



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE CÉLULAS
ESTROMALES MESENQUIMALES PROVENIENTES DE CÁNCER DE CÉRVIX
SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ramírez Menes Keyra Quetzal

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan José Montesinos Montesinos
UIMEO, Hospital de oncología, CMN S.XXI

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Abril, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RAMÍREZ MENES KEYRA QUETZAL
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **14 de noviembre de 2022**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Evaluación De La Capacidad Inmunosupresora De Células Estromales Mesenquimales Provenientes De Cáncer De Cérvix Sobre Células Dendríticas**", dirigida por el/la Dr(a). **MONTESINOS MONTESINOS JUAN JOSÉ**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

ZENTENO GALINDO ARTURO EDGAR	PMDCBQ	PRESIDENTE
VELASCO VELÁZQUEZ JAIME IVÁN	PMDCBQ	SECRETARIO
CRISPÍN ACUÑA JOSÉ CARLOS	PMDCBQ	VOCAL
GUERRA CRESPO MAGDALENA	PMDCBQ	VOCAL
VALVERDE RAMÍREZ MAHARA ANGÉLICA	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de noviembre de 2022



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por enriquecer mi formación académica y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través del programa de becarios (CVU 1083502).

Así mismo al financiamiento económico del CONACyT (Salud-2016-1-272793) y la Coordinación de Investigación del IMSS (R-2023-3602-013) otorgado al Dr. Juan José Montesinos Montesinos para la realización de este proyecto.

A mi tutor principal el Dr. Juan José Montesinos Montesinos por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por la calidez humana que lo distingue.

A los miembros de comité tutor: Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo y Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por su entusiasmo y aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A los miembros de jurado de Tesis Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo, Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, Dr. José Carlos Crispín Acuña, Dra. Magdalena Guerra Crespo, Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez; por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Víctor Adrián Cortés Morales por sus consejos, su atención y su asesoría brindada para el desarrollo de este trabajo, además por su compañía en las largas horas de trabajo en el laboratorio y por su valiosa amistad.

A todos los que fueron mi apoyo y sostén, durante los momentos
difíciles que atravesé, sin ustedes nunca lo hubiera logrado.

A mis padres, por su infinito amor y apoyo.

A mi bella Itzia, eres mi inspiración,
mi mejor motivo, la luz de mi soledad.

A todas esas mujeres que son mi familia, amigas, protectora,
consejeras, que con su ejemplo me engrandecen e inspiran:
Marcela, Martha, Bety, Mayra, Melissa, Kyro y Fanny.

Y a Ramses por ser irreverente y absurdo,
pero tremendamente divertido.

*Gracias por hablar conmigo cuando me daba miedo hablar,
por soñar por mi cuando no quería soñar.*

Contenido

Abreviaturas	I
Índice de figuras	III
Resumen	1
Marco teórico.....	3
1. Cáncer cervicouterino.....	3
2. Microambiente tumoral	6
2.1 Células dendríticas	7
2.1.1 Células dendríticas en el microambiente tumoral	9
2.2 Células estromales mesenquimales	12
2.2.1 Inmunomodulación de células estromales mesenquimales de médula ósea sobre células dendríticas derivadas de monocitos.....	14
2.2.2 Células estromales mesenquimales en el microambiente tumoral	15
2.3 El microambiente tumoral en cáncer cervicouterino	16
3. Respuesta inmunológica en cáncer cervicouterino	19
4. Células estromales mesenquimales en cáncer cervicouterino	24
Planteamiento del problema.....	28

Hipótesis.....	30
Objetivos	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares.....	30
Metodología.....	31
1. Obtención de células estromales mesenquimales.....	31
2. Obtención de monocitos.....	33
3. Inducción de diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras	33
4. Inducción de maduración desde monocitos a células dendríticas maduras	34
5. Fagocitosis	35
5. Generación de linfocitos T-reguladores.....	35
6. Proliferación de linfocitos T.....	36
7. Análisis estadístico	37
Resultados	38
1. Las células estromales mesenquimales disminuyeron la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas inmaduras.....	38

2. Las células estromales mesenquimales disminuyeron la maduración de las células dendríticas.	43
3. Las células estromales mesenquimales favorecieron la capacidad fagocítica de las células dendríticas inmaduras.	48
4. Las células estromales mesenquimales incrementaron la capacidad de las células dendríticas para generar linfocitos T-reguladores.....	50
5. Las células estromales mesenquimales disminuyeron la capacidad de las células dendríticas maduras para inducir proliferación de linfocitos T.	52
Discusión.....	54
Conclusiones.....	61
Perspectivas.....	63
Referencias	64
Anexo: Caracterización de las células estromales mesenquimales	75

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

CaCu: Cáncer cervicouterino

CAF: Fibroblasto asociado al cáncer

CFSE: Succinimidil éster de carboxifluoresceína

CN: Cérvix normal

CNM: Células mononucleares

DC: Célula Dendrítica

DMEM Ig: Medio Eagle modificado por Dulbeco bajo en glucosa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HLA-I: Antígeno leucocitario humano clase I

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano DR

iDC: Célula dendrítica inmadura

IDO: Indolamina 2-3 dioxigenasa

IFN: Interferón

IL: Interleucina

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

KC: Queratinocito

LCR: Región larga de control

LC: Célula de Langerhans

LPS: Lipopolisacárido

LTC: Linfocito T citotóxico

M-CSF: Factor estimulante de colonias macrófagos

mDC: Célula dendrítica madura

MEC: Matriz extracelular
MFI: Intensidad media de fluorescencia
MIC A/B: secuencia A/B relacionada al MHC-I
MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad
MMP: Metaloproteinasa
moDC: Célula dendrítica derivada de monocito.
MO: Médula ósea
MSC: Célula estromal mesenquimal
NIC: Neoplasia intraepitelial cervical
NK: Natural Killer
ORF: Marco de lectura abierto
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PD-1: Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1/2: Ligando de muerte celular programada 1/2
PGE₂: Prostaglandina E2
PRR: Receptor de reconocimiento de patrón
RANKL: Receptor activador para NF- κ B
SFB: Suero Fetal Bovino
TAA: Antígeno asociado a tumor
TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta
Th: Linfocitos T cooperadores
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral-alfa
TME: Microambiente tumoral
Treg: Linfocito T regulador
VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VPH: Virus de Papiloma Humano
VPHar: Virus de Papiloma Humano de alto riesgo

