



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA SOBRE CÉLULAS NK DE
CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE PACIENTES
CON CÁNCER DE CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MVZ. SERRATO LÓPEZ ANA GABRIELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CD. MX. ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA SOBRE CÉLULAS NK DE
CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE PACIENTES
CON CÁNCER DE CÉRVIX**

TESIS

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

PRESENTA:

MVZ. SERRATO LÓPEZ ANA GABRIELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019



OFICIO CPCB/1186/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SERRATO LÓPEZ ANA GABRIELA** con número de cuenta **306225428**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA SOBRE CÉLULAS NK DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE PACIENTES CON CÁNCER DE CÉRVIX"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS**:

Presidente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Vocal: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
Secretario: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DRA. MARTA ELENA CASTRO MANRREZA
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 11 de diciembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la oportunidad y el apoyo recibido.

Al CONACYT por la beca otorgada (clave 780393) para la realización de esta tesis.

Al Programa para la Formación de Investigadores y al Fondo de Investigación en Salud, IMSS (clave 99097173) por el apoyo recibido durante mi estancia en el instituto.

A mi tutor el Dr. Juan José Montesinos y a los miembros de mi Comité Tutor: la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y al Dr. Alberto Monroy García, quienes con su guía y aportaciones enriquecieron e hicieron posible este trabajo.

Al Dr. Juan José Montesinos por permitirme pertenecer a su equipo de trabajo, por toda su confianza en mí y por todas las enseñanzas que me brindó durante todo este tiempo.

Al M.C Víctor Adrián Cortés Morales, por su apoyo en el citómetro de flujo y por su asesoría experimental.

A la M.C Erika Haydé Hernández Estévez, por su apoyo y asesoría experimental.

A la Dra. Marta Elena Castro Manreza por su apoyo para la determinación de IDO y por su asesoría en la determinación de PGE2 y a la Dra. Karina Chávez por el apoyo en la lectura de esta.

A Patricia Rojo por su asesoría para la medición de proliferación celular.

Al Dr. Eliseo Sarmiento Rosales por su asesoría en estadística.

A la QFB Martina Flores por todo su apoyo en el laboratorio.

A Alexandra Elbakyan, por contribuir a derribar las barreras en el camino de la ciencia.

A todos mis compañeros de laboratorio: Adrián, Pilar, Ixel, Erika, Nacho, Lucero, Damián, Carlos y Ayesha, por su apoyo y compañía durante todo este tiempo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
I. CÁNCER CERVICOUTERINO.....	5
1. Patogenia	5
1.1. Virus del Papiloma Humano (HPV).....	6
2. Clasificación histológica.....	7
2.1. Carcinoma Epidermoide	7
2.2. Adenocarcinoma.....	7
3. Etapas clínicas.....	8
4. Respuesta inmunológica en CaCu	10
II. MICROAMBIENTE TUMORAL.....	14
1. Componentes del microambiente tumoral	15
1.1. Células tumorales.....	15
1.2. Células estromales.....	16
1.2.1. Células estromales mesenquimales (MSCs).....	16
1.2.2. Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs).....	17
1.2.3. Células vasculares angiogénicas.....	17
1.2.4. Células inmunes infiltradas.....	18
1.2.4.1. Células Natural Killer (NK).....	19
1.2.4.2. Células NKT.....	21
1.3. Matriz extracelular.....	22

2. Microambiente tumoral en CaCu.....	23
III. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (MSCs).....	24
1. Propiedades funcionales.....	24
1.1. Inmunomodulación	25
1.1.1. Inmunomodulación sobre células NK y NKT.....	27
2. MSCs en cáncer.....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	32
I. OBJETIVO GENERAL.....	32
II. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
METODOLOGÍA.....	33
I. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS.....	33
1. MSCs de médula ósea (MO-MSCs)	33
2. MSCs de cérvix normal (CN-MSCs) y de cáncer cervicouterino (CaCu-MSCs)	34
3. Células NK y NKT.....	35
II. CO-CULTIVOS.....	36
III. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NK Y NKT.....	37
IV. CITOTOXICIDAD	37
V. DETECCIÓN DE IFN- γ E IL-10 EN LAS CÉLULAS CD56+.....	38
VII. PRODUCCIÓN DE IDO, PGE2 Y EXPRESIÓN DE MICA/B POR LAS MSCs.....	39
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39

RESULTADOS.....	40
I. Las MSCs de CaCu expresan MICA/B en su membrana de manera basal, y esta expresión disminuye cuando están en contacto con células NK estimuladas.....	40
II. Las MSCs de CaCu disminuyen la proliferación de las células NK y NKT.....	42
III. Las MSCs de CaCu disminuyen la actividad citotóxica de las células NK.....	44
IV. Las MSCs de CaCu no disminuyen la producción de IFN γ por las células NK pero incrementan la producción de IL-10 por las células NKT.....	46
V. Las MSCs de CaCu incrementan su producción deIDO y PGE2 en cultivo con células NK activadas.....	49
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	60
PERSPECTIVAS.....	62
LITERATURA CITADA.....	63

ABREVIATURAS

α-SMA	Alfa actina de músculo liso
ALCAM	<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
CaCu	Cáncer cervicouterino
CaCuA	Adenocarcinoma de cérvix
CaCuE	Carcinoma epidermoide de cérvix
CAFs	Fibroblastos asociados a cáncer
Células iNKT	Células Natural Killer T invariantes
Células NK	Células Natural Killer
Células NKT	Células Natural Killer T
CMN	Células mononucleares
CN	Cérvix normal
CSCs	Células troncales cancerosas
DCs	Células dendríticas
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FAP	Proteína de activación de fibroblastos
FGF-4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos

HLA clase I	Antígeno leucocitario humano clase I
HPV	Virus del papiloma humano
HR-HPV	Virus del papiloma humano de alto riesgo
HSCs	Células troncales hematopoyéticas
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IDO	Indolamina 2-3 dioxigenasa
IFNγ	Interferón gama
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGF-2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
KIR	<i>Killer Ig-like Receptors</i>
MICA	<i>MHC class I-related chain A</i>
MICB	<i>MHC class I-related chain B</i>
MO	Médula ósea
MSCs	Células estromales mesenquimales
PGE2	Prostaglandina E2
PVR	Receptor del pilovirus (CD155)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T cooperadores 1
Th2	Linfocitos T cooperadores 2
TLR	Receptor tipo Toll

TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
ULBP	<i>Unique-long 16 binding proteins</i>
VCAM	Proteína de adhesión celular vascular

RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto con mayor incidencia y mortalidad en mujeres. En México, este tipo de cáncer es el segundo en incidencia y es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos en pacientes femeninos. Se ha sugerido que las células estromales mesenquimales (MSCs) forman parte del microambiente tumoral y podrían tener una capacidad inmunosupresora que favorecería el desarrollo del tumor. Particularmente en el caso de CaCu, nuestro grupo de investigación demostró la presencia de MSCs en tumores de pacientes (CaCu-MSCs), las cuales disminuyeron la expresión de moléculas del antígeno leucocitario humano clase I (HLA I) en las células tumorales y por lo tanto evadieron la actividad citotóxica de los linfocitos CD8+ en contra de ellas.

A la fecha no se conoce si las CaCu-MSCs tienen capacidad inmunosupresora sobre los componentes celulares del sistema inmune y particularmente sobre las células NK que participan en la eliminación de las células malignas, lo cual podría favorecer el crecimiento tumoral. En el presente estudio hemos comparado a las MSCs provenientes de cérvix normal (CN-MSCs) y CaCu-MSCs en términos de sus propiedades inmunosupresoras sobre poblaciones enriquecidas de células NK CD56+. Como control se utilizaron MSCs de médula ósea (MO-MSCs), las cuales han demostrado una adecuada capacidad inmunosupresora sobre las células NK. Nuestros resultados confirmaron el potencial inmunosupresor de las MO-MSCs y demostramos que las CaCu-MSCs, a diferencia de las CN-MSCs, presentan

capacidad de inmunosupresión sobre las células NK. Se observó que las CaCu-MSCs expresan cadenas relacionadas al MHC clase I A y B (MICA/B) en su membrana, ligandos que activan a las células NK. Interesantemente dichas moléculas disminuyeron cuando las CaCu-MSCs se cultivaron en presencia de células NK activadas y bajo esta condición, las CaCu-MSCs disminuyeron de manera significativa la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK. La disminución de la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK en estos cocultivos correlacionó con un incremento en la producción de Indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO) y Prostaglandina E2 (PGE2) en las CaCu-MSCs y de IL-10 en las células NKT. De manera interesante, en los cocultivos con CaCu-MSCs, no observamos disminución en la producción de Interferón gama (IFN γ) en las células NK, citocina que favorece la producción de moléculas inmunosupresoras en las MO-MSCs. Nuestros resultados indican que las CaCu-MSCs tienen capacidad inmunosupresora sobre las células NK y sugieren que dicha propiedad podría dar protección inmune a las células tumorales. Este mecanismo podría tener implicaciones importantes en el crecimiento tumoral en CaCu.

ABSTRACT

Worldwide, cervical cancer (CeCa) is the fourth in incidence and mortality in women, and in Mexico this type of cancer is the second in incidence and mortality. It has suggested that mesenchymal stromal cells (MSCs) are part of the tumor microenvironment and may have an immunosuppressive capacity that could favor tumor development. In the case of CeCa, our research group have demonstrated the presence of MSCs in tumors of patients (CeCa-MSCs), which decreased HLA class I molecules expression in tumoral cells and therefore these cells evaded the cytotoxic activity of CD8+ lymphocytes.

It is currently not known if CeCa-MSCs have immunosuppressive capacity against cells of the immune system and particularly on NK cells function, which mediate the lysis of tumor cells and therefore may favor tumor growth. In the present study we have compared the immunosuppressive capacity of MSCs of normal cervix (NC-MSCs) and CeCa-MSCs against enriched CD56+ NK cells populations. As a control we used bone marrow MSCs (BM-MSCs) which have been shown to have an immunosuppressive capacity against NK cells.

Our results confirmed the immunosuppressive capacity of BM-MSCs and demonstrated that CeCa-MSCs, unlike NC-MSCs, can decrease NK cells proliferation and cytotoxic activity. It was observed the expression of membrane MHC class I-related chain A/B (MICA/B) on CeCa-MSCs, NK activation ligands. Interestingly, these molecules decreased when CeCa-MSCs were cultivated in presence of activated NK cells and under this condition, CeCa-MSCs decreased

significantly the proliferation and cytotoxic activity of NK cells. Such decrease was related to increases in levels Indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO) and Prostaglandin E2 (PGE2) production by CeCa-MSCs and IL-10 by NKT cells. Interestingly, we did not find a decrease in the production of IFN γ by NK cells, cytokine that promotes the production of immunosuppressive molecules by BM-MSCs. Our results indicate that CeCa-MSCs have immunosuppressive properties against NK cells and suggest that such capacity may be involved in the immune protection of tumoral cells. This could have important implications in the development of CeCa.

INTRODUCCIÓN

I. CÁNCER CERVICOUTERINO

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto con mayor incidencia y mortalidad en mujeres, con un total de 527, 624 casos y 265, 672 muertes en 2012 (GCO, 2012). En México, este tipo de cáncer es el segundo en incidencia y es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos en mujeres, con un total de 13, 960 casos en 2012 (GCO, 2012) y 4, 065 muertes en 2016 (INEGI, 2016).

1. Patogenia

La presencia de una infección persistente por el virus del papiloma humano (HPV) es el factor más importante para el desarrollo de CaCu (Petry, 2014). La infección por HPV comienza por el contacto del virus con la membrana basal expuesta debido a micro-abrasiones en la superficie del cérvix (Song *et al.*, 2015). A pesar de que la infección con HPV es un factor indispensable para el desarrollo del CaCu por sí misma, no es suficiente para generarlo. Es necesaria la interacción con otros factores de riesgo como son: fumar, el uso de anticonceptivos orales, número de partos, inicio de actividad sexual temprana, número de parejas sexuales, otras infecciones de transmisión sexual, algunas enfermedades autoinmunes, estados de inmunosupresión crónicos, deficiencias nutricionales, entre otros (Muñoz *et al.*, 2006; ICESCC, 2006). Aunque la presencia de HPV es relativamente común, especialmente en mujeres jóvenes, entre los 20 y los 30 años, la mayoría de las infecciones son autolimitantes y únicamente el 10%

persiste durante años, de los cuales sólo entre el 1-2% resulta en cáncer (Deligeoroglou *et al.*, 2013; Petry, 2014).

1.1 Virus del Papiloma Humano (HPV)

EL HPV es un papilomavirus con una doble cadena de DNA que contiene 7,900 pares de bases nitrogenadas (Asiaf *et al.*, 2014). Su genoma consiste en 8 marcos de lectura abiertos, 6 genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos genes tardíos (L1 y L2) (Song *et al.*, 2015). La proteína E1 ayuda a la replicación viral. Las proteínas E5, E6 y E7 están asociadas a la evasión inmune. E6 y E7 son considerados oncogenes, ya que sus productos pueden unirse a la proteína p53 promoviendo su degradación y evitando así la apoptosis de las células infectadas (Faridi *et al.*, 2011). Las proteínas L1 y L2 forman los componentes estructurales de la cápside viral y E2 regula la transcripción de E6 y E7 (Song *et al.*, 2015).

Existen más de 120 diferentes tipos de papilomavirus humanos que pueden infectar la piel y las mucosas. De todos estos, sólo 15 son clasificados como de “alto riesgo” (HR-HPV) (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y son considerados carcinogénicos (Denny, 2012). Los HR-HPV difieren del resto debido a la expresión de los genes que codifican para E6 y E7, dos proteínas con propiedades oncogénicas (Petry, 2014). El HPV 16 es el más prevalente de estos, ya que está asociado al 50% de los casos de CaCu a nivel mundial. El segundo tipo en prevalencia es el 18 con un 20%, por lo que el 70% de los casos de CaCu se asocian a alguno de estos dos tipos de HPV (Muñoz *et al.*, 2006; Petry, 2014; Marth *et al.*, 2017).

2. Clasificación histológica

Según el tipo celular donde se origine el tumor, el CaCu se puede clasificar histológicamente en carcinoma epidermoide (CaCuE) y adenocarcinoma (CaCuA). Entre el 75-80% de los casos se clasifican como CaCuE, mientras que entre el 20-25% son CaCuA, los cuales son más agresivos y con peor pronóstico que los primeros (Galic *et al.*, 2012).

2.1. Carcinoma Epidermoide

El CaCuE está formado por células escamosas con un patrón de crecimiento diferente al normal y con morfología distinta. Se puede subclasificar en queratinizado y no queratinizado, con base en la presencia de perlas de queratina (Marth *et al.*, 2017). El CaCuE está relacionado a una infección con HR-HPV en casi todos los casos y la presencia de HPV 16 se asocia a un mal pronóstico (Marth *et al.*, 2017).

2.2. Adenocarcinoma

Los adenocarcinomas abarcan un grupo heterogéneo de tumores. Cerca del 80% se puede clasificar dentro del tipo endocervical. Las células tumorales de este tipo no son evidentemente mucinosas en su morfología y tienen un citoplasma eosinofílico. El resto de los adenocarcinomas son tumores de origen mixto como carcinomas adeno-escamosos, y otros pocos pueden incluir carcinomas de células claras y adenocarcinomas mesonéfricos (Marth *et al.*, 2017).

El 90% de los casos de adenocarcinoma endocervical han mostrado ser positivo a HPV. El HPV 18 es más común en este tipo de tumores que en CaCuE. El resto de los adenocarcinomas de cérvix, como el carcinoma de células claras y el adenocarcinoma mesonéfrico, parecen no estar relacionados con una infección por HPV (Marth *et al.*, 2017).

3. Etapas clínicas

El CaCu puede presentarse en diversos grados, desde una presentación apenas invasiva asintomática, hasta un estado avanzado metastásico. Según los criterios del comité de oncología ginecológica FIGO, el CaCu se puede clasificar con base en la presentación clínica en 4 etapas que a su vez se subdividen dependiendo del grado de invasión que se presente (FIGO, 2014), como se muestra en la tabla 1.

Etapa		Descripción
I		El tumor está confinado en el cérvix.
	IA	La invasión del tumor se identifica sólo microscópicamente y está limitada al estroma con una profundidad máxima de 5 mm y un ancho no mayor a 7 mm.
	IA1	Invasión al estroma de ≤ 3 mm en profundidad y ≤ 7 mm de ancho.
	IA2	Invasión al estroma de > 3 mm y < 5 mm de profundidad y ≤ 7 mm de ancho.
	IB	Lesiones clínicas confinadas en el cérvix, o lesiones preclínicas mayores a la etapa IA.
	IB1	Lesiones clínicas no mayores a 4 cm.
	IB2	Lesiones clínicas $>$ a 4 cm.
II		El carcinoma se extiende más allá del útero, pero no se extiende a la pared pélvica ni al último tercio de la vagina.
	IIA	Involucramiento hasta la parte superior del segundo tercio de la vagina. No involucramiento parametrial evidente.
	IIA1	Lesiones clínicas visibles ≤ 4 cm
	IIA2	Lesiones clínicas visibles $>$ 4 cm
	IIB	Involucramiento parametrial evidente pero no dentro de la pared pélvica.
III		El carcinoma se extiende a la pared pélvica. A la examinación rectal, no hay espacio entre el tumor y la pared pélvica. El tumor involucra el último tercio de la vagina. Todos los casos de hidronefrosis o falla renal deben ser incluidos al menos que se conozca otra causa.
	IIIA	Involucramiento del último tercio de la vagina, pero no se extiende dentro de la pared pélvica.
	IIIB	Extensión a la pared pélvica, o hidronefrosis/falla renal.
IV		El carcinoma se extiende más allá de la pelvis o involucra la mucosa de la vejiga y/o el recto.
	IVA	Se extiende a órganos pélvicos adyacentes.
	IVB	Se extiende a órganos distantes.

