasta el 90% de pacientes diagnosticadas en estadio I, y 60% en estadio II, sin embargo, el pronóstico para mujeres en estadios avanzados o recurrencia disminuye dramáticamente hasta el 15% (<http://www.cancer.org>, 2014).

En México, del total de muertes por cáncer cervicouterino registradas en el año 2000, 40.91% correspondieron a mujeres sin seguridad social, 42.62% eran derechohabientes del IMSS y 6.95% eran derechohabientes del ISSSTE (SSA, 2002). Debido al costo elevado del tratamiento para el CaCu, representa una merma en la economía de las familias que no cuentan con seguridad y en el presupuesto de las instituciones de salud pública, principalmente para el IMSS.

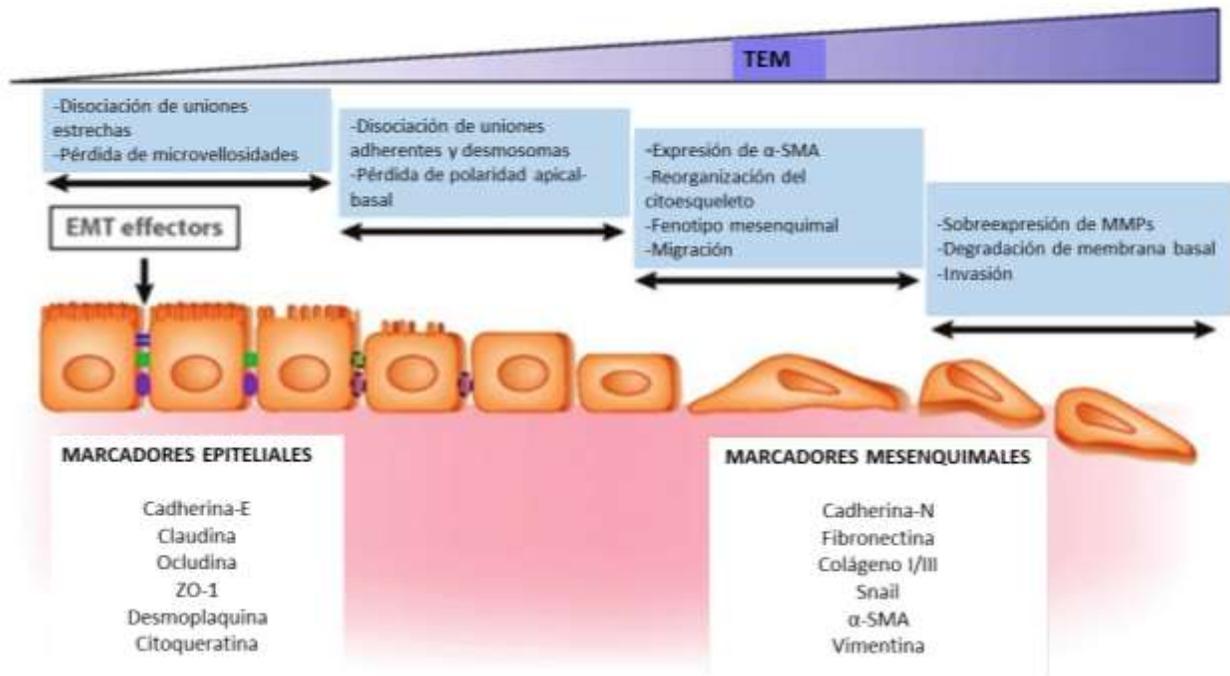
Debido a la gravedad del problema, y a que el mayor porcentaje de mortalidad se presenta en pacientes con metástasis, resulta de suma importancia estudiar procesos como la transición epitelio-mesénquima la cual es clave para que las células tumorales adquieran la capacidad de migrar a sitios distantes para formar nuevos tumores.

## **La Transición Epitelio Mesénquima (TEM)**

La TEM es un proceso biológico en el que se induce la remodelación gradual de la arquitectura de células epiteliales y una modificación de sus capacidades funcionales. Elizabeth Hay demostró por primera vez en 1968 que las células epiteliales tienen la capacidad de transformarse hacia un estado mesenquimal en el que pierden sus uniones célula-célula y la polaridad apical-basal y se convierten a un estado de baja proliferación con forma de célula semejante a un huso y con mayor migración celular, invasión y supervivencia (Kalluri R & Weinberg 2009).

Durante la TEM, las células se someten a cambios bioquímicos múltiples incluyendo: 1) la pérdida completa de características epiteliales como la disminución en la expresión de cadherina-E, placoglobina y citoqueratinas y el desmantelamiento de las uniones adherentes, uniones estrechas, uniones gap y desmosomas, 2) la adquisición total de características mesenquimales induciendo la expresión de vimentina, actina de músculo liso, cadherina-N, fibronectina (Gavert N & Ben-Ze', 2008), 3) el aumento de la producción de componentes de matriz extracelular (MEC) y 4) al aumento de la expresión y la actividad de proteasas extracelulares, como las metaloproteasas, que permiten a las células degradar proteínas de matriz extracelular, permitiendo la migración a órganos distantes.

Todos estos cambios, inducen en las células transformadas un cambio de fenotipo epitelial a fenotipo mesenquimal, cuya capacidad migratoria, invasividad y resistencia a la apoptosis aumenta con respecto a su contraparte epitelial (Figura 2). La TEM es un proceso reversible, el proceso inverso es conocido como transición mesénquima epitelio (TME) en el que las células que invaden nuevos tejidos vuelven a adquirir características epiteliales cuando se establecen en los focos metastáticos (Lee M *et al.*, 2008).



**Figura 2. Características de la TEM.** La TEM es un proceso en el que las células tumorales cambian gradualmente de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal, dicho cambio fenotípico es acompañado por un cambio en la expresión de marcadores y la adquisición de características funcionales como el aumento en la migración (Modificado de: Angadi P. & Kale A., 2015).

Diversos estímulos extracelulares pueden activar las cascadas de señalización involucradas en la TEM, incluyendo una variedad de factores de crecimiento que pueden ser secretados por las células tumorales y por las células del estroma tumoral. El estrés metabólico y mecánico, la hipoxia o la rigidez de la matriz también pueden actuar como poderosos inductores de TEM y favorecer la invasión de células tumorales (Lamouille S. *et al.*, 2014). También se ha demostrado la participación de micro RNAs (miRNAs) que son moléculas de RNA de entre 19 y 22 nucleótidos de cadena sencilla que actúan como reguladores postranscripcionales, principalmente los miembros de la familia miR-200 se asocian con el cambio de la morfología de las células epiteliales y su expresión disminuye cuando se induce TEM (Zavadil J. *et al.*, 2007; Kong W., 2008; Gregory P. *et al.*, 2008; Diaz-Martin J. *et al.*, 2014).

La mayoría de las vías que inducen TEM convergen a nivel de factores de transcripción (TFs) asociados a TEM (Nieto M. & Cano A., 2012). Las familias Snail (proteínas de dedo de zinc Snail y Slug), Zeb (proteínas Zeb1 y Zeb2) y Twist (proteínas H12, E47, Twist1, Twist2 e Id) juegan un papel central durante el desarrollo de la TEM y se consideran “Factores de Transcripción maestros de la TEM” (Peinado H. *et al.*, 2007), son inductores potentes del proceso de desdiferenciación de las células epiteliales y actúan como represores transcripcionales de genes epiteliales, como cadherina-E, y activadores de genes mesenquimales, incluyendo cadherina-N (Lamouille S. *et al.*, 2014; Peinado H. *et al.*, 2007).

Durante la TEM, las células pueden presentar fenotipos híbridos en los que no son totalmente epiteliales (E) o totalmente mesenquimales (M) sino que poseen características fenotípicas híbridas E/M (Burger G. *et al.*, 2017).

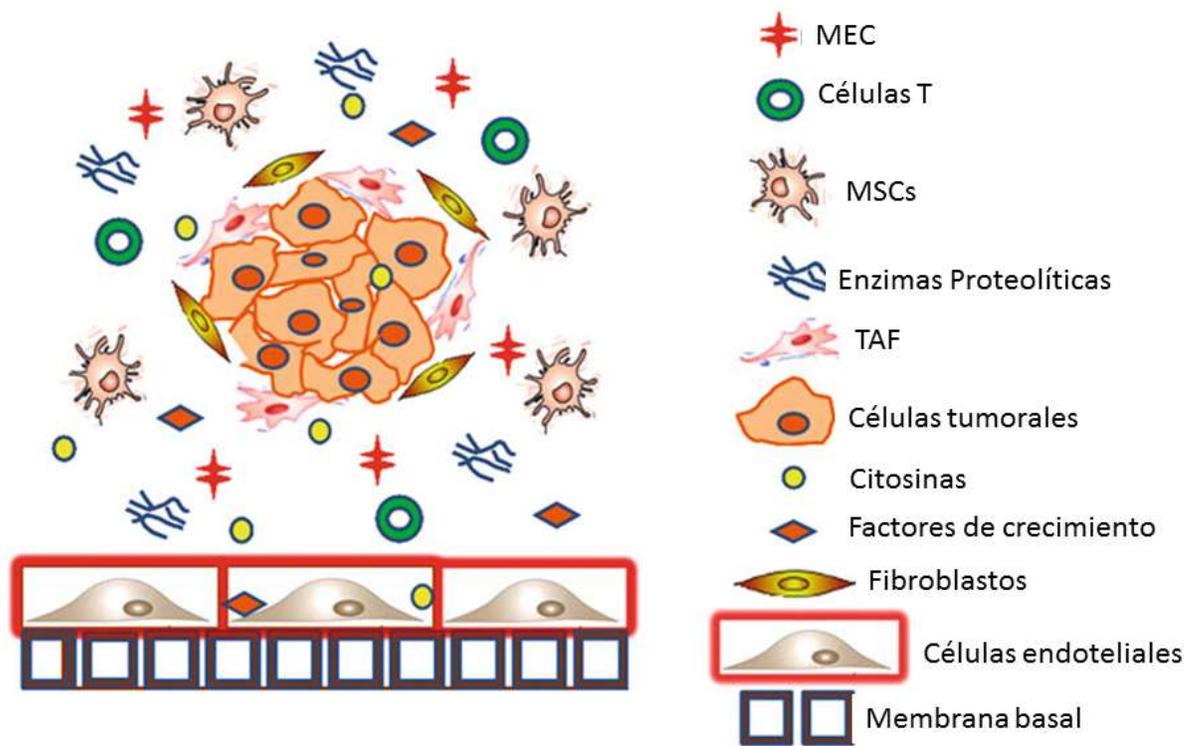
Recientemente se describió una clase de reguladores conocidos como “Factores Estabilizadores de Fenotipo” (PSF por sus siglas en inglés) los cuales pueden estabilizar las células en un fenotipo particular (ej. E/M). Los PSF más relevantes son OVOL, GRHL2 (los cuales también son factores de transcripción) y miR-145 (Burger G. *et al.*, 2017).

### **Microambiente tumoral**

Los tumores sólidos se componen de poblaciones heterogéneas de células neoplásicas y un conjunto elaborado de células mesenquimales e inflamatorias que forman el estroma asociado a tumores, y se conocen colectivamente como el microambiente tumoral (MAT). Se ha demostrado que las interacciones parácrinas entre las células cancerosas y las células del MAT regulan el crecimiento, la homeostasis y la progresión tumoral (McAllister S. *et al.*, 2014).

### Componentes del microambiente tumoral

Las células no cancerosas que conforman el microambiente tumoral son principalmente: fibroblastos, pericitos, MSC, adipocitos, macrófagos y otras células del sistema inmune (Bussard K. *et al.*, 2016). Con respecto a los factores solubles, se ha reportado principalmente la presencia de: a) citocinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucinas 6 (IL-6), 8 (IL-8), y 1 (IL-1), b) factores de crecimiento como el Transformante beta (TGF- $\beta$ ); el de Hepatocitos (HGF), el Derivado de Plaquetas (PDGF) y el Endotelial Vascular (VEGF), c) quimiocinas como el Factor-1 Derivado de Células Estromales (SDF-1), y d) Metaloproteasas de Matriz (MMPs) (Sun Z. *et al.*, 2014) (Figura 3).



**Figura 3. Microambiente tumoral.** El microambiente tumoral contiene varios mediadores como citocinas, factores de crecimiento, proteínas de la MEC, enzimas proteolíticas, fibroblastos, MSC, células T, células endoteliales y células tumorales, los cuales regulan la tumorigénesis al afectar el crecimiento tumoral, angiogénesis, inflamación y TEM.

## **Microambiente tumoral y TEM**

Se ha propuesto que diversas moléculas secretadas por las células cancerosas y las células del estroma tumoral pueden desencadenar eventos moleculares asociados con el programa de TEM en las células tumorales, incluyendo TGF- $\beta$ , FGF, EGF, IGF-1 y HGF (Kalluri R. & Weinberg R., 2009).

En un modelo de carcinoma hepatocelular (HCC) se observó que la TEM fue dependiente de la presencia de TGF- $\beta$  secretado por MSC (David P. & Müller I., 2015).

