



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental
Zaragoza**

(UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Inmunobiología

**Análisis del papel antagonista de la cafeína en la inmunosupresión
de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales
Mesenquimales de Cáncer Cérvico-uterino (CEM-CaCu) a través de
la vía Adenosinérgica.**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Navarro Romero Ramón Gilberto

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA

ASESOR INTERNO

Dra. MARIA DE LOURDES MORA GARCÍA



México, D.F. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **NAVARRO ROMERO RAMÓN GILBERTO**, con número de cuenta **304291377**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **23** del mes de **abril** de 2013 a las **16:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE BIÓL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA

VOCAL DR. ALBERTO MONROY GARCÍA*

SECRETARIO DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SUPLENTE BIÓL. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Análisis del papel antagonista de la cafeína en la inmunosupresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales de Cáncer Cérvico-uterino (CEM-CaCu) a través de la vía Adenosinérgica.**

Opción de titulación: tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
México, D.F., a 2 de abril de 2013.

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VG BC
Dr. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
JEFE DE CARRERA

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **UNAM** clave del proyecto IN223010 “Análisis funcional de la vía CD73 como mecanismo inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de neoplasias cervicales” y proyecto IN217013 “Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

El presente trabajo también recibió apoyo financiero de los proyectos de investigación: **FIS/IMSS/PROT/800** y **FIS/IMSS/PROT/G11-2/1014**

AGRADECIMIENTOS

Existen muchas personas a las que quiero agradecer, muchas personas que han dejado algo en mí y que eso que dejaron fue suficiente para impulsarme para la realización de este trabajo.

Me gustaría empezar agradeciendo a mis padres, Guadalupe Romero y Edgardo Navarro y a mis dos hermanos Brenda Navarro Romero y Edgardo Navarro Romero. Es esencial decir que sin ellos este logro no habría existido, me han apoyado en tantas formas y sé que lo seguirán haciendo, y en verdad no tengo manera de expresar toda la gratitud, más que plasmando su nombre en este trabajo y haciendo una puntual dedicatoria hacia ellos.

Me es imprescindible agradecer a la FES Zaragoza, UNAM, en donde indudablemente conocí a extraordinarias personas que me cambiaron. Una de esas personas y que me acompañó a lo largo del trayecto fue Susana García, a quien no tengo nada más que decir sino que este logro también es suyo, ha estado todo momento a mi lado apoyándome y dándome el coraje necesario para seguir. Te amo, entre otras cosas porque has sido mi motor.

No sería grato si no agradeciera a los maestros que han dejado huella en mi formación. A la Dra. Paty Rivera García, quien además de mi tutora fue un apoyo a lo largo de la carrera. A la Biól. Elvia García Santos quien además de enseñar, siempre tenía buenos consejos y a pesar de su mano dura no dejaba de ser divertida. A la Dra. Alejandrina Ávila Ortiz que, en aquel ya lejano, segundo semestre nos demostró que si intentábamos duro podíamos tener éxito. A Manuel Faustino Rico Berna y Nicté Ramírez Priego, quienes creyeron en un proyecto. Por último y no menos importante, al emblema de calidez humana que la FESZ tiene la suerte de tener, la Biól. María de los Ángeles Galván Villanueva.

En especial al Dr. Alberto Monroy García y la Dra. María de Lourdes Mora García, quienes me permitieron formar parte de su grupo de trabajo. Al Dr. Jorge Hernández Montes quien siempre tuvo el tiempo para ayudarnos y compartir con nosotros su conocimiento. A esos primeros maestros que tuve en el laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ, Selene, Azucena, Ivonne, Vianey, Paco, Arturo y Luis quienes siempre tenían consejos y experiencias que contar. A Brenda, Sofía y Toño quienes llegaron a darle un nuevo toque de diversión al laboratorio. A mi buen y estimado Carlos, con quien compartí gran parte de la carrea y a quien siempre podía recurrir.

A los integrantes del laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO Rosario, Nancy, Berenice, Carmina y Omar quienes me recibieron de la mejor manera y haciéndome sentir siempre cómodo, gracias.

A todos esas personas que siempre tendré presente por lo extraordinario de su ser como Juan Espinoza “Yets”, en quien creo será un gran ilustrador. Por último a dos grandes amigos Yunuen Rojas y Luis Rey Felipe con los que nunca existía un momento aburrido.

A todos mis amigos que a través del tiempo se han mantenido a mi lado Tovar, Oscar, Rodrigo Poncho, Nuria, Karen, Gris, Yeiker, Chucho, Violeta, Mayte y De Paris. Gracias a todos y cada uno de ustedes.

“...todos los cursos que allí se dan no tienen otra finalidad que el ganar dinero valiéndose del conocimiento de las cosas o conquistar el respeto del mundo mostrando a las gentes lo sabios que son, asuntos que no tienen nada que ver con el descubrimiento de las cosas ocultas a nuestros ojos.”

Dr. Paul de Kruif

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Cáncer	4
Asociación de los virus con el Cáncer	5
VPH y Cáncer	6
Sistema Inmune	8
Sistema inmune y Cáncer	11
Vía Adenosinérgica e Inmunosupresión	12
Células Estromales Mesenquimales (CEMs).....	14
La cafeína como antagonista de la adenosina (Ado).....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Particulares.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
<input type="checkbox"/> Ratones	20
<input type="checkbox"/> Células	20
<input type="checkbox"/> TC-1.....	20
<input type="checkbox"/> CEMs	20
<input type="checkbox"/> Ensayo de citometría de flujo	21
<input type="checkbox"/> Cuantificación de adenosina mediante UPLC.....	21
<input type="checkbox"/> Protección inmunológica	22

□ Administración de Cafeína	22
□ Inoculación de células para inducción de tumores	23
□ Cinética del crecimiento tumoral	24
□ Análisis Estadístico	24
RESULTADOS	25
La cafeína inhibe el crecimiento tumoral inducido por células TC-1 en presencia y ausencia de CEMs	25
La cafeína mejora la protección antitumoral en conjunto con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16.	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	42
BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. GENOMA VIRAL DEL VPH.....	6
FIGURA 2. DESREGULACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN CICLO CELULAR.....	7
FIGURA 3. RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADQUIRIDA.	8
FIGURA 4. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T	10
FIGURA 5. FOSFOHIDRÓLISIS DE NUCLEÓTIDOS ATP Y AMP.....	13
FIGURA 6. EFECTO DE LA ADENOSINA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	15
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD73 EN MEMBRANA DE CEMS-MON	26
FIGURA 8. EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD73 EN MEMBRANA DE CEMS-CXN	27
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD73 EN MEMBRANA DE CEMS-CACU	28
FIGURA 10. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES C57BL/6 (S/INM-S/CAF)	31
FIGURA 11. CINÉTICA DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES C57BL/6 (S/INM-CAF)	32
FIGURA 12. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES C57BL/6 (INM-S/CAF)	34
FIGURA 13. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES C57BL/6 (INM-CAF). .	35
TABLA 1. CONFORMACIÓN DE LOS GRUPOS DE RATONES C57BL/6 Y LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO	23
TABLA 2. ACTIVIDAD FUNCIONAL DE CD73 EN CEMS A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE ADENOSINA	29

ABREVIATURAS

- ❖ **Aminoácido** ----- **a.a.**
- ❖ **Anticuerpo** ----- **Ab**
- ❖ **Ácido Desoxiribonucleico** ----- **ADN**
- ❖ **Adenosina** ----- **Ado**
- ❖ **Antígeno** ----- **Ag**
- ❖ **Adenosin Monofosfato** ----- **AMP**
- ❖ **Adenosin Monofosfato cíclico** ----- **AMPC**
- ❖ **Receptor de Adenosina** ----- **AR**
- ❖ **Ácido Ribonucleico** ----- **ARN**
- ❖ **Adenosin Trifosfato** ----- **ATP**
- ❖ **Cáncer Cérvico-uterino** ----- **CaCu**
- ❖ **Células Estromales Mesenquimales** ----- **CEMs**
- ❖ **Células Estromales Mesenquimales
derivadas de Cáncer Cérvico-uterino** ----- **CEMs-CaCu**
- ❖ **Células Estromales Mesenquimales
derivadas de Cérvix Normal** ----- **CEMs-CxN**
- ❖ **Células Estromales Mesenquimales
derivadas de Médula Ósea** ----- **CEMs-MO**
- ❖ **Célula Presentadora de antígeno** ----- **CPA**
- ❖ **Interleucina 10** ----- **IL-10**
- ❖ **Sociedad Internacional de Terapia Celuar
(siglas en inglés)** ----- **ISCT**
- ❖ **Linfocitos B** ----- **LB**

- ❖ **Linfocitos T ----- LT**
- ❖ **Linfocitos T citotóxicos ----- LTC**
- ❖ **Linfocitos T cooperadores
(helpers) ----- LTh**
- ❖ **LTreg Linfocitos T reguladores ----- LTreg**
- ❖ **Anticuerpo monoclonal ----- mAb**
- ❖ **Complejo Mayor de
Histocompatibilidad ----- MHC**
- ❖ **Organización Mundial de la Salud ----- OMS**
- ❖ **Receptor de Linfocito T ----- TCR**
- ❖ **Vía Intravenosa ----- v.i.**
- ❖ **Vía Oral ----- v.o.**
- ❖ **Virus Papiloma Humano ----- VPH**
- ❖ **Virus Papiloma Humano
Alto Riesgo (High Risk) ----- VPH-HR**

RESUMEN

El Cáncer Cérvico uterino (CaCu) es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como el primer tipo de cáncer 100% atribuible a una infección viral, puesto que algunos tipos de virus del papiloma humano (VPH) denominados de alto riesgo, son los causantes etiológicos de este padecimiento. Aunque la infección por VPH es relevante para la generación de CaCu, otros factores están involucrados en la progresión de la enfermedad, como es la generación de un nicho que favorece el desarrollo de células transformadas, la inhibición y evasión del sistema inmune. Se ha estipulado que la presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs) en el microambiente tumoral, pueden favorecer la proliferación, crecimiento y metástasis tumoral. Nuestro grupo de investigación ha aislado y caracterizado CEMs de tejidos normales y de CaCu encontrando que estas, ejercen efectos inmunosupresores en la proliferación y actividad efectora de linfocitos T citotóxicos (LTC) *in vitro*, además de favorecer el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 (haplotipo H2-D^b) previamente inmunoprotegidos. En estudios previos hemos observado que las CEMs-CaCu, a través de la generación de adenosina (Ado) inhiben la función efectora de LTC, la cual es restaurada por la adición de cafeína. Por tanto en el presente trabajo se analizó la capacidad de cafeína para inhibir el crecimiento tumoral promovido por las CEMs-CaCu. Para ello, grupos de ratones hembra de 6-8 semanas de edad, que fueron protegidos mediante la inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH-16) y otros que no fueron protegidos, fueron inoculados con células tumorales positivas a la expresión de las proteínas E6/E7 de VPH-16 y al haplotipo H2-D^b (células TC-1) tanto en presencia como ausencia de CEMs derivadas de Médula Ósea Normal (MON), Cérvix Normal (CxN) y Cáncer Cérvico-uterino (CaCu), administradas vía i.v. A otros grupos tratados de forma paralela se les suministró cafeína (300µM, v.o). Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con cafeína inhibió en más del 80% el crecimiento tumoral promovido por la co-inoculación de las diferentes CEMs, además de hacer más eficiente la protección inmune proporcionada por el péptido RAHYNIVTF. Se sugiere que la cafeína suministrada a los ratones puede jugar un papel importante en inhibir la actividad inmunosupresora de Ado producida por las CEMs a través de la vía Adenosinérgica en donde CD73 juega un papel importante. Lo cual puede ser considerado en el diseño de estrategias terapéuticas para esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer puede tener múltiples definiciones y descripciones, debido a las diversas causas y tipos que existen. Sin embargo, de manera global puede ser definido como la proliferación anormal y descontrolada de células, causado por diversos cambios en la expresión genética. Este grupo de células descontroladas, llegan a tener la característica de generar metástasis, es decir, de invadir tejidos y órganos distantes al sitio de origen, desregulando las funciones de estos y finalmente causar la muerte del individuo.

Pueden agruparse dentro del cáncer, aquellas enfermedades que poseen alteraciones en la expresión de varios genes, conllevando a la desregulación de la división celular y a su diferenciación. Una característica importante es el potencial de metástasis de estas células y su capacidad de generar resistencia a la inhibición de la proliferación celular por agentes quimioterapéuticos (Ruddon, 2007).

De acuerdo con el tejido y tipo celular en el que se originan, siendo dos grandes grupos principalmente, los carcinomas (epitelios) y los sarcomas (tejido conjuntivo y células musculares) además de las leucemias (células hematopoyéticas). Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos son carcinomas, esto puede ser debido a que las células epiteliales sufren de una mayor proliferación celular al estar en un sistema de estratificación; además de ser el tipo celular que tiene una mayor probabilidad de sufrir lesiones ya sea físicas o químicas, lo cual pueda favorecer al desarrollo del cáncer (Alberts *et al.*, 2002).

Algunos autores como Cairns (1975) denominan al cáncer como “un proceso de microevolución”, ya que se puede observar en esta enfermedad los principios de la mutación y la selección natural que aplican en los procesos evolutivos a gran escala.

Asociación de los virus con el Cáncer

La variación de los tipos de cáncer se puede relacionar de alguna manera con diferentes factores, como la ubicación geográfica y grupo social así como la actividad y hábitos de cada persona (Gariglio y Rangel, 1992). Como antes se mencionó, el denominador común en el cáncer es la desregulación genética, esto atribuido principalmente a factores físicos y químicos. No obstante, en la década de 1950 se observó que extractos libres de células de ratón leucémico podían inducir leucemia o linfosarcoma al ser inoculados en ratones recién nacidos de cepas no leucémicas (Rieber, 1977) lo que llevo al pensamiento de que existía un factor biológico capaz de producir Cáncer, los virus.