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del VPH y organización del genoma.	4
Figura 2. El VPH accede a las células basales del epitelio cervical.	6
Figura 3. Acciones de las DCs en tumores.....	10
Figura 4. Efectos inmunosupresores de MSCs sobre células inmunológicas.	13
Figura 5. Modelo propuesto de carcinogénesis cervical inducida por VPH.	17
Figura 6. Papel de las DCs en el desarrollo de CaCu.	22
Figura 7. MSCs en CaCu.....	26
Figura 8. Marcadores CD11b, CD11c y CD14 en ensayo de diferenciación.	41
Figura 9. Cuantificación de HLA-DR y moléculas co-estimuladoras en ensayo de diferenciación.	42
Figura 10. Marcadores CD14 y CD11b/c en ensayo de maduración.....	46
Figura 11. Moléculas HLA-DR y CD80, CD86, CD83 en ensayo de diferenciación.	47
Figura 12. Ensayo de Fagocitosis.	49
Figura 13. Linfocitos Treg generados con DCs proveniente de cultivos con MSCs.	51

Figura 14. Proliferación de linfocitos T (CD3+)	53
Figura 15. Interacción MSCs con DCs en el cérvix.	62
Figura 16. Diferenciación de MO-MSCs, CN-MSCs y CaCu-MSCs.	75
Figura 17. Perfil de expresión de antígenos en MO-MSCs, CN-MSCs y CaCu-MSCs.	76

Resumen

En México, el cáncer de cérvix (CaCu) 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 del inglés *Mesenchymal Stromal Cells*), forman parte del microambiente tumoral y podrían tener 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) y su participación en proteger a las células neoplásicas de la actividad citotóxica de linfocitos T y Natural Killer (NK), pero actualmente no se conoce la capacidad inmunosupresora de MSCs hacia las células dendríticas (DCs) en el microambiente tumoral.

Con la idea de profundizar en los mecanismos que participan en el desarrollo del CaCu, en el presente estudio, hemos comparado la capacidad de MSCs provenientes de cérvix normal (CN-MSCs) y CaCu-MSCs de afectar el comportamiento de DCs derivadas de monocitos (moDCs) en términos de diferenciación, maduración, fagocitosis, capacidad de inducir proliferación de los linfocitos T y generar linfocitos T-reguladores (Tregs). Como control, se usaron MO-MSCs de las cuales se ha documentado su potencial inmunosupresor de moDCs

En este estudio se demostró que las CaCu-MSCs y CN-MSCs tienen capacidad similar de disminuir la diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs) ya que las DCs que fueron diferenciadas en cultivos con CaCu-MSCs y CN-MSCs mantuvieron la expresión de CD14. Además, la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD11b y CD11c fue menor en los cultivos con CaCu-MSCs y CN-MSCs. También ambos tipos de MSCs redujeron el porcentaje de células positivas para CD80, CD86 y CD83 al inducir maduración a las DCs.

Las CaCu-MSCs y CN-MSCs aumentaron el porcentaje de células que fagocitaron. Ambos tipos de MSCs mejoraron la capacidad de las DCs de generar linfocitos Tregs. Además, la proliferación de los linfocitos T fue significativa menor cuando las células dendríticas maduras (mDCs) habían sido cultivadas con CN-MSCs y CaCu-MSCs.

Marco teórico

1. Cáncer de cérvix

El CaCu es el cuarto cáncer diagnosticado con más frecuencia y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en mujeres en el mundo, en el 2020 se estimaron 604,000 casos nuevos de CaCu y 342,000 muertes por CaCu en todo el mundo, lo que representa el 8% de todas las muertes por cáncer en mujeres (GLOBOCAN, 2020; Sung et al, 2020). En México, este tipo de cáncer sigue ocupando el segundo lugar en incidencia y es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos en mujeres (GLOBOCAN, 2020).

La presencia de una infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor etiológico en el proceso de carcinogénesis, a pesar de eso, la infección por VPH por sí misma no es suficiente para generarlo, ya que no todas las infecciones de VPH culminan en CaCu, el 90% se resuelven por sí mismas en dos o tres años (Balasubramaniam et al, 2019; Okunade, 2019; Olusola et al, 2019).

Los VPH son un grupo de virus sin envoltura que pertenecen a la familia Papillomaviridae, de unos 55nm de diámetro, tienen una cápside icosaédrica con 72 capsómeros, el genoma consta de una sola molécula de Ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena circular de aprox. 8kb, que abarca ocho marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*), (Figura 1) (Estêvão et al, 2019; Okunade, 2019; Schiffman et al, 2016).