Tabla 1. Etapas del CaCu. Modificado de FIGO, 2014.

4. Respuesta inmunológica en CaCu

El HPV tiene varios mecanismos por los cuales evade la respuesta inmune. En un inicio, este virus permanece sin ser detectado por periodos largos de tiempo debido a que su duplicación y ensamblaje no causa citólisis de las células hospederas (Stanley y Sterling, 2014).

Algunos componentes de este virus le facilitan la evasión del sistema inmune, entre ellos las proteínas codificadas por sus genes tempranos. La proteína E5 puede disminuir la expresión del antígeno leucocitario humano clase I (HLA clase I) en las células infectadas (Campo *et al.*, 2010) lo que resulta en una disminución de la función de los linfocitos citotóxicos. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV pueden disminuir la expresión del receptor tipo Toll 9 (TLR9), el cual es necesario para el reconocimiento de DNA viral en las células presentadoras de antígenos (Hasan *et al.*, 2013) y también inhiben la síntesis de Interferón gama (IFN γ) (Crosbie *et al.*, 2013). En células infectadas por HR-HPV, la proteína E2 se une a la región reguladora del gen para la interleucina 10 (IL-10) e induce su expresión (Bermudez-Morales *et al.*, 2011). La IL-10 puede crear un microambiente inmunotolerante, facilitando la progresión de la enfermedad (Song *et al.*, 2015). El porcentaje de células que expresan IL-10, Fox-P3, IFN γ e indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO) se incrementa en las células de cérvix con neoplasia intraepitelial con respecto a las de cérvix normal (Kobayashi *et al.*, 2008; Mittal *et al.*, 2013).

En primera instancia, la infección por HR-HPV promueve la migración de células del sistema inmune al estroma. Los macrófagos, linfocitos T, células dendríticas (DCs) y las células natural killer (NK) desempeñan un papel importante en la respuesta inmune a la infección (Song *et al.*, 2015). Las células NK predominan en las primeras etapas de la infección y en las lesiones de bajo grado. En CaCu positivo a HPV 16, se ha encontrado que la expresión de algunos receptores de activación de las células NK, como NKp30, NKp45, NKp46, NKG2D y NKp80 se encuentra disminuida (García-Iglesias *et al.*, 2009), lo que puede estar relacionado con una disminución en su actividad citotóxica y con la progresión de la enfermedad.

Durante la progresión de CaCu, se incrementa significativamente el número de macrófagos M2 (Lepique *et al.*, 2009), los cuales pueden promover la proliferación y migración de células tumorales, favorecer la angiogénesis e inhibir a otras células del sistema inmune (Hammes *et al.*, 2007).

En relación con linfocitos T, durante la infección por HPV, se incrementa la presencia de linfocitos T-*helper* tipo 2 (Th2) (Bais *et al.*, 2005). El incremento en la respuesta Th2 y la disminución en la respuesta Th1 puede facilitar la progresión de la enfermedad. La presencia de este virus también induce la infiltración de linfocitos T reguladores (Treg), así como la producción de IL-10 y del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) las cuales son citocinas antiinflamatorias (Song *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016). La presencia de Tregs específicos a los antígenos E6 y E7 ha sido detectada en lesiones de alto grado de CaCu (De Vos Van Steenwijk *et al.*, 2008). Se ha reportado que los linfocitos Treg provenientes

de tumores de CaCu son capaces de inhibir la producción de IFN γ por las células NK de sangre periférica de pacientes con CaCu estimuladas con IL-12 (Chang *et al.*, 2016).

Se ha encontrado un número muy bajo o incluso la ausencia total de DCs funcionales en pacientes con CaCu (Song *et al.*, 2015). La expresión de la proteína E6 en células tumorales puede inhibir la diferenciación de monocitos en DCs funcionales (Iijima *et al.*, 2013). Además, se ha correlacionado la disminución de la expresión de CD80 y CD86 en DCs con una progresión en la enfermedad (Yang *et al.*, 2013) y la activación de PD-1/PD-L1, los cuales inducen una señal inhibitoria en los linfocitos T activados y promueven la apoptosis de los mismos, lo cual se asocia a la baja inmunidad de las DCs en CaCu (Yang *et al.*, 2013).

Otro mecanismo por el cual las células tumorales evaden la respuesta inmune es a través de la inhibición en la expresión de ligandos de receptores de activación de los linfocitos. NKG2D es un receptor de activación tipo lectina que se expresa en la superficie de las células NK y en los linfocitos $\gamma\delta$ T y CD8+ $\alpha\beta$ (Raulet, 2003). Los ligandos de NKG2D consisten en los dos miembros de la familia de *MHC class I-related chain* (MIC) MICA y MICB, y seis miembros de la familia *UL16 binding protein* o *retinoic acid early transcript* (ULBP/RAET) ULBP1, ULBP2, ULBP3, RAET1E, RAET1G y RAET1L (Raulet, 2003).

MICA y MICB se expresan bajo condiciones de estrés celular y actúan como ligandos de estimulación y activan al receptor NKG2D (Chen y Gyllensten, 2014). Hay una expresión baja de MICA constitutiva en células epiteliales del intestino y

del timo, células endoteliales, fibroblastos y monocitos (Groh *et al.*, 1996; Zwirner *et al.*, 1998). Su expresión se incrementa bajo condiciones de estrés como durante una infección viral o bacteriana, choque de calor, daño al DNA, transformación oncogénica y condiciones autoinmunes (Chen y Gyllensten, 2014). Las células tumorales han desarrollado mecanismos para minimizar o evadir la respuesta mediada por NKG2D eliminando MICA de la superficie celular e induciendo su liberación como MICA soluble (Groh *et al.*, 2002) lo que evita el reconocimiento de las mismas y resulta en una disminución de la expresión de NKG2D en las células NK y T CD8+ (Groh *et al.*, 2002). Una elevada expresión de MICA/B, ULBP1 y RAET1E en CaCu se relaciona a un mayor periodo de supervivencia libre de enfermedad (Cho *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que la presencia de moléculas inmunomoduladoras en cáncer puede favorecer la progresión del mismo. Algunas de estas moléculas encontradas en CaCu sonIDO y prostaglandina E2 (PGE2).IDO es una enzima intracelular que desempeña un papel importante para la inmunosupresión en el microambiente tumoral (Prendergast *et al.*, 2014). Las células trofoblásticas, DCs, macrófagos y las células tumorales pueden producirIDO bajo el estímulo de ligandos deTLRs, endotoxinas y deIFN γ (Ferns *et al.*, 2015). Esta enzima produce un estado de inmunotolerancia a través de la degradación del triptófano, el cual es metabolizado a través de la vía de las quinureninas. El triptófano es un aminoácido esencial requerido para la función efectora de los linfocitos T, mientras que las quinureninas tienen múltiples efectos en estas células, como inhibir su proliferación, inducir apoptosis y una diferenciación hacia un fenotipo regulador

(Kolodziej *et al.*, 2011; Orabona y Grohmann, 2011). Además, las quinureninas pueden reducir el número de células NK y disminuir su función citotóxica al inhibir la expresión de sus receptores de activación, lo que puede contribuir a la progresión tumoral (Chiesa *et al.*, 2006). Por otra parte, la expresión deIDO inhibe la actividad citotóxica de las células NK *in vitro* e inhibe la acumulación de estas células dentro del estroma tumoral en cáncer de ovario *in vivo* (Nonaca *et al.*, 2011).

La actividad de IDO se ha correlacionado con progresión tumoral y se ha propuesto que puede facilitar la metástasis (Muller *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). En CaCu, la actividad de esta enzima se ha asociado a un mal pronóstico y baja supervivencia (Ferns *et al.*, 2015) y la inhibición de la misma en células tumorales transfectadas para expresar constitutivamente esta enzima inhibe la progresión del cáncer *in vivo* (Sato *et al.*, 2012).

Finalmente, la PGE2 es producida por muchas células, como fibroblastos, macrófagos y algunos tipos de células malignas. PGE2 tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de linfocitos T, además, inhibe la producción de citocinas de tipo Th1 como IL-2 e INF γ e incrementa la actividad Th2, induciendo la liberación de IL-4, IL-5 e IL-10 (Harris *et al.*, 2002).

II. MICROAMBIENTE TUMORAL

Se ha establecido que las células malignas adquieren ciertas características que les permiten generar tumores: capacidad de proliferación sostenida, evasión de señales inhibitorias de crecimiento, inmortalidad replicativa, resistencia a la muerte

celular, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis, desregulación energética y evasión de la respuesta inmune (Hanahan y Weinberg, 2011). Sin embargo, las células tumorales por si solas no son capaces de generar estas condiciones, es necesario que exista un microambiente idóneo para la proliferación, supervivencia e invasión de éstas: el microambiente tumoral (Hanahan y Coussens, 2012).

1. Componentes del microambiente tumoral

El microambiente tumoral está compuesto por diversos tipos celulares, matriz extracelular de soporte y diversas moléculas solubles que en conjunto favorecen el desarrollo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1. Células Tumorales

Las células tumorales poseen diversas alteraciones en su genoma que les permite proliferar de manera incontrolada, como mutaciones y pérdida o amplificación de regiones del mismo, así como activación de oncogenes y silenciamiento de genes supresores de tumores (Albertson *et al.*, 2003).

Se ha reportado la presencia de células troncales tumorales (CSCs) como iniciadoras del cáncer en neoplasias hematológicas y en algunos tumores sólidos como cáncer de mama, tumores neuroectodermales, pancreáticos y colorrectales (Hanahan y Weinberg, 2011). Algunos marcadores de superficie expresados por las CSCs son CD44 y CD24 (Clevers, 2011).

1.2. Células estromales

Las células estromales presentes en tumores se pueden clasificar en tres grupos: células vasculares angiogénicas, células inmunológicas infiltrantes y fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) (Hanahan y Coussens, 2012). Algunos autores describen a las células estromales mesenquimales (MSCs) dentro de los CAFs, siendo las células que les dan origen (Hanahan y Coussens, 2012). No obstante, se puede considerar a las MSCs como un ente más dentro del microambiente tumoral que no sólo es capaz de diferenciarse a otros linajes, si no que por sí mismas llevan a cabo diversas funciones que permiten el desarrollo del tumor.

1.2.1. Células estromales mesenquimales (MSCs)

Las MSCs son una población heterogénea que inicialmente fue aislada de la médula ósea (MO) (Friedenstein *et al.*, 1974) y que se encuentran prácticamente en todo el tejido conjuntivo del organismo (Da Silva Meirelles *et al.*, 2006). Las MSCs tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, ya que pueden diferenciarse en linajes mesenquimales y además secretan citocinas y factores de crecimiento con efectos paracrinos que favorecen la regeneración de tejidos dañados (Gazit *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014). Aunado a lo anterior, las MSCs presentan importantes propiedades inmunomoduladoras *in vitro* e *in vivo* (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015).

Dentro del microambiente tumoral, las MSCs secretan diferentes factores, como IL-10,IDO, PGE2 y adenosina, que inhiben la respuesta inmune y favorecen la proliferación de las células tumorales y la metástasis (Montesinos *et al.*, 2013;

Mora-García *et al.*, 2016; Galland *et al.*, 2017; Gazdic *et al.*, 2017). Además, las MSCs pueden inducir la producción de TGF- β 1 y de IL-10 en las células tumorales, lo que ayuda a la evasión de la respuesta inmune (Xu *et al.*, 2012; García-Rocha *et al.*, 2015).

1.2.2. Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs)

Los fibroblastos son las células que predominan en el estroma de la mayoría de los tumores y entre sus principales funciones está secretar los componentes de la matriz extracelular (ECM) (Tlsty y Coussens, 2006). Los CAFs presentan un fenotipo de miofibroblastos y expresan principalmente α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína de activación de fibroblastos (FAP), la glicoproteína de membrana Thy-1, desmina y la proteína S100 de unión a calcio A4 (S100A4) (Tlsty y Coussens, 2006; Xing *et al.*, 2010). Además, estas células también secretan factores que promueven la tumorigénesis como metaloproteinasas, quimiocinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y el factor derivado de las células estromales-1 (SDF-1/CXCL12) los cuales estimulan la proliferación de las células tumorales (Xing *et al.*, 2010; Hanahan y Coussens, 2012).

1.2.3. Células vasculares angiogénicas

Las células que están implicadas en la angiogénesis tumoral son las células endoteliales y los pericitos (Armulik *et al.*, 2005). Las células endoteliales en tumores tienen la capacidad de degradar la membrana basal y la matriz extracelular a través de la secreción de metaloproteasas. Además, expresan en su

superficie receptores que permiten la adhesión a la matriz extracelular y a leucocitos circulantes y también poseen receptores para factores de crecimiento angiogénicos que son escasos en vasos sanguíneos normales (Bussolati *et al.*, 2010). Por otra parte, los pericitos asociados a tumores presentan múltiples anormalidades, como pérdida de la asociación con la pared del vaso sanguíneo y alteración en su expresión de proteínas (Morikawa *et al.*, 2002).

1.2.4. Células inmunes infiltrantes

Virtualmente todos los tumores sólidos presentan un infiltrado de diversas células leucocitarias (Tlsty y Coussens, 2006). En la mayoría de los tumores, los macrófagos son el principal componente del infiltrado leucocitario. Estas células inmunes pueden diferenciarse en dos tipos: M1 (clásicamente activados), los cuales son proinflamatorios y M2 (alternativamente activados), los cuales promueven la angiogénesis, remodelación y reparación en tejidos dañados (Sica, 2010). Los macrófagos asociados a tumores presentan un fenotipo M2, el cual favorece el desarrollo del cáncer (Mantovani *et al.*, 2002).

Otras células inmunes presentes en casi todos los tumores sólidos son los eosinófilos, los cuales varían en cantidad dependiendo del tipo de tumor (Lee *et al.*, 2010). Con relación a los neutrófilos, que también son comúnmente encontrados en tumores, se ha sugerido que estos pueden presentar dos fenotipos: N1, capaces de matar células tumorales y N2, que promueven el crecimiento del tumor (Fridlender *et al.*, 2009).

Las células NK son una clase de linfocitos que se encuentran en el microambiente tumoral (Policastro *et al.*, 2012). Más adelante se describe a detalle su papel en el mismo.

En cuanto a la inmunidad adaptativa, los linfocitos citotóxicos CD8+ desempeñan un papel importante eliminando células tumorales (DeNardo *et al.*, 2010). La presencia de linfocitos CD4+ Th1 productores de IFN γ correlaciona con buen pronóstico, mientras que la presencia de linfocitos CD4+ Th2 productores de IL-4, IL-5 e IL-13 o de Treg productoras de IL-10 y de TGF- β correlaciona con progresión de la enfermedad (Protti *et al.*, 2014).

1.2.4.1. Células Natural Killer (NK)

Las células NK son un tipo de linfocitos del sistema inmune innato que participan en la defensa frente a infecciones virales y contra células tumorales. Las células NK realizan su función a través de la secreción de citocinas como IFN γ , TNF- α y GM-CSF, además de poseer una actividad citotóxica (Walzer *et al.*, 2005). Estas células tienen la capacidad de atacar células tumorales y células infectadas por virus sin la necesidad de la presentación de antígenos específicos (Caligiuri, 2008).

Se dividen en dos subpoblaciones dependiendo de la expresión de la molécula CD56 y CD16 (Caligiuri, 2008). La mayoría de las células NK circulantes tienen un fenotipo CD3-CD16+CD56dim y desempeñan una actividad citotóxica, mientras que una subpoblación de células NK circulantes con un fenotipo CD3-CD16dim/-CD56bright presentan una baja actividad citotóxica y su principal función es

producir citocinas y quimiocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, IL-13, CCL3 y CCL4 (Lodoen y Lanier, 2006), al ser estimuladas con citocinas proinflamatorias como IL-12 y son consideradas inmunorreguladoras por algunos autores (Michel *et al.*, 2016).

La función de las células NK es regulada por el equilibrio entre señales transmitidas por receptores activadores e inhibidores que interactúan con moléculas HLA específicas en las células blanco (Walzer *et al.*, 2005). Cuando las células NK son expuestas a citocinas activadoras, como la IL-2, incrementan la expresión de receptores activadores NKp44, CD69, NKp30 y NKG2D (Moretta y Moretta, 2004). Las células NK tienen un efecto citotóxico mediado por perforinas, granzimas y Fas ligando (Le Blanc y Davies, 2015), sobre células que no expresan (o expresan de manera muy baja) HLA clase I, como las células infectadas por virus y las células tumorales (Poggi *et al.*, 2005) a través de receptores KIRs (Killer Ig-like Receptors).