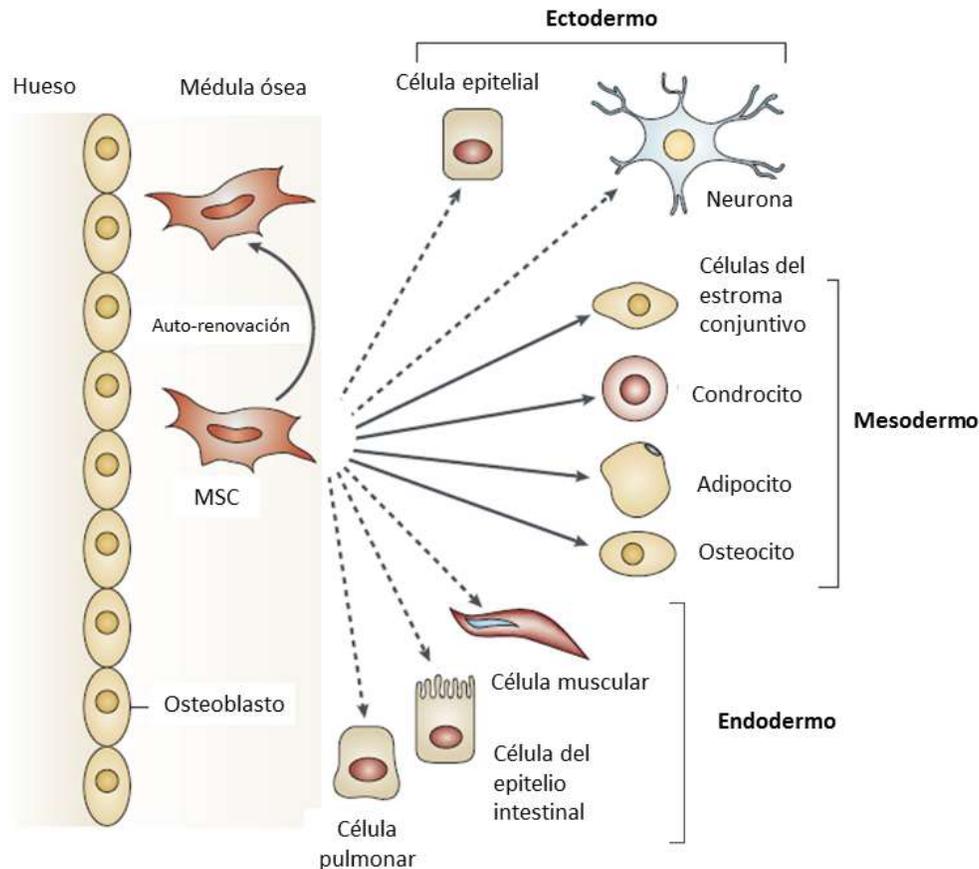
Recientemente se ha descrito que las Células Estromales Mesenquimales (MSC) participan en el crecimiento e invasividad de las células tumorales a través de la secreción de quimiocinas como CXCL5 que pueden funcionar de forma parácrina no solo promoviendo la invasión tumoral y la migración, sino también facilita la TEM entre las células tumorales (Sun Z. *et al.*, 2014).

La progresión del cáncer también puede estar dirigida por las respuestas sistémicas del cuerpo a la malignidad y por la participación de los sistemas orgánicos ubicados en sitios distantes del sitio del crecimiento del tumor primario. Por lo tanto, lo que determina si una población de células tumorales logra generar metástasis no solo depende de las propiedades intrínsecas de las mismas células cancerosas, sino también el estado del ambiente del huésped, que incluye tanto el MAT y el ambiente fisiológico sistémico (McAllister S. *et al.*, 2014).

## **Células Estromales Mesenquimales (MSC)**

Las MSC son células multipotenciales que se pueden obtener de diferentes tejidos maduros, tanto sanos (N-MSC) como tumorales (T-MSC), y se caracterizan mediante una serie de parámetros morfológicos, fenotípicos y de diferenciación establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular, incluyendo: su capacidad de adherencia al plástico, la expresión simultánea de CD73, CD90, CD105 y nula o baja expresión de marcadores específicos para células hematopoyéticas tales como CD14, CD31, CD34 CD45 y HLA-DR (Pittenger M *et al.*, 1999; Dominici M *et al.*, 2006). Otro de los criterios es la alta capacidad

de diferenciación en varios tipos de células, incluyendo osteocitos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, mioblastos, oocitos cardiomiocitos, hepatocitos, tenocitos, diferentes tipos de células epiteliales (ej. pulmón, intestino, riñón, y el bazo) e incluso neuronas (Figura 4) (Baksh D. *et al.*, 2004; Kidd S. *et al.*, 2012).



**Figura 4. Características de las MSC.** Las MSC tienen la capacidad de auto-renovarse en la cavidad de la médula ósea (flecha curvada) y también pueden diferenciarse (flechas sólidas) hacia el linaje mesodérmico. La capacidad para transdiferenciarse en células de otros linajes (ectodermo y endodermo) se muestra mediante flechas discontinuas, ya que la transdiferenciación aún es polémica *in vivo* (Modificado de: Uccelli A. *et al.*, 2008).

### Células Estromales Mesenquimales Asociadas a Tumor (T-MSC)

Las MSC pueden ser atraídas por citocinas proinflamatorias y quimiocinas hacia los tumores (Caplan A. & Correa D., 2011). El crecimiento invasivo de los tumores también causa daño tisular local e inflamación, por tanto, atrae a las MSC (Sun Z. *et al.*, 2014), en donde se les denomina T-MSC.

Las T-MSCs se han aislado y caracterizado en diversos tipos de cáncer, incluyendo: cáncer de ovario (McLean K. *et al.*, 2011), cáncer de hueso de células gigantes (Walling M. *et al.*, 2003), neuroblastoma (Johann P. *et al.*, 2010), osteosarcoma, lipoma (Gibbs C. *et al.*, 2005), cáncer gástrico (Cao H. *et al.*, 2009) y recientemente en colaboración con nuestro grupo de investigación se lograron obtener y caracterizar por primera vez T-MSCs a partir de tumores de CaCu y se denominaron MSC-CaCu, para diferenciarlas de su contraparte de cérvix normal denominadas MSC-CN (Montesinos J. *et al.*, 2013).

Las T-MSCs ejercen funciones importantes para soportar el crecimiento tumoral, favoreciendo la proliferación de las células tumorales (Liu Y. *et al.*, 2011), propician condiciones para incrementar el número de células troncales tumorales (David P. & Müller I., 2015), promueven la angiogénesis (Sun Z. *et al.*, 2014) e inducen la TEM de las células tumorales favoreciendo la metástasis en cáncer de páncreas (Kabashima-Niibe A. *et al.*, 2013).

Las T-MSCs y las N-MSCs presentan algunas similitudes y también diferencias. Ambos tipos de MSC expresan altos niveles de CD29, CD44, CD90 y CD105, pero bajos niveles de marcadores hematopoyéticos. Las diferencias entre T-MSCs y N-MSCs son: 1) existe una mayor cantidad de MSC en tejidos tumorales que en tejidos normales (en el caso de osteosarcoma), 2) las T-MSCs exhiben una mayor capacidad proliferativa que N-MSCs (en cáncer de ovario, pulmón, estómago y próstata), 3) las T-MSCs tienen mayor capacidad de migración que las N-MSCs (en cáncer gástrico), 4) T-MSCs exhiben una mayor resistencia a fármacos (en osteosarcoma), 5) las T-MSCs tienen mayor actividad inmunosupresora que N-MSCs (Sun Z. *et al.*, 2014).

### **El TGF- $\beta$ en la inducción de la TEM**

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés) es una citocina pertenece a una familia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas en humanos, TGF- $\beta$  1, 2 y 3, las cuales son proteínas pleiotrópicas que controlan numerosas funciones

biológicas incluyendo la proliferación, apoptosis, mantenimiento de células troncales, así como la progresión y metástasis tumoral (Bierie B. & Moses H., 2006).

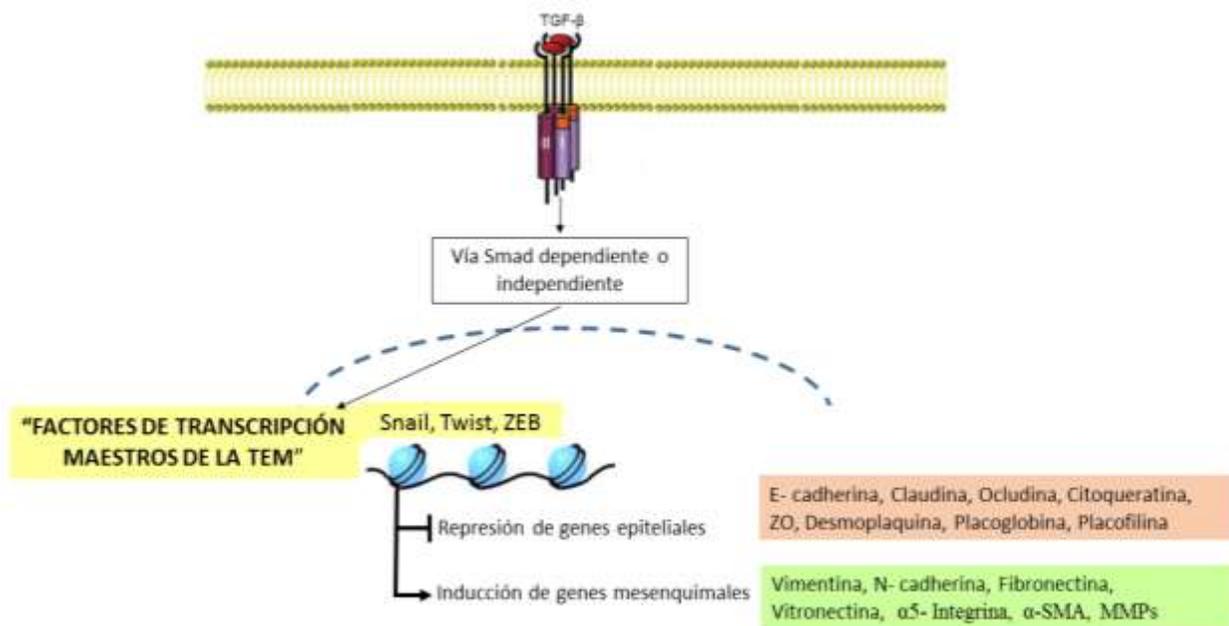
En un estudio realizado en biopsias de mujeres con neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) grado I-III y CaCu se demostró que la expresión de TGF- $\beta$  aumenta en correlación al grado de progresión tumoral (Wrzesinski S. *et al.*, 2007; Comerci J. *et al.*, 1996).

El TGF- $\beta$  está íntimamente relacionado con la inducción de TEM, la señalización puede ser a través de una vía transcripcional Smads-dependiente y una vía transcripcional Smads-independiente.

En la vía dependiente de Smads, dichas proteínas se fosforilan y se traslocan al núcleo donde controlan la transcripción de “factores de transcripción maestros de la TEM” que incluye a las familias Snail, ZEB y bHLH. La activación de estos FTs reprime la expresión de genes epiteliales y activan la expresión de genes mesenquimales (Figura 5) (Peinado H. *et al.*, 2007).

El TGF-  $\beta$  también puede inducir TEM a través de una vía independiente de Smads a través de la activación de vías como Erk/MAPK, GTPasas Rho y PI3K/Akt las cuales regulan distintos procesos, como la organización del citoesqueleto, crecimiento celular, supervivencia, migración e invasión (Valcourt U. *et al.*, 2005; Derynck R. & Zhang Y., 2003).

El tratamiento de células con inhibidores químicos que bloquean selectiva o específicamente una o varias de estas vías afectan dramáticamente la inducción de la TEM, sugiriendo que la activación de la señalización de manera Smad independiente complementa a las Smad dependiente (Xu J. *et al.*, 2009).



**Figura 5. TGF-β induce TEM al través de “Factores de transcripción maestros de la TEM”** tales como Snail, Twist y ZEB, los cuales reprimen la transcripción de genes epiteliales como cadherina-E, Claudina, Ocludina e inducen la transcripción de genes mesenquimales como vimentina, cadherina-N, fibronectina, etc. (Imagen modificada de: Papageorgis P., 2015; Xu J *et al.*, 2009 Moustakas A & Carl-Henrik H, 2016).

Las células epiteliales sometidas a TEM pueden segregar TGF-β de manera autócrina, pero con frecuencia, son las células del microambiente las que proporcionan TGF-β de forma parácrina.

Las tres isoformas TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 inicial la señalización de manera similar (Papageorgis P. *et al.* 2015) debido a que se unen al mismo receptor, por lo que comparten la capacidad de inducir la TEM (Miettinen P. *et al.*, 1994; Piek E *et al.*, 1999; Valcourt U *et al.*, 2005).

El TGF-β1 es el factor de crecimiento que más se conoce en la regulación de la TEM, el efecto de este en la transdiferenciación de células epiteliales a mesenquimales ha sido demostrado en ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* (Miettinen P. *et al.*, 1994).

## **Antecedentes y planteamiento del problema**

La TEM es un proceso biológico en el que se remodela gradualmente la arquitectura de las células epiteliales y adquieren una mayor capacidad migratoria favoreciendo la metástasis. Las características asociadas a la TEM se pueden adquirir a través de la exposición de las células tumorales a señales autócrinas o parácrinas que reciben de los diversos tipos de células y componentes que conforman el microambiente tumoral, dichas señales no son unidireccionales por lo que se establece una comunicación entre el componente mesenquimatoso y el epitelial dentro del tumor (Young H. *et al.*, 2001a; Young H *et al.*, 2001b).

En los últimos años se ha reportado que las MSC pueden promover la TEM en las células tumorales a través de la producción de factores solubles tales como IL-6, IL-8, FGF, EGF, IGF-1, HGF, CCL-5 y principalmente TGF- $\beta$  (Kalluri R. & Weinberg R., 2009).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se reportó que en co-cultivos de células tumorales de cuello uterino CaSki con MSC-CaCu, se induce un incremento de 4 veces la expresión de TGF- $\beta$ 1 lo que sugiere que la presencia de MSC-CaCu en el microambiente tumoral del CaCu, podría aumentar el contenido de TGF- $\beta$  extracelular que se encuentra en el estroma invasivo del CaCu (García-Rocha R. *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha documentado que el TGF- $\beta$  es un potente inductor de la TEM y que los niveles extracelulares de dicha citocina aumentan en etapas avanzadas del CaCu (Qureshi R. *et al.*, 2015).