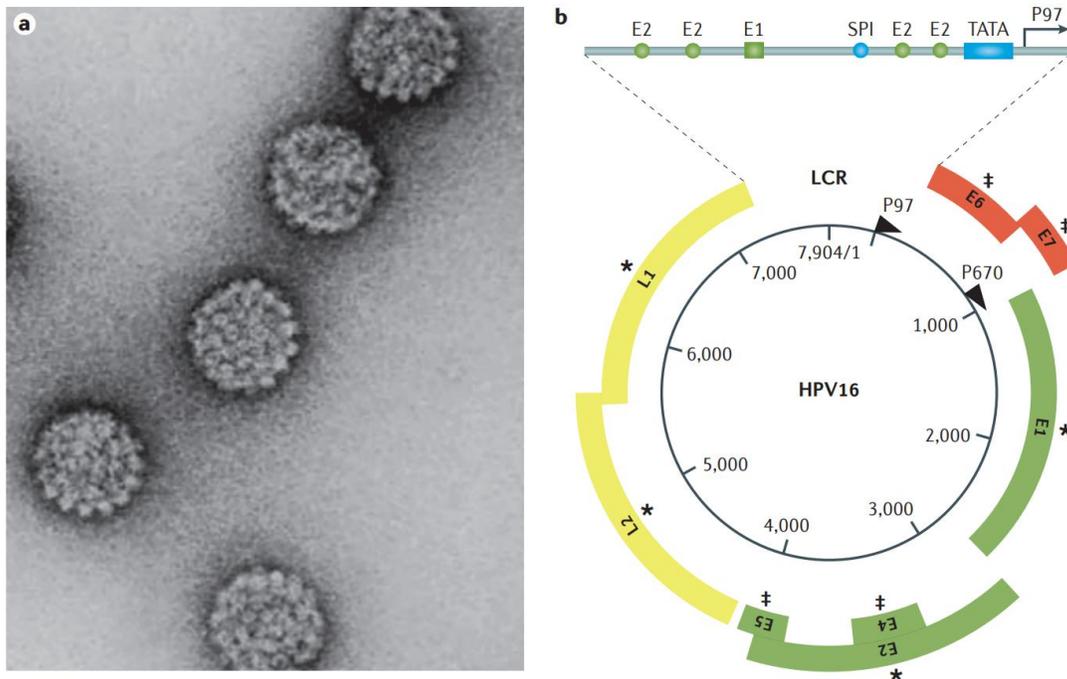


Figura 1. Estructura del VPH y organización del genoma. a) Se muestran partículas de VPH (55 nm de diámetro) en una micrografía electrónica de transmisión teñida negativamente. **b)** Diagrama del genoma del VPH típica de los tipos de VPHar, como VPH16. Los promotores temprano (P97) y tardío (P670) están marcados con puntas de flecha. Los seis primeros marcos abiertos de lectura (ORF), E1, E2, E4 y E5 (en verde) y E6 y E7 (en rojo), se expresan a partir de diferentes promotores en diferentes etapas durante la diferenciación de células epiteliales. Los ORF tardíos L1 y L2 (en amarillo) se expresan a partir del promotor P670 en las capas epiteliales superiores como resultado de cambios en el empalme. La región larga de control (LCR) es una región no codificante del genoma que contiene el origen de la replicación, así como secuencias de control postranscripcionales que contribuyen a la expresión génica viral. Se muestran los sitios de unión para los productos génicos virales E1 y E2 y el factor de transcripción SP1. Los productos génicos centrales (indicados con un asterisco (*)) son proteínas virales que se requieren para la replicación del genoma, el ensamblaje viral y la liberación; las indicadas con una doble cruz (‡) son proteínas accesorias con funciones que incluyen la entrada al ciclo celular y la evasión inmunitaria (Tomada de Schiffman et al, 2016).

El VPH es la infección viral más común del tracto reproductivo, pero solo trece tipos de VPH, conocidos como VPH de alto riesgo (VPHar), transmitidos sexualmente, en particular VPH16 y VPH18, causan prácticamente todos los cánceres de cuello uterino, una gran fracción de cánceres anogenitales, una

proporción creciente de otros cánceres orofaríngeos y algunos casos de cánceres del tracto genital inferior (vulva, vagina y pene) (Bravo et al, 2015; Estêvão et al, 2019; Okunade, 2019; Schiffman et al, 2016; Van Doorslaer, 2013).

El VPHar infecta a los queratinocitos (KCs, *keratinocyte*) indiferenciados, se ensambla exclusivamente en el núcleo y luego se replica de una manera dependiente de la diferenciación. La célula infectada es una célula basal epitelial, la amplificación del genoma ocurre típicamente en las capas epiteliales medias, mientras que el ensamblaje y liberación ocurre en la superficie epitelial (Figura 2) (Bravo et al, 2015; Estêvão et al, 2019).

La progresión de las células epiteliales infectadas por VPHar a cáncer invasivo es un proceso a largo plazo, aproximadamente 10 años, la infección de VPHar y la integración de su genoma en el cromosoma huésped de las KCs, impulsados principalmente por oncoproteínas E6 y E7 producen cambios epiteliales que ayudan a la transformación en un microambiente tumoral (Figura 2) (TME, *tumor microenvironment*) (Smola, 2017).

Otros factores que influyen en el desarrollo del cáncer son: la predisposición genética del individuo, frecuencia de reinfecciones por VPH y otros virus, microbiota vaginal, cambios en niveles hormonales, el tabaquismo, la edad, la dieta, higiene, nivel socioeconómico y la respuesta inmunológica (Balasubramaniam et al, 2019; Okunade, 2019; Olusola et al, 2019). Incluso, existen tumores cervicales no relacionados con VPH que representan aproximadamente 5% de los tumores cervicales (Fernández et al, 2022).