En cuanto al microambiente tumoral, las células NK constituyen menos del 1% de las células CD45+ infiltradas en carcinoma de células escamosas de pulmón (Galland *et al.*, 2017) y presentan una disminución en su actividad citotóxica (Carrega *et al.*, 2008), mientras que en CaCu, las células NK en sangre periférica de pacientes constituyen entre 15 y 11% de los linfocitos, mientras que en tumores corresponden entre 3 y 4% de los linfocitos (Chang *et al.*, 2016).

La acumulación intratumoral de células NK ha sido correlacionada con una mejor tasa de supervivencia en cáncer de estómago y en cáncer de células escamosas de

pulmón (Ishigami *et al.*, 2000; Villegas *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha reportado que las células NK de tumores de CaCu, incrementan su expresión de receptores inhibidores como CD158a, CD158b y NKG2A y disminuyen su expresión de receptores activadores como NKG2D, NKp46 y NKp30 y de perforinas con respecto a las células NK de sangre periférica (Chang *et al.*, 2016).

1.2.4.2. Células NKT

Las células Natural Killer T (NKT) son una subpoblación de linfocitos T no convencionales, y pueden clasificarse en tipo I o invariantes (iNKT) y tipo II (Vivier *et al.*, 2012). iNKT expresan un TCR semi-invariante V α 24-J α 18 en humanos (Wei *et al.*, 2006), mientras que las NKT tipo II expresan un TCR más diverso, y sus funciones no están bien estudiadas (Vivier *et al.*, 2012).

Las células iNKT presentan un fenotipo y funciones similares a las observadas en las células NK: expresan CD56 en su membrana, pueden ser activadas por citocinas proinflamatorias y comportarse como células NK (Brigl *et al.*, 2011). Además, secretan citocinas al ser estimuladas (Stetson *et al.*, 2003) y desempeñan una función citotóxica, aunque a diferencia de las células NK, donde esta ocurre mayoritariamente por la vía perforína/granzimas, esta se da principalmente por la vía CD95/CD178 (Wingender *et al.*, 2010).

En cáncer, se ha reportado que la frecuencia de células NKG2D+CD56+ NKT en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico es significativamente menor que en personas sanas, por lo tanto, se ha sugerido que las células NKT podrían desempeñar un papel importante en la eliminación de

estas células tumorales (Gharagozloo *et al.*, 2018). En CaCu, se ha reportado un incremento en el número de células iNKT en lesiones de alto grado de cérvix en comparación con cérvix sano (0.6% en el primero y 0.27% en el segundo) (Hu *et al.*, 2015).

1.3. Matriz extracelular

La matriz extracelular regula la homeostasis tisular no sólo sirviendo como andamio para la organización del tejido, sino también como medio de comunicación e interacción entre las células y su desregulación contribuye al desarrollo tumoral (Pickup *et al.*, 2014).

Las proteínas estructurales de la matriz extracelular pertenecen a la familia de la colágena y de la elastasa. Fibronectina, laminina y tenascina desempeñan una función de adhesión, mientras que los proteoglicanos y el heparan sulfato estabilizan la matriz en el medio acuoso (Policastro *et al.*, 2012).

La matriz extracelular del microambiente tumoral es bioquímica y biomecánicamente diferente a la normal. Se ha observado en tumores un incremento de colágena tipo I y fibronectina, lo que aumenta la rigidez del tejido (Provenzano *et al.*, 2009). Otras proteínas como tenascina, decorina, fibromodulina y osteopontina también están involucradas en el desarrollo tumoral (Policastro *et al.*, 2012).

2. Microambiente tumoral en CaCu

Se ha demostrado la presencia de MSCs en cáncer de cérvix y su participación en proteger a las células neoplásicas de la actividad citotóxica de linfocitos T, favoreciendo así el crecimiento tumoral (Montesinos *et al.*, 2013).

Con respecto a CAFs, se ha reportado que los presentes en CaCu promueven el crecimiento de células tumorales incluso después de un tratamiento con radiación, lo cual se asoció a la secreción de IGF2, EGF, FGF-4 y GM-CSF (Chu *et al.*, 2014). Se han detectado niveles elevados de estrógenos en mujeres con lesiones pre-cancerígenas y con cáncer HPV+ (Salazar *et al.*, 2001). En CaCu, la expresión de ER α se mantiene en el estroma, pero se pierde en las células tumorales epiteliales (De Boon *et al.*, 2015) y los CAFs median la señalización estrógeno-dependiente (Kumar *et al.*, 2016).

Como se mencionó antes, en CaCu positivo a HPV 16, se ha encontrado que la expresión de algunos receptores de activación de las células NK se encuentra disminuida (García-Iglesias *et al.*, 2009), lo que puede estar relacionado con una disminución en su actividad citotóxica y con la progresión de la enfermedad. Finalmente, durante la progresión de CaCu, incrementa significativamente el número de macrófagos M2 (Lepique *et al.*, 2009), linfocitos Th2 (Bais *et al.*, 2005) y linfocitos Treg (Song *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016) mientras que disminuyen las DCs funcionales (Song *et al.*, 2015).

III. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (MSCs)

Como se mencionó anteriormente, las MSCs son una población heterogénea que se encuentran prácticamente en todo el tejido conjuntivo del organismo (Da Silva Meirelles *et al.*, 2006) y que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Gazit *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014).

Según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, las MSCs deben poseer morfología fibroblastoide al ser cultivadas *in vitro*, expresar CD105, CD73 y CD90, bajos niveles de MHC-I y ser negativas a MHC-II, CD11b, CD14, CD34, CD45, y CD31. Además, deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici *et al.*, 2006).

1. Propiedades funcionales

Las MSCs poseen tres características funcionales que las definen: capacidad de soporte hematopoyético, plasticidad e inmunoregulación (Montesinos y Castro, 2013).

La hematopoyesis es el proceso a través del cual se forman todas las células de la sangre y se lleva a cabo, desde el nacimiento, en la médula ósea (Montesinos y Castro, 2013). Se ha demostrado que la inyección suplementaria y simultánea de MSCs y células troncales hematopoyéticas (HSCs) acelera la recuperación de la hematopoyesis después de la irradiación letal de los animales receptores (Zhang *et al.*, 2004) e incluso se ha demostrado su eficacia al administrarlas en pacientes hematológicos a los que se les había realizado trasplante de HSCs (Le Blanc *et*

al., 2004). La regulación de la hematopoyesis por las MSCs se da a través de la producción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 y de la expresión de moléculas que favorecen la adhesión de las células hematopoyéticas como ALCAM, ICAM1-3, L-selectina y VCAM (Deans y Moseley, 2000).

La plasticidad es la capacidad que tiene una célula troncal de diferenciarse en células de su mismo linaje y además transdiferenciarse en células de linajes distintos (Wulf *et al.*, 2001). Se ha reportado que las MSCs son capaces de diferenciarse tanto en células de su mismo linaje (adipocitos, condroblastos y osteoblastos) (Dominici *et al.*, 2006), como en hepatocitos (Wu y Tao, 2012), cardiomiocitos (Guo *et al.*, 2018), células neurales (Mareschi *et al.*, 2006) entre otras.

1.1. Inmunomodulación

Se ha propuesto que las MSCs pueden ser pro- o anti-inflamatorias dependiendo del estímulo ambiental al que estén expuestas (Waterman *et al.*, 2010). Las MSCs de MO (MO-MSCs) expresan TLRs en su superficie celular (Waterman *et al.*, 2010), y la activación de estos modula su respuesta. Las MO-MSCs pro-inflamatorias se asocian a un estado temprano de inflamación o infección, y expresan TLR2 y TLR4 (Tomchuck *et al.*, 2008; Waterman *et al.*, 2010). Mientras que cuando las MO-MSCs están en un ambiente pro-inflamatorio (presencia de IFN- γ y TNF- α y ligandos de TLR3) estas modifican la producción de moléculas pro-inflamatorias por las células del sistema inmune (Aggarwal y Pittenger, 2005) y

secretan moléculas como IDO y PGE2 (Waterman *et al.*, 2010; Bernardo y Fibbe, 2013) que generan un ambiente anti-inflamatorio o tolerante.

Las MSCs son atraídas por quimiocinas inflamatorias hacia sitios de daño (Yagi *et al.*, 2010). Por ejemplo, las MO-MSCs expresan receptores para las anafilatoxinas del complemento (C3aR y C5aR) y se sugiere que estas actúan como agentes quimiotácticos que promueven la migración de estas células al sitio de inflamación (Le Blanc y Davies, 2015). Además, producen de manera constitutiva el factor H, que inhibe la activación del complemento, y esta producción incrementa cuando están expuestas a citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α (Tu *et al.*, 2010).

También interactúan con varias células inmunes (linfocitos T, B, DCs, células NK, macrófagos) e inhiben la secreción de moléculas proinflamatorias como TNF- α e INF- γ , además de incrementar la secreción de moléculas anti-inflamatorias como IL-10 (Aggarwal y Pittenger, 2005). Las MO-MSCs pueden inducir el cambio de los macrófagos M1 a M2 (Bernardo y Fibbe, 2013) y también pueden inducir este fenotipo M2 directamente desde monocitos, lo cual está regulado a través de PGE2, IL-6 e IDO (Le Blanc y Davies, 2015). Las MO-MSCs suprimen activación y proliferación de linfocitos T *in vitro* (Bartholomew *et al.*, 2002; Nauta y Fibbe, 2007), y la citotoxicidad de los linfocitos CD8⁺ (Rasmusson *et al.*, 2007) y polarizan a los linfocitos T hacia un fenotipo Treg (Bernardo y Fibbe, 2013). Además, interfieren con la diferenciación, maduración y función de las DC (Ramasamy *et al.*, 2007), e inhiben la diferenciación, proliferación y producción de anticuerpos por los linfocitos B (Nauta y Fibbe, 2007).

1.1.1. Inmunomodulación sobre células NK y NKT

Las interacciones entre las células NK y las MSCs son complejas (Figura 1). En un contexto de inflamación, las MO-MSCs y las NK tienen un sistema de activación tiempo-dependiente. Primero las MO-MSCs activadas secretan IFN de tipo I que mejora la función de las células NK, después, secretan TGF- β e IL-6 que llevan a las NK a un estado de senescencia e inhiben su función (Petri *et al.*, 2017).

Las MO-MSCs tienen una baja expresión de HLA clase I y además expresan PVR y Nectina-2 (ligandos de DNAM-1) y ULBPs, MICA y MICB (ligandos de NKG2D) en su membrana celular (Spaggiari *et al.*, 2006). Por lo tanto, las células NK estimuladas con IL-2, IL-15, o la combinación de IL-12 e IL-18, son capaces de lisar a las MSCs (Poggi *et al.*, 2005; Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006; Najjar *et al.*, 2018) a través de la interacción de NKG2D con MICA (Poggi *et al.*, 2005) y de la alteración de la expresión de serptinas en éstas, estimulando la generación de ROS (Najjar *et al.*, 2018). Sin embargo, si las células NK no son estimuladas antes de entrar en contacto con las MSCs, no son capaces de lisarlas (Poggi *et al.*, 2005; Sotiropoulou *et al.*, 2006; Prigione *et al.*, 2009). Se ha reportado que el bloqueo de NKp30, NKG2D y DNAM-1 puede inhibir este efecto citolítico (Spaggiari *et al.*, 2008). Por otra parte, si las MO-MSCs son estimuladas con IFN- γ antes de ponerlas en contacto con las células NK, incrementan su expresión de HLA clase I y son capaces de evadir la lisis mediada por las células NK (Spaggiari *et al.*, 2008).

Se ha observado que en MO-MSCs estimuladas con IFN γ incrementa la expresión de CD112 (Nectina-2) y CD155 (PVR), los cuales son ligandos de DNAM-1 (Spaggiari *et al.*, 2008), pero disminuye cuando están en contacto con células NK estimuladas con IL-12 e IL-2 (Najar *et al.*, 2018).

Se ha observado que las MO-MSCs inhibe la proliferación de las células NK estimuladas con IL-2 o IL-15 (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006). Sin embargo, un estudio reciente mostró que dependiendo de la citocina con que se activen las células NK, las MO-MSCs pueden o no disminuir su proliferación: si son estimuladas con IL-12 o IL-21, el efecto es inhibitorio, pero si son estimuladas con IL-2 o IL-15 no (Najar *et al.*, 2018).

Las células NK co-cultivadas con MO-MSCs expresan CD69 e incrementan la secreción de TNF- α (Prigione *et al.*, 2009; Najar *et al.*, 2018) y de IFN- γ (Spaggiari *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2016; Najar *et al.*, 2018). Pero cuando están en contacto con MO-MSCs previamente activadas con IFN- γ , se inhibe la secreción de esta citocina por las células NK (Spaggiari *et al.*, 2008). También se ha reportado que las MO-MSCs inhiben la secreción de IFN- γ , IL-10, TNF α en células NK estimuladas con IL-15 (Sotiropoulou *et al.*, 2006).

En cuanto a su efecto sobre la citotoxicidad, las MO-MSCs disminuyen la expresión de NKp30, NKp44 y NKG2D en las células NK, por lo que disminuyen su actividad citotóxica (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). Contradictoriamente, se ha reportado que las MO-MSCs incrementan la

degranulación de las células NK (medida a través de la expresión de CD107a) y su secreción de granzimas y perforinas (Najar *et al.*, 2018).

Las moléculas involucradas en la inhibición de la actividad funcional de las células NK por las MO-MSCs son IDO y PGE2, y además se ha observado un efecto sinérgico entre estas, mientras que TGF- β no está involucrado directamente en la interacción entre estas células (Spaggiari *et al.*, 2008).

En cuanto a las interacciones con células iNKT, hay muy poca información, sin embargo, se sabe que las MO-MSCs inhiben la proliferación y la producción de IFN- γ por las células iNKT a través de PGE2, pero no tienen efecto sobre su citotoxicidad (Prigione *et al.*, 2009). Se ha descrito que las MO-MSCs inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-4 y estimulan la producción de IL-10 por células NKT en un modelo de daño hepático en ratón lo cual es mediado por IDO (Gazdic *et al.*, 2017).

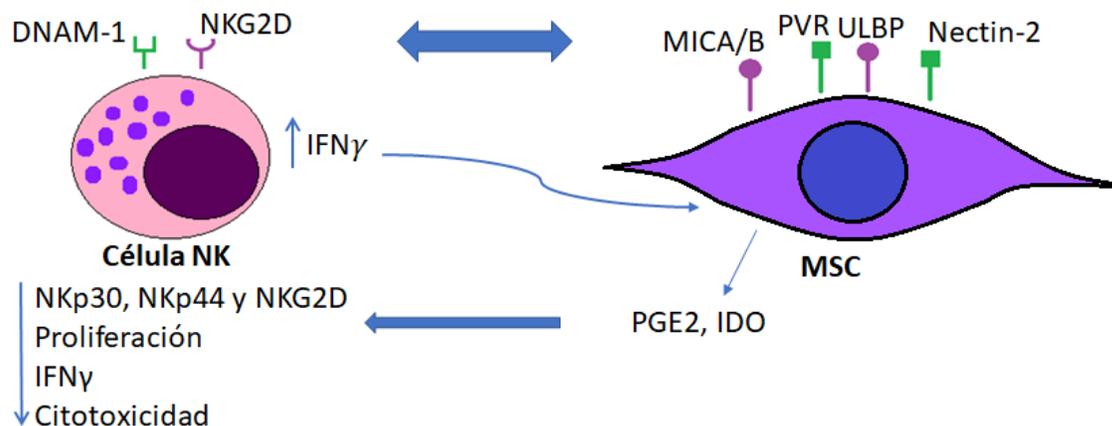


Figura 1. Interacciones entre las MO-MSCs y las células NK. Las interacciones entre las MO-MSCs y las células NK son complejas. Las MO-MSCs expresan MICA, MICB, ULBP (ligandos de NKG2D), PVR y Nectina-2 (ligandos de DNAM-1) y por lo tanto pueden activar a las células NK y ser lisadas. Sin embargo, esta lisis sólo se observa si las células NK son estimuladas con IL-2, IL-15 o una combinación de IL-12 e IL-18. Al ser activadas las células NK, producen IFN- γ que activa a las MSCs y como respuesta estas producen IDO y PGE2 que disminuyen la función de las células NK.

2. MSCs en cáncer

La MSCs se han detectado en tumores, tales como: carcinoma ovárico (McLean *et al.*, 2011), tumores de células gigantes de hueso (Wulling *et al.*, 2003), neuroblastoma (Johann *et al.*, 2010), osteosarcomas (Gibbs *et al.*, 2005), lipomas (Lin *et al.*, 2007), cáncer gástrico (Cao *et al.*, 2009) y carcinoma de células escamosas de pulmón (Galland *et al.*, 2017). Nuestro grupo de investigación demostró la presencia de MSCs en cáncer de cérvix y su participación en proteger a las células neoplásicas de la actividad citotóxica de linfocitos T, favoreciendo así el crecimiento tumoral (Montesinos *et al.*, 2013).