La transformación celular mediada por el virus ocurre cuando parte del genoma del virus o el genoma completo, persiste en la célula y por lo regular se integra en la cromatina de la célula infectada. Cuando se trasforma, la célula expresa genes virales ocasionando una infección no productiva y en algunas ocasiones una infección viral productiva. La transformación a nivel genético puede ser explicada por dos grupos de genes, los proto-oncogenes encargados de inducir el crecimiento en las células normales y los genes supresores de tumores, los cuales controlan a los proto-oncogenes. Los proto-oncogenes son normales por así decirlo y cuando mutan, pueden llegar a transformarse en oncogenes C-onc. Los virus de ARN oncogénicos, contienen genes homólogos a C-onc denominados V-onc mientras que los virus de ADN oncogénicos, sólo poseen oncogenes propios, por lo que no existen secuencias homólogas en las células normales (Cann, 2010). Cada grupo de oncogenes asociados a virus de ADN, funciona según su localización celular existiendo aquellos que intervienen en el proceso de transducción celular o aquellos involucrados en el ciclo celular. Este grupo de oncogenes produce una desregulación entre la fase G1 y S del ciclo celular, que es cuando se previene la división celular descontrolada, interactuando con proteínas celulares que de manera normal, regulan negativamente la proliferación celular como es el caso de p53 y pRB.

Para nuestro interés toman un papel fundamental las proteínas E6 y E7, ya que ambas son identificadas como las proteínas oncogénicas del VPH. E6 está conformada por casi 150 a.a. y tiene la característica de poseer un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y su principal función es descrita como el de cooperadora de la proteína E7 para llevar a cabo la transformación celular (**Figura 2**). Al ser una proteína temprana, ayuda a cambiar el microambiente celular propiciando además, el bloqueo de la apoptosis y la alteración de genes celulares mediante diversas interacciones así como una sobre activación de la telomerasa, lo que permite extender la vida celular (Schiffman *et al.*, 2007). La interacción clave que lleva a cabo E6 es con la proteína supresora de tumores p53, ya que E6 inhibe la función de p53 degradándola (Moody and Laimins, 2010).

Por su parte, E7 es una proteína conformada por aproximadamente 100 a.a. y es quien tiene la mayor capacidad transformante uniéndose a pRb, lo que hace que se liberen factores de transcripción involucrados en el proceso de avance de la fase S, por lo que esto conlleva a la replicación (Moody and Laimins, 2010). Esto de manera normal, activaría la apoptosis mediada por p53, sin embargo la proteína E6 colabora, como se menciona antes, en evadir este proceso.

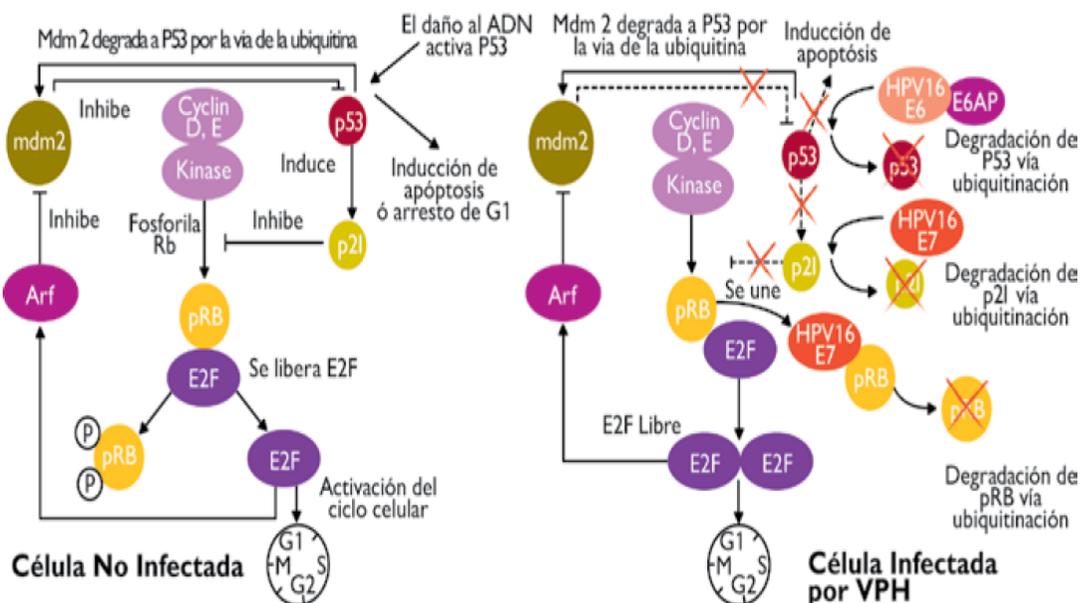


Figura 2. Desregulación de proteínas involucradas en ciclo celular mediadas por las proteínas virales tardías E6 y E7. (Tomado de López y Lizano, 2006)

Sistema Inmune

El organismo posee un repertorio amplio de mecanismos para luchar, en primera instancia contra la infección originada por el virus y dado el caso, contra las células transformadas. A esta serie de mecanismos se le denomina sistema inmune y se le conoce como respuesta inmune a la serie de acciones que se llevan a cabo para combatir la infección así como a la depuración de las células transformadas.

El sistema inmune, puede ser definido como el conjunto de células y moléculas que protegen al cuerpo contra un agente potencialmente dañino, y la importancia de este reside en el hecho que el accionar coordinado y conjunto de estos componentes de la inmunidad genera una eficaz protección. La defensa en contra de estos agentes potencialmente dañinos, es llevada a cabo en una primera fase por la inmunidad innata y posteriormente por la inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata establece las primeras barreras en contra de la infección (barreras físicas y químicas) y realiza los primeros ataques (células fagocíticas, sistema del complemento y células NK) entre otras acciones (**Figura 3**). Cuando la infección logra evadir por alguna circunstancia estas primeras líneas de defensa, como es el caso del VPH, el sistema adaptativo toma lugar para eliminar la infección.

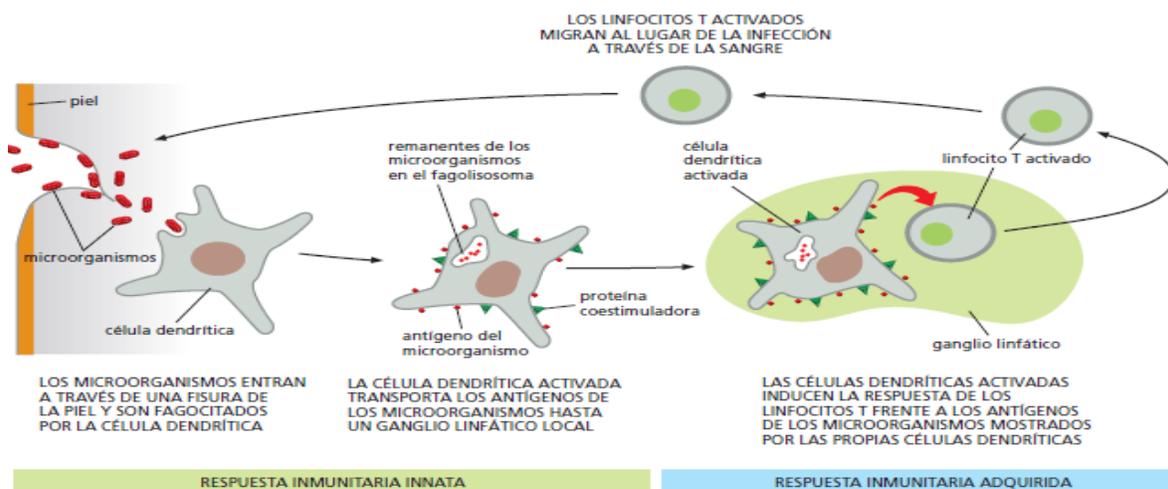


Figura 3. Respuesta inmune innata y adquirida. Se aprecia la vinculación entre ambas cuando la célula dendrítica, presente en inmunidad innata, migra al ganglio linfático para presentar Ag y con esto activar la inmunidad adquirida. (Tomado Alberts., 2002).

Sin embargo, es importante señalar que es necesario el funcionamiento o el reconocimiento por parte de la inmunidad innata para llevar a cabo una mejor respuesta inmune adaptativa (Abbas, 2008). La respuesta inmune adaptativa recibe este nombre ya que surge como respuesta a la exposición hacia una infección y necesita una adaptación para poder sobrellevar dicha infección. Este tipo de inmunidad tiene un alto grado de especificidad hacia una gran variedad de moléculas y está entre sus características el poseer una “memoria inmune”, lo que le permite recordar la exposición hacia un mismo agente infeccioso o ajeno, también conocido como antígeno (Ag) y con esto llevar su eliminación de una manera más efectiva.

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

En particular, los LT juegan un papel importante en la eliminación del cáncer. Su nombre deriva del lugar en donde maduran, el timo y es aquí en donde adquiere la capacidad de expresión del receptor de célula T (TCR), que es una molécula única de unión a antígeno. El TCR sólo tiene la capacidad de reconocer moléculas unidas al MHC (Kindt *et al.*, 2007). Existen dos tipos de MHC, el de clase I se expresa en todas las células y el de clase II lo encontramos principalmente expresado en macrófagos, células dendríticas y LB.

Estos LT al reconocer la molécula, según la clase de los dos tipos de MHC existente, se diferencian a varias clases funcionales de células T, como los CD8+ o linfocitos T citotóxicos (LTC), encargados de la citotoxicidad de células infectadas, sólo se transforman cuando el MHC I presenta dichas moléculas.

Por su parte el MHC II presenta moléculas al tipo CD4+ o linfocitos T cooperadores (LTh), siendo el tipo más flexible de linfocitos T, ya que pueden diferenciarse por distintas vías que generan subpoblaciones con diferentes funciones. Entre los principales están los Th1, Th2 y Th17 y varios subgrupos de linfocitos T reguladores (Treg) (**Figura 4**) que funcionan como inhibidores que limitan el grado de activación de la respuesta inmune (Murphy, 2009; Duffy *et al.*, 2011).

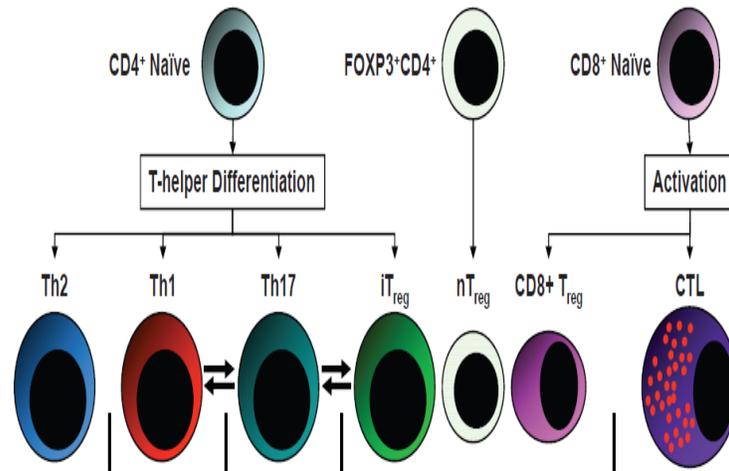


Figura 4. Subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺, CD4⁺ y FOXP3⁺CD4⁺. De todos estos, cuatro tipos (Th2, iTreg, nTreg y CD8⁺ Treg) actúan como mediadores de la respuesta inmune (Tomado de Duffy *et al.*, 2011).

Sistema inmune y Cáncer

Las células transformadas expresan moléculas que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune, tal y como si fuera un agente externo (virus, bacterias, hongos, etc.) el activador de dicha respuesta. La principal respuesta que se ha encontrado en varios tipos de cáncer es mediada principalmente por LTC, células NK y macrófagos. La pregunta que no se puede evitar en esta parte es ¿por qué el cáncer logra vencer si nuestro propio sistema elimina las células transformadas? Básicamente, podemos decir que al ser células propias, expresan muchos de los marcadores de células normales y sólo unos pocos eventualmente presentados por las células tumorales, generando una respuesta muy débil o nula. Hay que considerar además que las células cancerosas tienen una tasa de división muy elevada y esto provoca que el sistema inmune no se de abasto para eliminar a todas las células tumorales.

Se sabe también que las células tumorales presentan mecanismos especializados para la evasión de la respuesta inmune como son: la modulación de antígenos tumorales en membrana, expresión baja de moléculas del MHC I en células transformadas, señales co-estimuladoras deficientes (Kindt *et al.*, 2007) y mecanismos de supresión como es la producción de Ado a través de la vía adenosinérgica (Franco, 2008).

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

Vía Adenosinérgica e Inmunosupresión

Como su nombre lo indica, esta vía es activada mediante la adenosina (Ado), la cual es una molécula derivada del adenosin-trifosfato (ATP). La Ado es una molécula autoicoide (Franco, 2008) lo que significa que se encuentra en todas las células del cuerpo y esta propiedad le confiere múltiples funciones en los sistemas fisiológicos, entre los que se encuentran el sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, urogenital, respiratorio y sistema linfático (Góngora-Alfaro *et al.*, 2005). Todas estas acciones se llevan a cabo mediante receptores conocidos como purinérgicos ó purinoceptors P1, los cuales se subdividen en A1, A2 y A3 (Burnstock, 1978). A1 se encarga de la disminución en los niveles de adenosin-monofosfato cíclico (AMPC) y A2 del incremento del mismo. A2 a su vez se divide en A2A y A2B. Todos estos pertenecen a la superfamilia de receptores G acoplados a proteína, los cuales tienen siete dominios transmembranales (Jacobson *et al.*, 2012).

Los linfocitos humanos, poseen tres de los cuatro receptores de adenosina (AR) (Koshiba *et al.*, 1997; Mirabet *et al.*, 1999; Gessi *et al.*, 2004) dependiendo el grado de expresión de la activación de la célula. Se ha manejado que Ado posee efectos inhibitorios ante la capacidad antitumoral de los linfocitos, favoreciendo al crecimiento tumoral (Franco, 2008). De hecho, varios autores (Jacobson and Gao, 2006; Deaglio *et al.*, 2007; Hoskin *et al.*, 2007; Stagg and Smyth, 2010) han demostrado la propiedad de Ado para suprimir la respuesta inmunológica y contribuir a la evasión de la respuesta inmune por células tumorales.