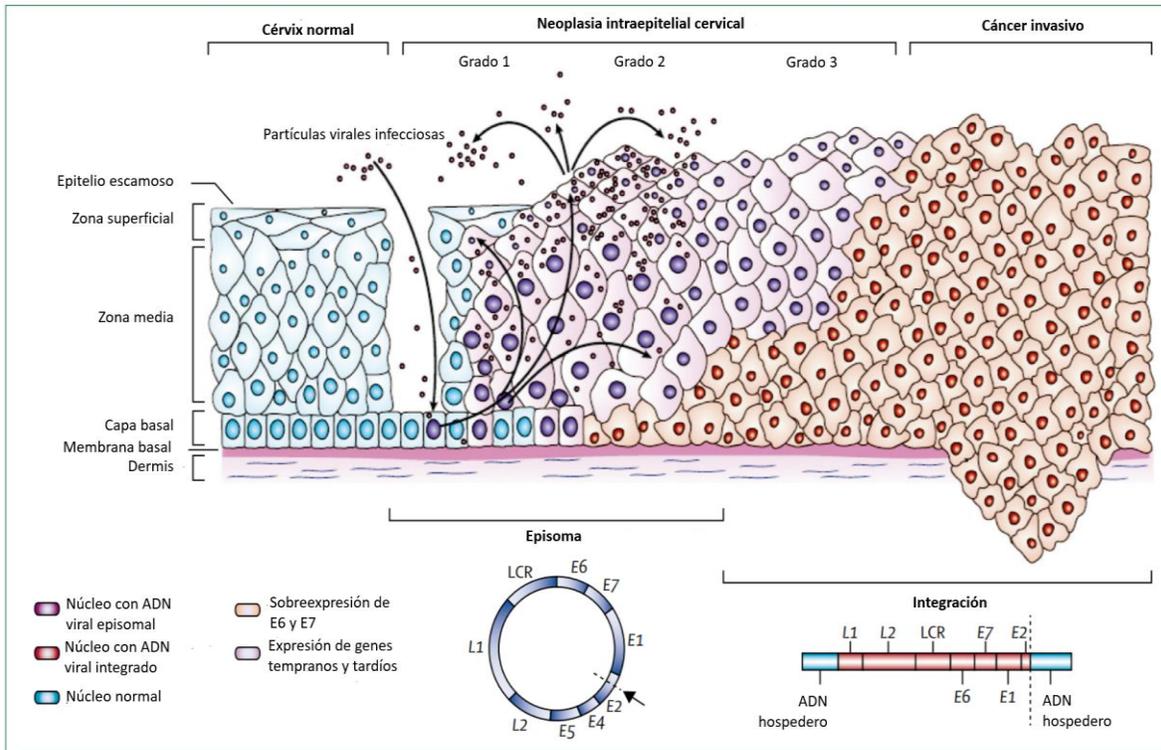


Figura 2. El VPH accede a las células basales del epitelio cervical. Después de la infección, los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 del VPH se expresan y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal. Las oncoproteínas E5, E6 y E7 son factores cruciales para la carcinogénesis, E5 promueve la hiperproliferación y previene la apoptosis de células infectadas, facilitando la progresión tumoral. Mientras las proteínas E6 y E7 provocan la desregulación del ciclo celular a través de mecanismos separados. En las capas superiores del epitelio (la zona media y la zona superficial), el genoma viral se replica aún más y se expresan los genes L1 y L2 y E4. El virus puede entonces iniciar una nueva infección. Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de bajo grado favorecen la replicación viral productiva. Algunas infecciones por el VPH progresan NIC a de alto grado. La progresión de las lesiones no tratadas a cáncer invasivo se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos) y la sobreexpresión posterior de la expresión del oncogén E6 y E7. (Tomada y modificada de Crosbie et al, 2013).

2. Microambiente tumoral

La composición del TME varía entre los diferentes tipos de tumor, pero las características distintivas incluyen células inmunes, células endoteliales, células del estroma y matriz extracelular (MEC) (Anderson y Simón, 2020; Arneht, 2019).

Entre las células inmunes presentes en el TME se pueden encontrar las DCs actúan como un vínculo entre la respuesta innata y adaptativa (Anderson y Simón, 2020). Las MSCs forman parte del estroma y son capaces de dar origen al resto de los componentes del estroma (fibroblastos, miofibroblasto, adipocitos y células estrelladas) (Coffman et al, 2019). Las células del estroma secretan factores que influyen en la angiogénesis, proliferación, invasión y metástasis (Anderson y Simón, 2020; Arneth, 2019).

2.1 Células dendríticas

Las DCs son células del sistema inmune especializadas en la presentación de antígeno. Todas las DCs exhiben las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), y en todas está presente las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86. Las DCs se originan a partir de células progenitoras comunes mieloides y células progenitoras comunes linfoides (MacDonald et al, 2002; Szabolcs et al, 2003).

Las DCs se clasifican funcionalmente en tres tipos: DC clásicas o comunes, las DCs plasmacitoides y las DC derivadas de monocitos (moDCs). Las DCs clásicas y plasmacitoides están presentes y activas en condiciones de estado estacionario, mientras las moDCs tienden a surgir solo durante la inflamación y son de naturaleza muy plástica. Las moDCs pueden originarse de sus precursores monocitos en caso de inflamación o cuando se exponen in vitro a combinaciones apropiadas de citocinas, que incluyan el Factor estimulante de colonias de

macrófagos y granulocitos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4) (MacDonald et al, 2002; Palucka et al, 1998; Szabolcs et al, 2003).

Las DCs se encuentran en grandes cantidades en los epitelios del cuerpo, como la piel, la vagina, la parte exterior del cuello uterino y el ano (Randolph et al, 2005). Estas se pueden encontrar en dos estadios de maduración: DC inmaduras (iDC) y DC maduras (mDC) (Shortman y Liu, 2002).

La función principal de las iDC es reconocer a los antígenos por medio de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR). Entre los PRR se encuentra los receptores CD11b y CD11c que reconocen al complemento. Al reconocer a su antígeno, las DCs lo fagocitan o endocitan y lo procesan para ser presentados por medio del MHC (Rossi y Young et al, 2005). Particularmente en las moDCs tienen una alta expresión de CD11c y CD11b (Tang-Huau y Segura, 2019).

Al madurar, las DCs disminuyen la capacidad de endocitosis, salen de los tejidos periféricos, pasan a la circulación sanguínea o linfática, emigran a regiones de los órganos linfoides donde residen linfocitos T y les presentan el antígeno correspondiente, induciendo la proliferación y activación de dichos linfocitos. Al madurar cambia el fenotipo de las DCs, disminuyen la expresión de PRR y expresan CD83, regulan al alza MHC-I y II, así como CD80 y CD86, requeridas para activar a linfocitos T, además aumentan la expresión de CCR7, lo que garantiza su migración a nódulos linfáticos (Foster et al, 1999; Sallusto et al, 1998).