En el contexto del microambiente tumoral, se ha reportado que las MSCs de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) tienen un efecto

inmunoestimulador sobre las células NK, y además este efecto es inducible cuando MSCs de donadores sanos son co-cultivadas con células de LLA (Entrena *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha propuesto que en tejidos quiescentes, en ausencia de estímulos inflamatorios, las MSCs pueden disminuir o incluso perder temporalmente su capacidad inmunosupresora. Sin embargo, en un microambiente tumoral, que imita la reparación tisular y contiene una gran variedad de citocinas pro-inflamatorias, las MSCs pueden recuperar su potencial inmunosupresor (Galland *et al.*, 2017). Al respecto, se ha reportado que las MSCs provenientes de carcinoma de células escamosas de pulmón pueden disminuir *in vitro* la producción de IFN- γ y TNF α además de la expresión de CD107a, NKp44, NKp30, NKG2D, DNAM-I, y NKG2A en células NK a través de la secreción de PGE2 (Galland *et al.*, 2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto con mayor incidencia y mortalidad en mujeres (GCO, 2012). En México, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar en incidencia y es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos en mujeres (INEGI, 2016).

Se ha sugerido que las células estromales mesenquimales (MSCs) forman parte del microambiente tumoral y podrían tener una capacidad inmunosupresora el cual favorecería el desarrollo del tumor (Hanahan y Coussens, 2012).

Como mencionamos anteriormente, se ha demostrado la presencia de MSCs en CN y en CaCu y estas células disminuyen la actividad citotóxica de los linfocitos CD8+ a través de la disminución de la expresión de HLA clase I en las células tumorales (Montesinos *et al.*, 2013). Sin embargo, no se sabe el efecto que tengan estas MSCs sobre las células del sistema inmune, y particularmente sobre las células NK, las cuales desempeñan un papel importante en la eliminación de las células tumorales (Song *et al.*, 2015) y cuya desregulación puede estar asociada a un mal pronóstico de la enfermedad (García-Iglesias *et al.*, 2009).

HIPÓTESIS

Las MSCs de CaCu (CaCu-MSCs) a diferencia de las MSCs de CN (CN-MSCs), tendrán la capacidad de disminuir la proliferación y capacidad citotóxica de células NK. Además, favorecerán la producción de moléculas inmunosupresoras en los co-cultivos con células NK.

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad inmunosupresora de las MSCs provenientes de pacientes con cáncer de cérvix sobre células NK.

II. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la expresión de MICA y MICB en las MSCs de CaCu en co-cultivo con células NK.
2. Evaluar el efecto de las CaCu-MSCs sobre la proliferación de células NK.

3. Determinar el efecto de las CaCu-MSCs en la actividad citotóxica de células NK.
4. Evaluar la producción de IFN- γ e IL-10 en las células NK provenientes de co-cultivo con CaCu-MSCs.
5. Evaluar la producción deIDO y PGE2 en las CaCu-MSCs en co-cultivo con células NK.

METODOLOGÍA

I. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS

1. MSCs de médula ósea (MO-MSCs)

Las MO-MSCs se obtuvieron de muestras criopreservadas y previamente caracterizadas. Brevemente, se obtuvieron muestras de 5 ml de MO, previo consentimiento informado, de donadores adultos hematológicamente sanos (n=4) que ingresaron al Hospital de traumatología y ortopedia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y de estas se separaron células mononucleares (CMN) mediante un gradiente de densidad. Las CMN fueron resuspendidas y sembradas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco bajo en glucosa (DMEM-Ig, Gibco, California, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Las células que se adhirieron a la caja de cultivo se cosecharon, resembraron y posteriormente se caracterizaron por medio de su inmunofenotipo y su capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica.

Para determinar su inmunofenotipo, se analizó la expresión de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, donde más del 90% fueron positivas a CD105, CD90, CD73, HLA-ABC y CD13 y negativas a HLA-DR, CD45, CD14, CD34 y CD31.

Para determinar su capacidad de diferenciación, se cultivaron en presencia de medios osteogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), condrogénico (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Maryland, USA) o adipogénico (Stem Cell Technologies) durante tres semanas. Después de este periodo, se comprobó la diferenciación mediante la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina (osteogénesis) o las tinciones de rojo oleoso (adipogénesis) y azul alciano (condrogénesis).

2. MSCs de cérvix normal (CN-MSCs) y de cáncer cervicouterino (CaCu-MSCs)

Se utilizaron células criopreservadas de CN-MSCs y de MSCs de carcinoma epidermoide de cérvix (CaCu-MSCs) previamente caracterizadas. Brevemente, las muestras de CN se obtuvieron previo consentimiento informado de donadoras sin lesiones ni cáncer de cérvix (n=3) que fueron sometidas a histerectomías y las muestras de CaCu fueron obtenidas previo consentimiento informado de biopsias de pacientes en estadios IIB, IIIA y IIIB (n=4) que fueron enviadas al Departamento de Patología del Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, para su diagnóstico. Se procesaron las muestras mediante disgregación enzimática (solución 0.5% tripsina 0.2% EDTA, Gibco) y mecánica y

se sembraron las células en medio DMEM-Ig suplementado al 10% SFB (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Se obtuvieron las células adherentes y se caracterizaron como se describe en la sección de MO-MSCs.

Se descongelaron las MSCs de cada fuente y se cultivaron en medio DMEM-Ig (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado al 10% con SFB (Biowest), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Una vez que alcanzaron una confluencia del 80-90% se cosecharon con tripsina-EDTA 1x (Biowest), y se sembraron para los experimentos como se describe más adelante. Se utilizaron resiembras de R3 a R6 tanto de MO-MSCs como de CaCu-MSCs.

3. Células NK y NKT

Para obtener linfocitos NK, se utilizaron muestras de sangre periférica de donadores sanos y se separaron las células mononucleares por gradiente de densidad (Lymphoprep, Stem Cell Technologies). Posteriormente se separaron a las células CD56+ por selección positiva utilizando perlas CD56+ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se evaluó el porcentaje de células CD56+ obtenidas mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD56-PECy7 (BioLegend, San Diego, California, USA), siendo más del 97%.

Para los ensayos de proliferación, producción de IL-10 y expresión de NKG2D, se evaluaron dos poblaciones: células NK (CD56+CD3-) y células NKT (CD56+CD3+), para ello se utilizaron los anticuerpos anti-CD56-PECy7

(BioLegend) y anti-CD3-PE (BD, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA) o anti-CD3-FITC (BD).

II. CO-CULTIVOS

Para los ensayos de proliferación y producción de citocinas, se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano 20,000 MSCs por pozo, con DMEM-Ig (Biowest) suplementado al 10% con SFB (Biowest) y con penicilina, estreptomycin y L-glutamina en las concentraciones antes descritas, y a las 24 h se cambió el medio. En cuanto las células formaron monocapas (48 h), se cambió el medio a medio de co-cultivo, el cual consistió de 50% DMEM-Ig (Biowest) y 50% RPMI 1640 (Biowest) suplementado al 10% con SFB (Biowest), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina. Sobre esta monocapa se sembraron 100,000 células CD56+ por pozo recién obtenidas de sangre periférica y se estimularon con 15 ng/ml de IL-2 cys145ser (R&D, Minneapolis, USA) y se dejaron en co-cultivo durante 5 días.

Para los ensayos de citotoxicidad y para evaluar la expresión de MIC A/B y la producción de IDO y PGE2 en las MSCs, se sembraron 70,000 MSCs por pozo en placas de 48 pozos, en DMEM-Ig (Biowest) suplementado al 10% con SFB (Biowest) y con penicilina, estreptomycin y L-glutamina en las concentraciones antes descritas. Se incubaron 24 h y se les cambió el medio a medio de co-cultivo. Se sembraron sobre las monocapas de MSCs 350,000 células CD56+ recién aisladas por pozo, se adicionaron 15 ng/ml de IL-2 (R&D) y se cultivaron durante 5 días.

III. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NK Y NKT

Se tiñeron a las células CD56+ recién aisladas con carboxifluoresceína ester succinimidil (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) a una concentración de 2.5 μ M, se sembraron en co-cultivo con MSCs de las diferentes fuentes y se estimularon con 15 ng/ml de IL-2 (R&D) por 5 días. Como controles, se sembraron durante el mismo periodo de tiempo células CD56+ teñidas con CFSE (Invitrogen) sin MSCs estimuladas con IL-2 (R&D) (control positivo) y sin estimular (control negativo). Se realizaron co-cultivos en contacto celular y sin contacto celular utilizando una membrana permeable con un ancho de poro de 0.4 μ m Transwell (Corning, Nueva York, USA).

Después de 5 días, se cosechó la fracción no adherente y se les realizó tinción de citometría para los marcadores CD56 (PECy7, BioLegend), CD3 (PE, BD) y para viabilidad con 7-AAD (BD). Se realizó su lectura inmediata en un citómetro FACS CANTO II BD (BD, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA) y se realizó el análisis de los datos con el programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA).

IV. CITOTOXICIDAD

Se co-cultivaron MSCs de las diferentes fuentes con células CD56+ como se describió anteriormente. Se cosechó la fracción no adherente (efectoras) y se sembraron en placas de 96 pozos con fondo en U junto con células de la línea K562 como blanco en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 10% SFB (Biowest), penicilina, estreptomina y L-glutamina en las concentraciones antes descritas.

Se sembraron las siguientes proporciones (efectora: blanco):

- 1:1 (100,000:100,000)
- 2:1 (200,000:100,000)
- 4:1 (400,000:100,000)

Se incubaron durante 4h y después se les realizó una tinción de citometría para CD56-PECy7 (BioLegend), AnnexinV-APC (BD) y 7-AAD (BD). Se realizó su lectura de manera inmediata en un citómetro FACS CANTO II BD (BD). Se analizaron los datos con el programa FlowJo. El porcentaje de citotoxicidad se evaluó sumando el porcentaje de células en apoptosis temprana (Annexin V+, 7-AAD-) más el porcentaje de las células en apoptosis tardía (Annexin V+, 7-AAD+).

V. DETECCIÓN DE IFN- γ E IL-10 EN LAS CÉLULAS CD56+

Se realizaron co-cultivos de células CD56+ y MSCs como se describió anteriormente. También se sembraron células CD56+ sin MSCs estimuladas con IL-2 (R&D) (control positivo) y sin estimular (control negativo) durante el mismo periodo de tiempo. A los 4 días de co-cultivo, se les adicionó 1ng/ml de IL-12 (R&D) y 10 ng/ml de IL-18 (R&D) para estimular la producción de citocinas, y se estimularon por 24h. Se incubaron con GolgiStop (BD) por 6 h, y se tiñeron con CD56-PECy7 (BioLegend) y CD3-FITC (BD) para citometría de flujo, seguida de una tinción intracelular para detectar IFN γ -BV421 (BD) e IL-10-PE (BD). Para la tinción intracelular, las células NK fueron fijadas y permeabilizadas con solución Cytotfix/Cytoperm (BD), luego incubadas con anti- IFN γ -BV421 (BD) y/o anti-IL-10-PE (BD) por 20 minutos a 4°C, lavadas y resuspendidas en PBS para su análisis.

Se realizó su lectura inmediata en un citómetro FACS CANTO II BD (BD) y se realizó el análisis de los datos con el programa FlowJo.

VII. PRODUCCIÓN DEIDO, PGE2 Y EXPRESIÓN DE MICA/B POR LAS MSCs

Para evaluar la producción deIDO y la expresión de MICA/B en las MSCs, se cultivaron células CD56+ con MSCs de las diferentes fuentes como se describió anteriormente. Después de 5 días, se incubaron con GolgiStop (BD) por 6 h, se cosecharon las monocapas de MSCs de manera mecánica y se les realizó una tinción de citometría para detectar CD90-APC (BD), MICA/B (BD) seguida de una tinción intracelular para detectarIDO-PE (BD).

Para la detección de PGE2, se colectaron los sobrenadantes de los co-cultivos y se realizó con un kit de detección ELISA (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó en un lector de ELISA (DYNATEC MR5000) a 412 nm.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La n de las muestras de MSCs fue 3 para cada tipo, y cada una se retó con dos donadores diferentes de células CD56+. Se analizaron los datos con el programa SPSS statistics 25, utilizando ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey tomando como nivel de significancia los valores ≤ 0.05 .

RESULTADOS

I. LAS CaCu-MSCs EXPRESAN MICA/B EN SU MEMBRANA DE MANERA BASAL Y ESTA EXPRESIÓN DISMINUYE CUANDO ESTÁN EN CONTACTO CON CÉLULAS NK ESTIMULADAS

Se sabe que las MO-MSCs expresan PVR y Nectina-2 (ligandos de DNAM-1) así como ULBPs, MICA y MICB (ligandos de NKG2D) en su membrana celular (Spaggiari *et al.*, 2006). Además, se ha observado que la expresión de Nectina-2 y PVR en las MO-MSCs disminuye cuando están en contacto con células NK estimuladas con IL-2 (Najar *et al.*, 2018). La presencia de estos ligandos de receptores de activación de las células NK en las MSCs, media el efecto citotóxico que las células NK tienen sobre estas. Por su parte, la disminución en expresión de dichos ligandos en las MSCs, puede evitar que sean lisadas por las NKs y por lo tanto, sean capaces de ejercer su actividad inmunosupresora. Con estos antecedentes, en primera instancia decidimos analizar la interacción entre MSCs y células NKs en el contexto de la regulación de la expresión de ligandos de activación de células NKs por parte de las MSCs.

Con este propósito se cultivaron MO-MSCs (como control), CN-MSCs (también como control) y CaCu-MSCs en presencia y en ausencia de células CD56+ activadas con IL-2 y se evaluó la expresión de MICA/B en la membrana celular de las MSCs mediante citometría de flujo.

Solamente las MO-MSCs y las CaCu-MSCs expresaron MICA/B de manera basal ($52.77\% \pm 2.56$ y $51.6\% \pm 5.33$ respectivamente) (figura 2) y esta disminuyó de

manera significativa cuando estuvieron en contacto con células NK activadas con IL-2 (29.38%±6.12 y 27.2%±4.22 respectivamente) (figura 2 A, B).

Estos resultados sugieren que las MSCs de CaCu, al igual que las de MO, tienen una alta expresión basal de MICA/B, por lo cual son susceptibles de ser lisadas por las células NK. De manera interesante, la expresión de los ligandos disminuye significativamente cuando están en contacto con las células NK activadas, con lo cual podrían evadir su efecto citotóxico mediado por NKG2D.

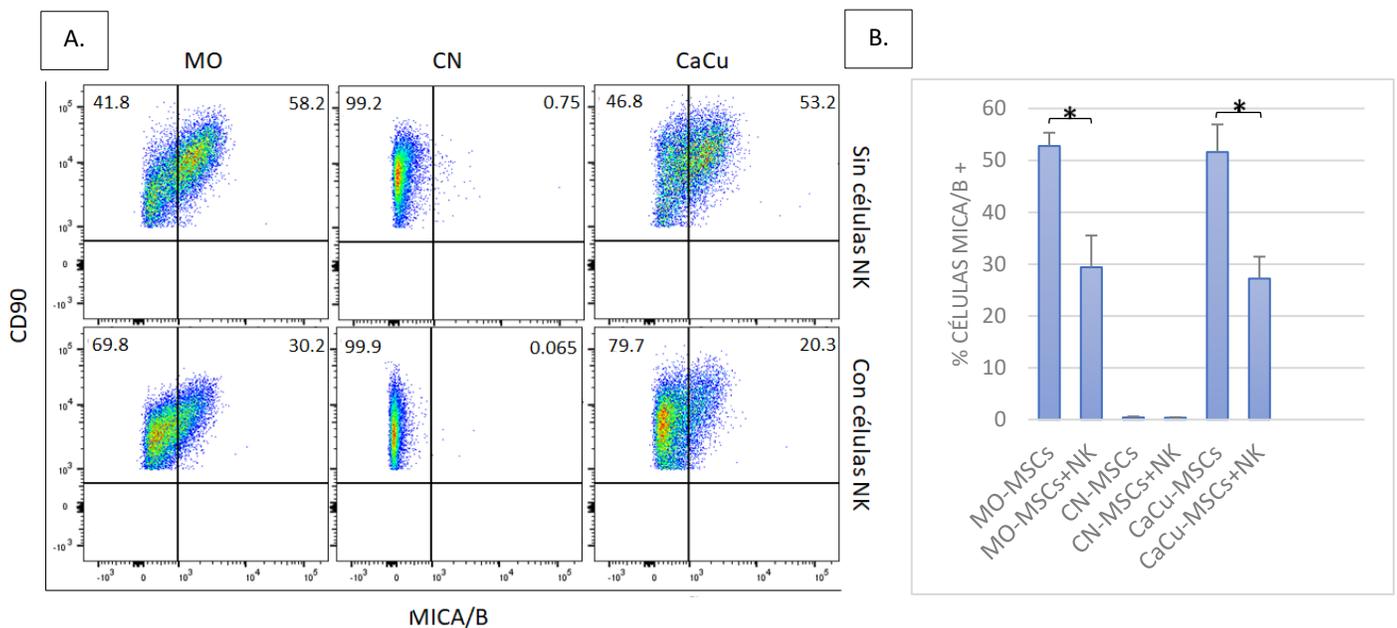


Figura 2. Las CaCu-MSCs expresan MICA/B en su membrana. Se cultivaron MSCs de MO, CN y CaCu solas y en presencia de células NK activadas con IL-2 durante 5 días. A) Gráficas de puntos representativas de la expresión de MICA/B en las MSCs de CaCu. B) Las CaCu-MSCs expresan MICA/B en su membrana y esta disminuye cuando están en presencia de células NK activadas. *P≤0.05.