Se ha observado que, al co-cultivar células tumorales de cáncer colorrectal en contacto con MSC derivadas de médula ósea que expresan TGF- $\beta$  unido a membrana se induce la TEM en las células tumorales, lo cual se comprobó al observar un aumento en la expresión de Snail, Slug, ZEB, cadherina-N, disminución en la expresión de cadherina-E y la adquisición de un fenotipo mesenquimal (Mele V. *et al.*, 2014).

Con base en estos antecedentes, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar la capacidad de MSC-CaCu para inducir cambios asociados con la TEM en células tumorales

de CaCu y si el TGF- $\beta$  producido por las MSC-CaCu juega un papel importante en este proceso.

### **Hipótesis**

Las MSC-CaCu participan en la inducción de la TEM en células tumorales de CaCu a través de la producción de TGF- $\beta$ .

### **Objetivos**

#### **General:**

Analizar la capacidad de MSC-CaCu para inducir la TEM en células tumorales de CaCu a través de la producción de TGF- $\beta$ .

#### **Específicos:**

1. Analizar el efecto de TGF- $\beta$  en la inducción de la TEM en células tumorales de CaCu.
2. Obtener medios condicionados de MSC-CaCu y evaluar los contenidos de TGF- $\beta$  en cultivos de células tumorales de CaCu.
3. Analizar el efecto de medios condicionados de MSC-CaCu en la migración, expresión de Snail 1, Twist 1 y vimentina en células tumorales de CaCu.

### **Estrategia experimental**

#### **Objetivo 1. Analizar el efecto de TGF- $\beta$ en la inducción de la TEM en células tumorales de CaCu.**

Debido a que la TEM es un evento raro *in vitro* (Brown K. *et al.*, 2004), es decir, que no todas las líneas celulares son capaces de recapitular el fenómeno, el primer enfoque fue identificar líneas celulares de CaCu que nos permitan estudiar la TEM inducida por TGF- $\beta$ , para ello se utilizaron 8 líneas celulares de CaCu: dos negativas a VPH (C33A y VIBO),

dos positivas para VPH-16 (CaSki y SiHa), y cuatro positivas para VPH-18 (HeLa, ROVA, VIPA y MS751) las cuales fueron incubadas en medio RPMI suplementado con 0.5% de SFB bajo dos condiciones, en ausencia (control negativo) o en presencia de 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 recombinante humano (rh-TGF- $\beta$ 1).

Para evaluar la inducción de la TEM en las células tumorales de CaCu se realizaron ensayos de migración celular mediante la técnica de cierre de herida para lo cual, se cultivaron 100,000 células tumorales en placas de 6 pozos en las condiciones mencionadas anteriormente y la migración celular se evaluó durante 72 h. Las células tratadas fueron analizadas para la expresión de marcadores de la TEM cadherina-E y vimentina mediante citometría de flujo.

**Objetivo 2. Obtener medios condicionados de MSC-CaCu y evaluar los contenidos de TGF- $\beta$  en cultivos de células tumorales de CaCu.**

Posteriormente se realizaron cultivos de células tumorales de CaCu en placas de 6 pozos durante 72 h con medios condicionados provenientes de muestras de MSC-CaCu y de MSC-CN, utilizados como control, para analizar la producción de TGF- $\beta$  mediante la técnica de ELISA.

**Objetivo 3. Analizar el efecto de medios condicionados de MSC-CaCu en la migración, expresión de Snail 1, Twist 1 y vimentina en células tumorales de CaCu.**

Las células tumorales de CaCu en placas de 6 pozos durante 72 h bajo las siguientes condiciones: medio RPMI (control basal), 20 ng/ml de rh-TGF- $\beta$ 1 (control positivo), y con medios condicionados provenientes de MSC-CaCu y MSC-CN solos o con 10  $\mu$ g/ml de anti-TGF- $\beta$ . Bajo dichas condiciones se determinó la expresión de vimentina mediante citometría de flujo y la capacidad migratoria mediante ensayo de herida.

## **Metodología**

### **Condiciones de cultivo de las líneas celulares de CaCu**

Las células tumorales de CaCu se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 de Gibco (Life Technologies, USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies) 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y mantenidas en condiciones de esterilidad en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente de humedad saturante.

Características de las líneas celulares que muestran cambios característicos de la TEM: SiHa (ATCC HTB-35, HPV-16<sup>+</sup> obtenidas de neoplasia intraepitelial cervical grado) y ROVA (HPV-18<sup>+</sup> obtenidas de carcinoma de células escamosas en estadio IV-A).

### **Condiciones de cultivo de las Células Estromales Mesenquimales (MSC)**

Se utilizaron dos muestras de MSC de tumores de CaCu (MSC-CaCu) y dos de tejido cervical sano (MSC-CN) previamente obtenidas y caracterizadas por nuestro grupo de investigación con base en los parámetros morfológicos, fenotípicos y de diferenciación establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Montesinos J. *et al.*, 2013). Las MSC fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa suplementado con 5mM de L-glutamina y 15% de SFB (Gibco, USA).

### **Ensayo de Herida**

Se sembraron 100,000 células de cada línea celular en placas de 6 pozos con medio RPMI suplementado al 10% de SFB, una vez que llegaron a una confluencia de ~ 80%, se cambió el medio de cultivo a RPMI suplementado con 0.5 % de SFB para disminuir al mínimo la tasa de proliferación y se dejó con dicho medio durante 24 h. Posteriormente, con una punta estéril de 200µl, se raspó la monocapa de células para generar una herida, se lavó con PBS1X y se tomaron fotografías de la misma área cada 24h durante 72h para cada condición, con reemplazo de los medios de cultivo cada vez. Las fotografías se obtuvieron en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL con la cámara AxioCam ERc 5s a un

aumento de 10 X. El área de la herida se analizó con el software Zen 2 de Zeiss obteniendo el área para graficar el porcentaje de cierre.

### **Citometría de flujo**

Para analizar la expresión de cadherina-E después de las 72 horas de estímulo, las células se lavaron y despegaron de la placa de cultivo, se fijaron con formaldehído al 2% en PBS durante 10 minutos, se lavaron y se bloquearon con SFB durante 30 minutos a 4°C, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo mouse anti cadherina-E (Novus bio Cat:7H12) a una dilución 1:100 durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG- FITC (Sigma Cat: F5262) a una dilución 1:250 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron y finalmente se fijaron con 400 µl de una solución de PBS con formaldehído al 1%.

Para analizar la expresión de vimentina, después de las 72 horas de estímulo, las células se lavaron y despegaron de la placa de cultivo, se fijaron con formaldehído al 2% durante 10 minutos, se lavaron y posteriormente se permeabilizaron con saponina al 0.03 % en PBS, se lavaron y después se bloquearon con SFB durante 30 minutos a 4°C, se lavaron y posteriormente se incubaron con el anticuerpo rabbit anti-vimentina marcado con Alexa Fluor® 594 a una dilución 1:100 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron y finalmente, las células se fijaron con 400 µl de una solución de formaldehído al 1%.

La citometría de flujo se realizó adquiriendo 10,000 eventos en el citómetro FACS Canto (BD) y los datos se analizaron en el software Summit (DAKO) y FlowJo.

### **Obtención de medios condicionados**

Se sembraron 800,000 células MSC en cajas Petri de 100 X 15mm con 10 ml de medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 15 % SFB, se incubaron 24 h para que se adhirieran y después de este tiempo se lavaron y se adicionaron 13 ml de DMEM- bajo en glucosa suplementado con 15 % SFB y se incubaron durante 72 h. Posteriormente se recuperaron los medios condicionados y se añadió RPMI con 0.5 % de SFB en proporción 1:1, se centrifugaron durante 10 minutos a 2,000 rpm y se filtraron con membranas de poro 0.2 µm para guardarlos a -80 °C hasta su uso.

## **Cuantificación de TGF- $\beta$ 1 por ELISA**

Se sembraron 100,00 células tumorales de CaCu SiHa y ROVA y 100,00 células de cada muestra de MSC-CN y MSC-CaCu en placas de 6 pozos, a la par se sembraron 100,00 células tumorales de CaCu SiHa y ROVA las cuales fueron incubadas con medios condicionados de MSC durante 72 h. De cada condición se colectó sobrenadante para determinar la concentración de TGF- $\beta$ 1 mediante la técnica de ELISA de acuerdo con el procedimiento establecido por el proveedor (R&D). Para ello, primero se fijó el anticuerpo de captura en una placa de 69 pozos de fondo plano (Corning, NY, USA) durante toda la noche, al día siguiente se lavó la placa 4 veces con 300  $\mu$ l de amortiguador de lavado compuesto de 0.05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) en PBS. Posteriormente se bloqueó con 300  $\mu$ l de solución amortiguadora compuesta de 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich), y se incubó por 1 h, se lavó la placa y se adicionó el anticuerpo estándar y los sobrenadantes de los cultivos, incubando por 2 h, al término de este tiempo nuevamente se lavó la placa, se adicionó el anticuerpo de detección y se incubó por 2 h. Después de lavar la placa, se adicionó avidina-HRP conjugada y se incubó durante 30 min. La placa se lavó 3 veces y se adicionó el sustrato, se incubó 30 minutos, y finalmente, la cuantificación se realizó en un lector para placas EPOCH (BioTek Instruments, Inc. Winooski, USA) a 450 nm con una corrección de 540 nm. Esta corrección se realizó con la finalidad de eliminar variaciones en la lectura provocadas por las imperfecciones ópticas en la placa. Las lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección pueden ser más altas y menos precisas.

## **Extracción de RNA**

Después de 72 h de cultivo de las líneas celulares de CaCu con medios condicionados de MSC, se realizó la extracción de RNA con el uso de trizol (Invitrogen, California, USA.), se disolvió en 15  $\mu$ l de agua DEPC (Invitrogen) y posteriormente se cuantificó en EPOCH (BioTek Instruments, Inc. Winooski, USA), se utilizaron las muestras cuya pureza fuera igual o mayor a 1.8 de acuerdo al parámetro 260/280. La absorbancia máxima de los ácidos nucleicos es de 260 nm y la de la mayoría de las proteínas es de 280 nm. La relación 260/280 se utiliza como una medida de pureza en las extracciones de DNA y RNA. Una

muestra cuya relación de 260/280 sea mayor a 1.8 se acepta generalmente como pura (Wilfinger W. *et al.*, 1997).

### qRT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa es una técnica que permite analizar la expresión genética de manera cuantitativa. La técnica consta de dos pasos: el primer paso es la retro transcripción de las copias de RNA de una muestra para obtener cDNA (RT-PCR) y el segundo paso es la PCR en tiempo real, en donde se cuantifica en número de copias de cDNA de dicha muestra.

### RT-PCR

Para llevar a cabo la reacción de la retrotranscripción (RT) se utilizó el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, California, USA) utilizando 500 ng de RNA como templado siguiendo las condiciones que se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Mezcla de reacción para la retrotranscripción.**

COMPONENTE	VOLUMEN POR REACCIÓN	
	REACCIÓN RT (+)	REACCIÓN RT (-)
2X RT Buffer Mix	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
20X RT Enzyme Mix	1 $\mu$ l	-
Muestra de RNA	< a 9 $\mu$ l (suficiente para 500 ng)	< a 9 $\mu$ l (suficiente para 500 ng)
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Lo necesario para llevar a 20 $\mu$ l	Lo necesario para llevar a 20 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

La reacción de retrotranscripción para obtener cDNA se realizó en el termocilador (TC1000-G Dragon Laboratory Instruments, Beijing), de acuerdo a las instrucciones del fabricante como lo muestra la tabla 3.

**Tabla 3. Programa para RT-PCR**

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Temperatura	37 °C	95 °C	4 °C
Tiempo	60 min	5 min	∞

**PCR en tiempo real**

En los cDNAs obtenidos se analizó la expresión de 2 genes por PCR en tiempo real o cuantitativo (qRT-PCR) utilizando como control endógeno el gen de H6PD, las secuencias de los iniciadores, el amplicón y las temperaturas de alineamiento se muestran en la Tabla 4. Todas las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un equipo Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), siguiendo el protocolo de *LightCycler 480 Probe Master* (Roche Diagnostic). Al final se obtuvo el Ct para cuantificar la expresión relativa de los genes de interés con respecto al gen de referencia H6PD. El Ct (ciclo umbral) es el punto en el que la curva de reacción comienza su fase exponencial. Los valores de C<sub>t</sub> son inversos a la cantidad de ácido nucleico que está en la muestra, y se correlacionan con la cantidad de copias en la muestra.

**Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos para amplificar genes involucrados en la TEM mediante qRT-PCR**

Marcador	Primer	Tamaño	Posición	Tm	%GC	Secuencia	Sonda
<i>SNAIL 1</i>	Left	21	147 - 167	59	52	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA	# 11
	Right	18	213 - 230	60	61	ATCTCCGGAGGTGGGATG	
<i>TWIST 1</i>	Left	25	1352 - 1376	59	40	GGCATCACTATGGACTTTCTCTATT	# 6
	Right	21	1426 - 1446	60	48	GGCCAGTTTGATCCCAGTATT	
<i>H6PD</i>	Left	20	1373 - 1392	59	55	GCTACGCTCGGATCTTGTTTC	# 40
	Right	18	1415 - 1432	59	56	CCCAGTGCTTTTCGCTCT	

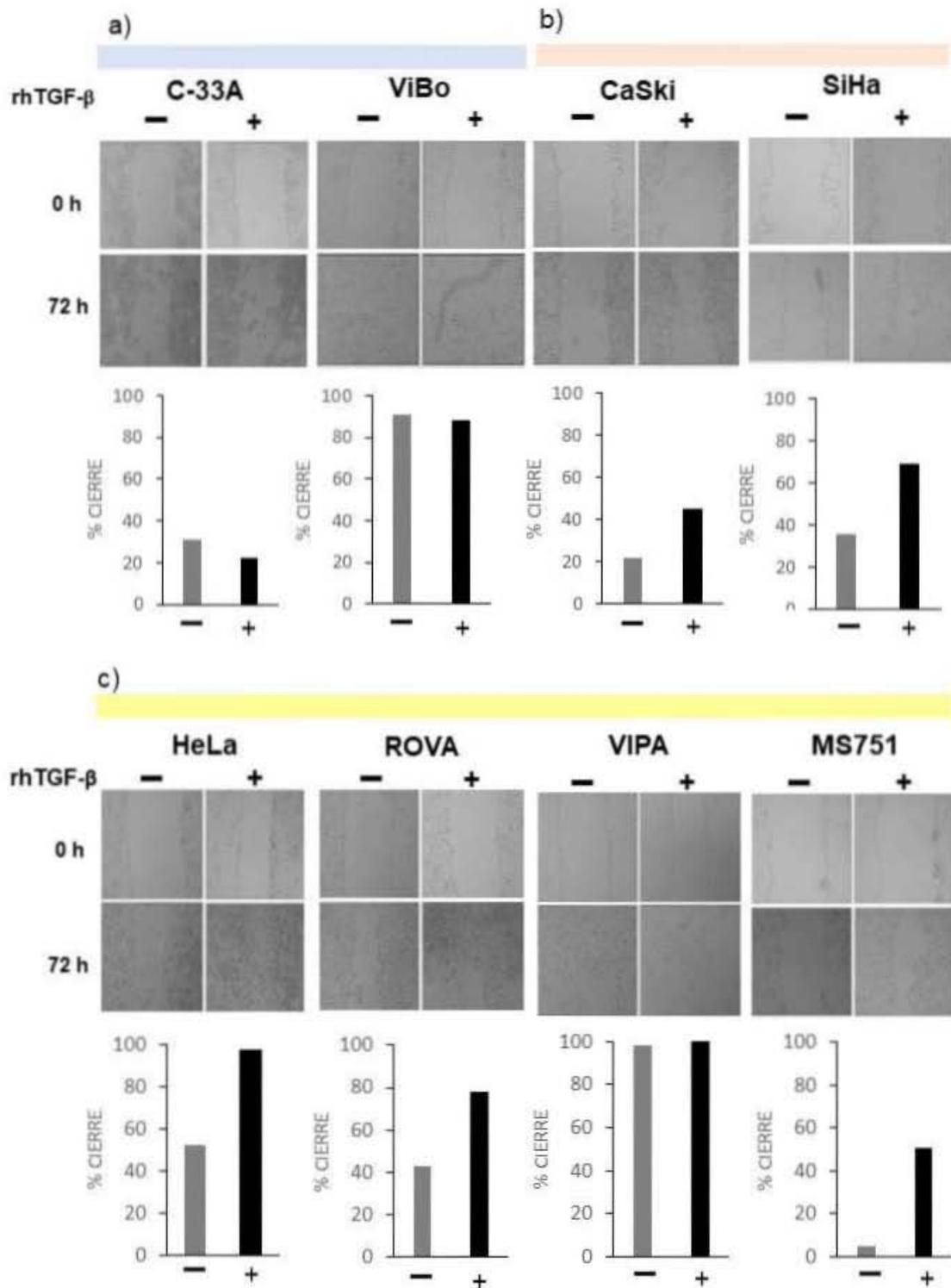
## **Análisis estadísticos**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de los experimentos realizados por duplicado. Se realizó la prueba de análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar si existen diferencias entre las medias. Se utilizó como prueba post hoc la prueba t de Student para comparar entre dos condiciones utilizando el software GraphPad Prism, versión 7.0. Los valores de P se representan de la siguiente manera:  $\leq 0.05$  por un asterisco \*,  $\leq 0.01$  por dos asteriscos \*\* y  $\leq 0.001$  por tres asteriscos \*\*\*.

## **Resultados**

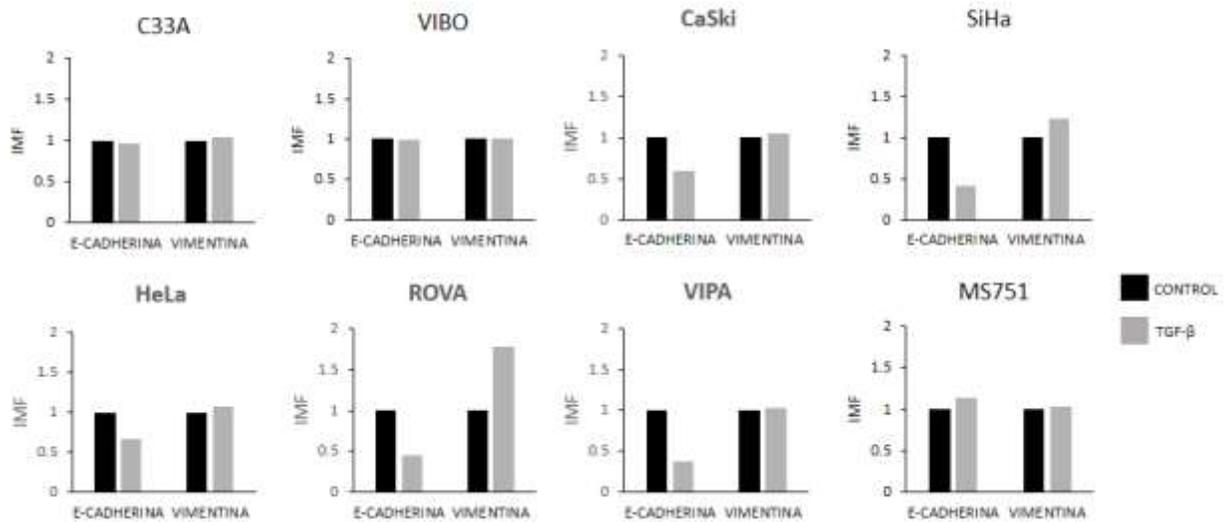
### **TGF- $\beta$ induce cambios asociados con la TEM en células tumorales de CaCu**

La adquisición de una mayor capacidad migratoria, así como de cambios fenotípicos que incluyen la disminución de moléculas de adhesión celular como la cadherina-E, y la adquisición de marcadores mesenquimales como vimentina, son rasgos característicos de la TEM en las células tumorales (Xie L. *et al.*, 2004). El primer enfoque de nuestro estudio fue identificar la capacidad de TGF- $\beta$  para inducir estos cambios en células tumorales de CaCu. Para ello, se utilizaron 8 líneas celulares de CaCu: dos VPH negativas (C33A y VIBO), dos positivas para VPH-16 (CaSki y SiHa), y cuatro positivas para VPH-18 (HeLa, ROVA, VIPA y MS751), las cuales fueron cultivadas *in vitro*, en ausencia (control negativo) o presencia de 10ng/ml de TGF- $\beta$ 1 recombinante humano (rh-TGF- $\beta$ 1). El tratamiento de las células tumorales de CaCu con rh-TGF- $\beta$ 1 indujo incremento en la capacidad migratoria en las líneas celulares CaSki, SiHa, HeLa, ROVA y MS751 a través de la técnica denominada cierre de herida (Figuras 6 a, b y c). Es importante resaltar que rh-TGF- $\beta$ 1 indujo la mayor capacidad migratoria en las líneas SiHa (70%) (Figura 6 b), HeLa (90%) y ROVA (80%) (Figura 6 c). Sin embargo, el tratamiento con rh-TGF- $\beta$ 1 no modificó la capacidad migratoria de las líneas celulares C33A (Figura 6 a) y VIPA (Figura 6 b) que presentaron de manera basal la menor y mayor capacidad migratoria, respectivamente.



**Figura 6. Ensayo de cierre de herida en células tumorales de CaCu.** Microfotografías de las líneas celulares de CaCu a) VPH<sup>-</sup> C33A y ViBo; b) VPH<sup>16+</sup> CaSki y SiHa; y c) VPH<sup>18+</sup> HeLa, ROVA, VIPA, MS751 cultivadas durante 72 h con medio RPMI suplementado con 0.5 % de SFB en presencia (+) o ausencia (-) de 10 ng/ml de TGF- $\beta$ . Microfotografías en aumento 10 X. En la parte inferior de las microfotografías se muestra gráficamente el porcentaje de cierre de herida, el cual se determinó con software Zen 2 al término del cultivo celular como se describe en los métodos. Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

De manera interesante, las líneas celulares que presentaron la mayor capacidad migratoria; CaSki, SiHa, HeLa y ROVA, también mostraron disminución en la expresión de cadherina-E respecto a su expresión basal cuando fueron cultivadas en presencia de rh-TGF- $\beta$ 1 (Figura 7). Es importante hacer notar que los cambios característicos de la TEM como el aumento de la migración, disminución de cadherina-E y aumento de vimentina, cuando se adiciona rh-TGF- $\beta$ 1 en las líneas celulares SiHa y ROVA cultivadas en presencia de rh-TGF- $\beta$ 1, por lo que se utilizaron estas líneas celulares en los estudios posteriores.

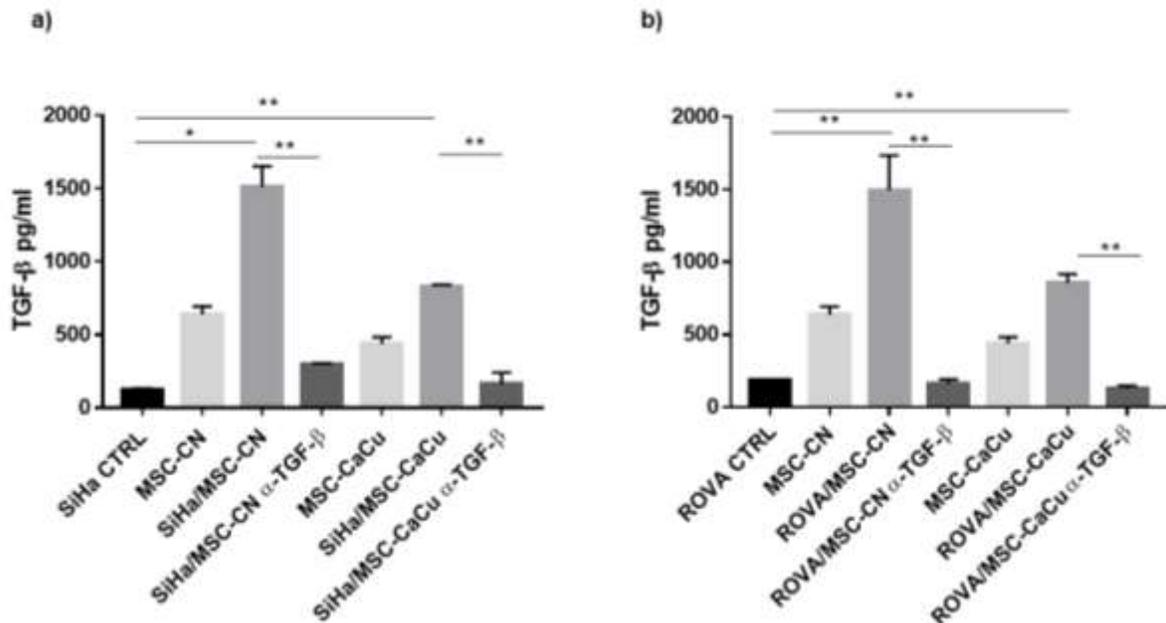


**Figura 7. Efecto del TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de cadherina-E y vimentina en células tumorales de CaCu.** Células tumorales de CaCu: C33A, VIBO, CaSki, SiHa, HeLa, ROVA, VIPA y MS751 fueron cultivadas durante 72 h en ausencia (barras en color negro) o presencia (barras en color gris) de 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1. Posteriormente se determinó la expresión de cadherina-E y vimentina mediante citometría de flujo. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) normalizada contra el control. Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

## **Los medios condicionados de MSC inducen incremento en la producción de TGF- $\beta$ 1 en células tumorales de CaCu**

Las células epiteliales pueden segregar TGF- $\beta$  de una manera autócrina, pero con frecuencia, son las células del microambiente las que proporcionan una mayor cantidad de TGF-  $\beta$  de forma parácrina.