Las DCs dirigen la respuesta inmunológica, ya que regulan la diferenciación y activación de los linfocitos CD4⁺, son las únicas células presentadoras de antígeno que pueden presentar de forma cruzada los antígenos para activar a los linfocitos Tnaive CD8⁺ y Tnaive CD4⁺. Además, que pueden presentar antígenos no proteicos a linfocitos T γ δ y NKT. Por lo cual, las DCs son clave para inducir una correcta respuesta del sistema inmune y mantener la tolerancia inmunológica (Chancellor et al, 2018; Van Rhijn y Le Nours, 2021).

Las DCs también inducen la proliferación de linfocitos B, el cambio de isotipo de inmunoglobulinas y su diferenciación hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Banchereau y Steinman, 1998). También las DCs pueden activar a los linfocitos NK por medio de contacto célula-célula o por citocinas como provocando la citotoxicidad, la proliferación y la liberación de interferón gamma (IFN- γ) por parte de las NK (Walzer et al, 2005).

2.1.1 Células dendríticas en el microambiente tumoral

El destino de las DCs en el TME está determinado por señales que promueven una respuesta inmune antitumoral o de tolerancia. Las DCs están inherentemente programadas para tener una función antitumoral, las mDCs, estas presentan en los tumores y pueden procesar antígenos asociados a tumor (TAA *tumour-associated antigens*) para promover la activación de linfocitos T CD8⁺, e inducir en los linfocitos T CD4⁺ una respuesta Th1 y Th2 además las DCs pueden generar altas cantidades de IL-12, IFN-I y quimiocinas como CXCL9 y CXCL10 que atraen

a los linfocitos T CD8⁺ al microambiente tumoral (Figura 3) (Fu y Jiang, 2018; Wculek et al, 2020).

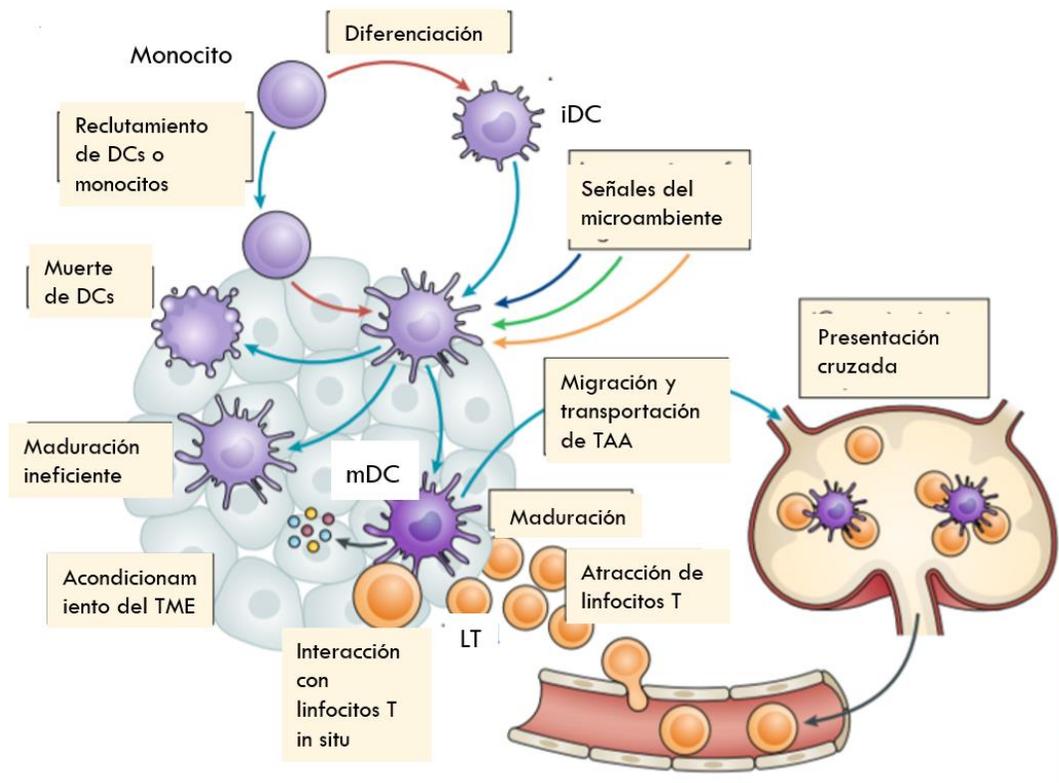


Figura 3. Acciones de las DCs en tumores. Las DCs o sus precursores pueden incorporarse al TME, donde estos últimos pueden diferenciarse en DCs. Dentro del TME, las DCs pueden detectar diferentes señales moleculares que determinan su destino como la muerte celular, la activación ineficiente y la maduración exitosa. Mientras las iDCs carecen de la capacidad de activar a los LTC e inducir tolerancia, las mDCs pueden migrar a los ganglios linfáticos que drenan los tumores para preparar la respuesta de las células T, reclutarlas al TME y producir citocinas inmunoestimuladoras que condicionan el TME. (Tomado y modificado de Wculek et al, 2020).

En algunos casos las células cancerosas pueden promover la tolerancia inmunológica al impulsar a DCs a disminuir las moléculas co-estimuladoras, al presentar TAA, sin la señal de CD80/CD86, se induce anergia a los linfocitos T. Otra forma de limitar la actividad efectora de los linfocitos T, es por medio del

antígeno de linfocito T citotóxico 4 que tiene mayor afinidad por CD80/CD86 que CD28, evitando así el acoplamiento con CD28. Además, por el receptor de muerte celular programada-1 (PD-1, o CD279) expresado por linfocitos T, este receptor se une a los ligandos PD-L1 y PD-L2 presente en DCs, provoca la apoptosis, anergia o agotamiento de linfocitos T efectores (Figura 3) (Fu y Jiang, 2018; Wculek et al, 2020; Yang et al, 2013).