II. LAS CaCu-MSCs DISMINUYEN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS NK Y NKT EN AUSENCIA DE CONTACTO CELULAR

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio indican que las MSCs de CaCu no disminuyen la proliferación de linfocitos T CD3+ activados ni de subpoblaciones de los mismos CD4+ y CD8+ (Hernández-Estévez, 2016). Sin embargo, debido a que se ha reportado que las MSCs de MO inhiben la proliferación de las células NK estimuladas (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006), evaluamos el efecto de las MSCs de CaCu y CN sobre esta actividad funcional. Para ello, obtuvimos una población de células CD56+ las cuales se tiñeron con CFSE, se co-cultivaron en monocapas de MSCs de MO, CN y CaCu con y sin contacto celular durante 5 días y se activaron con IL-2. Como controles se utilizaron células CD56+ teñidas y cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs. Se analizaron dos poblaciones: CD56+CD3- (células NK) y CD56+CD3+ (células NKT). La proliferación de las células NK y NKT estimuladas en ausencia de MSCs se tomó como el 100%.

No se encontró diferencia significativa en contacto celular en la proliferación de las células NK y NKT co-cultivadas con MSCs de MO, CN y CaCu (Figura 3 A, B). Sin embargo, en co-cultivos sin contacto celular, las MO-MSCs y CaCu-MSCs disminuyeron la proliferación de las células NK (50.3% \pm 8.5 y 51.7 \pm 5 respectivamente) y en mayor medida de las células NKT (12.07% \pm 0.77 y 13.8% \pm 6.91 respectivamente) (Figura 3 B). Estos resultados sugieren que las MSCs de CaCu a diferencia de aquellas de CN, tienen la capacidad de inhibir la proliferación de las células NK y NKT en ausencia de contacto celular.

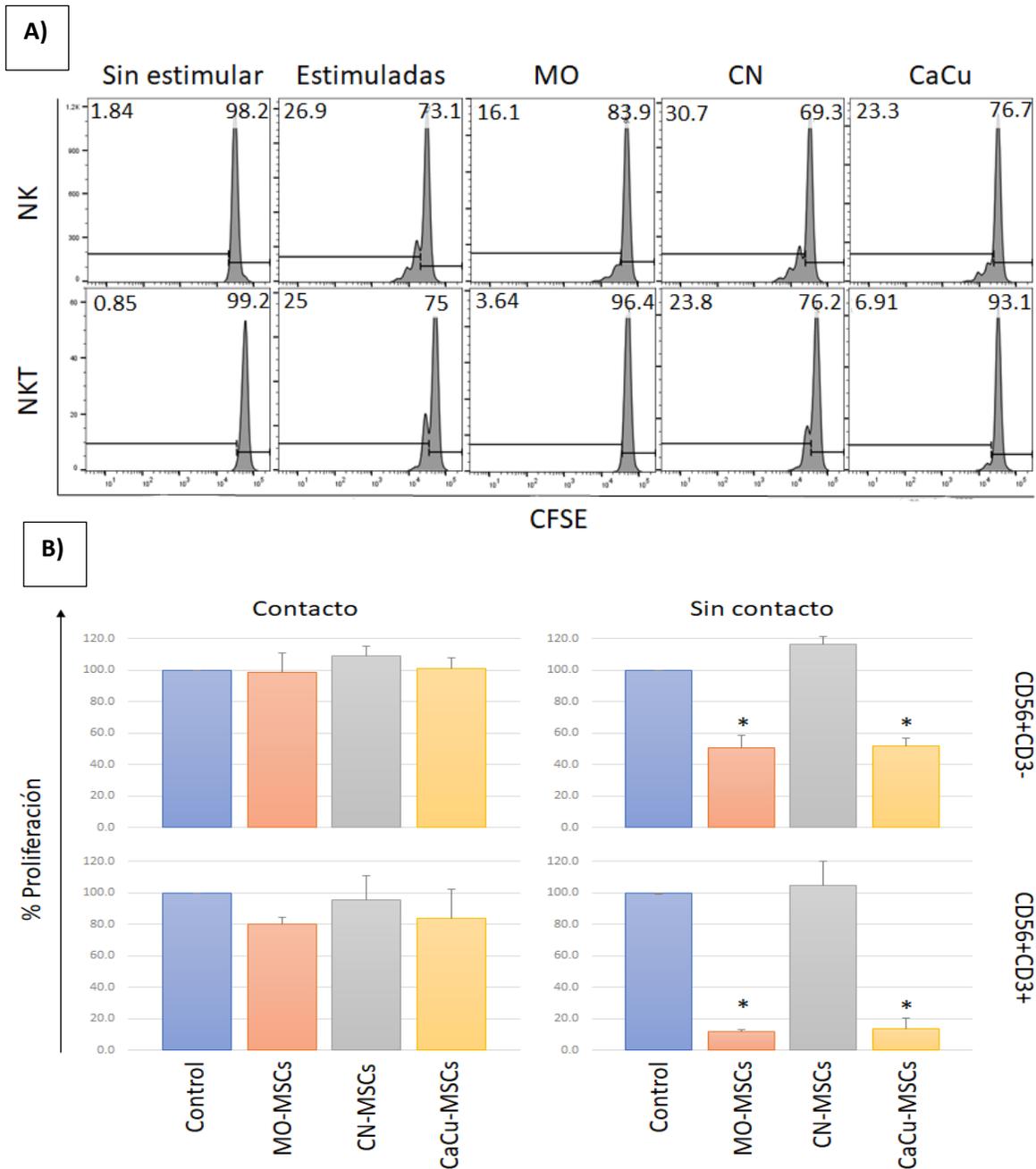


Figura 3. Las CaCu-MSCs inhiben la proliferación de las células NK y NKT en ausencia de contacto celular. Células CD56+ activadas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, CN y CaCu. Como control se utilizaron células CD56+ activadas con IL-2 en ausencia de MSCs y su porcentaje de proliferación se tomó como el 100%. A) Histogramas representativos del efecto de las MSCs de CaCu sobre la proliferación de las células NK y NKT sin contacto celular. B) Media normalizada de porcentaje de proliferación de células NK. Solamente las MSCs de MO y CaCu sin contacto celular disminuyeron la proliferación de las células NK (CD56+CD3-) y NKT (CD56+CD3+). *P \leq 0.05.

III. LAS CaCu-MSCs DISMINUYEN LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK

Nuestro equipo de trabajo ha demostrado que las MSCs de CaCu disminuyen la actividad citotóxica de los linfocitos CD8+ a través de la disminución de la expresión de HLA clase I en las células tumorales (Montesinos *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que las MSCs de MO disminuyen la actividad citotóxica de las células NK (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008), por ello decidimos evaluar el efecto de las MSCs de CaCu y CN sobre esta actividad funcional en las células NK.

Para determinar lo anterior, se co-cultivaron células CD56+ estimuladas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, CN y CaCu durante 5 días en presencia de contacto celular. Después de este periodo, se cosecharon y retaron frente a células de la línea K562 como blanco en diferentes proporciones efectora: blanco (1:1, 2:1 y 4:1) durante 4 horas. Posteriormente, las células K562 se tiñeron con 7-AAD y Annexin V para evaluar el porcentaje de apoptosis de las mismas. Como control positivo fueron utilizadas células CD56+ estimuladas con IL-2 y cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs.

Las MSCs de CN no tuvieron ningún efecto sobre la actividad citotóxica de las células NK (figura 4), mientras que las MSCs de MO y CaCu la disminuyeron de manera significativa cuando la proporción efectora: blanco (E:B) fue 4:1 (control 73.5%±3.1, MO-MSCs 55.67%±2.31 y CaCu-MSCs 56.23%±3.1) (figura 4).

Estos resultados sugieren que las MSCs de CaCu tienen un efecto inhibitorio en la citotoxicidad de las células NK, la cual es una de las funciones más importantes de estas.

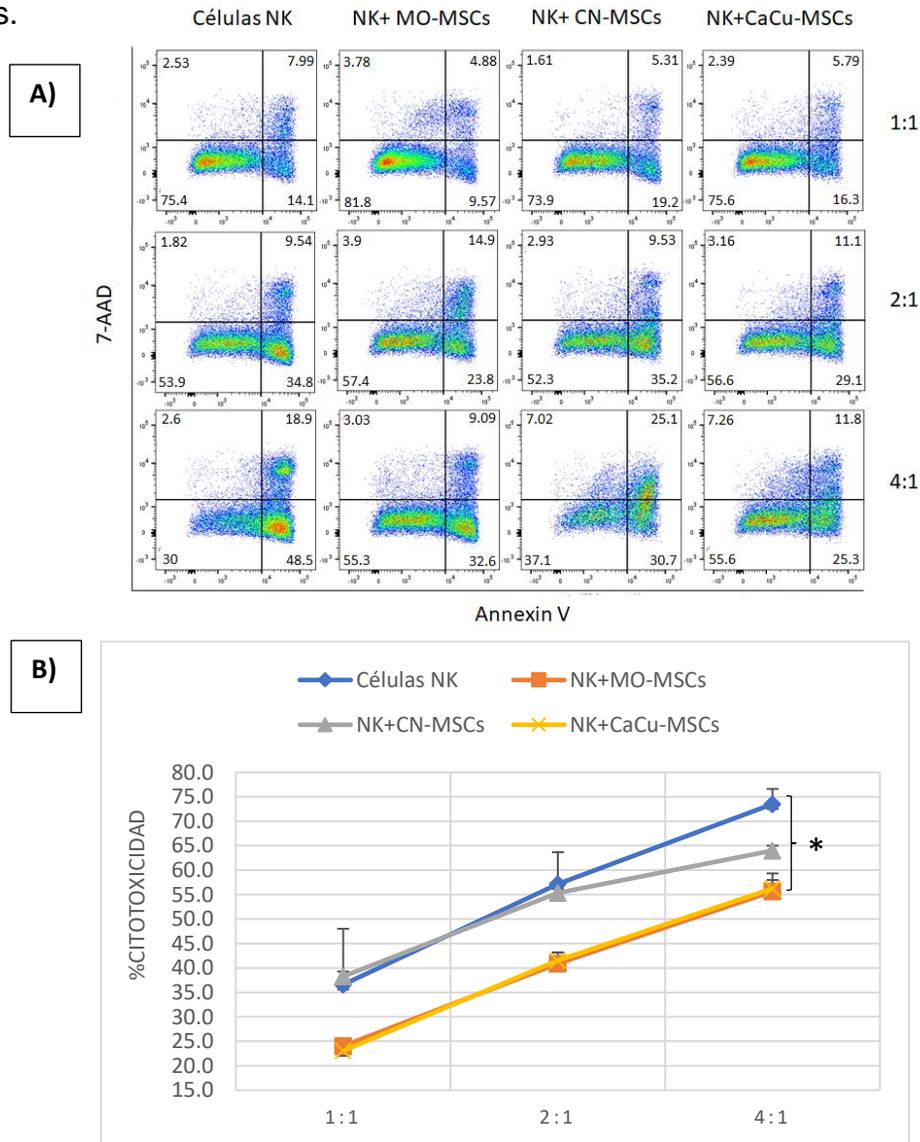


Figura 4. Las CaCu-MSCs disminuyen la actividad citotóxica de las células NK. Se cultivaron células NK estimuladas con IL-2 en presencia de MSCs de MO, CN y CaCu y se evaluó su actividad citotóxica hacia células de la línea K562 bajo diferentes proporciones E:B (1:1, 2:1 y 4:1). Como control se evaluaron a células NK cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs. A) Gráficas de puntos representativas. B) Solamente las MSCs de MO y CaCu disminuyeron esta función de las células NK en la proporción 4:1. De manera interesante, las CaCu-MSCs se comportaron de manera muy parecida a las MO-MSCs en todas las proporciones E:T evaluadas. *Indica diferencia significativa respecto al control ($P \leq 0.05$).

IV. LAS MSCs DE CaCu NO DISMINUYEN LA PRODUCCIÓN DE IFN γ EN LAS CÉLULAS NK PERO INCREMENTAN LA PRODUCCIÓN DE IL-10 EN LAS CÉLULAS NKT

La presencia de MICA/B en las MSCs permite la interacción con las células NK a través de la activación de receptores como NKG2D, estimulando así la producción de IFN- γ en las células NK, citocina que induce la actividad inmunosupresora de las MSCs.

Se ha descrito que las células NK co-cultivadas con MO-MSCs incrementan la producción de IFN- γ en primera instancia (Spaggiari *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2018) pero bajo ciertas condiciones, las MO-MSCs pueden disminuir la producción de IFN- γ en las células NK (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). También se ha descrito que las MO-MSCs estimulan la producción de IL-10 por células NKT (Gazdic *et al.*, 2017).

Con base en lo reportado para MO-MSCs, quisimos evaluar el efecto de CN-MSCs y CaCu-MSCs sobre la producción de citocinas por las células NK y NKT, para lo cual obtuvimos células CD56+ y las cultivamos en presencia de IL-2 y de MSCs de MO, CN y CaCu en contacto celular durante 5 días. Al cuarto día las estimulamos con IL-12 e IL-18 durante 24 h y después evaluamos la producción de IFN- γ en las células NK (CD56+CD3-) y de IL-10 en las células NK y NKT (CD56+CD3+) por medio de citometría de flujo. Como controles se utilizaron células CD56+ cultivadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de MSCs.

Nosotros encontramos que las MSCs de CaCu, CN e incluso MO, no tienen un efecto significativo sobre la producción de IFN γ por las células NK. Sin embargo,

se puede apreciar una tendencia a la disminución de la producción de esta citocina por las células NK que fueron co-cultivadas con MSCs de MO y de CaCu (figura 5 A y C). En cuanto a la producción de IL-10, la cual es una citocina antiinflamatoria, detectamos un incremento significativo de esta por las células NKT en co-cultivo con MSCs de MO y de CaCu (control 1.82% \pm 0.38, MO 14.53% \pm 1.5, CaCu 11.07 \pm 0.65) pero no por las células NK (figura 5 B y D).

Estos resultados sugieren que las MSCs de CaCu bajo estas condiciones de cultivo no tienen un efecto significativo sobre la producción de IFN por las células NK, pero incrementan la producción de IL-10 por las células NKT.

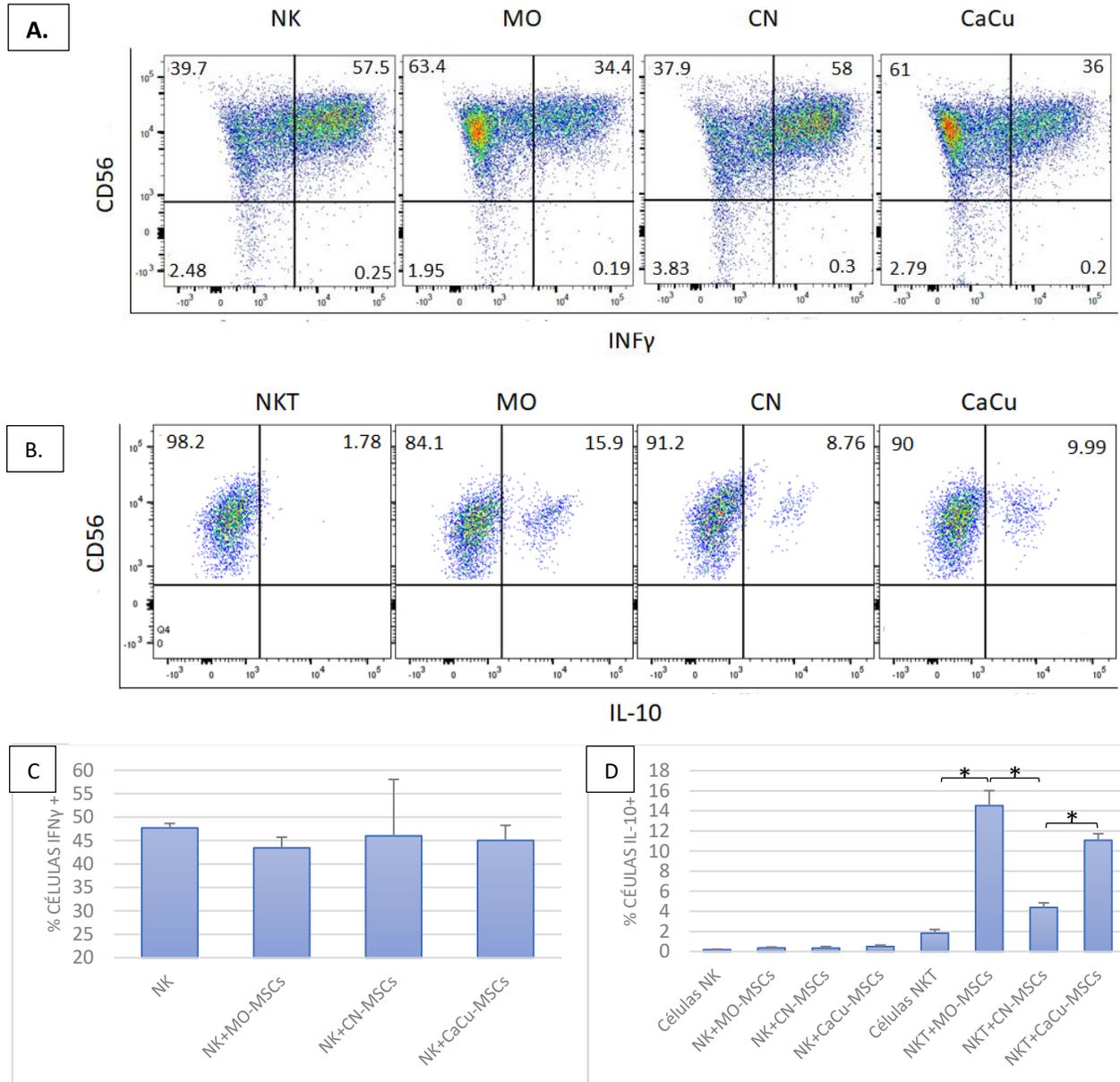


Figura 5. Efecto de las MSCs de CaCu en la producción de citocinas por las células NK y NKT. Se aislaron células CD56⁺ y se co-cultivaron en presencia de MSCs de MO, CN y CaCu e IL-2 durante 5 días. Al cuarto día se adicionaron IL-12 e IL18 y se estimularon durante 24 h, y se evaluó la producción de IFN- γ e IL-10 mediante citometría de flujo. A) Gráficas de puntos representativas de la producción de IFN- γ por las células NK en co-cultivo con MSCs de MO, CN y CaCu. B) Gráficas de puntos representativas de la estimulación de la producción de IL-10 en las células NKT por las MSCs de CaCu. C) Las MSCs de MO, CN y CaCu no tienen efecto sobre la producción de IFN- γ en las células NK. D) Las MSCs de CaCu incrementan la producción de IL-10 en las células NKT pero no en las NK. *P \leq 0.05.