Como se mencionó antes, Ado es generada a partir de ATP. Esto se hace a través de la fosfohidrólisis mediada por las nucleotidasas CD39 y CD73 (**Figura 5**) ligadas a membrana de varios tipos celulares como son las células endoteliales y LTreg. En tejidos cancerosos se ha encontrado que CD73 está significativamente más aumentada además de tener una alta actividad enzimática (Zhang, 2010; Szychala, 2000).

La Ado por su parte, actúa como mecanismo de retroalimentación negativa, previniendo una respuesta inmune exacerbada convirtiendo ATP extracelular en Ado (Stagg and Smyth, 2010). La Ado que es generada y liberada al ambiente extracelular, interacciona potencialmente con cuatro receptores (A1, A2A, A2B, A3). A diferencia de los receptores A1, A2A y A3 que se activan con niveles fisiológicos, el receptor A2B necesita niveles elevados de Ado, los cuales podemos encontrar cuando existe algún tipo de infección (Fredholm *et al.*, 2001) o en los alrededores del tumor (Ohta *et al.*, 2006).

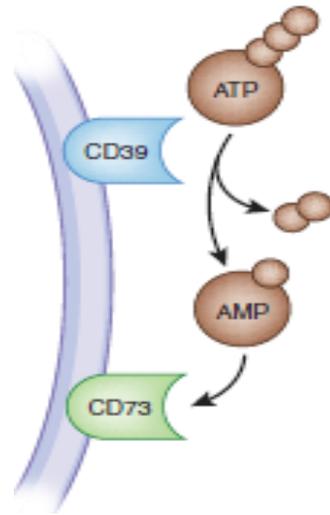


Figura 5. Fosfotransferencia de nucleótidos, ATP y AMP, mediada por las ectonucleotidasas CD39 y CD73 respectivamente (Tomado de Bauerle *et al.*, 2011).

Los efectos de Ado como molécula inmunosupresora, se ejercen en la mayoría de los tipos celulares de la respuesta inmune. Estos efectos se pueden apreciar en macrófagos, (Hasko *et al.*, 2000), células NK (Beavis *et al.*, 2012) y LB (Minguet *et al.*, 2005). Además se ha encontrado que en células microgliales (Kocsó *et al.*, 2012), funciona como un mecanismo inmunomodulador y de la inflamación, evitando la producción de citocinas pro-inflamatorias y generando, por el contrario, citocinas de efecto anti-inflamatorio como es IL-10.

Células Estromales Mesenquimales (CEMs)

Las células estromales mesenquimales también conocidas como CEMs son definidas como células troncales de origen no hematopoyético con propiedades multipotenciales y poseen la habilidad de diferenciarse en varios componentes del microambiente medular (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011). Friedenstein *et al.* (1966) las describió por primera vez como “colonias formadoras de fibroblastos” con una alta capacidad de autorrenovación y originadoras de varios linajes celulares. Son aisladas principalmente de médula ósea pero se pueden encontrar en tejido adiposo, sangre de cordón umbilical, bazo, pulmón y músculo esquelético (da Silva *et al.*, 2006)

Otra de las propiedades de estas células es su potencial inmunoregulador en donde encontramos evidencia que indica su capacidad para incrementar la neovascularización y crecimiento tumoral (Suzuki *et al.*, 2011). Esto principalmente debido a que existe cierto tropismo de estas células hacia los tumores, mediado por la presencia de ciertos factores solubles secretados por las células tumorales similares a los que existe en la respuesta inflamatoria ya que las CEMs migran a tejidos dañados donde existe una respuesta inflamatoria para así contribuir con la regeneración del tejido en cuestión (Karp and Leng, 2009).

Se ha observado que otra de las propiedades inmunosupresoras es el reclutamiento de LTreg (Di Ianni *et al.*, 2008), quienes poseen en membrana CD39 y CD73 (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011) lo que sugiera fuertemente que su actividad reguladora está involucrada con la vía adenosinérgica. Aunado a esto, evidencia mostrada por Saldanha-Araujo *et al.* (2011) ha demostrado que en presencia de CEMs también los linfocitos LTh expresan en mayor medida CD39 y CD73.

La cafeína como antagonista de la adenosina (Ado)

En la última década, se ha señalado a la cafeína o los análogos de esta (teofilina, y teobromina) como posible tratamiento para combatir el cáncer (Franco, 2008). La cafeína es un antagonista análogo en estructura a la Ado que es capaz de bloquear la transformación celular en un modelo celular murino (Nomura *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que la cafeína puede inhibir el crecimiento tumoral, ya que al bloquear los AR, principalmente el A_{2A}AR presente en los LTC, se impide su inhibición y actividad efectora (**Figura 6**), dando como resultado una mejor actividad antitumoral y como consecuencia reducción de la metástasis y la angiogénesis en los tumores (Ohta *et al.*, 2006).

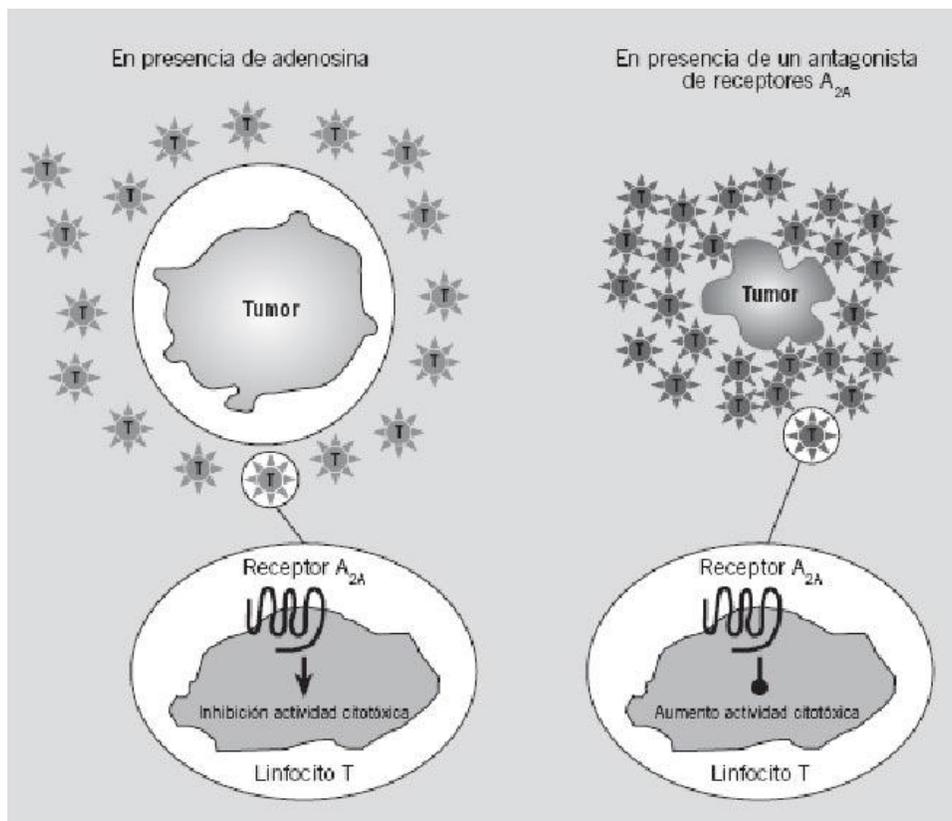


Figura 6. Efecto de la adenosina en el microambiente tumoral en contra de los LTC, actuando por vía de los AR, presente en los mismos LTC. En el lado derecho se muestra el posible efecto causado por la acción de un antagonista de la adenosina (Tomado de Franco, 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres Mexicanas con cáncer (INEGI, 2010). Cada año se diagnostican alrededor de 11,000 casos nuevos de cáncer cérvico uterino (CaCu) invasor. Esta enfermedad se encuentra fuertemente asociada con la infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-HR) (Walboomers *et al.*, 1999).

La presencia de VPH en este tipo de cáncer genital, también se ha asociado con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por LTC (Visser *et al.*, 2007; Molling *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Piersma *et al.*, 2007). Estas evidencias han sugerido que durante el desarrollo de la enfermedad se genera tolerancia inmunológica hacia el tumor, además de la aparición de células inmunosupresoras. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos mediante los cuales estas células regulan e inhiben el reconocimiento inmune mediado por LTC.

Las células neoplásicas se encuentran inmersas en el estroma tumoral, compuesto de fibroblastos, vasos sanguíneos y también de las células inmunes mencionadas. Estos elementos estromales, responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del tumor, incluyendo soporte estructural, vascularización y matriz extracelular (Albini *et al.*, 2007). Asimismo, en este microambiente tumoral son reclutadas células con importante actividad inmunosupresora tal como las Células Estromales Mesenquimales (CEMs). De manera interesante, se ha postulado que las CEMs participan en la inducción y reclutamiento de linfocitos T reguladores (LTreg) en los tumores, los cuales se caracterizan por tener actividad inmunosupresora y por su capacidad de inducir, reclutar y mantener la función de otros LTreg (Pittenger *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006; Prevosto *et al.*, 2007; Di Ianni *et al.*, 2008).

Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado obtener y caracterizar CEMs de tejidos normales de cuello uterino y de tumores avanzados de CaCu en las que fue evaluada su capacidad de apoyo al tumor mediante la supresión de la respuesta inmune antitumoral. Para ello se llevó a cabo, en un modelo de protección antitumoral *in vivo*, la aplicación de CEMs, fue capaz de revertir dicha protección e inducir nuevamente el crecimiento tumoral (Contreras, 2011). Lo anterior hace sugerir que las CEMs-CaCu, a través de la generación de Ado, pudieran tener un efecto supresor de la respuesta inmune en este modelo tumoral. En consecuencia, el presente proyecto tuvo como finalidad la de analizar en un modelo tumoral *in vivo*, el papel antagonista de la cafeína en la inmunosupresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por CEMs-CaCu.

HIPÓTESIS

Se sabe que las CEMs tienen alta capacidad de migración hacia sitios de lesión como son los nichos tumorales, en donde contribuyen de manera importante a la neovascularización y soporte estromal de las células tumorales. Asimismo a través de la producción y liberación de varios factores solubles, son capaces de inhibir la respuesta inmune antitumoral siendo uno de estos factores la Ado, producida a través de la actividad ectonucleotidasa de las moléculas CD39-CD73 dispuestas en la membrana de las CEMs.

En estudios previos, en modelo de ratón con protección antitumoral *in vivo*, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la inoculación de CEMs derivadas de tumores de CaCu (CEMs-CaCu) pueden revertir dicha protección e inducen nuevamente el crecimiento tumoral, el cual está asociado con la disminución de LTC y el reclutamiento de CEMs y LTreg en el estroma tumoral. Por otra parte, se ha reportado que la cafeína puede tener un papel importante en el tratamiento del cáncer; al boquear la actividad inmunosupresora de la Ado e inhibir el crecimiento tumoral. Por tanto, en un modelo tumoral de ratón (C57BL/6) en presencia de CEMs-CaCu el tratamiento con cafeína será capaz de proteger al animal del crecimiento tumoral, con o sin protección antitumoral previa.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar el papel antagonista de la cafeína en la inmunosupresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales de Cáncer Cérvico-uterino (CEMs-CaCu).

Objetivos Particulares

- ✓ Analizar la capacidad de la cafeína en el control del desarrollo tumoral *in vivo* en ratonas de la cepa C57BL/6, inoculados con células tumorales en presencia y ausencia de CEMs-CaCu.
- ✓ Analizar la capacidad de la cafeína en el control del desarrollo tumoral *in vivo* en ratonas de la cepa C57BL/6, con protección inmunológica antitumoral, inoculados con células tumorales en presencia y ausencia de CEMs-CaCu.

MATERIALES Y MÉTODOS

∴ Ratones

Se utilizaron 80 ratones hembra de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D^b) de entre 6 y 8 semanas de edad para la inducción de tumores y 10 como grupos control. Los grupos de ratones se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con alimento y agua *ad libitum*, conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto 2001.

∴ Células

• TC-1

Se utilizaron células tumorales TC-1 las cuales son células derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6 que expresan de manera permanente los genes E6 y E7 de HPV-16 junto con el oncogen *ras* (Lin *et al.*, 1996). Estas fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI (GibcoBRL, Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, Life Technologies) al 10%, y mantenidas en condiciones de esterilidad en una incubadora (Forma Scientific) a 37°C con 5 % de CO₂ y humedad saturante.

• CEMs

Las CEMs utilizadas en el presente trabajo derivaron de diferentes tejidos: a) un donador de médula ósea normal (CEMs-MON); b) de histerectomía realizada a una mujer sin infección por VPH ni lesión tumoral CEMs-CxN; y c) de una biopsia de paciente con CaCu IIIB (CEMs-CaCu). Las CEMs fueron previamente establecidas y caracterizadas de acuerdo a los parámetros establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). Los parámetros contemplan características como la adherencia celular al sustrato de cultivo, su morfología tipo fibroblasto, fenotipo característico (CD73, CD90 y CD105) y de baja expresión de marcadores de células hematopoyéticas (CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 y HLA-DR), además de su capacidad de diferenciación a los linajes de adipocitos, condrocitos y osteocitos (Montesinos *et al.*, 2013). Estas fueron cultivadas con medio DMEM-Lg GibcoBRL (Life Technologies, USA) y suplementado con SFB GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 15% y antibióticos (estreptomicina 100µg/ml y penicilina 100U/ml). Asimismo, estuvieron en condiciones de esterilidad, suministro de CO₂ al 5%, humedad saturante (95%) y a una temperatura de 37°C en una incubadora (Forma Scientific).

Todas las estirpes fueron proporcionadas por el Laboratorio de Células Troncales Mesénquimales de la UIMEO del Hospital de Oncología, CMN SXXI a cargo del Dr. Juan José Montesinos.