Además, las DCs tumorales pueden promover la generación de linfocitos Tregs por medio de sus ligandos PD-L1/2 y coestimulador inducible-ligando, y por medio de citocinas como Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-10 (Fu y Jiang, 2018; Wculek et al, 2020).

El TME también contiene una red de factores inmunosupresores que puede inhibir la infiltración, frenar el desarrollo y la proliferación de DCs por medio de IL-6, factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF), IL-10, indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF- β y prostaglandina E2 (PGE₂) (Figura 3) (Fu y Jiang, 2018; Wculek et al, 2020).

IL-6, IDO y M-CSF mantienen a la población de monocitos CD14⁺ que no median la proliferación de células Tnaive. VEGF, IL-6 y PGE₂, también inhiben la diferenciación, maduración y supervivencia de moDCs. IL-10 afecta la maduración, la secreción de IL-12 y su capacidad de presentar antígenos de DCs, también induce un fenotipo tolerogénico en DCs que conduce a la inducción de linfocitos T maduros anérgicos. Además, IL-10 es capaz de inducir a los monocitos CD14⁺ a

diferenciarse hacia macrófagos M2 en lugar de DCs. Asimismo, TGF- β inhibe la maduración y la capacidad de iniciar una respuesta antitumoral, disminuyendo las moléculas co-estimuladoras y MHC-II de las DCs (Figura 3) (Fu y Jiang, 2018; Wculek et al, 2020).

2.2 Células estromales mesenquimales

Las MSCs son células troncales estromales multipotenciales y cuyos criterios mínimos para identificarlas son: (I) adherentes al plástico con morfología fibroblastoide; (II) pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos; (III) expresan los marcadores CD73, CD90 y CD105, además de carecer de los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD11b y CD14, así como del endotelial CD31 y no expresan antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR, *Human leukocyte antigen-DR*) (Anexo) (Dominici et al, 2006).

Las MSCs se aislaron por primera vez de medula ósea (MO) (Friedenstein et al, 1974); sin embargo, actualmente se ha demostrado su presencia en diferentes tejidos. Se ha observado que las MSCs de dichas fuentes, presentan potenciales distintos de diferenciación, expresión inmunofenotípica, capacidad proliferativa y de inmunoregulación, lo cual depende del tejido del que se aíslan (Castro-Manrreza et al, 2014; Montesinos et al, 2009).

Las MSCs tienen efectos inmunomoduladores sobre varias células inmunes y aquellas provenientes de MO son la población en las que más se han estudiado estos efectos. Entre dichos efectos se encuentran: la inhibición de la proliferación

y citotoxicidad de linfocitos T y NK, disminución de la proliferación y producción de inmunoglobulinas de las células B y modulación de la producción de citocinas y quimiocinas de macrófagos, a los cuales favorecen preferentemente hacia el fenotipo M2 (Figura 4) (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015).

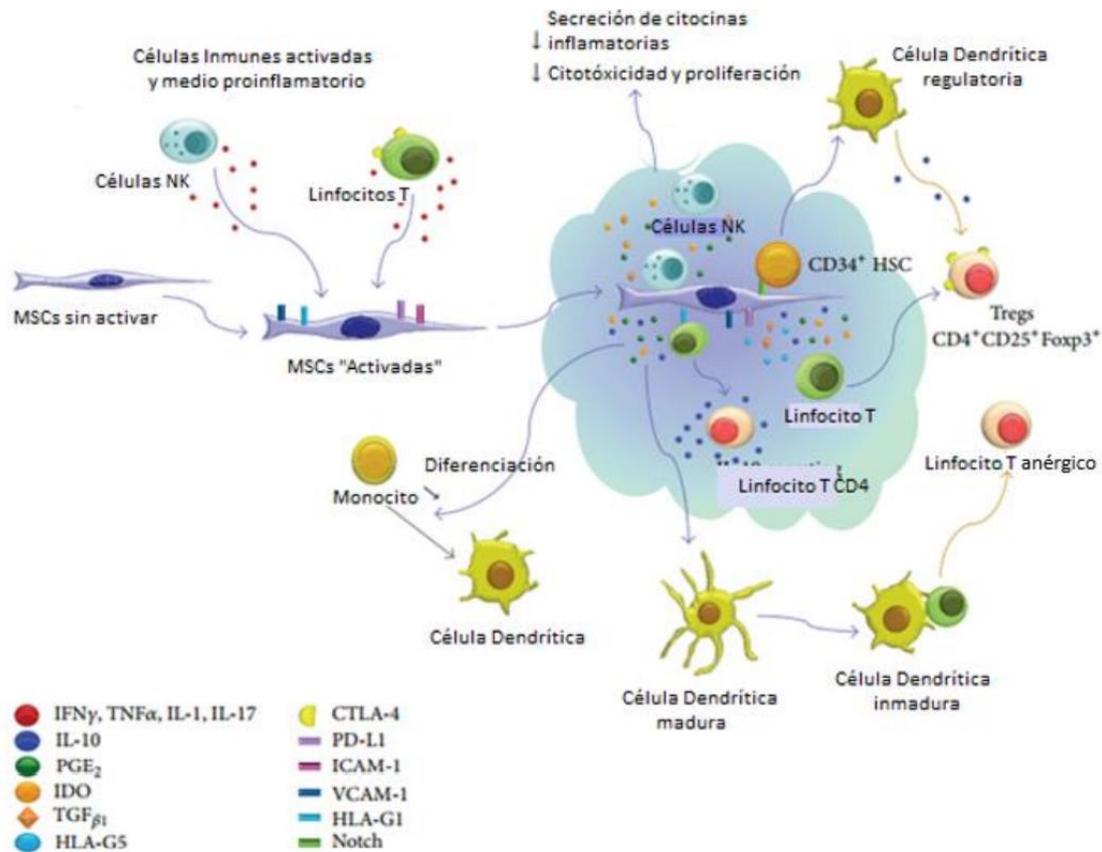


Figura 4. Efectos inmunosupresores de MO-MSCs sobre células inmunológicas. Citocinas proinflamatorias como IFN- γ secretadas por células NK activadas y linfocitos T promueven una disminución o un aumento en la producción de citocinas inmunosupresoras. IDO, PGE₂, TGF- β 1 y moléculas de membrana participan principalmente en la inhibición de activación en células NK. IDO, PGE₂ e IL-10 están involucrados en la disminución de la diferenciación de monocitos a iDCs, también evita la maduración de DCs, lo que resulta en anergia de los linfocitos T. Las MO-MSCs inducen una población reguladora de DCs en progenitores hematopoyéticos (HSC) CD34⁺, estas DCs reguladoras estimulan la generación de Tregs FoxP3⁺ (Tomado y modificado Castro-Manrreza y Montesinos, 2015).