V. LAS MSCs DE CaCu INCREMENTAN SU PRODUCCIÓN DE IDO Y PGE2 EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS NK ACTIVADAS

Se ha reportado que las moléculas involucradas en la inhibición de la actividad funcional de las células NK por las MO-MSCs son IDO y PGE2, y además se ha observado un efecto sinérgico entre estas (Spaggiari *et al.*, 2008). Se sabe que cuando las MO-MSCs están en presencia de IFN- γ secretan IDO y PGE2 (Waterman *et al.*, 2010; Bernardo y Fibbe, 2013). También se ha descrito que las MO-MSCs estimulan la producción de IL-10 en células NKT mediado por IDO (Gazdic *et al.*, 2017). Por lo tanto, evaluamos la producción de IDO y PGE2 en las MSCs de CaCu como posibles responsables de la disminución de la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK.

Para evaluar ello, cultivamos MSCs de CN y CaCu en presencia de células CD56+ estimuladas con IL-2 y medimos la presencia de IDO intracelular en las MSCs y de PGE2 en el sobrenadante de los diferentes co-cultivos mediante ELISA. Como control positivo se utilizaron MO-MSCs bajo las mismas condiciones de cultivo.

Se detectó la presencia de IDO en las MSCs de CaCu de manera basal (MO 23.86% \pm 0.78, CN 2.27% \pm 0.95, CaCu 13.42% \pm 6.56) (figura 6 A, B) y no hubo diferencia significativa entre la producción de esta enzima en las MSCs de CaCu y MO (figura 6B). Cuando se cultivaron en presencia de células NK activadas con IL-2, las MSCs de MO y de CaCu incrementaron su producción de IDO (MO 44.5% \pm 3, CN 5.24% \pm 0.68, CaCu 26.55% \pm 2.88) y las CaCu-MSCs produjeron significativamente más que las CN-MSCs (figura 6C). Aunque este incremento en

la producción deIDO por las CaCu-MSCs en contacto con células NK activadas no alcanzó a ser significativo con respecto al basal a diferencia de lo ocurrido con las MO-MSCs, si se observa un notorio aumento de esta enzima ($p = 0.09$) (figura 6D).

En cuanto a PGE2, todas las MSCs evaluadas secretaron esta molécula cuando estuvieron en contacto con células NK estimuladas con IL-2 (MO 3.7 ± 0.61 , CN 10.93 ± 0.24 , CaCu 3.46 ± 1.82) y de manera interesante las CN-MSCs secretaron una cantidad significativamente mayor en comparación con los otros tipos evaluados (figura 7).

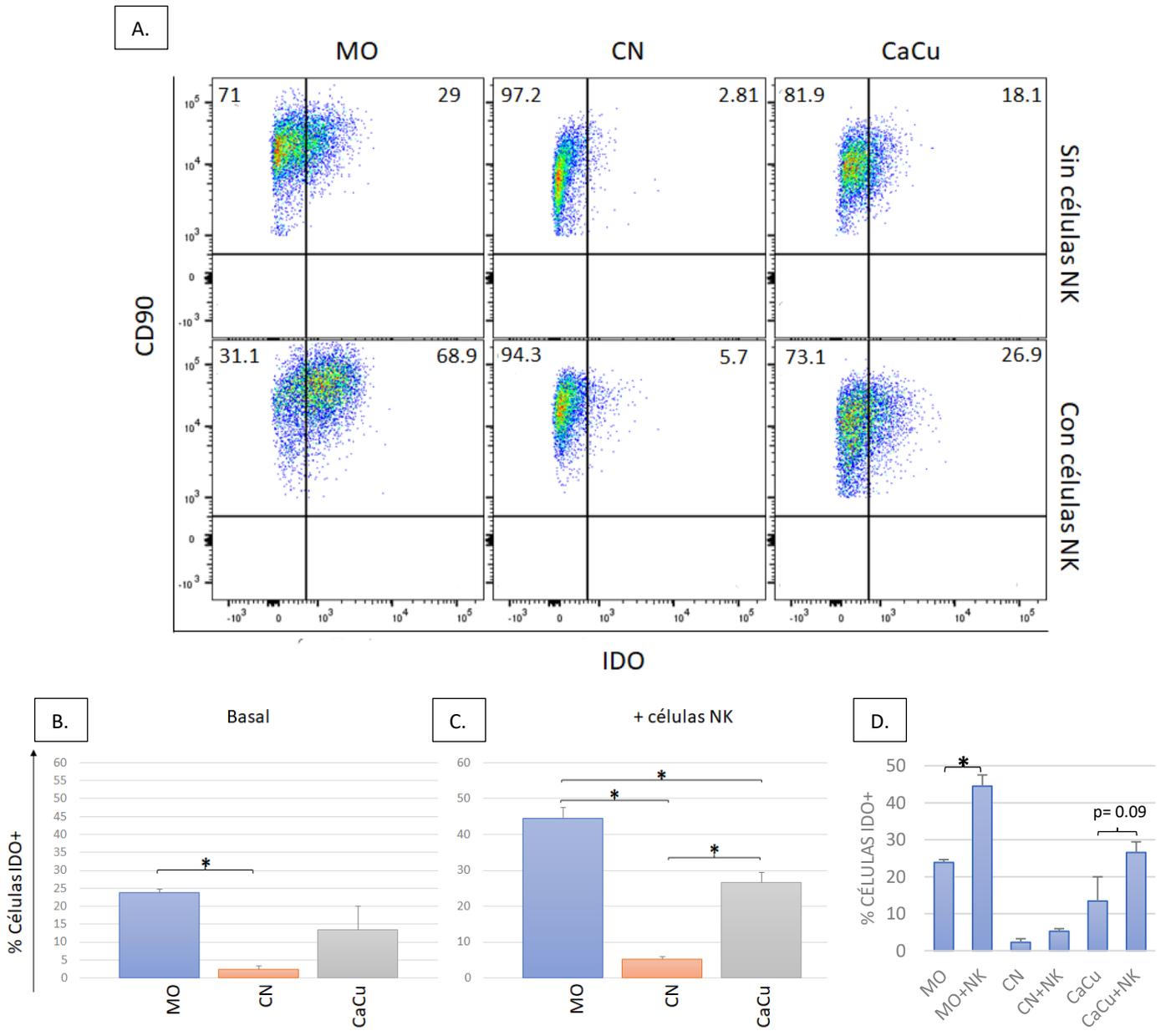


Figura 6. Las MSCs de CaCu incrementan la producción de IDO en presencia de células NK estimuladas con IL-2. Se cultivaron MSCs de MO, CN y CaCu en presencia de células NK estimuladas con IL-2 y se detectó la presencia de IDO dentro de las MSCs mediante citometría de flujo. A) Gráficas de puntos representativas de la producción de IDO por las CaCu-MSCs. B) Las CaCu-MSCs producen IDO de manera basal. C) CaCu-MSCs estimuladas con células NK producen más IDO que CN, aunque la diferencia entre el basal y estimuladas no alcanza a ser significativa (D). *P≤0.05.

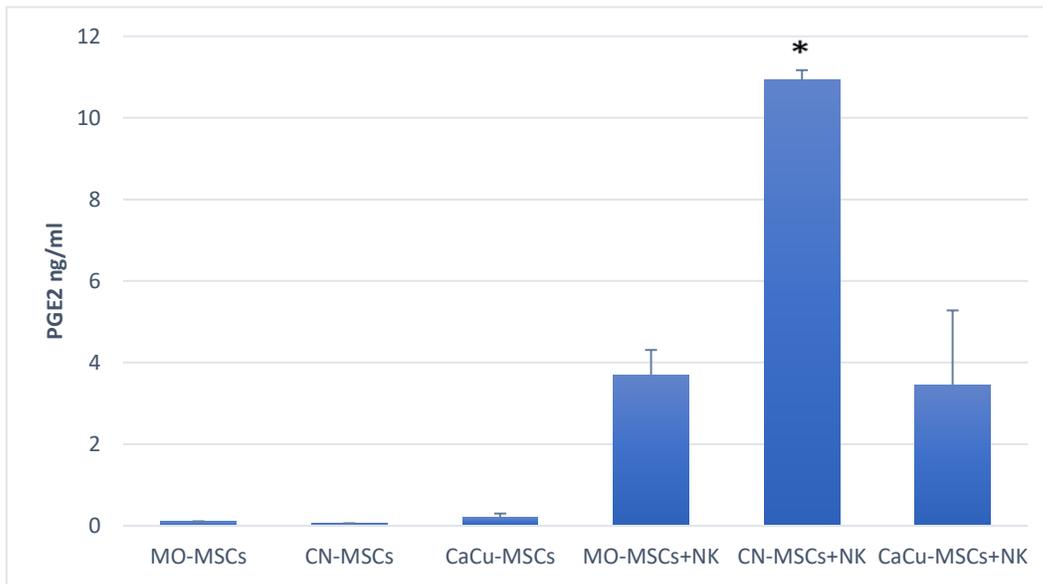


Figura 7. Las MSCs de CN y CaCu secretan PGE2. Se cultivaron MSCs de MO, CN y CaCu en presencia de células NK activadas con IL-2 y se detectó en el sobrenadante la presencia de PGE2 mediante ELISA. Las CaCu-MSCs secretan PGE2 cuando son estimuladas por las células NK, pero las CN-MSCs secretan una cantidad significativamente mayor. * $P \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

Nuestro equipo de trabajo ha demostrado que las MSCs provenientes de CaCu disminuyen la actividad citotóxica de los linfocitos CD8+ a través de la reducción de la expresión de HLA clase I en las células tumorales (Montesinos *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta ahora, no se sabía el efecto de estas MSCs sobre las células NK, las cuales desempeñan un papel importante en la eliminación de las células tumorales (Song *et al.*, 2015).

Se ha publicado que las MO-MSCs expresan ligandos de activación de las células NK como PVR, Nectina-2, ULBPs, MICA y MICB en su membrana celular (Spaggiari *et al.*, 2006) y debido a ello, las células NK estimuladas a través de los mismos, son capaces de lisar a las MSCs (Poggi *et al.*, 2005; Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006; Najjar *et al.*, 2018), por ejemplo a través de la interacción de NKG2D con MICA (Poggi *et al.*, 2005). De igual forma se ha demostrado que el bloqueo de Nkp30, NKG2D y DNAM-1, puede inhibir este efecto citolítico (Spaggiari *et al.*, 2008). De manera interesante, se ha observado una disminución en la expresión de Nectina-2 y PVR en las MO-MSCs cuando están en contacto con células NK estimuladas con IL-12 e IL-2 (Najar *et al.*, 2018). Con base en ello, decidimos evaluar como primer punto de interacción entre MSCs de cérvix y células NK, si las primeras expresaban MICA/B en condiciones basales y si esta expresión se modificaba en presencia de las células NK activadas. Encontramos que tanto las MO-MSCs como las CaCu-MSCs, expresaron MICA/B de manera basal y esta disminuyó de manera significativa cuando estuvieron en contacto con células NK activadas con IL-2. Estos resultados sugieren que las

MSCs de CaCu, al igual que las de MO, tienen una alta expresión basal de MICA/B, por lo cual son susceptibles de ser lisadas por las células NK. Sin embargo, esta expresión disminuye de manera significativa cuando están en contacto con las células NK activadas, lo cual podría repercutir en la evasión de la citotoxicidad mediada por NKG2D y por lo tanto permitir que las CaCu-MSC puedan ejercer efecto sobre la proliferación y citotoxicidad capacidades de las NK.

Asimismo, se ha reportado que las células tumorales han desarrollado mecanismos para minimizar o evadir la respuesta de las células NK mediada por NKG2D, ello al liberar MICA de la superficie celular y comportarse como una molécula soluble, la cual al interactuar con NKG2D, bloquea el reconocimiento de las células tumorales por parte de las células NK y linfocitos T CD8+ (Groh *et al.*, 2002). Con ello un posible escenario es que las CaCu-MSCs liberen esta molécula para inhibir su lisis por las células NK, al bloquear el receptor NKG2D, sin embargo, esto debe ser probado.

Es importante notar que la presencia de MICA/B en las MSCs, puede permitir la interacción con las células NK activándolas y estimulando la producción de IFN- γ , el cual se sabe enciende la actividad inmunosupresora de las MSCs (Spaggiari *et al.*, 2006).

Un posible efecto de las CaCu-MSCs sobre las células NK, es disminuir su proliferación para favorecer el desarrollo de las células tumorales. Al respecto demostramos que la proliferación de las células NK y NKT, no es afectada en cultivos con contacto en presencia de MSCs de MO, CN o CaCu. Sin embargo, en

ausencia de contacto celular, las MO-MSCs y CaCu-MSCs, disminuyeron la proliferación de las células NK y, en mayor medida de las células NKT, lo cual puede deberse a que al expresar MICA/B en su membrana, las CaCu-MSCs son blancos de las células NK y pueden ser lisadas. Sin embargo, al eliminar el contacto celular, las CaCu-MSCs evaden esta interacción y secretan moléculas inmunosupresoras comoIDO y PGE2. Estos resultados contrastan con lo reportado por algunos autores (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006) quienes encontraron que las MSCs de MO inhiben la proliferación de las células NK estimuladas con IL-2 o IL-15 con contacto celular. Sin embargo, un estudio reciente donde utilizaron sobrenadantes en vez de co-cultivo, mostró que dependiendo de la citocina con que se activen las células NK, las MO-MSCs pueden o no disminuir su proliferación, es decir, si son estimuladas con IL-12 o IL-21, el efecto es inhibitorio, no así al ser estimuladas con IL-2 o 15 (Najar *et al.*, 2018). Nuestros resultados pueden deberse a que en contacto celular con las células NK, las CaCu-MSCs son susceptibles a ser lisadas por las células NK a través de NKG2D, dado que expresan MICA/B en su membrana. Dicho efecto se evita al colocar una membrana permeable entre ambos tipos celulares, tal es el caso de los cultivos sin contacto en donde la CaCu-MSCs ejercieron un efecto significativo sobre las células NK y NKT al disminuir su proliferación.

Se ha demostrado que, en un microambiente tumoral, las células NK presentan una disminución en su actividad citotóxica (Carrega *et al.*, 2008), por lo que evaluamos el efecto de las MSCs de CaCu sobre esta función, para determinar si las CaCu-MSCs podrían ser responsables en parte de este fenómeno en el

contexto de CaCu. Nosotros encontramos que las MSCs de CN no tuvieron efecto sobre la actividad citotóxica de las células NKs, mientras que las MSCs de CaCu la disminuyeron de manera significativa. Se ha reportado que las MSCs de MO pueden disminuir la actividad citotóxica de las NKs, debido a su capacidad para disminuir la expresión de los receptores de activación NKp30, NKp44 y NKG2D en estas células (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008) y a la secreción de moléculas inmunosupresoras como IDO y PGE2 las cuales actúan de manera sinérgica (Spaggiari *et al.*, 2008, Galland *et al.*, 2017). Contradictoriamente, se ha reportado que las MO-MSCs incrementan la degranulación de las células NK (medida a través de la expresión de CD107a) y la secreción de granzimas y perforinas (Najar *et al.*, 2018). Sin embargo, estos resultados se obtuvieron usando como célula blanco a la misma MSCs, lo cual comprueba lo ya reportado sobre la actividad citotóxica de las células NK hacia las MSCs.