∴ Ensayo de citometría de flujo

Para determinar la expresión de CD73 en la membrana celular de las diferentes estirpes de CEMs, se empleó un análisis de citometría de flujo. Un total de 1×10^5 CEMs fueron resuspendidas en PBS suplementado al 3% con SFB y centrifugadas a 1500rpm 4°C por 5 min (Hettich, MIKRO 220). Después de la centrifugación, se procedió al bloqueo añadiendo 150µl de SFB resuspendiendo homogéneamente el botón celular y dejándolo en incubación 30min a 4°C. Transcurrido el tiempo, se procedió a 2 lavados con la solución de PBS al 3% SFB. Hecho esto, se añadieron 15µl del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD73-PE, (BD). Las células fueron también teñidas con un isotipo control, IgG1κ-PE Isotype Control (BD). La incubación de ambos Ab fue a 4°C en oscuridad durante 25min. Después se realizaron 2 lavados con PBS al 3% SFB, las células marcadas fueron analizadas mediante un citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter), contando un mínimo de 10,000 eventos.

∴ Cuantificación de adenosina mediante UPLC

10^5 CEMs fueron cultivadas en medio HEPES (Invitrogen, USA) libre de suero en presencia de 1mg/ml de Adenosin Monofosfato (AMP). Al mismo tiempo las CEMs fueron cultivadas bajo las mismas condiciones en presencia de 5mg/mL de un inhibidor específico de CD73, adenosina 5'-αβ-metileno difosfato (APCP). A partir de la adición de AMP o de AMP+APCP se tomaron alícuotas de 500ml de sobrenadante (inicio), así como a las 2 y 5 hrs. de cultivo. Para determinar la cantidad de Ado generada en los cultivos de CEMs se utilizó un equipo de UPLC de alta resolución y el análisis se realizó empleando el software Empower 3 (Waters, USA). Previo a la lectura de las muestras, se prepararon estándares de Ado a una concentración de 0.5-50 ng/ml disueltas en Fase Móvil (0.5% acetonitrilo: 5% metanol: 94.5% acetato de sodio 0.25M pH 6.3). Por otro lado, los sobrenadantes fueron adicionados a tubos que contenían 1 ml de acetonitrilo, se agitaron en vortex durante 1

minuto y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 min para extraer las proteínas y estabilizar la Ado. Posteriormente el líquido fue evaporado mediante la aplicación de un flujo de aire conteniendo N₂. La pastilla se resuspendió en 200 µl de fase móvil y posteriormente fue introducida al equipo para su determinación. Las condiciones de corrida de cada muestra fueron las siguientes: Velocidad de flujo 1.0 ml/min; Detector UV 254-260 nm; Tiempo de retención 7.5 minutos; T° ambiente; Columna LiChrosfer RP 18e 5 µm, 100 RP-18 (tamaño 125 mm x 4 mm, 5 mm de tamaño de partícula).

∴ Protección inmunológica

Para la inmunización de los ratones (C57BL/6) se ocuparán 9 grupos de 5 ratones cada uno, a los cuales se les inmunizará con el péptido RAHYNIVTF (Invitrogen, USA), proveniente de la proteína E7 del VPH-16. Este será administrado vía cavidad peritoneal en 3 dosis de 100µg cada una, disuelto en PBS (Phosphate Buffer Solution) a proporción 1:1 y con adyuvante completo de Freund (Sigma, USA) sólo en la primera dosis y adyuvante incompleto de Freund para las siguientes 2 dosis, en un volumen total de 100µl. A partir de la primera dosis, cada 10 días se aplicaron las subsecuentes.

∴ Administración de Cafeína

Para la administración de cafeína se utilizaron 8 grupos de 5 ratones cada uno en los que, de manera permanente, en su bebedero se les administró cafeína disuelta. Tomando en consideración que el consumo promedio de agua para los ratones es de 5ml/día (Spinelli y Enos, 1987) y que la cantidad reportada para bloquear los AR es de 300µM (Góngora 2005), se procedió a proporcionar una solución de 0.05825mg/ml de cafeína a los ratones para ser bebida de manera *ad libitum*. La preparación de la solución de cafeína se realizaba de manera rutinaria cada segundo día, y se determinaba el volumen de agua ingerida por el grupo de ratones para tener un cálculo de cafeína ingerida por cada ratón.

∴ **Inoculación de células para inducción de tumores**

Tanto células TC-1 como CEMs de las 3 estirpes fueron utilizadas para la inducción de tumores en 80 de los 90 ratones. Las CEMs fueron co-inoculadas con células TC-1 en 60 de las 80 ratonas, las 20 ratonas restantes, sólo recibieron la inoculación de células TC-1. Se inocularon 1×10^5 de cada tipo celular y en proporción 1:1. La inoculación de células TC-1 se llevó a cabo de manera subcutánea en el flanco derecho dorsal, mientras que las CEMs se inocularon de manera intravenosa, vía vena caudal en ratones previamente inmunizados con tres dosis del péptido RAHYNIVTF o sin inmunizar (**Tabla 1**).

Los ratones recibieron un refuerzo de células tumorales TC-1, 10 días después de la primera inoculación.

De tal forma que los tratamientos quedaron como muestra la siguiente tabla:

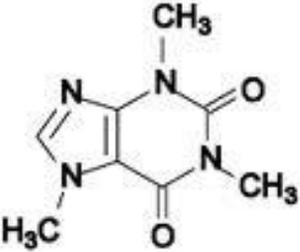
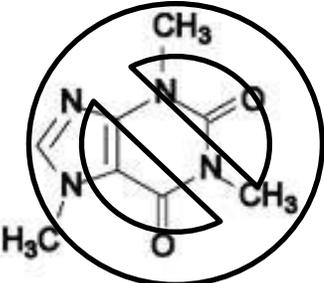
<p style="text-align: center;">GRUPO CON CAFEÍNA</p> 	<p style="text-align: center;">INMUNIZADOS</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CaCu</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CxN</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-MON</p>	<p style="text-align: center;">SIN INMUNIZAR</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CaCu</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CxN</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-MON</p>
<p style="text-align: center;">GRUPO SIN CAFEÍNA</p> 	<p style="text-align: center;">INMUNIZADOS</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CaCu</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CxN</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-MON</p>	<p style="text-align: center;">SIN INMUNIZAR</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CaCu</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-CxN</p> <p style="text-align: center;">5 TC-1+CEMs-MON</p>

Tabla 1. Se muestra la conformación de los grupos de ratones C57BL/6 y los tratamientos utilizados en el estudio. Los ratones inmunizados recibieron 3 dosis del péptido RAHYNIVTF antes de ser inoculados con las diferentes CEMs y las células tumorales TC-1. Grupo control, ratones a quienes se les administró cafeína (Grupo con cafeína), o únicamente agua (Grupo sin cafeína). Cada grupo de estudio estuvo conformado por 5 ratones. TC-1, ratones inoculados únicamente con células tumorales; TC-1+CEMs-CaCu, ratones inoculados con células tumorales TC-1 y Células Estromales Mesenquimales de Cáncer Cérvico-uterino (CEMs-CaCu); TC-1+CxN, ratones inoculados con células tumorales TC-1 y células estromales mesenquimales de cuello uterino normal (CEMs-CxN); TC-1+CEMs-MON, ratones inoculados con células tumorales TC-1 y células estromales mesenquimales de médula ósea normal (CEMs-MON).

∴ Cinética del crecimiento tumoral

Para determinar la evolución (tamaño) del tumor, se midió el tamaño de los mismos cada segundo día, durante 52-53 días después de haber inoculado el refuerzo de células TC-1; para esto se utilizó un calibrador tipo Vernier midiendo el diámetro mayor (R1) y menor (R2) del tumor. El volumen tumoral se determinó mediante la fórmula $V = (R1 * R2^2) / 2$ derivada de la fórmula de un elipsoide (Addison *et al.*, 1995).

∴ Análisis Estadístico

Los datos de volumen tumoral obtenidos durante el experimento fueron analizados con una prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey, se comparó cada uno de los grupos tratados con TC-1 y TC-1+CEMs. La significancia fue determinada como $P < 0.05$.

RESULTADOS

La cafeína inhibe el crecimiento tumoral inducido por células TC-1 en presencia y ausencia de CEMs

Como se ha venido mencionando a lo largo de este trabajo, las células tumorales son afectadas por elementos que se pueden encontrar dentro del nicho tumoral (vasos sanguíneos, tejido conectivo y células del sistema inmune entre otros). Se ha comprobado también que las CEMs participan en el crecimiento tumoral promoviendo la neovascularización del tumor (Suzuki, *et al.* 2011) además de bloquear la proliferación de LT (Sattler *et al.*, 2011) e inhibir la actividad de LTC (Saldanha-Araujo, *et al.*, 2011).

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo con ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H-2D^b), hemos encontrado que la co-inoculación de células tumorales TC-1 (del mismo haplotipo) con CEMs-CaCu exacerba el crecimiento tumoral inducido por las células TC-1 (Contreras, 2011). Asimismo, también se demostró que las CEMs-CaCu co-cultivadas con linfocitos de sangre periférica estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 inhiben su proliferación; sin embargo, la adición de cafeína (un bloqueador inespecífico de los receptores de adenosina) en estos cultivos fue capaz de proteger a los linfocitos T CD8+ de la inhibición de la proliferación celular generada por las CEMs-CaCu, sugiriendo que uno de los factores inhibitorios producidos por las CEMs era la Ado (Pérez-Saldaña, 2012). El presente estudio se realizó con la finalidad de analizar el papel antagonista de la cafeína sobre el crecimiento tumoral inducido por las células tumorales TC-1 y las CEMs derivadas de tres fuentes: de cáncer cérvico-uterino (CEMs-CaCu), de cérvix normal (CEMs-CxN, y de médula ósea normal (CEMs-MON).

La presencia de la molécula 5'endonucleotidasa (CD73) en membrana de CEMs ha sido reportada ampliamente (Caplan *et al.*, 1992; Nauta and Fibbe, 2007; Montesinos *et al.*, 2009; Kucerova *et al.*, 2010; Rodríguez-Pardo *et al.*, 2010) y es empleado como marcador fenotípico para identificar a éstas células según el ISCT (Comité Internacional de Terapia Celular por sus siglas en inglés).

En nuestro estudio, inicialmente se analizó la expresión de CD73 en las tres estirpes celulares utilizadas, además de analizar su capacidad para producir Ado a través de la adición del sustrato AMP (adenosin monofosfato). La estirpe CEMs-MON fue quien mostró la menor expresión del marcador CD73 en membrana con un valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) de 63.67, seguida por la estirpe de CEMs-CxN con una IMF de 150.43 y finalmente la estirpe de CEMs-CaCu mostró la mayor expresión del marcador CD73 con una IMF de 253.07 (Figuras 7-9).

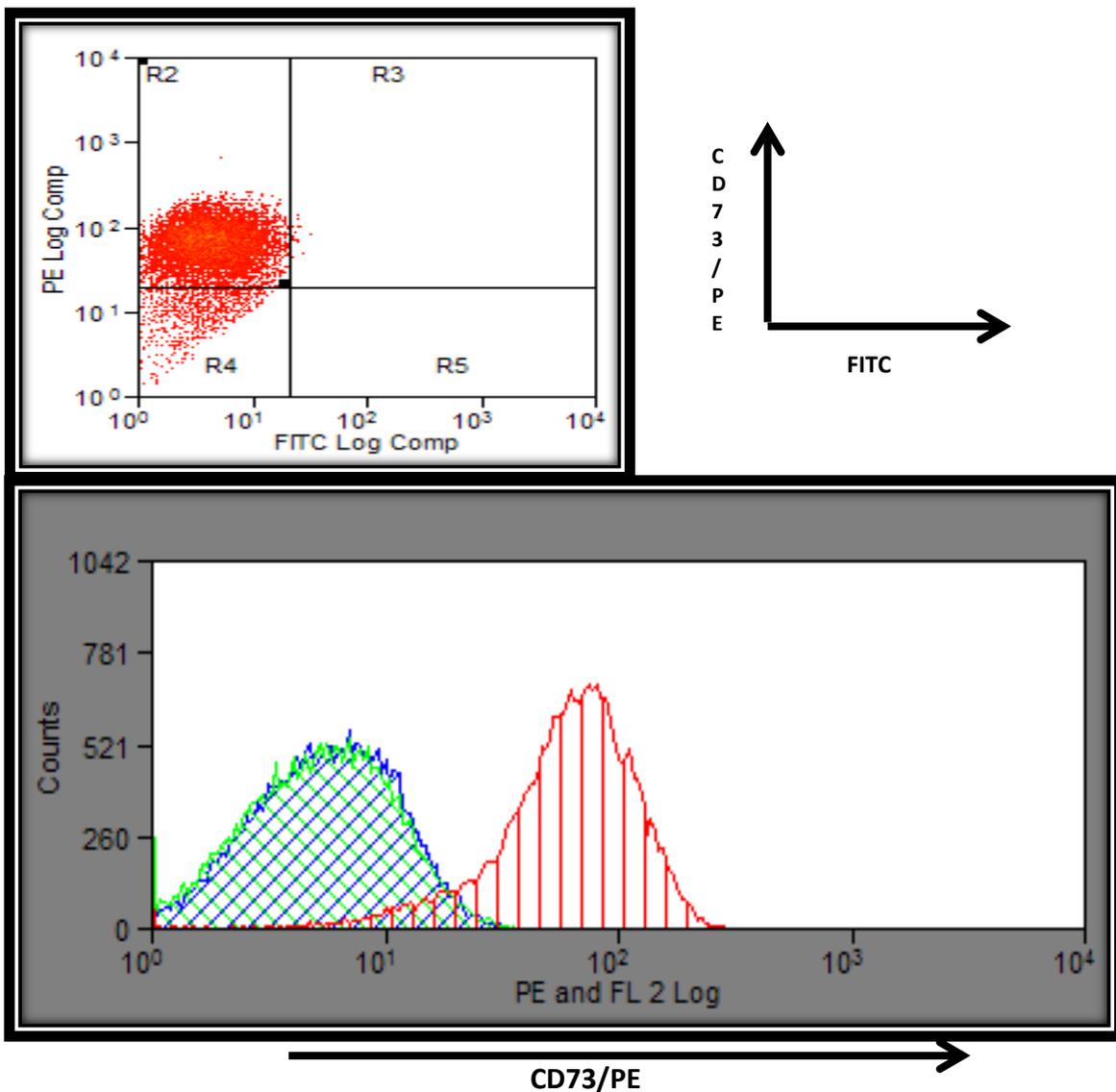


Figura 7. Expresión de la molécula CD73 en la membrana de las CEMs-MON. Las CEMs-MON fueron teñidas con el anticuerpo anti CD73 marcado con ficoeritrina (PE) y analizadas mediante citometría de flujo. En la parte superior se observa el desplazamiento de la población celular seleccionada, hacia la región CD73+ marcado con PE. Los histogramas muestran la autofluorescencia (verde), isotipo control IgG1κ (azul) y el marcaje con el anticuerpo anti CD73 (rojo).