2.2.1 Inmunomodulación de células estromales mesenquimales de médula ósea sobre células dendríticas derivadas de monocitos

Las MO-MSCs tiene la capacidad de modular la expresión de marcadores específicos de DCs cuando están en presencia de monocitos estimulados con GM-CSF e IL-4, particularmente evitando la expresión de CD1a y manteniendo CD14. Posterior a la estimulación con lipopolisacárido (LPS), que normalmente induce la maduración de DCs, en presencia de MO-MSCs dichas células expresan niveles más bajos de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD83, en comparación con las DCs en ausencia de MO-MSCs (Figura 4) (Jiang et al, 2005).

También se ha demostrado que las MO-MSCs disminuyen la capacidad de las moDCs de estimular la proliferación de células T alogénicas, a su vez estas DCs producen bajos niveles de IL-12 tras la estimulación con LPS o CD40L (Jiang et al, 2005; Nauta et al, 2006), siendo estos efectos favorecidos principalmente por PGE₂ (Spaggiari et al, 2009). Otros estudios han encontrado que las moDCs en presencia de MO-MSCs son capaces de estimular la producción de FoxP3 en linfocitos T (Li et al, 2008). En otro estudio similar, se demostró que los linfocitos T cultivados con las moDCs diferenciadas y estimuladas con LPS en cultivos con MO-MSCs proliferaban menos que los linfocitos T en cultivos con moDCs que no estuvieron con MO-MSCs. Además, las iDCs después de estar en cultivos con MO-MSCs generaron más linfocitos Tregs (CD4+ CD25+ FoxP3+) que iDCs sin contacto con MO-MSCs (Zhao et al, 2012a).

2.2.2 Células estromales mesenquimales en el microambiente tumoral

Las MSCs pueden reclutarse al TME de otros tejidos como MO, a través de la circulación sanguínea, lo cual podría ser inducido por un incremento en la concentración de citocinas como TGF- β , VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas presentes en el TME y un aumento de expresión de CCR2 en MSCs (Klopp et al, 2007; Quante et al, 2011). También se ha sugerido que las células tumorales son capaces de inducir la proliferación y modificar a las MSCs in situ (Coffman et al, 2018).

En algunos tumores, las MSCs cumplen los criterios mínimos previamente descritos para ser consideradas como tales, pero presentan un perfil inmunofenotípico diferente en comparación con las MSCs residentes del tejido. No obstante, conservan su capacidad de diferenciación hacia componentes estromales que ayudan la progresión del tumor, estos cambios son debidos a una “reprogramación” por parte de las células tumorales (Coffman et al, 2018).

Las MSCs presentes en el tumor podrían utilizar mecanismos similares a MSC-MO para inhibir al sistema inmune. Se ha demostrado que las MSCs de carcinoma presentan una mayor expresión de M-CSF, con lo cual, son capaces de promover el reclutamiento y la polarización de macrófagos al fenotipo M2 (Mathew et al, 2016). Aunado a lo anterior, se ha descrito que las MSCs asociadas a cáncer favorecen la exclusión de linfocitos T del tumor y reducen la respuesta al inhibidor anti-PD-L (Cascio et al, 2021).

También se comprobó que las MSCs derivadas de tumor tenían capacidad de disminuir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos NK, así como la citotoxicidad de NKs. Adicionalmente disminuyeron la expresión de los receptores NKp46, NKp44, NKp30 y NKG2D, en procesos mediados principalmente por PGE₂ (Jojann et al, 2010; Galland et al, 2017).

Las MSCs también pueden promover la proliferación y supervivencia de las células tumorales, y la angiogénesis en tumores (Liu et al, 2011; Maffey et al, 2017; McLean et al, 2011; Suzuki et al, 2011). Además, por medio de CCL5 las MSCs pueden favorecer la transición epitelio-mesenquima, dado que CCL5 promueve la secreción de metaloproteinasa (MMP) que modifican los componentes proteicos de la matriz extracelular (MEC) mejorando el potencial invasivo y migratorio de las células tumorales (Karnoub et al, 2007).

2.3 El microambiente tumoral en cáncer de cérvix

Los KCs infectados con VPH reforman activamente al entorno local y crean un microambiente propicio para la persistencia, progresión y propagación viral, promoviendo el desarrollo tumoral. Los KCs infectados por VPHar muestran una baja expresión de citocinas y quimiocinas como consecuencia directa de la supresión mediada por E6 y E7, limitando el tráfico de células inmunitarias innatas y la activación de células efectoras específicas de antígeno, promoviendo una respuesta inmune tolerogénica (Figura 5) (Smola, 2017; Yuan et al, 2021).