La interacción entre las MO-MSCs y las células NK en cuanto a la regulación de producción de citocinas es compleja. Algunos autores reportan que estas MSCs inhiben la producción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IFN- γ e IL-4 (Aggarwal y Pittenger, 2005; Sotiropoulou *et al.*, 2006). Spaggiari *et al* (2008) observaron que esta inhibición ocurrió cuando pre-estimularon a las MSCs con IFN- γ . Por otra parte, se ha descrito que las MSCs de MO inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IFN- γ e IL-4 y estimulan la producción de IL-10 por células NKT (Gazdic *et al.*, 2017). En cuanto a MSCs de cáncer, las MSCs provenientes de carcinoma de células escamosas de pulmón pueden disminuir *in vitro* la producción de IFN- γ y TNF- α a través de la secreción de PGE2

(Galland *et al.*, 2017). En contraste, otros autores encontraron que las células NK co-cultivadas con MO-MSCs incrementan su secreción de TNF- α (Prigione *et al.*, 2009; Najjar *et al.*, 2018) y de IFN- γ (Spaggiari *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2018).

Nosotros no encontramos un efecto significativo de las MSCs de MO, CN ni de CaCu sobre la producción de INF γ por las células NK, pero encontramos que las MSCs de CaCu incrementan la producción de IL-10 en las células NKT. La IL-10 es una citocina antiinflamatoria, mientras que IFN- γ es proinflamatoria, sin embargo, se ha propuesto que IFN- γ es una citocina que tiene funciones pro y antiinflamatorias, ya que puede inducir la secreción de mediadores inmunes, como IDO, que disminuyen la actividad de los linfocitos T y NK (Minguela *et al.*, 2007; Munn y Mellor, 2012). Nuestros resultados sugieren que las MSCs de CaCu bajo estas condiciones de cultivo no tienen un efecto significativo sobre la producción de IFN en las células NK, pero incrementan la producción de IL-10 en las células NKT.

Cuando las MSCs están en un ambiente pro-inflamatorio, secretan moléculas como IDO y PGE2 (Waterman *et al.*, 2010; Bernardo y Fibbe, 2013) que generan un ambiente anti-inflamatorio. Se ha descrito que las MSCs son capaces de producir moléculas involucradas en la inhibición de la actividad funcional de las células NK y NKT como IDO y PGE2 (Spaggiari *et al.*, 2008; Prigione *et al.*, 2009; Galland *et al.*, 2017) y además se ha observado que estas moléculas tienen un efecto sinérgico, mientras que TGF- β no está involucrado directamente en la interacción entre estas células (Spaggiari *et al.*, 2008; Galland *et al.*, 2017).

IDO ha mostrado disminuir la proliferación y citotoxicidad de las células NK (Chiesa *et al.*, 2006). En cáncer de ovario, la expresión de IDO inhibe la actividad citotóxica de las células NK *in vitro* e inhibe la acumulación de estas células en el estroma del tumor *in vivo* (Nonaca *et al.*, 2011) mientras que en CaCu, la actividad de IDO se ha asociado a un mal pronóstico y baja sobrevida (Ferns *et al.*, 2015). Nosotros detectamos la presencia de IDO en las MSCs de CaCu de manera basal, y no hubo diferencia significativa entre CaCu y MO. Cuando se cultivaron en presencia de células NK, las CaCu-MSCs incrementaron su producción de IDO y las CaCu-MSCs produjeron significativamente mayor cantidad que las CN-MSCs.

La PGE2 tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de linfocitos T, además, inhibe la producción de citocinas de tipo Th1 como IL-2 e INF γ e incrementa la actividad Th2, induciendo la liberación de IL-4, IL-5 e IL-10 (Harris *et al.*, 2002). Las MSCs de carcinoma de células escamosas de pulmón lograron inhibir la actividad citotóxica y la producción de IFN- γ por las células NK a través de PGE2 (Galland *et al.*, 2017). En nuestro sistema, todas las MSCs que evaluamos secretaron PGE2 cuando estuvieron en contacto con células NK estimuladas con IL-2 y de manera interesante las CN-MSCs secretaron una cantidad significativamente mayor en comparación con los otros tipos evaluados. Estos resultados sugieren que las CaCu-MSCs producen IDO y PGE2, moléculas inmunosupresoras cuando están en contacto con células NK activadas, por lo que estas moléculas podrían tener un efecto sinérgico y ser responsables del efecto inmunosupresor que detectamos en proliferación y citotoxicidad. La secreción de

PGE2 por las MSCs de CaCu, puede ser responsable de la estimulación de la producción de IL-10 por las células NKT.

En conjunto, nuestros resultados concuerdan con lo reportado con Galland *et al* (2017) quienes mencionan que las MSCs provenientes de carcinoma de células escamosas de pulmón fueron significativamente más inmunosupresoras (contacto dependiente) que las MSCs de pulmón sano. Nosotros demostramos un fenómeno similar con las MSCs provenientes de carcinoma epidermoide de cérvix.

En tejidos quiescentes, en ausencia de estímulos inflamatorios, las MSCs pueden disminuir o incluso perder temporalmente su capacidad inmunosupresora. Sin embargo, en un microambiente tumoral, que imita la reparación tisular y contiene una gran variedad de citocinas proinflamatorias, las MSCs pueden recuperar su potencial inmunosupresor (Galland *et al*, 2017), por lo tanto, es congruente que las CaCu-MSCs estén más relacionadas funcionalmente con MO-MSCs que con las de CN.

CONCLUSIONES

Las CaCu-MSCs expresan MICA/B en su membrana plasmática, y esta puede permitir que inicie una interacción entre las MSCs y las células NK a través de la unión a receptores de activación de las células NK, las cuales en respuesta secretan INF- γ , una citocina proinflamatoria necesaria para la activación de las MSCs hacia una función inmunosupresora. Una vez activadas, las MSCs incrementan su producción de moléculas antiinflamatorias como IDO y PGE2.

Las MSCs provenientes de CaCu lograron disminuir de manera significativa la proliferación y citotoxicidad de las células NK y NKT estimuladas con IL-2, pero la inhibición de la proliferación solamente se observó en ausencia de contacto celular. Lo cual puede estar relacionado a que este tipo de MSCs demostraron expresar MICA/B en su membrana, por lo que son susceptibles a ser lisadas por las células NK a través de la interacción con el receptor NKG2D cuando están en contacto directo con estas. De manera interesante, esta expresión de MICA/B disminuyó cuando estuvieron en cultivo en presencia de células NK, lo cual podría protegerlas en cierta medida de este efecto citotóxico.

Las MSCs de MO y de CaCu no tuvieron efecto en la producción de IFN- γ por las células NK, aunque se observa una tendencia a disminuirla; sin embargo, estas células lograron estimular a una población de células NKT para que produjeran IL-10, la cual es una citocina inmunosupresora que puede estar participando en la disminución de la proliferación y citotoxicidad de las células NK en co-cultivo con las CaCu-MSCs.

Las moléculas involucradas en la supresión de la actividad de las células NK por las MSCs pueden ser IDO y PGE2, ya que se detectó la presencia de IDO en las MSCs de CaCu de manera basal y esta aumentó en presencia de células NK activadas. También se detectó la presencia de PGE2 en el sobrenadante de los co-cultivos de MSCs con células NK e interesantemente, las CN-MSCs secretaron una cantidad significativamente mayor de PGE2 que las demás MSCs, pero esto no se vio reflejado en un efecto inmunosupresor. Esto puede deberse a que, como se ha reportado anteriormente, el efecto inmunosupresor de PGE2 mejora de manera sinérgica en presencia de IDO, y no se detectó esta molécula en las MSCs de CN.

Las MSCs provenientes de CaCu mostraron un comportamiento inmunosupresor similar al de las MO-MSCs y superior a aquellas de CN. Estos resultados demuestran que las CaCu-MSCs pueden desempeñar un papel importante en la progresión de CaCu, por lo que podrían ser un futuro blanco dentro del tratamiento de esta enfermedad.

PERSPECTIVAS

Para probar el efecto de las CaCu-MSCs sobre la actividad citotóxica de las células NK, se utilizó a una línea celular que ha sido reportada como blanco de éstas (K562), pero sería muy interesante evaluar el efecto de las CaCu-MSCs sobre la citotoxicidad de las células NK hacia células tumorales de cáncer de cérvix.

La inhibición de la proliferación de las células NK y NKT por las MSCs de MO y CaCu sólo se observó en ausencia de contacto celular, por lo tanto, sería interesante evaluar el efecto de las CaCu-MSCs sobre la producción de IFN- γ e IL-10 por las células NK y NKT bajo estas mismas condiciones.

Para comprobar que PGE2 e IDO son las moléculas responsables de la actividad inmunosupresora de las MSCs de CaCu sobre las células NK y NKT, se debe evaluar el efecto de inhibidores de estas moléculas en este sistema de co-cultivo.

Finalmente, la inclusión de células tumorales en este sistema nos brindaría información importante sobre la función de las MSCs de CaCu en un modelo un poco más cercano al microambiente tumoral.

LITERATURA CITADA

Aggarwal, S., & Pittenger, M. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559

Albertson, D., Collins, C., McCormick, F., & Gray, J. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature Genetics*, 34(4), 369-376. doi: 10.1038/ng1215

Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/Pericyte Interactions. *Circulation Research*, 97(6), 512-523. doi: 10.1161/01.res.0000182903.16652.d7

Asiaf, A., Ahmad, S., Mohammad, S., & Zargar, M. (2014). Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *European Journal Of Cancer Prevention*, 23(3), 206-224. doi: 10.1097/cej.0b013e328364f273

Bais, A., Beckmann, I., Lindemans, J., Ewing, P., Meijer, C., Snijders, P., & Helmerhorst, T. (2005). A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *Journal Of Clinical Pathology*, 58(10), 1096-1100. doi: 10.1136/jcp.2004.025072

Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., & Patil, S. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), 42-48. doi: 10.1016/s0301-472x(01)00769-x

Bermúdez-Morales, V., Peralta-Zaragoza, O., Alcocer-González, J., Moreno, J., & Madrid-Marina, V. (2011). IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 4(2), 369-375. doi: 10.3892/mmr.2011.429

Bernardo, M., & Fibbe, W. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392-402. doi: 10.1016/j.stem.2013.09.006

Brigl, M., Tatituri, R., Watts, G., Bhowruth, V., Leadbetter, E., & Barton, N. (2011). Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *The Journal Of Experimental Medicine*, 208(6), 1163-1177. doi: 10.1084/jem.20102555

Bussolati, B., Deregibus, M., & Camussi, G. (2010). Characterization of Molecular and Functional Alterations of Tumor Endothelial Cells to Design Anti-Angiogenic Strategies. *Current Vascular Pharmacology*, 8(2), 220-232. doi: 10.2174/157016110790887036

Caligiuri, M. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112(3), 461-469. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438

Campo, M., Graham, S., Cortese, M., Ashrafi, G., Araibi, E., & Dornan, E. (2010). HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, 407(1), 137-142. doi: 10.1016/j.virol.2010.07.044

Cao, H., Xu, W., Qian, H., Zhu, W., Yan, Y., & Zhou, H. (2009). Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Letters*, 274(1), 61-71. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.036

Carrega, P., Morandi, B., Costa, R., Frumento, G., Forte, G., & Altavilla, G. (2008). Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56^{bright}CD16⁻ cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer*, 112(4), 863-875. doi: 10.1002/cncr.23239

Castro-Manreza, M., & Montesinos, J. (2015). Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal Of Immunology Research*, 2015, 1-20. doi: 10.1155/2015/394917

Chang, W., Li, C., Chu, L., Huang, P., Sheu, B., & Huang, S. (2016). Regulatory T Cells Suppress Natural Killer Cell Immunity in Patients With Human Cervical Carcinoma. *International Journal Of Gynecological Cancer*, 26(1), 156-162. doi: 10.1097/igc.0000000000000578

Chen, D., & Gyllenstein, U. (2014). MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*, 35(12), 2633-2642. doi: 10.1093/carcin/bgu215

Chiesa, M., Carlomagno, S., Frumento, G., Balsamo, M., Cantoni, C., & Conte, R. (2006). The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of Nkp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*, 108(13), 4118-4125. doi: 10.1182/blood-2006-03-006700

Cho, H., Chung, J., Kim, S., Braunschweig, T., Kang, T., & Kim, J. (2014). MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. *BMC Cancer*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2407-14-957

Chu, T., Yang, J., Huang, T., & Liu, H. (2014). Crosstalk with Cancer-Associated Fibroblasts Increases the Growth and Radiation Survival of Cervical Cancer Cells. *Radiation Research*, 181(5), 540-547. doi: 10.1667/rr13583.1

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3), 313-319. doi: 10.1038/nm.2304

Crosbie, E., Einstein, M., Franceschi, S., & Kitchener, H. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382(9895), 889-899. doi: 10.1016/s0140-6736(13)60022-7

Cui, R., Rekasi, H., Hepner-Schefczyk, M., Fessmann, K., Petri, R., & Bruderek, K. (2016). Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1). doi: 10.1186/s13287-016-0353-9

Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P., & Nardi, N. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal Of Cell Science*, 119(11), 2204-2213. doi: 10.1242/jcs.02932

De Vos van Steenwijk, P., Piersma, S., Welters, M., van der Hulst, J., Fleuren, G., & Hellebrekers, B. (2008). Surgery followed by Persistence of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Is Associated with the Induction of a Dysfunctional HPV16-Specific T-Cell Response. *Clinical Cancer Research*, 14(22), 7188-7195. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-0994

Deans, R., & Moseley, A. (2000). Mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 28(8), 875-884. doi: 10.1016/s0301-472x(00)00482-3

Deligeoroglou, E., Giannouli, A., Athanasopoulos, N., Karountzos, V., Vatopoulou, A., Dimopoulos, K., & Creatsas, G. (2013). HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. *Infectious Diseases In Obstetrics And Gynecology*, 2013, 1-9. doi: 10.1155/2013/540850

Den Boon, J., Pyeon, D., Wang, S., Horswill, M., Schiffman, M., & Sherman, M. (2015). Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(25), E3255-E3264. doi: 10.1073/pnas.1509322112

DeNardo, D., Andreu, P., & Coussens, L. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer And Metastasis Reviews*, 29(2), 309-316. doi: 10.1007/s10555-010-9223-6

Denny, L. (2012). Cervical cancer prevention: New opportunities for primary and secondary prevention in the 21st century. *International Journal Of Gynecology & Obstetrics*, 119, S80-S84. doi: 10.1016/j.ijgo.2012.03.023

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., & Krause, D. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905

Entrena, A., Varas, A., Vázquez, M., Melen, G., Fernández-Sevilla, L., & García-Castro, J. (2015). Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity. *Cancer Letters*, 363(2), 156-165. doi: 10.1016/j.canlet.2015.04.012

Faridi, R., Zahra, A., Khan, K., & Idrees, M. (2011). Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal*, 8(1), 269. doi: 10.1186/1743-422x-8-269

Ferns, D., Kema, I., Buist, M., Nijman, H., Kenter, G., & Jordanova, E. (2015). Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology*, 4(2), e981457. doi: 10.4161/2162402x.2014.981457

FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. (2014). *International Journal Of Gynecology & Obstetrics*, 125(2), 97-98. doi: 10.1016/j.ijgo.2014.02.003

Fridlender, Z., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., & Ling, L. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183-194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017

Friedestein, A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83-92.

Galic, V., Herzog, T., Lewin, S., Neugut, A., Burke, W., & Lu, Y. (2012). Prognostic significance of adenocarcinoma histology in women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 125(2), 287-291. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.01.012

Galland, S., Vuille, J., Martin, P., Letovanec, I., Caignard, A., Fregni, G., & Stamenkovic, I. (2017). Tumor-Derived Mesenchymal Stem Cells Use Distinct

Mechanisms to Block the Activity of Natural Killer Cell Subsets. *Cell Reports*, 20(12), 2891-2905. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.089

Garcia-Iglesias, T., del Toro-Arreola, A., Albarran-Somoza, B., del Toro-Arreola, S., Sanchez-Hernandez, P., & Ramirez-Dueñas, M. (2009). Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*, 9(1). doi: 10.1186/1471-2407-9-186

García-Rocha, R., Moreno-Lafont, M., Mora-García, M., Weiss-Steider, B., Montesinos, J., Piña-Sánchez, P., & Monroy-García, A. (2015). Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF- β 1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity. *Cytokine*, 76(2), 382-390. doi: 10.1016/j.cyto.2015.09.001

Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Jovicic, N., Misirkic-Marjanovic, M., Djonov, V., & Jakovljevic, V. (2017). Mesenchymal Stem Cells Promote Metastasis of Lung Cancer Cells by Downregulating Systemic Antitumor Immune Response. *Stem Cells International*, 2017, 1-11. doi: 10.1155/2017/6294717

Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Vucicevic, L., Nikolic, T., Djonov, V., & Arsenijevic, N. (2017). Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver natural killer T cells in an inducible nitric oxide synthase- and indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent manner. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 12(2), e1173-e1185. doi: 10.1002/term.2452

Gazit Z., Pelled G., Sheyn D., Kimelman N., Gazit D. (2014) Mesenchymal Stem Cells. En: Lanza, R. and Atala, A. (eds). *Essentials of Stem Biology*. 3ra edición. USA: Elsevier.