En estudios previos, nuestro grupo de trabajo observó que células tumorales CaSki incrementan la producción de TGF- $\beta$ 1 cuando son co-cultivadas con MSC-CaCu, sugiriendo que factores producidos por las MSC promueven la producción de este factor (García-Rocha R., 2015). En el presente trabajo se analizó el efecto de medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu en la producción de TGF- $\beta$  en el cultivo de las líneas celulares SiHa y ROVA. Para este propósito, las células SiHa y ROVA fueron cultivadas durante 72 h en presencia de medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu, al término de la incubación se analizó la concentración de TGF- $\beta$  en los sobrenadantes. Como se muestra en la figura 8, para ambas líneas celulares se incrementó de manera significativa la concentración de TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de los cultivos celulares. La concentración media basal de TGF- $\beta$  en el cultivo de las células SiHa fue de 126.86 pg/ml (Figura 8 a) y en ROVA de 187.83 pg/ml (Figura 8 b). En presencia de los medios condicionados de MSC-CN o de MSC-CaCu, los contenidos de TGF- $\beta$  en las células SiHa incrementaron hasta 1509.03 pg/ml y 831.13 pg/ml, respectivamente (Figura 8a); mientras que en los cultivos de ROVA los contenidos incrementaron hasta 1444.96 pg/ml y 847.73 pg/ml, respectivamente (Figura 8b). Es importante mencionar que las concentraciones medias basales de TGF- $\beta$  de la dilución 1:1 con RPMI de los sobrenadantes de MSC-CN y MSC-CaCu fueron de 637.49 pg/ml y 438.90 pg/ml respectivamente, dichos medios condicionados se utilizaron en ensayos posteriores. Con base en los resultados obtenidos, la adición de medios condicionados de MSC-CN a los cultivos de las líneas celulares incrementó de manera significativa la producción de TGF  $\beta$  para SiHa ( $P < 0.01$ ) y ROVA ( $p < 0.05$ ) y la adición de medios condicionados de MSC-CaCu para SiHa ( $P < 0.01$ ) y en ROVA ( $p < 0.01$ ). De manera interesante, la adición de anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$  al inicio de los cultivos, bloqueó en más de 80% la producción de TGF- $\beta$  en los cultivos de ambas líneas celulares (Figura 8).

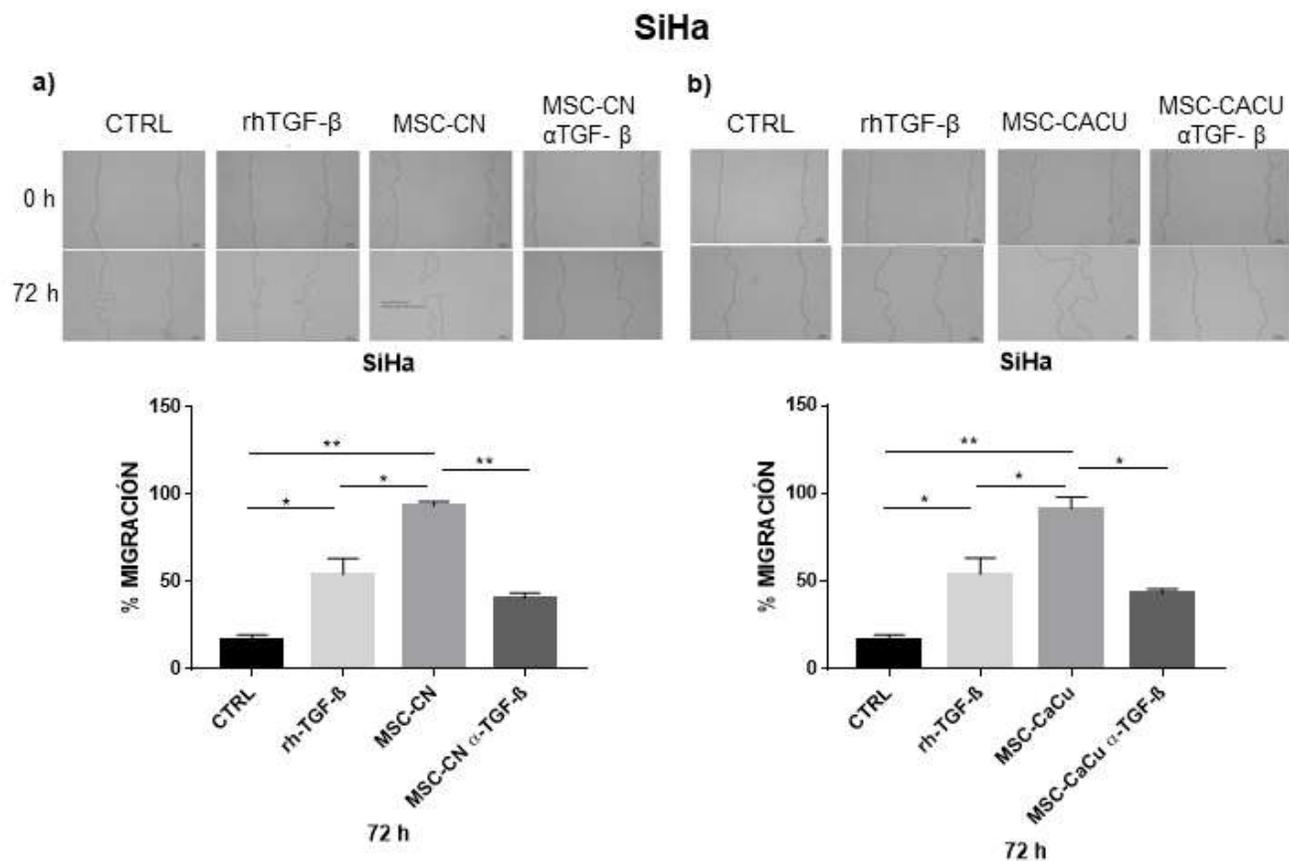


**Figura 8. Medios condicionados de MSC inducen incremento en la concentración de TGF-β en cultivos de células tumorales de CaCu.** Las células tumorales SiHa a) y ROVA b) fueron cultivadas durante 72 h en presencia de sobrenadantes de MSC-CN o MSC-CaCu. Se adicionó anticuerpo neutralizante anti-TGF-β para comprobar la eficiencia de bloqueo. Las diferentes condiciones se normalizaron restando la concentración basal de TGF-β de ambas líneas celulares, respectivamente. La concentración de TGF-β se cuantificó mediante la técnica de ELISA. DE de dos ensayos realizados. P < 0.05 \*, P < 0.01\*\*.

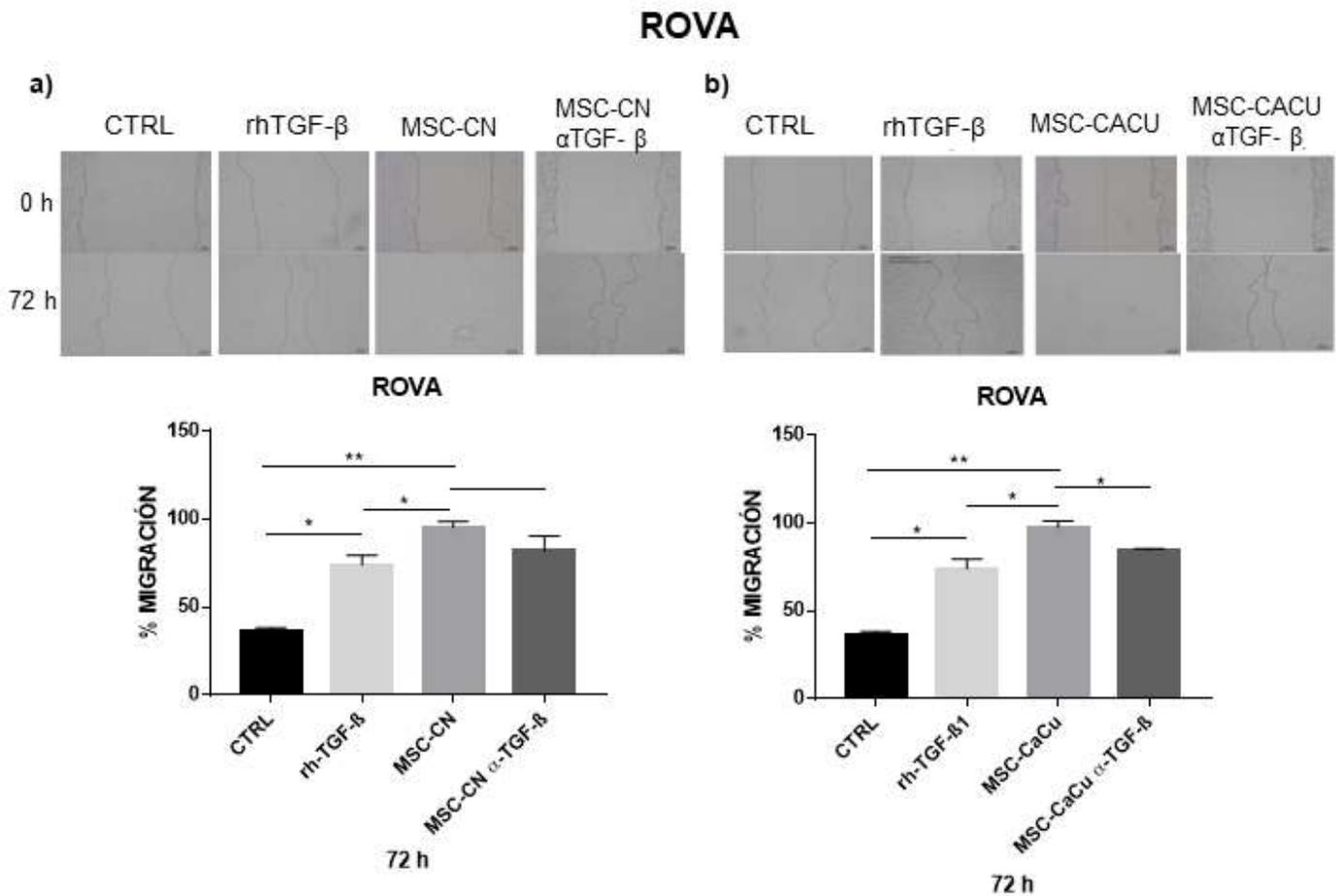
### **Las células tumorales de CaCu cultivadas en presencia de medios condicionados de MSC incrementan su capacidad migratoria**

Está documentado que el TGF-β es un potente inductor de la TEM y favorece la capacidad migratoria de células tumorales (Qureshi R. *et al.*, 2015). Tomando en consideración que los cultivos de SiHa y ROVA en presencia de los medios condicionados de MSC incrementaron la producción de TGF-β, se procedió a analizar si bajo estas condiciones las células tumorales incrementan también su capacidad migratoria. De manera interesante, los sobrenadantes de MSC-CN y MSC-CaCu incrementaron significativamente la capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu. En la línea celular SiHa se observó un incremento en el porcentaje de cierre de la herida de 77.3 % y 75.1 % con los sobrenadantes de MSC-CN y MSC-CaCu, respectivamente (Figuras 9a y 9b); mientras que en las células ROVA, se observó un incremento de 58.7 % y 60%, respectivamente

(Figuras 10a y 10b). Por otra parte, la adición de rh-TGF- $\beta$ 1 incrementó en aproximadamente 40 % la capacidad migratoria de las células SiHa y ROVA (Figuras 9 y 10). Además, la adición de 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$  redujo significativamente la migración inducida por los medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu. En el caso de la línea celular SiHa el porcentaje de migración se redujo en 56.4 % y 53 % respectivamente y en la línea celular ROVA en 14.2% y 13.4 % lo cual sugiere que los medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu favorecen la capacidad migratoria de las células tumorales SiHa y ROVA, y que TGF- $\beta$  juega un papel importante en este proceso.



**Figura 9. Incremento en la capacidad migratoria de las células SiHa en presencia de medios condicionados de MSC.** Células SiHa fueron cultivadas en ausencia o presencia de 20 ng/ml de rh-TGF- $\beta$ 1, y con medios condicionados de MSC-CN (a) y MSC-CaCu (b) durante 72 h y mediante ensayo de herida se analizó la migración. Microfotografías representativas de una muestra de MSC-CN y una de MSC-CaCu. En las gráficas se representa el porcentaje de cierre en cada tiempo  $\pm$  la DE de dos ensayos realizados por duplicado.



**Figura 10. Incremento en la capacidad migratoria de las células ROVA en presencia de medios condicionados de MSC.** Células ROVA fueron cultivadas durante 72 h en ausencia o presencia de 20 ng/ml de rh-TGF- $\beta$ 1, y con medios condicionados de MSC-CN (a) y MSC-CaCu (b). Mediante ensayo de herida se analizó la migración a las 72 h. Microfotografías representativas de una muestra de MSC-CN y una de MSC-CaCu. En las gráficas se representa el porcentaje de cierre en cada tiempo  $\pm$  la DE de dos ensayos realizados por duplicado.