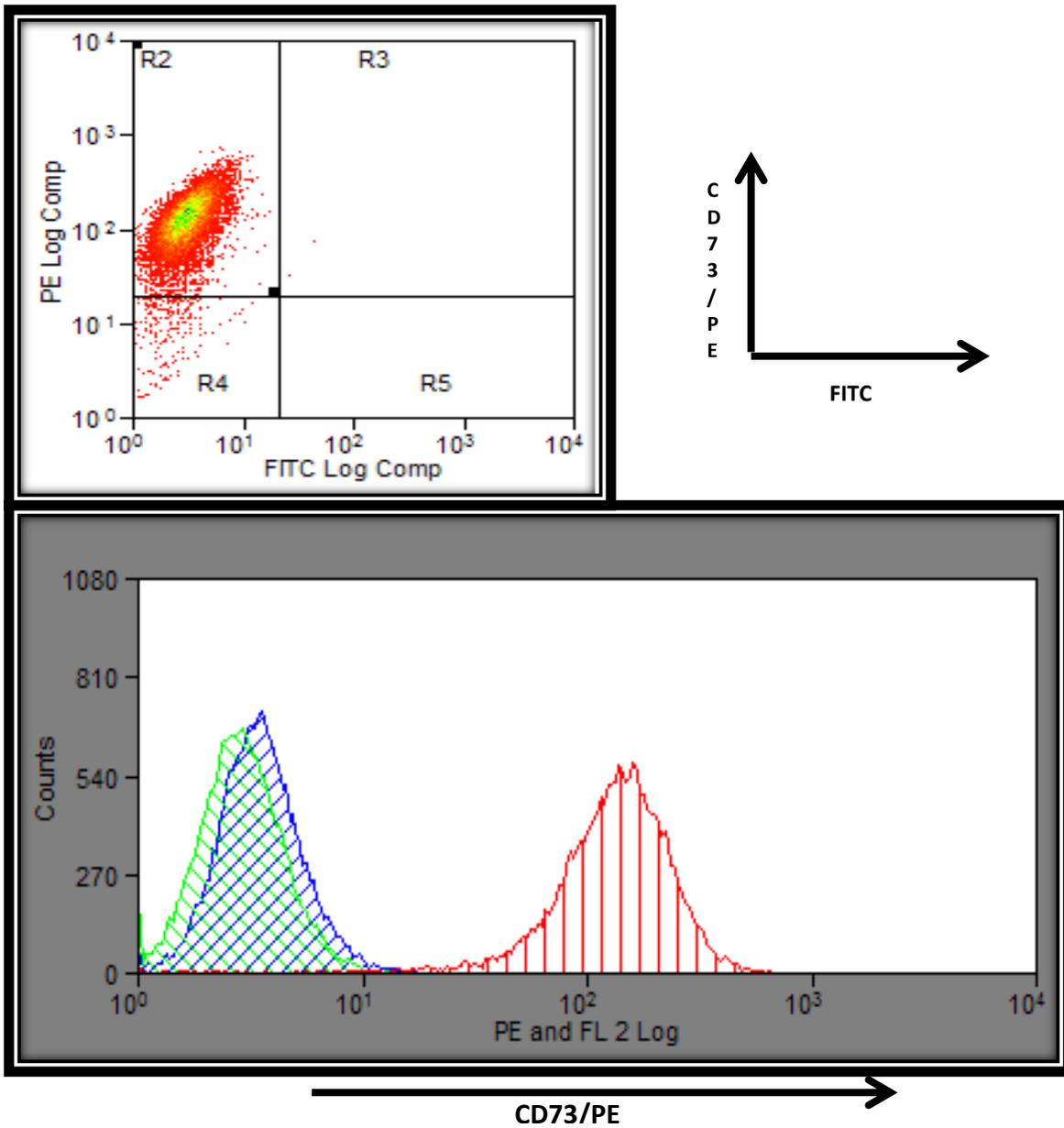


Figura 8. Expresión de la molécula CD73 en la membrana de las CEMs-CxN. Las CEMs-CxN fueron teñidas con el anticuerpo anti CD73 marcado con ficoeritrina (PE) y analizadas mediante citometría de flujo. En la parte superior se observa el desplazamiento de la población celular seleccionada, hacia la región CD73+ marcado con PE. Los histogramas muestran la autofluorescencia (verde), isotipo control IgG1κ (azul) y el marcaje con el anticuerpo anti CD73 (rojo).

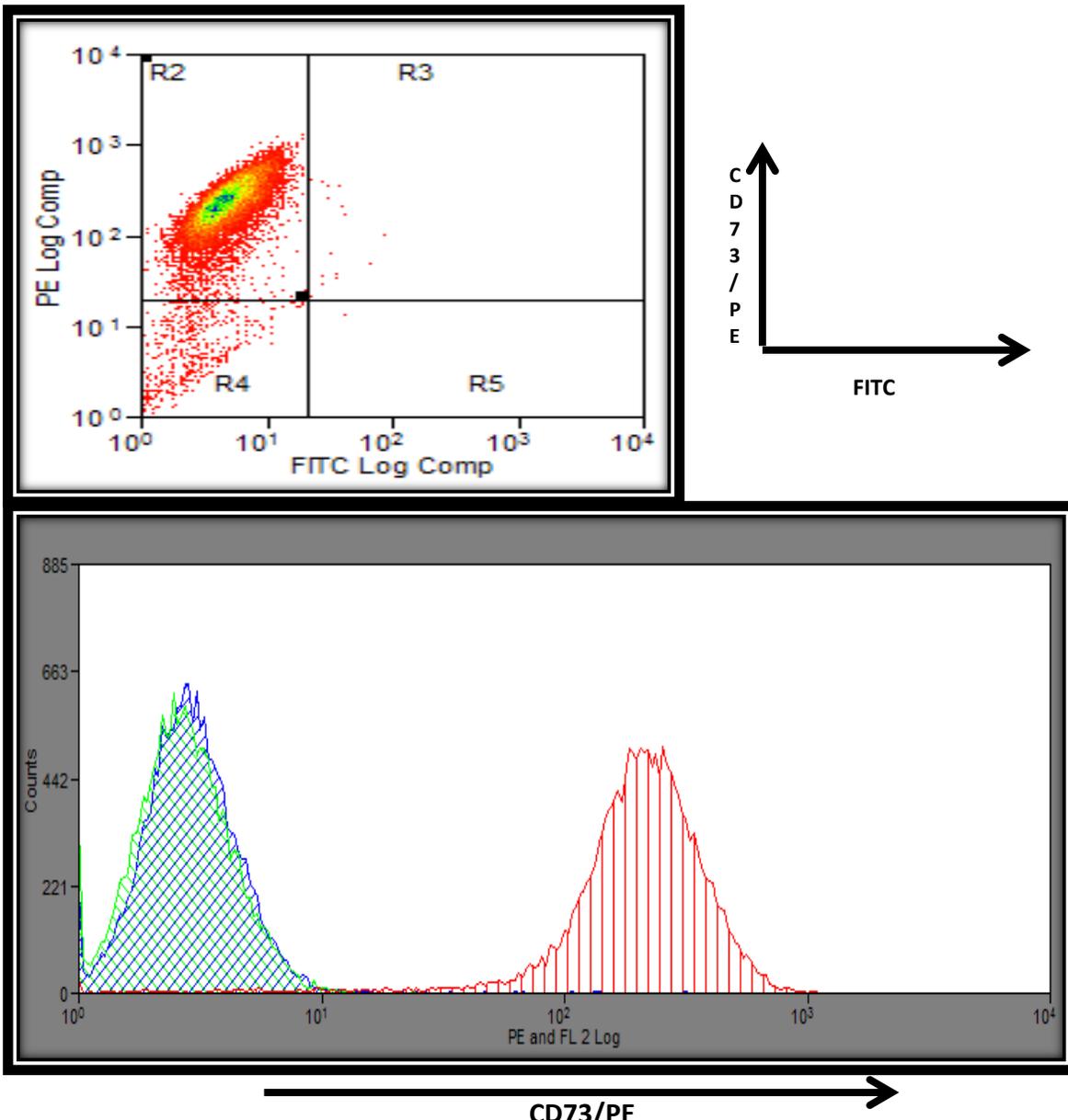


Figura 9. Expresión de la molécula CD73 en la membrana de las CEMs-CaCu. Las CEMs-CaCu fueron teñidas con el anticuerpo anti CD73 marcado con ficoeritrina (PE) y analizadas mediante citometría de flujo. En la parte superior se observa el desplazamiento de la población celular seleccionada, hacia la región CD73+ marcado con PE. Los histogramas muestran la autofluorescencia (verde), isotipo control IgG1κ (azul) y el marcaje con el anticuerpo anti CD73 (rojo).

La actividad funcional de CD73 fue analizada en las CEMs-CxN y en las CEMs-CaCu mediante la capacidad de generar adenosina a partir del sustrato específico de CD73, Adenosina Monofosfato (AMP). Para ello 1×10^5 células de cada estirpe fueron cultivadas en medio de cultivo conteniendo AMP a una concentración de 1mg/ml, en presencia (+) y ausencia (-) de 5mg/mL de un inhibidor específico de CD73, adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP). Como puede observarse en la **Tabla 2**, ambas estirpes celulares fueron capaces de generar Ado a partir de AMP a través del tiempo de cultivo. De manera interesante la actividad funcional de CD73 se inhibió fuertemente con la adición de APCP, sugiriendo que la producción de adenosina por las CEMs es debida principalmente a la actividad funcional de CD73.

ADENOSINA ng/ml						
CEMs	INICIO		2HRS		5 HRS	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
<u>CxN</u>	1.8	0.74	11.3	0.8	26.6	1.03
<u>CaCu</u>	5.6	0.62	8.2	0.7	21.3	0.97
<u>MON</u>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 2. Actividad funcional de CD73 en las CEMs a través de la producción de adenosina. Cien mil CEMs de cada estirpe fueron cultivadas en medio de cultivo conteniendo 1mg/ml de AMP en presencia (+) y ausencia (-) de 5mg/mL del inhibidor de CD73, APCP. Muestras de sobrenadante (500 μ l) fueron tomadas al inicio, 2hr y 5hr de cultivo. Los sobrenadantes fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) para determinar la producción de Ado en ng/ml. ND, no determinado.

Por otra parte, la presencia de CD73 y la actividad funcional de las CEMs-CaCu y CEMs-CxN para generar Ado a partir de AMP toma relevancia en nuestro estudio, debido a que las CEMs a través de la producción de ésta molécula, suprimen la respuesta inmune antitumoral mediada por LTC a través de su interacción con el AR, A2A de alta afinidad, favoreciendo el crecimiento y la metástasis tumoral (Ohta *et al.*, 2006; Nauta and Fibbe, 2007; Yen BL and Yen ML, 2008). Por tanto, tomando en consideración que la cafeína es un antagonista de AR (Sitkovsky *et al.*, 2008), en este estudio evaluamos la capacidad de cafeína para inhibir el crecimiento tumoral en el modelo de ratón C57BL/6 en presencia y ausencia de CEMs.

Para ello, se establecieron 4 grupos de 5 ratones cada uno con los siguientes tratamientos: 1) TC-1+ CEMs-CaCu; 2) TC-1+CEMs-CxN; 3) TC-1+CEMs-MON; y 4) Sólo células tumorales TC-1. De igual manera se establecieron 4 grupos de 5 ratones c/u con los mismos tratamientos a los cuales se les administró desde el inicio del experimento una solución de cafeína 300 μ M (necesaria para bloquear los AR) por v.o. a través del agua en bebedero. Cabe mencionar que inicialmente se determinó el volumen de ingesta diario de agua durante dos semanas y éste correspondió a un volumen aproximado de 5ml de agua por día y por ratón, lo que permitió calcular la cantidad de cafeína (0.05825mg/ml de agua) para tener una concentración de 300 μ M.

Como se puede observar en la **Figura 10**, los grupos de ratones tratados con las células tumorales TC-1 y las CEMs y que no recibieron suministro de cafeína, presentaron crecimientos tumorales durante los 52 días de seguimiento. Es importante destacar que los grupos de ratones que recibieron tratamiento de TC-1+CEMs-CaCu y TC-1+CEMs-CxN presentaron un mayor crecimiento tumoral al final del experimento, presentando un volumen tumoral promedio de 2.1 y 2cm³ respectivamente, estos volúmenes no fueron significativamente mayores al mostrado por el grupo de ratones que recibieron únicamente células tumorales TC-1, quienes promediaron un volumen de tumor de 1.5cm³. Cabe mencionar que los ratones tratados con TC-1+CEMs-MON mostraron un volumen promedio de 0.6cm³, el cual fue significativamente menor al presentado por los ratones tratados con células TC-1 ($p < 0.05$) y aquellos tratados con TC-1+CEMs-CaCu y TC-1+CEMs-CxN ($p < 0.01$).