GCO, Global Cancer Observatory (2012). *Cancer Today*. [En línea] <https://gco.iarc.fr/today/home> [Acceso: 26/07/2018].

Gharagozloo, M., Rezaei, A., Kalantari, H., Bahador, A., Hassannejad, N., & Maracy, M. (2018). Decline in peripheral blood NKG2D+CD3+CD56+ NKT cells in metastatic colorectal cancer patients. *Bratislava Medical Journal*, 119(01), 6-11. doi: 10.4149/bl_2018_002

Gibbs, C., Kukekov, V., Reith, J., Tchigrinova, O., Suslov, O., & Scott, E. (2005). Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis. *Neoplasia*, 7(11), 967-976. doi: 10.1593/neo.05394

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., & Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(22), 12445-12450. doi: 10.1073/pnas.93.22.12445

Groh, V., Wu, J., Yee, C., & Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 419(6908), 734-738. doi: 10.1038/nature01112

Guo, X., Bai, Y., Zhang, L., Zhang, B., Zagidullin, N., & Carvalho, K. (2018). Cardiomyocyte differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: new regulators and its implications. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). doi: 10.1186/s13287-018-0773-9

Hammes, L., Tekmal, R., Naud, P., Edelweiss, M., Kirma, N., & Valente, P. (2007). Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression—Clinicopathological correlation. *Gynecologic Oncology*, 105(1), 157-165. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.11.023

Hanahan, D., & Coussens, L. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

Harris, S., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends In Immunology*, 23(3), 144-150. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02154-8

Hasan, U., Zannetti, C., Parroche, P., Goutagny, N., Malfroy, M., & Roblot, G. (2013). The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *The Journal Of Experimental Medicine*, 210(7), 1369-1387. doi: 10.1084/jem.20122394

Hernández-Estévez, EH. (2016) Evaluación de la capacidad inmunosupresora de células troncales mesenquimales provenientes de cáncer de cérvix. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

Hu, T., Yang, P., Zhu, H., Chen, X., Xie, X., & Yang, M. (2015). Accumulation of invariant NKT cells with increased IFN- γ production in persistent high-risk HPV-infected high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Diagnostic Pathology*, 10(1). doi: 10.1186/s13000-015-0254-8

ICESCC. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: Collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. (2006). *International Journal Of Cancer*, 120(4), 885-891. doi: 10.1002/ijc.22357

Iijima, N., Goodwin, E., DiMaio, D., & Iwasaki, A. (2013). High-risk human papillomavirus E6 inhibits monocyte differentiation to Langerhans cells. *Virology*, 444(1-2), 257-262. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.020

INEGI (2016). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. [En línea] <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> [Acceso: 26/07/2018].

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., & Iwashige, H. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*, 88(3), 577-583. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(20000201)88:3<577::aid-cncr13>3.0.co;2-v

Johann, P., Vaegler, M., Gieseke, F., Mang, P., Armeanu-Ebinger, S., & Kluba, T. (2010). Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer*, 10(1). doi: 10.1186/1471-2407-10-501

Kobayashi, A., Weinberg, V., Darragh, T., & Smith-McCune, K. (2008). Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunology*, 1(5), 412-420. doi: 10.1038/mi.2008.33

Kolodziej, L., Paleolog, E., & Williams, R. (2011). Kynurenine metabolism in health and disease. *Amino Acids*, 41(5), 1173-1183. doi: 10.1007/s00726-010-0787-9

Kumar, M., Davuluri, S., Poojar, S., Mukherjee, G., Bajpai, A., & Bafna, U. (2016). Role of estrogen receptor alpha in human cervical cancer-associated fibroblasts: a transcriptomic study. *Tumor Biology*, 37(4), 4409-4420. doi: 10.1007/s13277-015-4257-6

Le Blanc, K., & Davies, L. (2015). Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology Letters*, 168(2), 140-146. doi: 10.1016/j.imlet.2015.05.004

Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*, 363(9419), 1439-1441. doi: 10.1016/s0140-6736(04)16104-7

Lee, J., Jacobsen, E., McGarry, M., Schleimer, R., & Lee, N. (2010). Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(4), 563-575. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03484.x

Lepique, A., Daghanli, K., Cuccovia, I., & Villa, L. (2009). HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses. *Clinical Cancer Research*, 15(13), 4391-4400. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-0489

Lin, T., Chang, H., Wang, K., Kao, A., Chang, C., & Wen, C. (2007). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 361(4), 883-889. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.116

Lodoen, M., & Lanier, L. (2006). Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current Opinion In Immunology*, 18(4), 391-398. doi: 10.1016/j.coi.2006.05.002

Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 21(2), 216-225. doi: 10.1038/cdd.2013.158

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends In Immunology*, 23(11), 549-555. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5

Mareschi, K., Novara, M., Rustichelli, D., Ferrero, I., Guido, D., & Carbone, E. (2006). Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types. *Experimental Hematology*, 34(11), 1563-1572. doi: 10.1016/j.exphem.2006.06.020

Marth, C., Landoni, F., Mahner, S., McCormack, M., Gonzalez-Martin, A., & Colombo, N. (2017). Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals Of Oncology*, 28(suppl_4). doi: 10.1093/annonc/mdx220

McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K., & Bai, S. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells

and tumorigenesis via altered BMP production. *Journal Of Clinical Investigation*, 121(8), 3206-3219. doi: 10.1172/jci45273

Michel, T., Poli, A., Cuapio, A., Briquemont, B., Iserentant, G., Ollert, M., & Zimmer, J. (2016). Human CD56brightNK Cells: An Update. *The Journal Of Immunology*, 196(7), 2923-2931. doi: 10.4049/jimmunol.1502570

Minguela, A., Pastor, S., Mi, W., Richardson, J., & Ward, E. (2006). Feedback Regulation of Murine Autoimmunity via Dominant Anti-Inflammatory Effects of Interferon. *The Journal Of Immunology*, 178(1), 134-144. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.134

Mittal, D., Kassianos, A., Tran, L., Bergot, A., Gosmann, C., & Hofmann, J. (2013). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Contributes to Local Immune Suppression in the Skin Expressing Human Papillomavirus Oncoprotein E7. *Journal Of Investigative Dermatology*, 133(12), 2686-2694. doi: 10.1038/jid.2013.222

Montesinos JJ. y Castro ME. (2013) Células troncales mesenquimales. En: Células troncales y medicina regenerativa. Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I (Editores). UNAM.

Montesinos, J., Mora-García, M., Mayani, H., Flores-Figueroa, E., García-Rocha, R., Fajardo-Orduña, G., Castro-Manreza M., Weiss, B., Monroy-García, A. (2013). In Vitro Evidence of the Presence of Mesenchymal Stromal Cells in Cervical Cancer and Their Role in Protecting Cancer Cells from Cytotoxic T Cell Activity. *Stem Cells And Development*, 22(18), 2508-2519. doi: 10.1089/scd.2013.0084

Mora-García, LM., García-Rocha, R., Morales-Ramírez, O., Montesinos, J., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J. *et al.* (2016). Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *Journal Of Translational Medicine*, 14(1). doi: 10.1186/s12967-016-1057-8

Moretta, L., & Moretta, A. (2003). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *The EMBO Journal*, 23(2), 255-259. doi: 10.1038/sj.emboj.7600019

Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R., & McDonald, D. (2002). Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *The American Journal Of Pathology*, 160(3), 985-1000. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64920-6

Muller, A., DuHadaway, J., Chang, M., Ramalingam, A., Sutanto-Ward, E., Boulden, J. *et al.* (2010). Non-hematopoietic expression of IDO is integrally required for inflammatory tumor promotion. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(11), 1655-1663. doi: 10.1007/s00262-010-0891-4

Munn, D., & Mellor, A. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends In Immunology*, 34(3), 137-143. doi: 10.1016/j.it.2012.10.001

Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A., & Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.115

Najar, M., Fayyad-Kazan, M., Meuleman, N., Bron, D., Fayyad-Kazan, H., & Lagneaux, L. (2018). Mesenchymal stromal cells of the bone marrow and natural killer cells: cell interactions and cross modulation. *Journal Of Cell Communication And Signaling*. doi: 10.1007/s12079-018-0448-4

Nauta, A., & Fibbe, W. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110(10), 3499-3506. doi: 10.1182/blood-2007-02-069716

Nonaka, H., Saga, Y., Fujiwara, H., Akimoto, H., Yamada, A., Kawaga, S. *et al.* (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through inhibition of natural killer cell function and angiogenesis promotion. *International Journal Of Oncology*, 38(1), 113-120. doi: 10.3892/ijo_00000830

Orabona, C., & Grohmann, U. (2011). Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Regulatory Function: Tryptophan Starvation and Beyond. *Methods In Molecular Biology*, 269-280. doi: 10.1007/978-1-60761-869-0_19

Petri, R., Hackel, A., Hahnel, K., Dumitru, C., Bruderek, K., Flohe, S. *et al.* (2017). Activated Tissue-Resident Mesenchymal Stromal Cells Regulate Natural Killer Cell Immune and Tissue-Regenerative Function. *Stem Cell Reports*, 9(3), 985-998. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.020

Petry, K. (2014). HPV and cervical cancer. *Scandinavian Journal Of Clinical And Laboratory Investigation*, 74(sup244), 59-62. doi: 10.3109/00365513.2014.936683

Pickup, M., Mouw, J., & Weaver, V. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, 15(12), 1243-1253. doi: 10.15252/embr.201439246

Poggi, A., Prevosto, C., Massaro, A., Negrini, S., Urbani, S., Pierri, I. *et al.* (2005). Interaction between Human NK Cells and Bone Marrow Stromal Cells Induces NK Cell Triggering: Role of NKp30 and NKG2D Receptors. *The Journal Of Immunology*, 175(10), 6352-6360. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6352

Policastro, L., Ibañez, I., Notcovich, C., Duran, H., & Podhajcer, O. (2012). The Tumor Microenvironment: Characterization, Redox Considerations, and Novel Approaches for Reactive Oxygen Species-Targeted Gene Therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), 854-895. doi: 10.1089/ars.2011.4367

Prendergast, G., Smith, C., Thomas, S., Mandik-Nayak, L., Laury-Kleintop, L., Metz, R., & Muller, A. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(7), 721-735. doi: 10.1007/s00262-014-1549-4

Prigione, I., Benvenuto, F., Bocca, P., Battistini, L., Uccelli, A., & Pistoia, V. (2009). Reciprocal Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and $\gamma\delta$ T Cells

Or Invariant Natural Killer T Cells. *Stem Cells*, 27(3), 693-702. doi: 10.1634/stemcells.2008-0687

Protti, M., Monte, L., & Lullo, G. (2014). Tumor antigen-specific CD4+T cells in cancer immunity: from antigen identification to tumor prognosis and development of therapeutic strategies. *Tissue Antigens*, 83(4), 237-246. doi: 10.1111/tan.12329

Provenzano, P., Inman, D., Eliceiri, K., Knittel, J., Yan, L., Rueden, C. *et al.* (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine*, 6(1). doi: 10.1186/1741-7015-6-11

Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E., Soeiro, I., Lombardi, G., & Dazzi, F. (2007). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Dendritic Cell Differentiation and Function by Preventing Entry Into the Cell Cycle. *Transplantation*, 83(1), 71-76. doi: 10.1097/01.tp.0000244572.24780.54

Rasmusson, I., Uhlin, M., Le Blanc, K., & Levitsky, V. (2007). Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *Journal Of Leukocyte Biology*, 82(4), 887-893. doi: 10.1189/jlb.0307140

Raulet, D. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology*, 3(10), 781-790. doi: 10.1038/nri1199

Salazar, E., Mercado, E., Sojo, I., & Salcedo, M. (2001) Relationship between estradiol 16 α -hydroxylation and human papillomavirus infection in cervical cell transformation. *Gynecological Endocrinology*, 15:5, 335-340, DOI: 10.1080/gye.15.5.335.340

Sato, N., Saga, Y., Mizukami, H., Wang, D., Takahashi, S., Nonaka, H. *et al.* (2012). Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncology Reports*, 28(5), 1574-1578. doi: 10.3892/or.2012.1984

Sica, A. (2010). Role of tumour-associated macrophages in cancer related inflammation. *Experimental Oncology*, 32(3), 153-158.

- Song, D., Li, H., Li, H., & Dai, J. (2015). Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncology Letters*, 10(2), 600-606. doi: 10.3892/ol.2015.3295
- Sotiropoulou, P., Perez, S., Gritzapis, A., Baxevanis, C., & Papamichail, M. (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*, 24(1), 74-85. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359
- Spaggiari, G., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M., & 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(3), 1327-1333. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997
- Spaggiari, G., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M., & Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), 1484-1490. doi: 10.1182/blood-2005-07-2775
- Stanley, M., & Sterling, J. (2014). Host Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Human Papillomavirus*, 58-74. doi: 10.1159/000355964
- Stetson, D., Mohrs, M., Reinhardt, R., Baron, J., Wang, Z., Gapin, L. *et al.* (2003). Constitutive Cytokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function. *The Journal Of Experimental Medicine*, 198(7), 1069-1076. doi: 10.1084/jem.20030630
- Thomas, H., Jäger, M., Mauel, K., Brandau, S., Lask, S., & Flohé, S. (2014). Interaction with Mesenchymal Stem Cells Provokes Natural Killer Cells for Enhanced IL-12/IL-18-Induced Interferon-Gamma Secretion. *Mediators Of Inflammation*, 2014, 1-11. doi: 10.1155/2014/143463
- Tlsty, T., & Coussens, L. (2006). Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease*, 1(1), 119-150. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224

Tomchuck, S., Zvezdaryk, K., Coffelt, S., Waterman, R., Danka, E., & Scandurro, A. (2008). Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells*, 26(1), 99-107. doi: 10.1634/stemcells.2007-0563

Tu, Z., Li, Q., Bu, H., & Lin, F. (2010). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Complement Activation by Secreting Factor H. *Stem Cells And Development*, 19(11), 1803-1809. doi: 10.1089/scd.2009.0418

Villegas, F., Coca, S., Villarrubia, V., Jiménez, R., Chillón, M., Jareño, J. *et al.* (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 35(1), 23-28. doi: 10.1016/s0169-5002(01)00292-6

Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 239-252. doi: 10.1038/nri3174

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S., Zitvogel, L., & Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*, 106(7), 2252-2258. doi: 10.1182/blood-2005-03-1154

Waterman, R., Tomchuck, S., Henkle, S., & Betancourt, A. (2010). A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *Plos ONE*, 5(4), e10088. doi: 10.1371/journal.pone.0010088

Wei, D., Curran, S., Savage, P., Teyton, L., & Bendelac, A. (2006). Mechanisms imposing the V β bias of V α 14 natural killer T cells and consequences for microbial glycolipid recognition. *The Journal Of Experimental Medicine*, 203(5), 1197-1207. doi: 10.1084/jem.20060418

Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B., & Kronenberg, M. (2010). Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency. *The Journal Of Immunology*, 185(5), 2721-2729. doi: 10.4049/jimmunol.1001018

Wu, X., & Tao, R. (2012). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 11(4), 360-371. doi: 10.1016/s1499-3872(12)60193-3

Wulf, G., Jackson, K., & Goodell, M. (2001). Somatic stem cell plasticity. *Experimental Hematology*, 29(12), 1361-1370. doi: 10.1016/s0301-472x(01)00752-4

Wülling, M., Delling, G., & Kaiser, E. (2003). The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Human Pathology*, 34(10), 983-993. doi: 10.1053/s0046-8177(03)00413-1

Xing, F., Saidou, J., & Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers In Bioscience*, 15(1), 166. doi: 10.2741/3613

Xu, Q., Wang, L., Li, H., Han, Q., Li J., Qu, X. *et al.* (2012). Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β . *International Journal Of Oncology*, 41(3), 959-968. doi: 10.3892/ijo.2012.1541

Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R., Kobayashi, N., & Yarmush, M. (2010). Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Cell Transplantation*, 19(6-7), 667-679. doi: 10.3727/096368910x508762

Yang, W., Song, Y., Lu, Y., Sun, J., & Wang, H. (2013). Increased expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-

mediated immunity in high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology*, 139(4), 513-522. doi: 10.1111/imm.12101

Yu, J., Sun, J., Wang, S., Li, H., Cao, S., Cong, Y. *et al.* (2011). Upregulated Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Primary Breast Cancer Correlates with Increase of Infiltrated Regulatory T Cells In Situ and Lymph Node Metastasis. *Clinical And Developmental Immunology*, 2011, 1-10. doi: 10.1155/2011/469135

Zhang, Y., Adachi, Y., Suzuki, Y., Minamino, K., Iwasaki, M., Hisha, H. *et al.* (2004). Simultaneous Injection of Bone Marrow Cells and Stromal Cells into Bone Marrow Accelerates Hematopoiesis In Vivo. *Stem Cells*, 22(7), 1256-1262. doi: 10.1634/stemcells.2004-0173

Zwirner, N., Fernández-Viña, M., & Stastny, P. (1998). MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics*, 47(2), 139-148. doi: 10.1007/s002510050339