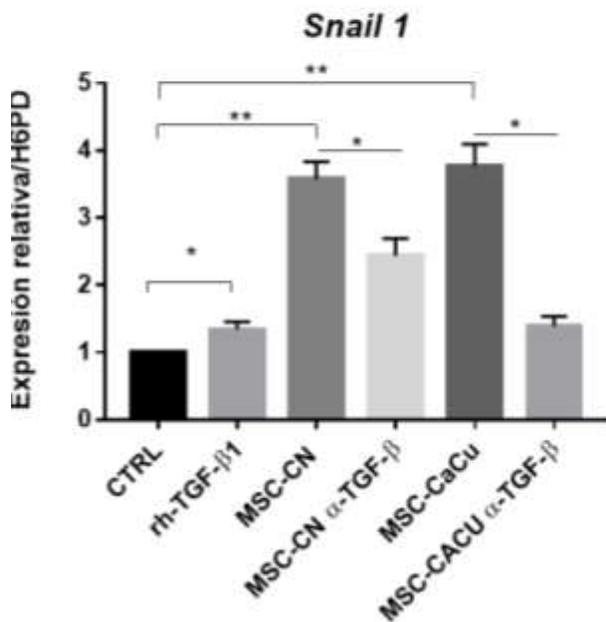
### Los medios condicionados de las MSC inducen incremento en la expresión de los factores de transcripción Snail 1 y Twist 1 en células tumorales de CaCu

Durante la TEM ocurre la activación de genes maestros como Snail, Twist y ZEB, los cuales reprimen la transcripción de genes que codifican para proteínas que se expresan en epitelios, como cadherina-E, Claudina, Ocludina e inducen la transcripción de genes mesenquimales como vimentina, cadherina-N, fibronectina etc. (Papageorgis P. *et al.* 2015). En el presente trabajo se analizó si la expresión de Snail 1 y Twist 1 es modificada en células tumorales de CaCu cultivadas con medios condicionados de MSC-CN y MSC-

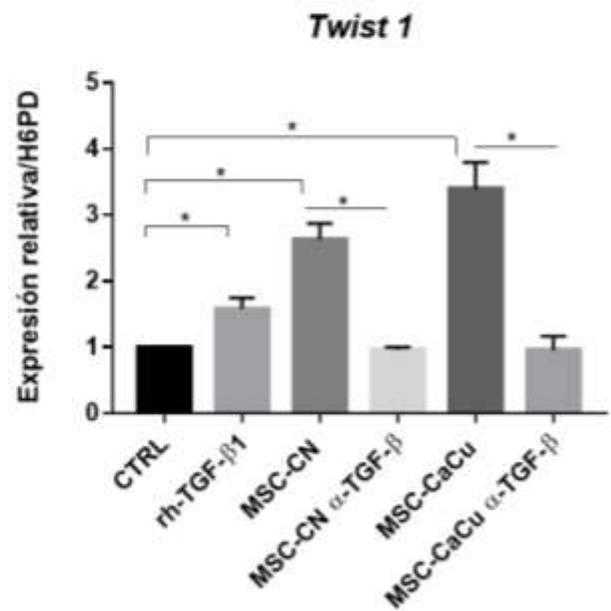
CaCu. Con este propósito, las líneas celulares SiHa y ROVA fueron cultivadas durante 72 h con medios condicionados, posteriormente se analizó mediante qRT-PCR la expresión relativa de Snail 1 y Twist 1. Para la línea celular SiHa cultivada con medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu se observó un incremento de Snail 1 de 3.6 y 3.8 veces respectivamente, respecto a la expresión basal de este factor (Figura 11 A); mientras que Twist 1 aumentó su expresión de 2.6 y 3.4 veces, en presencia de los respectivos medios condicionados (Figura 11 B). En el caso de en la línea celular ROVA cultivada con medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu, Snail 1 aumentó su expresión al de 2.3 y 2.5 veces respectivamente (Figura 12 A) y Twist 1 aumento de 3.1 y 3.6 veces, respectivamente (Figura 12 B) al comparar con la expresión basal. Cuando ambas líneas celulares fueron cultivadas con medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu, superaron al efecto ejercido por rh-TGF- $\beta$ 1 utilizado como control positivo. La adición de anti-TGF- $\beta$  revirtió significativamente ( $P < 0.5$ ) entre el 31.8 % y 89.8 % el efecto de los medios condicionados en la expresión de los factores de transcripción Snail 1 y Twist 1 para ambas líneas celulares. Estos resultados sugieren que el TGF- $\beta$  de las células tumorales SiHa y ROVA cultivadas con medios condicionados de las MSC-CN y MSC-CaCu juega un papel importante en la inducción de la expresión de factores de transcripción maestros de la TEM, tal como se ha demostrado previamente por Li, Y. *et al.*, 2014. Lo cual permite sugerir que la presencia de MSC en el microambiente tumoral de CaCu puede favorecer la TEM en las células tumorales a través de la producción de TGF- $\beta$ .

## SiHa

a)



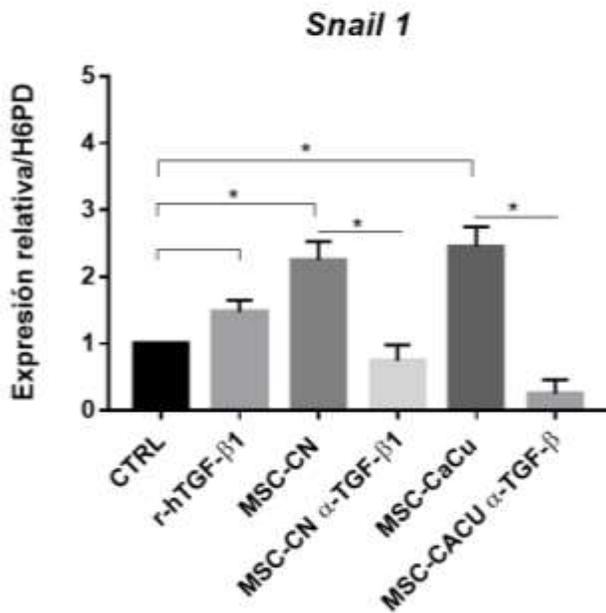
b)



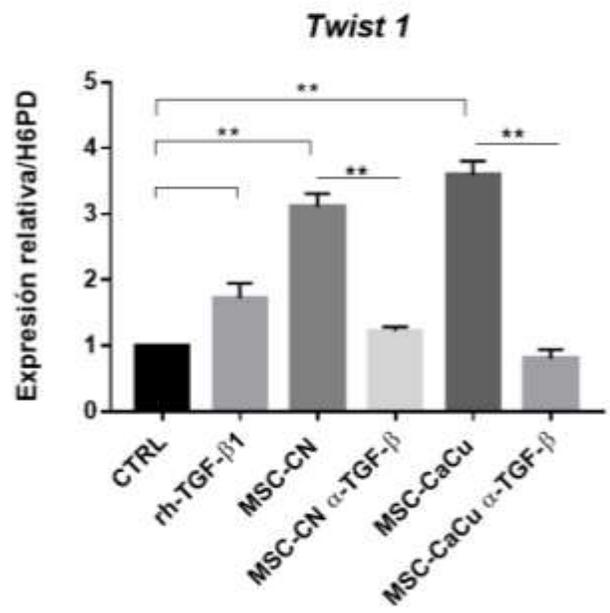
**Figura 11. Inducción de la expresión de Snail 1 y Twist 1 en la línea celular SiHa con medios condicionados de MSC.** Las células SiHa fueron cultivadas durante 72 h en presencia de 20 ng/ ml de rh-TGF-β1 o medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu. Se añadieron 10 µg/ml de anticuerpo neutralizante anti-TGF-β (α TGF-β). La expresión de los factores de transcripción Snail 1 (a) y Twist 1 (b) se determinó mediante qRT-PCR. El rh-TGF-β1 induce un aumento en la expresión de Snail 1 y de Twist 1, sin embargo, con los sobrenadantes el incremento fue aún mayor, la adición de anti-TGF-β inhibió el efecto de dicha citocina ya que se observó una disminución de la expresión tanto de Snail 1 como de Twist 1. Se muestra la expresión relativa al control comparada con el gen endógeno H6PD ± DE de dos ensayos P ≤0.05 \* y P≤0.01\*\*.

## ROVA

a)



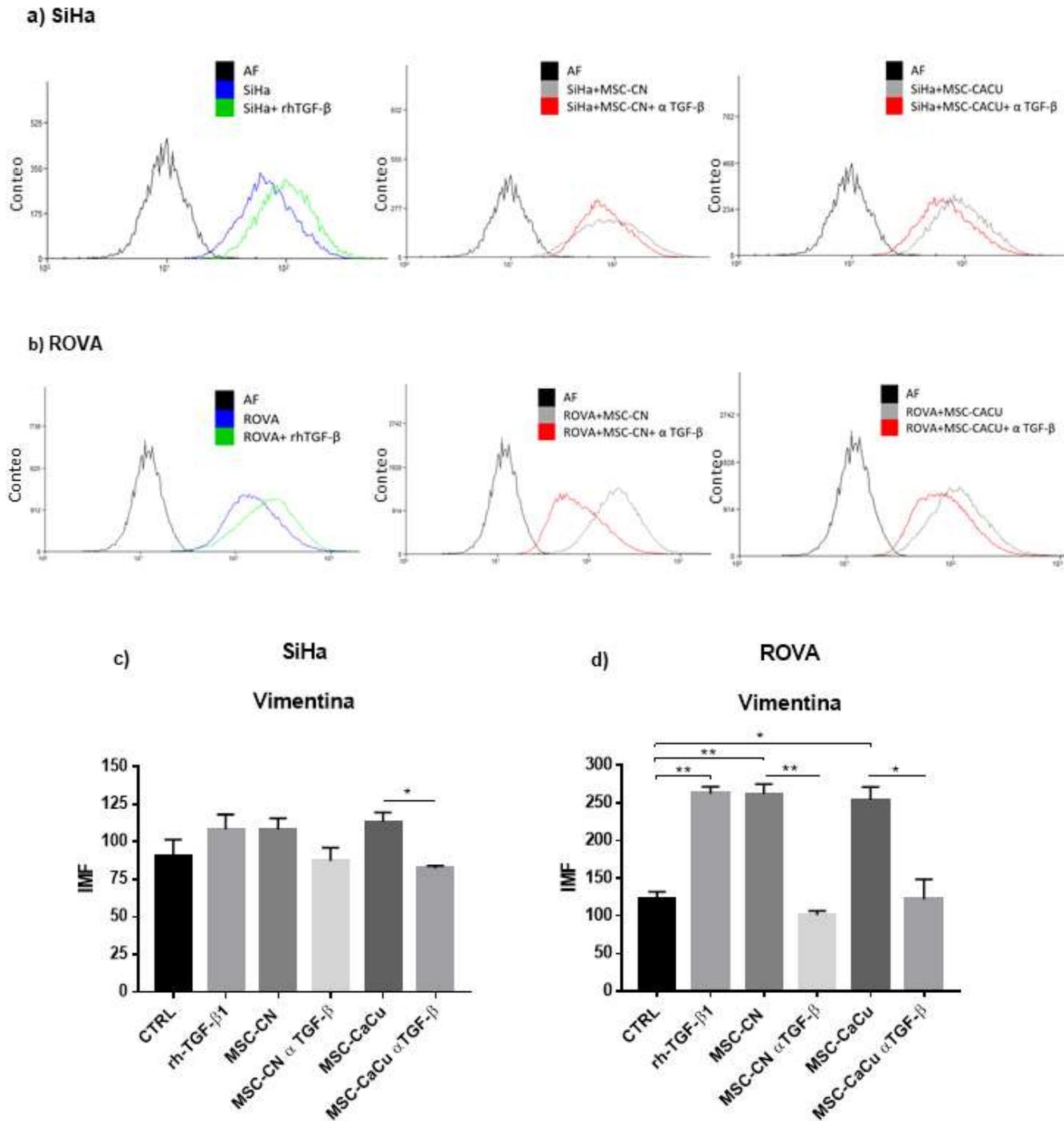
b)



**Figura 12. Las MSC inducen cambios en la expresión de Snail 1 y Twist 1 en la línea celular de CaCu ROVA.** Las células ROVA fueron cultivadas durante 72 h en presencia de 20 ng/ml de rh-TGF-β1, medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu o 10 μg/ml de anticuerpo neutralizante anti-TGF-β (α-TGF-β). La expresión de los factores de transcripción Snail 1 (a) y Twist 1 (b) se determinó mediante qRT-PCR. El Rh-TGF-β1 indujo un aumento en la expresión de Snail 1 y de Twist 1 pero el incremento es aún mayor al cultivar la línea celular con medios condicionados, la adición de anti-TGF-β junto con los medios condicionados, inhibió el efecto de dicha citocina favoreciendo la disminución de la expresión de ambos factores de transcripción. Se muestra la expresión relativa al control comparada con el gen endógeno H6PD ± DE de dos ensayos P ≤ 0.05 \*, P ≤ 0.01\*\*.

### **Los medios condicionados de las MSC inducen incremento en la expresión de vimentina en células tumorales de CaCu**

Con la finalidad de indagar si el incremento en la expresión de los factores de transcripción Snail 1 y Twist 1 observado en las líneas celulares SiHa y ROVA cultivadas con medios condicionados de las MSC, repercute en la expresión de algún marcador de tipo mesenquimal en las células tumorales de CaCu, se analizó la expresión de vimentina en ambas líneas celulares cultivadas con medios condicionados. En la línea celular SiHa incubada con medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu la expresión de vimentina se incrementó en 20.35 % y 25.91 % respectivamente (Figuras 13a y 13c), sin embargo dicho aumento no fue significativo respecto a la expresión basal de esta proteína en las células SiHa. En el caso de la línea celular ROVA, la expresión de vimentina aumentó significativamente respecto a la expresión basal, alcanzando un aumento de 113.92% con medios condicionados de MSC-CN y 107.83 % con medios condicionados de MSC-CaCu (Figura 13b y 13d). Cabe mencionar que el cultivo de estas líneas celulares con rh-TGF- $\beta$  incrementó la expresión de vimentina de manera similar a la producida por los medios condicionados de las MSC. Mientras que, la adición del anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$  revirtió el efecto inducido por los sobrenadantes de las MSC en ambas líneas celulares, lo que indica que dicha citocina participa en la regulación de la expresión de vimentina, principalmente en la línea celular ROVA. Con base en dichos resultados se determinó que los medios condicionados de las MSC-CN y MSC-CaCu fueron capaces de inducir cambios asociados con la TEM como el aumento en la migración y en la expresión de Snail 1 y Twist 1 en las líneas celulares SiHa y ROVA, en donde TGF- $\beta$  participa de manera importante.



**Figura 13. Los medios condicionados de MSC inducen incremento en la expresión de vimentina en células tumorales de CaCu.** Las células SiHa y ROVA fueron cultivadas durante 72 h en presencia de medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu, Se utilizó 10  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$  ( $\alpha$  TGF- $\beta$ ), para inhibir el efecto de esta citocina. Se muestran los histogramas representativos del nivel de vimentina detectado mediante citometría en las líneas celulares SiHa (a) y ROVA (b) cultivadas con medio RPMI al 0.5% de SFB (azul), 20 ng/ml de rh-TGF- $\beta$ 1 (verde) o en presencia de medios condicionados de MSC (gris) y medios condicionados en presencia del anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$  (rojo). La autofluorescencia (AF) de cada línea celular es mostrada en negro. (c y d) Gráficas de la intensidad media de fluorescencia  $\pm$  DE del nivel de vimentina de dos ensayos realizados de manera independiente. Las diferencias significativas entre los tratamientos son indicadas como: \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ .

## Discusión

La TEM es un proceso que permite a las células tumorales adquirir una mayor capacidad migratoria favoreciendo la metástasis. Las características asociadas a la TEM se pueden adquirir a través de la exposición de las células tumorales a estímulos provenientes de diversos componentes del microambiente tumoral.

En el presente estudio encontramos que el TGF- $\beta$ 1 producido por MSC-CN y MSC-CaCu participa en la inducción de la TEM en las líneas celulares de CaCu, SiHa y ROVA, observándose en ellas incremento en la expresión de Snail 1, Twist 1 y vimentina, además de incremento en su capacidad migratoria. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Mc Andrews y colaboradores (2015), quienes observaron que MSC inducen migración direccional a través de la señalización de TGF- $\beta$  en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. No obstante, otros estudios han mostrado que las MSC pueden inducir la TEM en células tumorales a través de diversos mecanismos, como lo reportado por Li y colaboradores (2017), quienes describieron que los medios condicionados de MSC de cordón umbilical, tejido adiposo y médula ósea promueven la migración de la línea MDA-MB-231 al regular la fosforilación de receptores de insulina. En otro estudio de cáncer de próstata, empleando un modelo murino, se observó que las MSC se integran en el estroma tumoral y se convierten en fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y secretan CXCL12, la cual induce la TEM y promueve la metástasis tumoral a distancia (Jung Y *et al.*, 2013). Asimismo, en cáncer de páncreas se observó que las MSC inducen TEM en las células tumorales a través de la activación de la vía Notch mediante la producción de Jagged-1 (Kabashima-Niibe A. *et al.*, 2013). En el caso particular del CaCu, se ha reportado que los niveles de TGF- $\beta$  en suero y tejidos de cuello uterino de pacientes con diferentes estadios de la enfermedad correlaciona con la gravedad de la lesión (Bermúdez-Morales V *et al.*, 2008). El presente estudio aporta la primera evidencia de que MSC presentes en los tejidos tumorales (MSC-CaCu), pueden participar en la producción de TGF- $\beta$ , el cual participa de manera importante en la inducción de la TEM de las células tumorales de CaCu.

El TGF- $\beta$  es uno de los inductores más potentes de la TEM, las tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) comparten la capacidad de inducir dicho proceso (Miettinen P. *et al.*, 1994; Piek E *et al.*, 1999; Valcourt U *et al.*, 2005), sin embargo, varios reportes coinciden que TGF- $\beta$ 1 tiene el mayor efecto (Moustakas A & Carl-Henrik H, 2016; Yi J *et al.*, 2002). En el presente trabajo identificamos que TGF- $\beta$ 1 presente en los medios condicionados de las MSC y el producido por las células tumorales de CaCu es uno de los factores principales en la inducción de la TEM en las células tumorales de CaCu. De hecho, observamos que la producción de TGF- $\beta$ 1 en los cultivos celulares prácticamente duplicó a la producida de manera basal por las células tumorales y la cantidad contenida en los sobrenadantes de las MSC. La inducción de la producción de TGF- $\beta$ 1 en las células tumorales de CaCu puede deberse a que en los medios condicionados de MSC-CaCu y MSC-CaCu existen factores solubles, tal como IL-10, que pueden promover la producción de TGF- $\beta$  en las células tumorales de CaCu (García-Rocha R. *et al.*, 2015).

Aunque la TEM es un evento que raramente puede producirse *in vitro* (Brown K *et al.*, 2003), el primer enfoque del estudio fue identificar la línea celular que nos permitiera analizar la TEM inducida por TGF- $\beta$ 1 para lo cual 8 líneas celulares de CaCu se cultivaron con rh-TGF- $\beta$ 1 y sólo en las líneas SiHa y ROVA se observaron cambios característicos de la TEM por lo cual se utilizaron en los ensayos posteriores.

Con respecto a la concentración de TGF- $\beta$ 1 en las MSC-CN y MSC-CaCu se observó que fue muy similar en MSC-CN y MSC-CaCu, incluso fue mayor en MSC-CN, hasta el momento se desconoce a qué se debe ese fenómeno, sería importante analizar el perfil de citocinas para conocer las diferencias o similitudes entre MSC-CN y MSC-CaCu, por otro lado, a pesar de que *in vivo* las dos fuentes de MSC indujeron efectos similares, es posible que *in vivo* haya una mayor cantidad de MSC-CaCu, en este sentido, también hay reportes en donde se ha observado que los efectos inducidos por MSC provenientes de distintas fuentes no difieren (Li P *et al.*, 2017).

En el presente estudio se observaron cambios característicos de la TEM en las células tumorales de CaCu SiHa y ROVA cultivadas en presencia de los medios condicionados de MSC-CN y MSC-CaCu. Tomando en cuenta el TGF- $\beta$  induce la TEM a través de las vías Smads-dependiente y Smads-independiente para activar a los “factores maestros de la

TEM”, tales como Snail, Twist y ZEB, los cuales a su vez reprimen la expresión de genes epiteliales (ej. cadherina-E) y activan la expresión de genes mesenquimales (ej. vimentina) (Peinado H. *et al.* 2007; Fan Q. *et al.*, 2015), y que la concentración de TGF- $\beta$ 1 fue incrementada sustancialmente en los cultivos de las células SiHa y ROVA, en principio analizamos la expresión de los factores de transcripción Snail 1 y Twist 1 en las células tumorales tratadas con los medios condicionados de las MSC. De manera interesante, encontramos un incremento significativo en la expresión de dichos factores en las células tumorales de CaCu cultivadas con los medios condicionados, el cual fue revertido al adicionar anti-TGF- $\beta$ 1, confirmando el papel de esta citocina en la inducción de la TEM.

Por otro lado, la vimentina es uno de los marcadores ampliamente reportados para el desarrollo de TEM, su expresión está asociada con el potencial invasivo y migratorio en células de CaCu *in vitro* (Gilles C *et al.*, 1996), incluso se ha utilizado como marcador clínico-patológico relacionado con la progresión del carcinoma escamoso de cérvix (Husain N *et al.* 2015). También se ha reportado que el factor de transcripción Twist1 induce la expresión de genes mesenquimales, como vimentina (Lv N. *et al.*, 2016; Fan Q. *et al.*, 2015). Por esa razón analizamos la expresión de vimentina en las líneas celulares SiHa y ROVA y observamos que su expresión incrementó significativamente, principalmente en la línea celular ROVA. De hecho, la línea celular ROVA que fue aislada que de un tumor en estadio clínico IV-A, expresó mayores niveles de vimentina y fue más inducible a incrementar esta proteína en presencia de los medios condicionados de las MSC-CN y MSC-CaCu, lo cual va acorde con el hecho de que la expresión de esta proteína incrementa con el grado de avance de la enfermedad. Aunado a estos cambios fenotípicos, también observamos que las células tumorales cultivadas en presencia de los medios condicionados de las MSC-CN y MSC-CaCu incrementaron significativamente su capacidad migratoria, e incluso en mayor proporción que la inducida por rh-TGF- $\beta$ 1, lo cual sugiere que otros factores promotores de la TEM, como IL-6, EGF y HGF, puedan estar contenidos en los medios condicionados de las MSC-CaCu y MSC-CN (Corcoran K. *et al.*, 2008; Kalluri R. & Weinberg R., 2009).

En general, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los reportados en cáncer de mama, donde se observó que MSC obtenidas de tejido adiposo humano co-cultivadas con MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) inducen la activación de la TEM

en células MCF-7 a través de TGF- $\beta$ 1 (Xu Q. *et al.* 2012); y en células de melanoma cultivadas con medios condicionados de MSC obtenidas de médula ósea adquirieron una morfología mesenquimal y expresaron marcadores específicos de TEM, como cadherina-N, vimentina,  $\alpha$ -SMA y los factores de transcripción Snail y Slug a través de la señalización de TGF- $\beta$ , lo cual se comprobó al inhibir el efecto de esta citocina con un péptido denominado P17, el cual impide que TGF- $\beta$  se una a su receptor (Laurenzana A. *et al.*, 2015). Estos estudios en conjunto revelan que en condiciones de contacto célula-célula o a través de factores solubles, como lo observado en este estudio, las MSC ejercen un efecto importante en la inducción de la TEM en las células tumorales. Además el TGF- $\beta$  secretado o anclado a la superficie de las MSC (Mele V. *et al.*, 2014) es uno de los principales factores promotores de la TEM.

Finalmente, es importante tomar en cuenta que en nuestro estudio, al utilizar las líneas celulares SIHA (VPH-16<sup>+</sup>) y ROVA (VPH-18<sup>+</sup>), la presencia de algunas oncoproteínas virales pueden favorecer la aparición de características asociadas a la TEM. Por ejemplo, se ha reportado que en estudios *in vitro*, la oncoproteína viral E5 de VPH-16 y 18 desempeña un papel en la promoción de la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de cuello uterino SiHa y HeLa (Shujie L *et al.*, 2013). También la oncoproteína E6 de VPH-16 induce la migración de las líneas celulares de CaCu SiHa y CaSki al aumentar la expresión de uPA (YCL Au *et al.*, 2011); mientras que en el caso de VPH-18, E6 induce la expresión de eIF4E, importante para promover la proliferación y migración de la línea celular HeLa (Wang S *et al.*, 2013).

Por tanto, la persistencia de la infección de genotipos de VPH de alto riesgo, asociados con la presencia de MSC y la producción de altos niveles de TGF- $\beta$  a nivel tisular, pueden ser indicativos de un pronóstico desfavorable al promover cambios asociados con la TEM en las células tumorales de CaCu.

## **Conclusiones**

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que las MSC-CN y MSC-CaCu son capaces de inducir cambios fenotípicos y funcionales asociados a la TEM, tales como la inducción en la expresión de Snail 1 y Twist 1, aumento en el nivel de vimentina y aumento en la capacidad migratoria en células tumorales de CaCu (SiHa y ROVA) a través de la producción de TGF- $\beta$ . Lo cual sugiere que la presencia de MSC en el microambiente tumoral puede participar en la inducción de la TEM en las células tumorales y promover su capacidad metastásica a través de la producción de factores solubles como el TGF- $\beta$ .

## **Perspectivas**

Realizar un ensayo de Milliplex para determinar qué otras citocinas liberadas por MSC- CN y MSC-CaCu son capaces de inducir la TEM actuando en colaboración con TGF- $\beta$ .

Realizar ensayos de invasión en cámaras transwell con matrigel para investigar si las células tumorales de CaCu cultivadas con medios condicionados de las MSC aumentan su capacidad invasiva.

Analizar una mayor cantidad de marcadores de TEM, como cadherina-N, y factores de transcripción como ZEB.

Realizar un ensayo *in vivo* en un modelo murino para determinar si los sobrenadantes de las MSC favorecen la metástasis.

## LITERATURA CITADA

Ao M., Franco O., Park D., Raman D., Williams K., & Hayward S. 2007. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res* 67 (9): 4244–4253.

Angadi P. & Kale A. 2015. Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. *Indian J Health Sci Biomed Res* 8 (2): 77-84.

Baksh D., Song L. & Tuan R. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 3 (8):301-316.

Balkwill F., Capasso M., & Hagemann T. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 23):5591–6.

Barrière G., Tartary M., & Rigaud M. 2013. Metformin: A rising star to fight the epithelial Mesenchymal transition in oncology. *Anticancer Agents Med Chem* 13 (2): 333–340.

Bergfeld S. & DeClerck Y. 2010. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29 (2)249–261.

Bermudez-Morales V., Gutierrez L., Alcocer-Gonzalez J., Bргуete A., Madrid-Marina V. 2008. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest* 26 (10):1037–1043.

Bierie B., & Moses, H. 2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (7) 506–520.

Burger G., Danen E. & Beltman J. 2017. Deciphering Epithelial–Mesenchymal Transition Regulatory Networks in Cancer through Computational Approaches. *Front. Oncol* 3 (7) :162.

Bussard K., Mutkus L., Stumpf K., Gomez-Manzano K. & Marini F. 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* (2016) 18:84.

Brown K., Aakre M., Gorska A., Price J., Eltom S., Pietenpol J., & Moses H. 2004. Induction by transforming growth factor-β1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res* 6 (3):215-231

Castro-Manreza M., Fajardo-Orduña G., Monroy-García A. y Montesinos J. Células troncales Mesenquimales: Potencial Terapéutico (Capítulo 21, pp:233-257). En Células Troncales Biología y Aplicaciones en la Biomedicina. Editores: Chávez-González

María Antonieta, Chimal-Monroy Jesus, Flores-Figueroa Eugenia, Lama Mónica. Editado por: Universidad Nacional Autónoma de México. Primera Edición, mayo 2017.

Cao H., Xu H., Qian W., Zhu Y., Yan H. & Zhou. 2009. Mesenchymal stem cell- like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett* 274 (1) 61–7.

Caplan A. & Correa D. 2011. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9(1):11–15.

Castellanos-Morales M. 2003. Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Rev Fac Med UNAM* 46 (2): 64-66.

Chambers A., Groom A. & MacDonald I. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2 (8):563–572.

Choi J., Kim S., Seong C., Sim J., Lee H. & Do K. 2000 Recurrent uterine cervical carcinoma: spectrum of imaging findings. *Korean J Radiol* 1 (4):198-207.

Comerci J., Runowicz C., Flanders, K., De Victoria C., Fields A., Kadish A. & Goldberg G. 1996. Altered expression of transforming growth factor-beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer* 77 (6): 1107–1114.