De manera interesante, a los ratones que se les administró cafeína y que recibieron los mismos tratamientos con células tumorales TC-1 y que también fueron co-inoculados con las diferentes CEMs presentaron una importante protección ante el crecimiento tumoral, debido a que después de los 52 días de tratamiento, los ratones presentaron tumoraciones apenas perceptibles, teniendo volúmenes tumorales promedio menores a 0.25 cm³ (**Figura 11**). Estos resultados nos muestran que cafeína es capaz de inhibir el crecimiento tumoral producido por las células tumorales TC-1 en presencia y ausencia de CEMs.

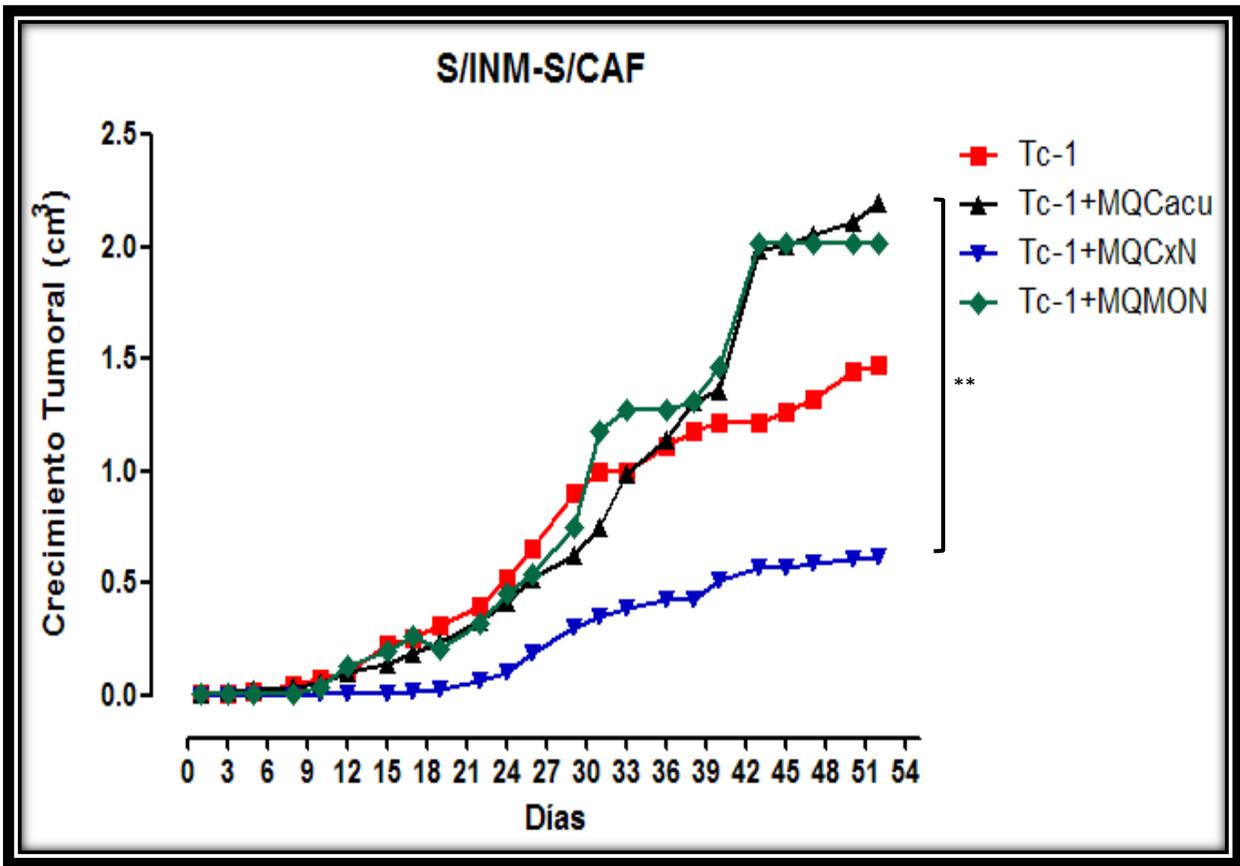


Figura 10. Cinéticas de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 y co-inoculados con TC-1 + CEMs bajo condiciones normales (sin protección inmunológica). 10^5 células TC-1 fueron inoculadas vía subdérmica en el dorso de un grupo de ratones en ausencia de CEMs (TC-1), o de manera simultánea fueron inoculados por la vena caudal con 10^5 CEMs derivadas de Medula Ósea Normal (TC1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC1+CEMs-CxN) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC1+CEMs-CaCu). TC-1+CEMs-MON/CaCu vs TC-1 * $P < 0.05$ y TC-1+CEMs-CxN vs TC-1+CEMs-CaCu/MON **($P < 0.0001$) (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

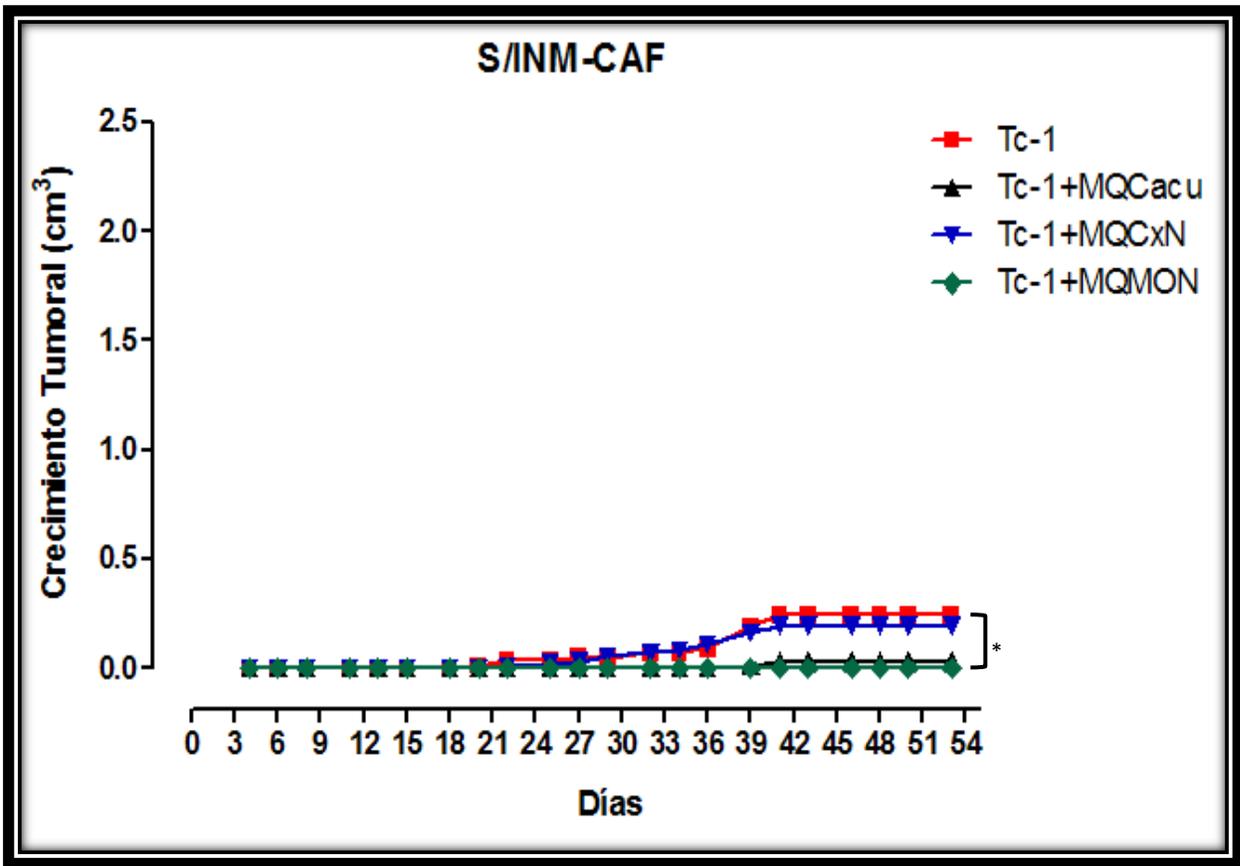


Figura 11. Cinética de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 que recibieron suministro de cafeína y que fueron inoculados con células tumorales TC-1 y co-inoculados con TC-1 + CEMs bajo condiciones normales (sin protección inmunológica). 10^5 células TC-1 fueron inoculadas vía subdérmica en el dorso de un grupo de ratones en ausencia de CEMs (TC-1), o de manera simultánea fueron inoculados por la vena caudal con 10^5 CEMs derivadas de Medula Ósea Normal (TC1+CEMs-MON); de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CxN) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC1+CEMs-CaCu). A todos los grupos de ratones se les suministró cafeína disuelta en el agua a una concentración de $300\mu\text{M}$ para ser bebida *ad libitum* durante el desarrollo del experimento. Diferencia no significativa entre grupos * $P < 0.05$ (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

La cafeína mejora la protección antitumoral en conjunto con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de VPH-16.

Es conocido que el péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH-16, el cual tiene alta especificidad para el alelo H-2D^b propio de la cepa de ratones C57BL/6 (Feltkamp *et al.*, 1993), es altamente inmunogénico en este modelo tumoral al proteger a los animales ante el reto tumoral inducido por células tumorales que expresan la proteína oncogénica E7 de VPH-16, por lo cual ha sido incluido en diversas vacunas terapéuticas diseñadas para contrarrestar el crecimiento tumoral usando ratones C57BL/6 (Greenstone *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998; Schöfer *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2001; Bian *et al.*, 2008; Wick and Webb, 2011; Paz de la Rosa, 2009; Barrios *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012).

En nuestro modelo experimental de estudio también utilizamos al péptido inmunogénico RAHYNIVTF para inmunizar previamente a los ratones C57BL/6 que fueron sometidos a los diferentes tratamientos descritos anteriormente (**Tabla 1**). Los ratones recibieron 3 dosis del péptido RAHYNIVTF con adyuvante completo (1 dosis) e incompleto (2 dosis) de Freund y posteriormente fueron inoculados con las células tumorales TC-1 o co-inoculados con las tres diferentes CEMs. Como se observa en la **Figura 12**, la inmunización permitió una protección ante el crecimiento tumoral en los ratones que recibieron únicamente células tumorales TC-1. No obstante, los ratones que fueron co-inoculados con CEMs-CxN y CEMs-CaCu, mostraron un ligero crecimiento tumoral 0.4cm^3 y 0.2cm^3 respectivamente, al menos durante 42 días que duró el tratamiento. Por otro lado, los ratones que fueron inmunizados previamente con el péptido RAHYNIVTF y que de manera simultánea a los tratamientos con células tumorales TC-1 y TC-1+CEMs se les suministró cafeína, no mostraron crecimiento tumoral perceptible después de 52 días de tratamiento (**Figura 13**). Estos resultados nos permiten sugerir que el tratamiento con cafeína en los animales inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF favorece la protección antitumoral en este modelo experimental.

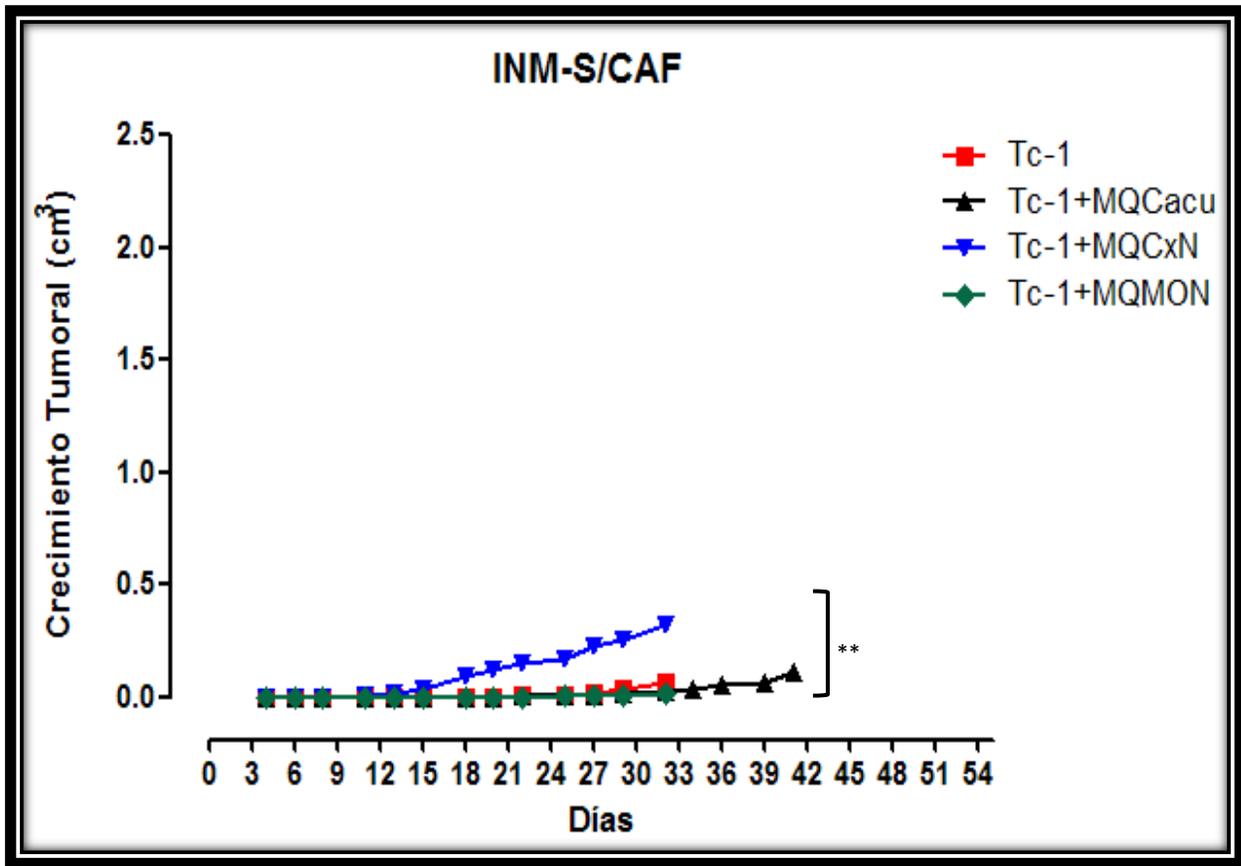


Figura 12. Cinéticas de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 y co-inoculados con TC-1 + CEMs bajo protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF. Ratones de la cepa C57BL/6 recibieron 3 dosis del péptido RAHYNIVTF con adyuvante completo (1 dosis) e incompleto (2 dosis) de Freund con 10 días entre cada dosis, posteriormente fueron inoculados con 10^5 células TC-1 por vía subdérmica en el dorso de un grupo de ratones en ausencia de CEMs (TC-1), o de manera simultánea fueron inoculados por la vena caudal con 10^5 CEMs derivadas de Medula Ósea Normal (TC1+CEMs-MON); de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CxN) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC1+CEMs-CaCu). TC-1+CEMs-MON/CaCu vs TC-1 * $P < 0.05$ y TC-1+CEMs-CxN vs TC-1+CEMs-CaCu/MON **($P < 0.0001$) (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