Corcoran K., Trzaska K., Fernandes H., Bryan M., Taborga M., Srinivas V., Packman K., Patel P. & Rameshwar P. 2008. Mesenchymal stemcells in early entry of breast cancer into bone marrow, *PLoS ONE* 3 (6): e2563.

Coronel-Martínez J., Rivera-Rubí L., Azuara-Forcelledo H. & Floriano-Sánchez. E. 2014. Tratamiento en cáncer cervicouterino localmente avanzado. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4):67-70

Dai X., Tan Y., Cai S., Xiong X., Wang L., Ye Q., Yan X., Ma K. & Cai L. 2011. The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 15(6):1299-309.

David P., & Müller I. 2015. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Possible Culprits in Solid Tumors?. *Stem Cells Int* (2005):1-11.

Derynck R. & Zhang Y. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958):577–584.

Diaz-Martin J., Diaz-Lopez A., Moreno-Bueno G., Castilla M., Rosa- Rosa J., Cano A. & Palacios J. 2014. A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. *J Pathol* 232 (3):319-329.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. & Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4): 315-317.

Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I., Stoler M., Broker T. & Stanley M. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 20 (5): 55-70.

Duarte-Franco E., & Franco E. 2004. Cancer of the Uterine Cervix. *BMC Women's Health* 4 (S1): 1-10.

Evander M., Edlund K., Gustafsson A., Jonsson M., Karlsson R., Rylander E. & Wadell G. 1995. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J. Infect Dis* 171 (4): 1026–1030.

Fan Q., Qiu M., Zhu Z., Zhou J., Chen L., Zhou Y., Gu W., Wang L., Li Z., Xu Y., Cheng W., Wu D. & Bao W. 2015. Twist induces epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinogenesis by regulating the TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. *Oncol Rep* 34(4):1787-94.

Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J., Comber H., Forman D. & Bray F. 2012. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49(6):1374-403.

Forman D., de Martel C., Lacey C., Soerjomataram I., Lortet-Tieulent J., Bruni L., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Plummer M. & Franceschi S. 2012. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* 30 (5):12-23.

García-Rocha R., Moreno-Lafont M., Mora-García M., Weiss-Steider B., Montesinos J., Piña-Sánchez P., & Monroy-García A. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF- $\beta$ 1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity. *Cytokine* 76 (2): 382–390.

Gavert N., & Ben-Ze'ev, A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* 14 (5):199–209.

GBD 2015. Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388 (10053):1659-1724.

Gibbs C., Kukekov V., Reith J., Tchigrinova O., Suslov O., Scott E., Ghivizzani S., Ignatova T. & Steindler D. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7 (11):967–976.

Gilles C., Polette M., Piette J., Delvigne A., Thompson E., Foidart J. & Birembaut P. 1996. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol* 180(2):175-80.

Goldstein R., Reagan M., Anderson K., Kaplan D. & Rosenblatt M. 2010. Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis. *Cancer Res* 70 (24):10044–10050.

Gregory P., Bert A., Paterson E., Barry S., Tsykin A., Farshid G., Vadas M., Khew-Goodall Y. & Goodall G. 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10(5) 593–601.

Hass R. & Otte A. 2012. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun Signal* 10(1):26.

Hidalgo-Martínez A. 2006. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed* 17:81-84.

Hiratsuka S., Nakamura K., Iwai S., Murakami M., Itoh T., Kijima H., Shipley J., Senior R. & Shibuya M. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2(4): 289–300.

Hiratsuka S., Watanabe A., Sakurai Y., Akashi-Takamura S., Ishibashi S., Miyake K., Shibuya M., Akira S., Aburatani H. & Maru Y. 2008. The S100A8-serum amyloid A3–TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 10 (11): 1349–1355.

Husain N., Babiker A., Albutti A., Alsahli M., Aly S., & Rahmani A. 2016. Clinicopathological Significance of Vimentin and Cytokeratin Protein in the Genesis of Squamous Cell Carcinoma of Cervix. *Obstet Gynecol Int* (2016): ID 8790120.

Ijaz T., Eifel P., Burke T. & Oswald M. 1998. Radiation therapy of pelvic recurrence after radical hysterectomy for cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 70 (2):241-6.

Jing Y., Han Z, Zhang S., Liu Y. & Wei L. 2011. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci* (31):1-29.

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

Jung Y., Kim J., Shiozawa Y., Wang J., Mishra A., Joseph J., Berry J., McGee S., Lee E., Sun H., Wang J., Jin T., Zhang H., Dai J., Krebsbach P., Keller E., Pienta K., & Taichman R. 2013. Recruitment of Mesenchymal Stem Cells Into Prostate Tumors Promotes Metastasis *Nat Commun.* 4: 1795.

Kabashima-Niibe A., Higuchi H., Takaishi H., Masugi Y., Matsuzaki Y., Mabuchi Y., Funakoshi S., Adachi M., Hamamoto Y., Kawachi S., Aiura K., Kitagawa Y., Sakamoto M. & Hibi T. 2013. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci* 104 (2):157–164.

Kalluri R. & Weinberg R. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119 (6):1420-1428.

Kidd S., Spaeth E., Watson K., Burks J., Lu H., Klopp A., Andreeff M. & Marin F. 2012. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One* 7(2):e30563.

Kojima Y., Acar A., Eaton E., Mellody K., Scheel C., Ben-Porath I., Onder T., Wang Z., Richardson A., Weinberg R. & Orimo A. 2010. Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 107(46): 20009–20014.

Kong W., Yang H., He L., Zhao J., Coppola D., Dalton W. & Cheng J. 2008. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 28(22):6773-84.

Lamouille S., Xu J. & Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(3):178-96.

Lee M., Chou C., & Tang, M. 2008. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cervical Cancer: Correlation with Tumor Progression, Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression, and Snail Up-Regulation. *Clin Cancer Res* 14(15): 4743–4751.

Li P., Zhou H., Di G., Liu J., Liu Y., Wang Z., Sun Y., Duan H., & Sun J. 2017. Mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes MDA-MB-231 cell migration and inhibits A549 cell migration by regulating insulin receptor and human epidermal growth factor receptor 3 phosphorylation. *Oncol Lett* 13(3): 1581-1586.

Li Y., Zhao Q., Fan L., Wang L., Tan B., Leng Y., Liu Y. & Wang D. 2014. Zinc finger protein expression in gastric cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol* 20 (48):18346–18353.

Liu Y., Han Z., Zhang S., Jing Y., Bu X., Wang C., Sun K., Jiang G., Zhao X., Li R., Gao L., Zhao Q., Wu M. & Wei L. 2011. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem* 286(28):25007-15.

Lv N., Shan Z., Gao Y., Guan H., Fan C., Wang H. & Teng W. 2016. Twist1 regulates the epithelial-mesenchymal transition via the NF-kappaB pathway in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine* 51(3):469–77.

Martin F., Dwyer R., Kelly J., Khan S., Murphy J., Curran C., Miller N., Hennessy E., Dockery P., Barry F., O'Brien T. & Kerin M. 2010. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 124 (2): 317–326.

McAllister S. & Weinberg R. 2014. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 16 (8):717-27.

McAndrews K., McGrail D., Ravikumar N., & Dawson M. 2015. Mesenchymal Stem Cells Induce directional migration of invasive breast cancer cells through TGF- $\beta$ . *Sci Rep* 20 (5):16941

McLean K., Gong Y., Choi Y., Deng N., Yang K., Bai S., Cabrera L., Keller E., McCauley L., Cho K. & Buckanovich R. 2011. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J. Clin. Invest* 121 (8) 3206– 3219.

Mele V., Muraro M., Calabrese D., Pfaff D., Amatruda N., Amicarella F., Kvinlaug B., Bocelli-Tyndall C., Martin I., Resink T., Heberer M., Oertli D., Terracciano L., Spagnoli G. & Iezzi G. 2014. Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- $\beta$ . *Int J Cancer* 134(11):2583-2594.

Melzer C., Yang Y., Hass R. 2016. Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Commun Signal* 14(1):20

Miao J., Liu L. & Huang J. 2014. Interleukin-6-induced epithelial-mesenchymal transition through signal transducer and activator of transcription 3 in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 45 (1):165–176.

Miettinen P., Ebner R., Lopez A. & Derynck R. 1994. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127(6pt2): 2021-36.

Montesinos J., Mora-García M., Mayani H., Flores-Figueroa E., García-Rocha R., Fajardo-Orduña G., Castro-Manreza M., Weiss-Steider B. & Monroy-García A. 2013. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells Dev* 22 (18) 2508–2519.

Moustakas A. & Carl-Henrik H. 2016. Mechanisms of TGFβ-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition *J. Clin Med* 5 (7): 63.

Muñoz N. Bosch F., de Sanjosé S., Herrero R., Castellsagué X., Shah K., Snijders P., & Meijer C. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348 (6):518-27.

Nieto M. & Cano A. 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* 22(6):361-368.

Papageorgis P. 2015. TGF-β Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *J Oncol* 2015 (2015): 587193.

Parkin D., Pisani P., & Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *Cancer J Clin* 49 (1): 33-64.

Pecorelli S. 2009. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 105(2):107-108.

Peinado H., Olmeda D. & Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7(6):415-28.

Peiritti M., Zapardiel I., Zanagnolo V., Landoni Morrow C. & Maggioni A. 2012. Management of recurrent cervical cancer: a review of the literature. *Surg Oncol* 21(2): e59-66.

Piek E., Moustakas A., Kurisaki A., Heldin C., & ten Dijke P. TGF-b type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112:4557-4568.

Pittenger M., Mackay A., Beck S., Jaiswal R., Douglas R., Mosca J., Moorman M., Simonetti D., Craig S. & Marshak D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.

Qureshi R., Arora H. & Rizvi M. 2015. EMT in cervical cancer: Its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Lett* 356 (2):321-331.

Rattigan Y., Hsu J., Mishra P., Glod J., Banerjee D. 2010. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp Cell Res* 316: 3417–3424.

Rhee K., Lee J. & Eom Y. 2015. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. *Int J Mol Sci* 16(12):30015-33.

Shujie L., Deng D., Zhang W., Hu X., Wang W., Wang H., Lu Y., Wang S., Meng L. & Ma D. 2013. Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and accelerates tumor growth in vivo. *Oncol Rep* 29 (1): 95-102.

Simcock B. 2007. Invasive cancer of cervix. Obstetrics. *Gyn & Reproductive Med* 17(6):181–187.

Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. 2008. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15 (10):730–738.

SSA, 2002, Programa de Acción: Cáncer Cérvico Uterino. Primera Edición. Impreso y hecho en México ISBN 970-721045-1

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

Tindle R. 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2 (1): 59-65.

Uccelli A., Moretta L. & Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immuno* 8(9):726-36.

Valcourt U., Kowanetz M., Niimi H., Heldin C. & Moustakas A. 2005. TGF- $\beta$  and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 16(4):1987-2002.

van Roy F & Berx G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65(23):3756-88.

Wang S., Pang T., Gao M., Kang H., Ding W., Sun X., Zhao Y., Zhu W., Tang X., Yao Y. & Hua X. HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. *FEBS Lett* 587 (6): 690–697.

Wilfinger W., Mackey K & Chomczynski Piotr. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques* 22 (3):

474-48.

Wrzesinski S., Wan Y., & Flavell R. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13 (18 Pt. 1): 5262-5270.

Wulling M., Delling G. & Kaiser E. 2003. The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol* 34 (10) 983-993.

Xie L. Brian K., Anna M., Brown C. Aakre M., & Moses H. 2004. Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- $\beta$ 1-Induced EMT In Vitro. *Neoplasia* 6 (5): 603 – 610.

Xu F., Zhang J., Hu G., Liu L. & Liang W. 2017. Hypoxia and TGF- $\beta$ 1 induced PLOD2 expression improve the migration and invasion of cervical cancer cells by promoting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and focal adhesion formation. *Cancer Cell Int* 2017 12; 17:54

Xu J., Lamouille S. & Derynck R. 2009. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19 (2):156-72.

Xu Q., Wang L., Li H., Han Q., Li J., Qu X., Huang S. & Zhao R. 2012. Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- $\beta$ . *Int J Oncol* 41(3):959-68.

Yeung C., Tsang T., Yau P. & Kwok T. 2011. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene* 30(21):2401-10.

Yi J., Hur K., Lee E., Jin Y., Arteaga C. & Son Y. 2002. TGF $\beta$ 1 -mediated epithelial to mesenchymal transition is accompanied by invasion in the SiHa cell line. *Eur J Cell Biol* 81: 457-468.

a)Young H., Duplaa C., Young T., Floyd J., Reeves M., Davis K., Mancini G., Eaton M., Hill J., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Parikh A., Groom J., Hudson J. & Black A. 2001. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec* 263 (4): 350–360.

b)Young H., Steele T., Bray R., Hudson J., Floyd J., Hawkins K., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Duenzl M., Lucas P. & Black A. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264 (1): 51–62

Zavadil J., Narasimhan M., Blumenberg M., Schneider R.. 2007. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs* 185(1-3):157-61.

Zhang J., Tian X. & Xing J. 2016. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- $\beta$ , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J Clin Med* (4): E41.

zur Hausen H. 1977. Human papillomaviruses & their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 78:1–30.

## **PÁGINAS CITADAS**

American Cancer Society. Cervical cancer: survival rates by stage. <http://www.cancer.org/Cancer/CervicalCancer/DetailedGuide/cervical-cancer-survival>, 2014.

International Agency for Research on Cancer and Cancer Research UK. World Cancer Factsheet. <http://www.globocan.iarc.fr> Cancer Research UK, 2012

OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>, 2017.