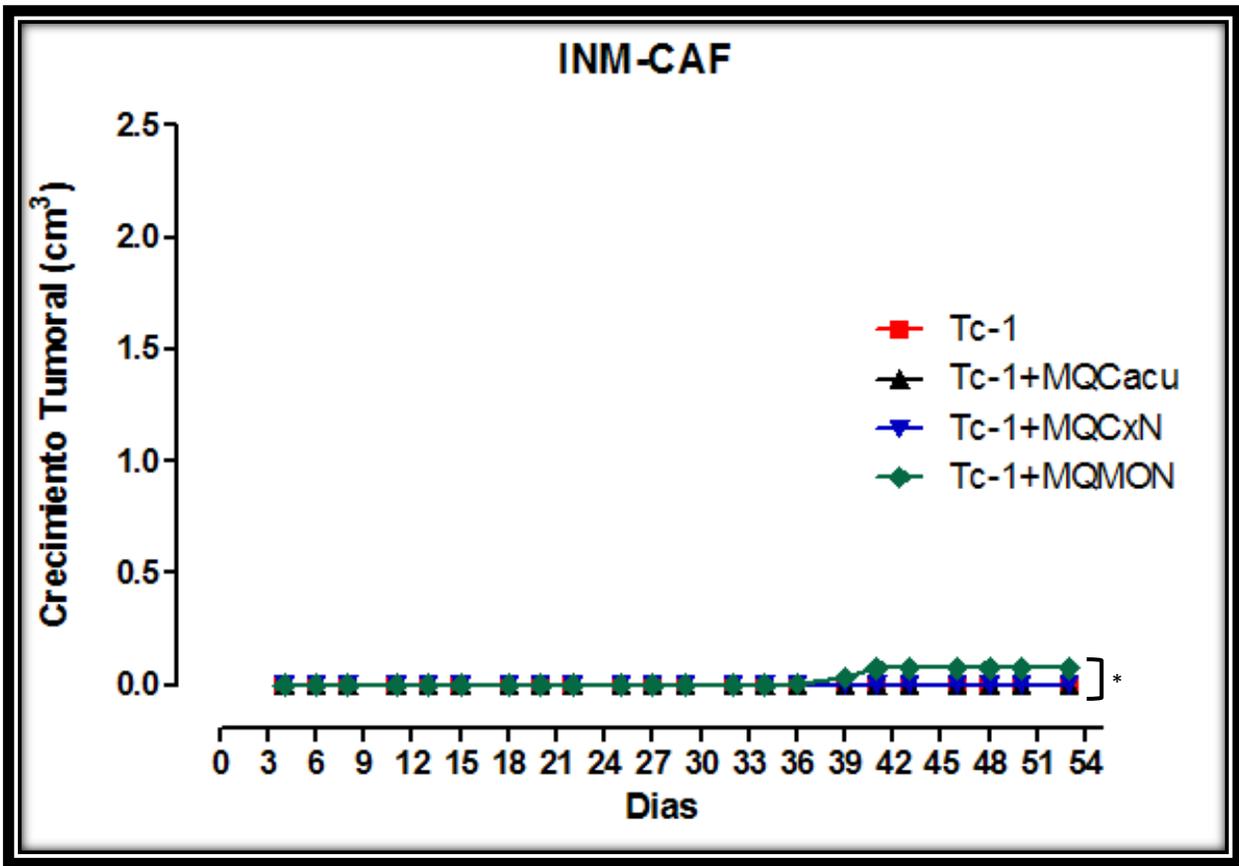


Figura 13. Cinéticas de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 que recibieron suministro de cafeína y que fueron inoculados con células tumorales TC-1 y co-inoculados con TC-1 + CEMs bajo protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF. Ratones de la cepa C57BL/6 recibieron 3 dosis del péptido RAHYNIVTF con adyuvante completo (1 dosis) e incompleto (2 dosis) de Freund con 10 días entre cada dosis, posteriormente fueron inoculados con 10^5 células TC-1 vía subdérmica en el dorso de un grupo de ratones en ausencia de CEMs (TC-1), o de manera simultánea fueron inoculados por la vena caudal v.i. con 10^5 CEMs derivadas de Medula Ósea Normal (TC1+CEMs-MON); de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-CxN) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC1+CEMs-CaCu). Diferencia no significativa entre grupos * $P < 0.05$. (Prueba de ANDEVA seguida por una prueba de Tukey).

DISCUSIÓN

Las CEMs son un tipo de células troncales que pueden ser extraídas de muchos tejidos. Ellas se pueden diferenciar en células de linaje mesodérmico, tales como adipocitos, osteocitos y condrocitos, así como en otros linajes de tipo embrionario (Bruder *et al.*, 1997; Djouad *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2002). Las CEMs interactúan con células del sistema inmune innato y adaptativo y ejercen efectos importantes en la respuesta inmune, primariamente a través de moléculas con función inmunosupresora, incluyendo prostaglandina-E2 (PGE2), óxido nítrico, indoleamina 2,3-desoxigenasa (IDO), liberación de moléculas no clásicas del MHC como HLA-G5 soluble, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), IL-10, y la producción de Ado a través de la fosfohidrólisis de ATP hacia Ado, mediante las ectoenzimas CD39 y CD73 (Haynesworth *et al.*, 1992; Spaeth *et al.*, 2008; Pittenger *et al.*, 1999; Yazhow *et al.*, 2004; Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Engela *et al.*, 2012). Por otro lado, varios estudios sugieren que las CEMs contribuyen a la formación del estroma tumoral para proveer un nicho permisivo para el desarrollo del tumor a través de un proceso de inmunosupresión que favorece la evasión del sistema inmune (Tsuji *et al.*, 2007; Spaggiari *et al.*, 2008). Tales procesos han sido implicados en varios aspectos de la biología epitelial del tumor, tales como el crecimiento tumoral, la progresión neoplásica, angiogénesis y metástasis (Uccelli *et al.*, 2008; Wong, 2011). De hecho las CEMs, han sido extraídas de diferentes tipos tumorales tales como carcinoma de ovario (McLean *et al.*, 2011), de tumores de células gigantes de hueso (Wuling *et al.*, 2003), neuroblastomas (Gibbs *et al.*, 2003), osteosarcomas (Johann *et al.*, 2010), lipomas (Lin *et al.*, 2007), cáncer gástrico (Cao *et al.*, 2009). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las CEMs inhiben la respuesta inmune antitumoral para permitir el desarrollo del tumor no han sido completamente esclarecidos. Nuestro grupo de trabajo ha logrado obtener CEMs de tumores malignos de Cáncer Cérvico-uterino (CEMs-CaCu) (Montesinos *et al.*, 2013), y a través de un modelo tumoral *in vivo*, se ha encontrado que al co-inocular CEMs-CaCu con células tumorales positivas a la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de VPH-16 (células TC-1) en ratones de la cepa C57BL/6, se exagera el crecimiento tumoral.

Asimismo, al co-inocular ambos tipos celulares en ratones previamente inmunizados con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH-16, se ha obtenido que la presencia de las CEMs-CaCu favorece el crecimiento tumoral, teniendo como resultado una disminución en la población de LT CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF y un incremento importante en la población de LT con fenotipo regulador (CD4+, CD25+, FoxP3+) (Contreras, 2011). Sugiriendo entonces que la presencia de CEMs derivadas de CaCu en este modelo de ratón tiene un efecto inmunomodulador que favorece el crecimiento tumoral e interfiere con la respuesta inmune específica hacia el mismo tumor. Aunado a ello, se ha encontrado que las CEMs-CaCu inhiben la proliferación y función efectora de LTC específicos a péptidos antigénicos a través de la generación de Ado cuando son co-cultivados en presencia de AMP (Pérez-Saldaña, 2012), lo cual nos permite sugerir que uno de los mecanismos que utilizan las CEMs-CaCu para inhibir la respuesta citotóxica específica es mediante la producción de Ado y la consecuente inhibición de la población efectora de linfocitos cuando esta misma molécula, interacciona con los AR en los LT. Para explorar la posibilidad de que las CEMs-CaCu a través de la generación de Ado, inhiben la respuesta inmune antitumoral, en el presente trabajo evaluamos la capacidad de cafeína (un antagonista de AR) para bloquear el efecto de Ado en la inhibición de la respuesta inmune en el modelo tumoral de ratones C5/BL/6. En nuestro modelo experimental, además de evaluar el papel de CEMs-CaCu en el desarrollo tumoral inducido por células tumorales TC-1, también analizamos el papel de CEMs provenientes de médula ósea normal (CEMs-MON) y de tejido cervical normal (CEMs-CxN). Inicialmente evaluamos la expresión de CD73 en los tres diferentes tipos de CEMs y encontramos diferencias importantes en la expresión de esta ectonucleotidasa en la membrana celular entre las CEMs derivadas de tejido cervical con respecto a las CEMs-MON. De manera interesante, al evaluar la actividad funcional de las diferentes CEMs para realizar la fosfohidrólisis de AMP, las CEMs-CaCu y las CEMs-CxN mostraron similar actividad funcional, evidenciando entonces que ambos tipos de CEMs pueden utilizar este mecanismo en el modelo tumoral para inhibir la respuesta inmune en el ratón. En este contexto, se ha reportado que la Ado en el microambiente tumoral puede provenir de varias fuentes tales como: a) la hipoxia celular en la cual se inhibe la adenosina cinasa, lo que causa un incremento de AMP extracelular y por tanto un incremento de Ado, cuando

este sustrato interacciona con CD73 dispuesto en células que expresan esta ectonucleotidasa, como ocurre en LTreg, células dendríticas foliculares y células epiteliales entre otras (Decking *et al.*, 1997; Synnestvedt *et al.*, 2002; Kobie *et al.*, 2006; Deaglio *et al.*, 2007; Resta *et al.*, 1998); b) se ha descrito que algunas células tumorales también pueden producir Ado (Dzhandzhugazyan *et al.*, 1998); c) asimismo, nucleótidos liberados por LT durante la activación y presentación de antígeno pueden ser fuentes de la misma (Takayama *et al.*, 1988). Tomando estas consideraciones, los ratones C57BL/6 fueron sujetos a diferentes tratamientos para la inducción de tumores en condiciones normales (sin previa inmunización) y previamente inmunizados con el péptido inmunogénico (RAHYNIVTF) para protegerlos ante el reto tumoral. Bajo nuestras condiciones se encontró que los ratones no inmunizados, como era de esperarse, desarrollaron tumores cuando fueron inoculados con las células tumorales TC-1, asimismo el crecimiento tumoral fue incrementado de manera notable cuando las CEMs-CaCu y las CEMs-CxN fueron co-inoculadas (v.i.). Cabe mencionar que este desarrollo ha sido consistentemente observado por nuestro grupo de trabajo (Don, 2011; Contreras, 2011). Considerando que las CEMs, a través de la generación de Ado, estuvieran inhibiendo la respuesta inmune del animal para contrarrestar el desarrollo del tumor, en nuestro modelo de estudio se incluyó un grupo de ratones a los cuales se les administró cafeína a una dosis permanente de 300µM con la finalidad de bloquear los AR (Góngora-Alfaro *et al.*, 2005) durante el desarrollo del experimento. De manera interesante se encontró que la administración de cafeína tuvo un efecto importante en el control del crecimiento tumoral, tanto en ratones que fueron inoculados con células TC-1 como en aquellos que fueron co-inoculados con las CEMs y las células tumorales. El efecto de la cafeína en el control de crecimiento tumoral, aunque de manera parcial, ha sido previamente reportado en tumores inducidos con células de cáncer de mama en modelos animales (Otha *et al.*, 2006). En el modelo tumoral de los ratones C57BL/6, hemos encontrado que la inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF protege a los ratones del crecimiento tumoral inducido por las células TC-1, no obstante la co-inoculación de CEMs-CaCu inhibe la respuesta antitumoral resultando por consecuencia en el crecimiento tumoral en estos animales (Don 2011; Contreras, 2011). En nuestro estudio este efecto se pudo observar de manera parcial, debido a que el grupo de ratones fue sacrificado al día 42 y no pudo ser monitoreado de manera total, sin embargo se

lograron observar tumores con un crecimiento tumoral cercano a 0.5cm^3 en ratones que recibieron CEMs-CxN y CEMs-CaCu. Por otro lado, cuando a otro grupo de ratones previamente inmunizado y tratados de la misma manera con células TC-1 y CEMs además de suministrarles cafeína, en ninguno de ellos se encontró desarrollo tumoral perceptible. Lo anterior nos hace sugerir que la cafeína puede tener un efecto antitumoral importante, sobre todo cuando ésta se administra de manera simultánea a un antígeno que induce respuesta inmune específica como lo es el péptido RAHYNIVTF. Este fenómeno puede tener soporte por el hecho de que de manera experimental al co-cultivar CEMs-CaCu con LT antígeno específicos en presencia de AMP, la actividad proliferativa y efectora de éstos es inhibida notablemente; sin embargo cuando en los co-cultivos a los cuales se les adicionó, dichas actividades no fueron alteradas de manera importante (Pérez-Saldaña 2012; Pérez-Mariscal 2012). De tal manera que el bloqueo de AR, dispuestos en la membrana de los linfocitos a través de la cafeína como molécula antagonista, pudiera inhibir la actividad supresora que ésta ejerce sobre la población efectora de la respuesta inmune. Aunque en nuestro modelo experimental no se monitoreó la población efectora de LT CD8+ específicos al péptido RAHYNIVTF, en estudios posteriores resultaría de gran relevancia hacer su evaluación. Por otro lado, algunos autores han reportado que Ado puede tener un efecto supresor adicional al inducir la liberación de IL-10, tal como lo observado por Koscsó *et al* (2012), donde se encontró que células de microglía al ser estimuladas por Ado a través del receptor A2B, son capaces de inducir la síntesis de cantidades importantes de IL-10. En ensayos preliminares en nuestro laboratorio, hemos encontrado que las CEMs-CaCu y CEMs-CxN al ser cultivadas con AMP o Ado incrementan la producción basal de IL-10 y ésta es disminuida cuando se agrega cafeína ($300\mu\text{M}$) al cultivo, por ejemplo CEMs-CaCu produce alrededor de 1 ng/ml de IL-10 y CEMs-CxN alrededor de 600 pg/ml cuando son incubadas con $300\mu\text{M}$ de AMP y en presencia de cafeína ($300\mu\text{M}$), éstas producen <30 pg/ml de IL-10, sugiriendo que en nuestro modelo experimental éste fenómeno pudiera estar generándose durante el crecimiento tumoral, lo cual debe ser explorado en estudios posteriores.

En estudios previos hemos encontrado que las CEMs inoculadas, vía vena caudal, son capaces de migrar al sitio tumoral, además de que la presencia de CEMs-CaCu favorece el reclutamiento de LTreg con fenotipo CD4+, CD25+ FoxP3 en mucho mayor proporción que aquellos la inducida por CEMs-MON y CEMs-CxN (Contreras, 2011). La presencia de LTreg y macrófagos asociados a tumor (macrófagos tipo 2) junto con CEMs pudieran co-participar en la inhibición de la respuesta inmune antitumoral, ya sea a través de la liberación de Ado o de la producción simultánea de IL-10 (Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012; Saldanha-Araujo *et al.*, 2011; Engela *et al.*, 2012; Zhang, 2012; Zhang, 2010). Resulta entonces interesante, conocer si inhibiendo la vía adenosinérgica, que conduce a la producción de Ado mediada por CEMs, a través de la desregulación de la expresión de CD73 en estas células, pudiera favorecer la respuesta inmune antitumoral, lo que representaría un mecanismo clave de las CEMs-CaCu para favorecer la evasión de la respuesta inmune en su microambiente natural. Este fenómeno lleva a proponer que la regulación de la vía adensinérgica debe ser considerada como un blanco terapéutico potencial para favorecer el rechazo tumoral (Jin *et al.*, 2010; Clayton *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

- Las CEMs utilizadas en el estudio expresan de manera importante la molécula CD73
- CEMs-CxN y CaCu tienen la capacidad de hidrolizar AMP y generar Ado como producto de su actividad enzimática
- La inoculación de las CEMs de manera conjunta con células TC-1 promovieron el crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6
- La administración de cafeína por vía oral fue capaz de inhibir de manera importante el crecimiento tumoral inducido en ratones por la inoculación de células TC-1 solas y en combinación con CEMs
- La administración del péptido inmunogénico RAHTNIVTF de la proteína E7 de VPH-16, protegió a los ratones en cierta medida del crecimiento tumoral inducido por células TC-1 y CEMs, siendo que la administración simultánea de cafeína la que permitió una mejor protección antitumoral en los ratones.
- Los resultados sugieren que las CEMs derivadas de tumor de CaCu pueden tener un efecto inhibitorio importante en la respuesta inmune antitumoral en el modelo de estudio a través de la producción de Ado y que éste fenómeno pudiera representar un mecanismo de supresión inmunológica en el microambiente tumoral natural.

PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, resultará relevante analizar si el bloqueo de la generación de Ado por las CEMs , a través de la inhibición específica de la molécula CD73 o la desregulación con siRNA, así como el bloqueo específico de los AR en LTC, favorece la respuesta inmune celular para el control del crecimiento tumoral.

Asimismo, será importante analizar las poblaciones celulares participantes en el microambiente tumoral, tales como macrófagos, LTreg y LTC, bajo las diferentes condiciones experimentales. Lo anterior será de gran importancia para dilucidar de manera global la participación de las CEMs a través de la vía adenosinérgica en la evasión de la respuesta inmune. Esta información puede resultar importante para establecer nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la respuesta inmune antitumoral de manera paralela a la estimulación de la respuesta inmune empleando vacunas que incluyen antígenos específicos tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. Editorial Elsevier. 6a Edición. 3-19pp

Addison CL, Braciak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. (1995). Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8522-8526.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Martin R., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Ediciones Omega. 4a Edición. 3336-3338 pp.

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

Barrios K, Celis E. (2012). TriVax-HPV: an improved peptide-based therapeutic vaccination strategy against human papillomavirus-induced cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 61:1307-1317.

Bauerle JD, Grenz A, Kim JH, Lee HT, Eltzschig HK. (2011). Adenosine generation and signaling during acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 22:14-20.

Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 33:231-237.

Bian T, Wang Y, Lu Z, *et al*. (2008). Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. *Mol Cancer Ther* 7:1329-1335.

Bruder SP, Jaiswal N and Haynesworth, SE. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 64:278-294.

Cairns J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 255:197-200.

Cann A. (2010). *Principles of molecular virology*. 4a Edición. 224-235 pp.

Cao H, Xu W, Qian H, Zhu W, Yan Y, Zhou H, Zhang X, Xu X, Li J, Chen Z, Xu X. (2009). Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett*. 274: 61-71.

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

Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. (2011). Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol*. 187:676-683.

Contreras LS. (2011). Análisis de la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119:2204-2213.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 204: 1257–1265.
- Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. (1997). Hypoxia induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res.* 81:154–164.
- Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini Z, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. (2008). Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 36: 309-318.
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 102: 3837-3844.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8:315-317.
- Don C. (2010). Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.
- Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. (2011). Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther.* 2, 34.
- Dzhandzhugazyan KN. (1998). Ecto ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett.* 430:227-23
- Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. (2012). On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front Immunol.* 3, 126.
- Feltkamp M, Smits H, Vierboom M, *et al.* (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol.* 23:2242-2245.
- Franco R. (2008). Café y Cáncer. *Med Clin (Bar).* 131: 633-635.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz K-N, Linden J (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527–552.
- Friedenstein, AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova, KV, (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 16:381–390
- Gariglio P y Rangel LM (1992). Virus y Cáncer. *Salud Pública de México* 34:308-317.

Gessi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gafa R, Lanza G, Cavazzini L, Bianchi N, Gambari R, Feo C, Liboni A, Gullini S, Leung E, Mac-Lennan S, Borea PA. (2004) Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. *Clin Cancer Res.* 17:5895- 5901.

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

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

Greenstone H, Nieland J, De Visser K, *et al.*(1998). Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1800–1805.

Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabo C. (2000). Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14:2065-2074.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 13:81–88.

Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. (2007). Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells. *Inter J Onc.* 32:527-535.

Howley P and Lowy D. (2006). Papillomaviruses. In *Fields Virology*. 5° Edición.

INEGI (2010). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx

Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG. (2012). G-protein coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal.* 8:419-436

Jacobson KA and Gao ZG (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 247–264.

Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418:41–49.

Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, Shin T, Curiel TJ, Zhang B. (2010). CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.* 70:2245-2255.

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

Karp JM and Leng Teo GS. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 4:206-216.

- Kindt T, Goldsby R, Osborne B. (2007). *Inmunología de Kuby*. McGraw Hill. 6a Edición. 14-18pp
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine. *J Immunol*. 177:6780-6786.
- Kocsó B, Csoka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virag L, Hasko G. (2012). Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol*. 188:445-453.
- Koshiba M, Kojima H, Huang S, Apasov S, Sitkovsky MV (1997). Memory of extracellular adenosine/A2a purinergic receptor-mediated signalling in murine T cells. *J Biol Chem*. 272:25881-25889.
- Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S. (2000). Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer*. 36:1402-1410.
- López SA y Lizano SM. (2006). Cáncer cérvico uterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 1:31-55.
- Lin TM, Chang HW, Wang KH, Kao AP, Chang CC, Wen CH, Lai CS, Lin SD. (2007). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem. Biophys Res. Commun*. 361: 883-889.
- Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. (2013). Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells via Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway. *PLoS One*. 8, e55487.
- Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, Zenke M, Keating A, Zhao RC. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *J Immunol*. 189:1182-1192.
- Liu Y, Chiriva M, Grizzi F, *et al.* (2001). Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Cancer Gene Ther*; 8:948-957.
- McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, Cabrera L, Keller E, McCauley L, Cho KR, Buckanovich RJ. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest*, 121:3206-3219.
- Mirabet M, Herrera C, Cordero OJ, Mallol J, Lluís C, Franco R. (1999). Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J Cell Sci*. 112:491-502.
- Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. (2005). Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol*. 35:31-41.
- Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blomberg ME, Bontkes HJ. (2007). CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 121:1749-1755.

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

Montesinos J, Mora GM, Mayani H, Flores FE, García RR, Fajardo OG, Castro MM, Weiss SB, Monroy GA. (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. Sometido a publicación. *Stem cells and Development*.

Moody CA and Laimins LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Rev Cancer*. 10:550-560.

Murphy K, Travers P, Walport M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*. McGraw Hill. 7a Edición. 137pp

Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. (2007). Expression of ondoeamine 2,3-dioxigenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci*. 98:874-881.

Nauta AJ, Fibbe WE. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 110:3499-3506

Nomura M, Ichimatsu D, Moritani S, Koyama I, Dong Z, Yokogawa K. (2005). Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine. *Mol Carcinog*. 44:67-76.

Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:13132–13137.

Paz de la Rosa G, Monroy A, Mora M, *et al.* (2009). An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virol*. 2:1-11.

Peng S, Frazer IH, Fernando GJ, Zhou J. (1998). Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virol*. 240: 147–157.

Pérez-Mariscal F. (2012). Efecto inmunosupresor de la vía CD73/Adenosina generada por las células estromales mesenquimales (CEMs) sobre la actividad funcional de linfocitos T citotóxicos (LTC). Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM.

Pérez-Saldaña K. (2012). Análisis funcional de la vía CD73 como mecanismo inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de neoplasias cervicales. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.

Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst M, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. (2007). High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer. *Cancer Res*. 67: 354-61.

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-7.
- Prendville W, Davies P. (2004). The Health Professional's HPV Handbook. 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Taylor and Francis Group. The European Consortium of Cervical Cancer Education. NY. 94pp.
- Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. (2007). Generation of CD4+ or CD8+ regulatory cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 92:881-8.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208-1213
- Rasmusson I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 312:2169-2217.
- Resta R, Yamashita Y, Thompson LF (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*. 161:95-109.
- Rieber M. (1977). Aspectos de Biología Celular y la Transformación Maligna. Secretaria General de Organización de los Estados Americanos. 43-45pp.
- Rodríguez-Pardo V, Fuentes LM, Aristizabal CJ, Vernot HJ. (2010). Aislamiento y caracterización de células “stem” mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientarium*. 15:224-239.
- Ruddon W. (2007). Cancer Biology. 4ª Edición. Oxford University Press. 4-5,400-404 pp.
- Saldanha-Araujo F, Ferreira FIS, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RHC, Covas DT, Zago MA, Panepucci RA. (2011). Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res*. 7:66-74.
- Sattler C, Steinsdoerfer M, Offers M, Fischer E, Schierl R, Heseler K, Daubener W, Seissler J. (2011). Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant*. 20:1221-1230.
- Schöfer H, Ophoven A, Henkeu, *et al.* (2006). Randomized, comparative trial on the sustained efficacy of topical imiquimod 5% cream versus conventional ablative methods in external anogenital warts. *Eur J Dermatol*. 6:642-648.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 370: 890-907.
- Sharma C, Dey B, Wahiduzzaman M, Singh N. (2012). Human papillomavirus 16 L1-E7 chimeric virus like particles show prophylactic and therapeutic efficacy in murine model of cervical cancer. *Vacc*. 30: 5417- 5424.
- Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson SC, Ohta A. (2008). Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol*. 153:S457-464.

- 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.* 15:730-738.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111:1327-1333.
- Spinelli SJ, Enos RL. (1987) Manual de farmacología veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. México. 400pp
- Spychala J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 87:161-173.
- Stagg J and Smyth MJ. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 29:5346-5358.
- Sverdrup F and Khan SA. (1994). Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol.* 68:505-509.
- Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. (2002). Ecto-5 α -nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 110:993–1002.
- Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. (1988). Locus of inhibitory action of cAMP-dependent protein kinase in the antigen-receptor triggered cytotoxic T-lymphocyte activation pathway. *J Biol Chem.* 263:2330–2336.
- Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. (2007). Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 13: 2082-2090.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 8:726-736.
- Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulhad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. (2007) Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 150:199-209.
- Vousden KH.(1992). Papillomaviruses and assays for transforming genes. *Methods Mol Biol.* 8: 159-74.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
- Wick D and Webb J. (2011). A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. *Vacc.* 29:7857-7866.
- Wong, RS. 2011. Mesenchymal stem cells: angels or demons? *J Biomed Biotechnol.* 2011:459510.
- Zhang B. (2010). CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70:6407-6411.

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

Yazhou C, Wenlv S, Weidong Z, Licun W. (2004). Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol.* 25: 290-295.

Yen BL and Yen ML. (2008). Mesenchymal stem cells and cancer- for better or for worse. *J Can Molec.* 4:5-9.

Zhang B. (2012). CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncimmunology.* 1:67-70.