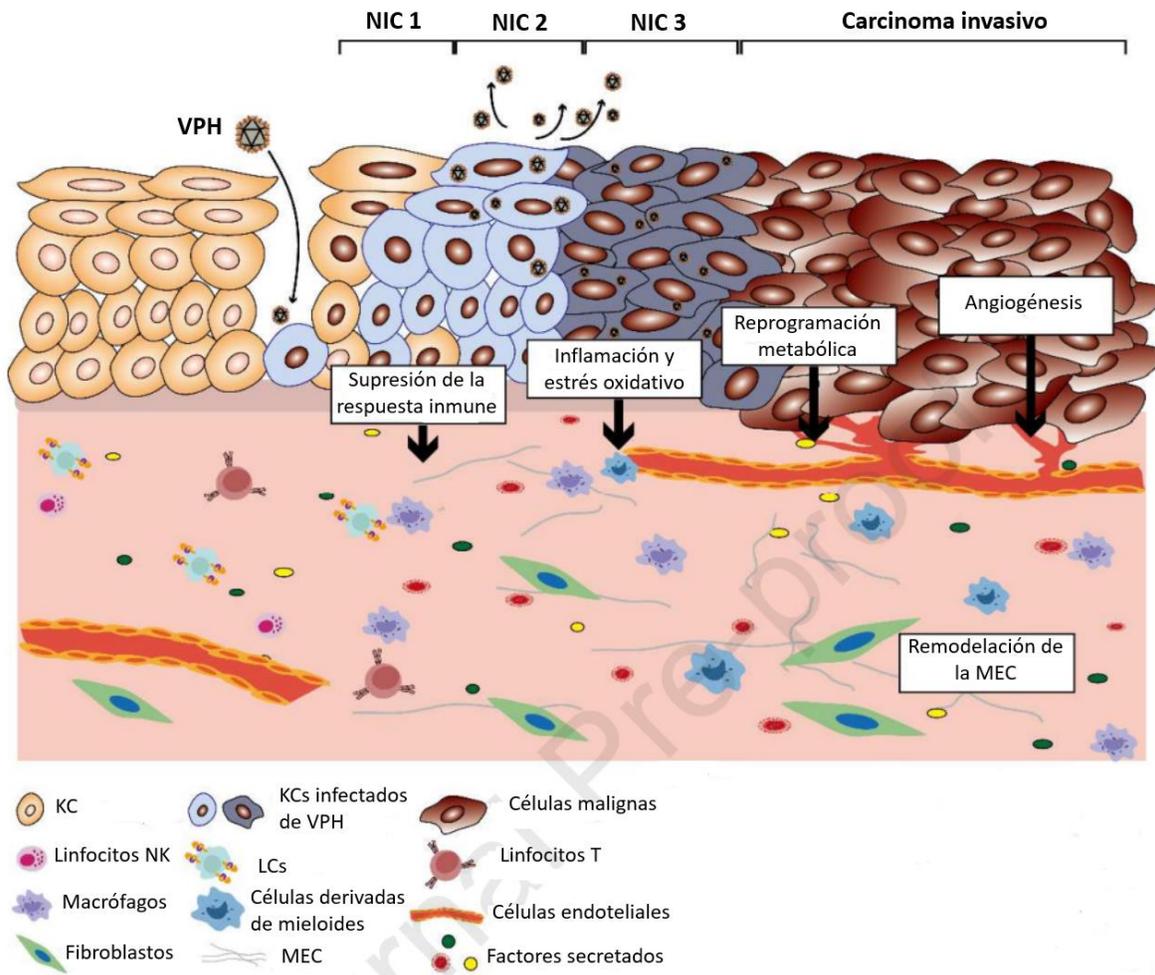


Figura 5. Modelo propuesto de carcinogénesis cervical inducida por VPH. Los viriones penetran en el epitelio a través de microabrasiones para alcanzar los queratinocitos basales y los genes virales se expresan secuencialmente con la diferenciación celular. Durante el desarrollo de la enfermedad, los queratinocitos infectados por virus moldean activamente el entorno local e impiden las redes inmunitarias celulares que son esenciales para la eliminación eficaz del virus y para iniciar la comunicación con el estroma del huésped, promoviendo la formación de TME para la persistencia viral, la propagación y la neoplasia cervical. (Tomado y modificado de Yuan et al, 2020).

Sin embargo, con el aumento de displasia, se observa un aumento de infiltrado de células inmunes, E6 y E7 del VPH también se identifican como la causa principal de la incidencia de inflamación crónica, las oncoproteínas del VPH podrían dar lugar a la producción de diversos mediadores proinflamatorios. La

inflamación crónica puede conducir a la inducción de especies reactivas de oxígeno celular y Óxido nítrico sintetasa inducible, junto con la disminución de la expresión de antioxidantes, los cuales representan los principales mecanismos para que el huésped contrarreste los efectos dañinos oxidativos. A su vez, el estrés oxidativo podría contribuir aún más a la perpetuación del proceso inflamatorio con el potencial de crear daño en el ADN, lo que permitiría la acumulación de mutaciones y la inestabilidad del genoma que conducen a la transformación progresiva de células normales a células cancerosas. (Figura 5) (Smola, 2017; Yuan et al, 2021).

Las proteínas virales E2, E5, E6 y E7 aumentan la actividad de enzimas glucolíticas, produciendo un cambio en los metabolitos de TME que conducen a un aumento de ATP, para satisfacer las demandas metabólicas de las células infectadas (Figura 5) (Martinez-Ramirez et al, 2018). También se ha observado que los estrógenos ayudan a la proliferación epitelial; las células epiteliales y los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) expresan el receptor de estrógenos- α (Spurgeon et al, 2017).

Los KCs infectados por VPH promueven la proliferación epitelial, la angiogénesis en células endoteliales, y formación de nuevo tejido, esto con ayuda de E6/E7 (Figura 5) (Chen et al, 2007; Mazibrada et al, 2008; Pietras et al, 2008; Szabowski et al, 2000). Además, los KCs infectados y los CAFs presentes en estas lesiones aumentan la expresión de MMPs, promoviendo la progresión e invasión de células malignas (Figura 5) (Fullár et al, 2015).

3. Respuesta inmunológica en cáncer de cérvix

La supresión de la respuesta inmune en el TME favorece la persistencia y propagación viral, el cual emplea varias estrategias para establecer la infección y garantizar su replicación continúa evadiendo al sistema inmune. Las alteraciones neoplásicas relacionadas con el VPH son más prevalentes en individuos inmunodeprimidos, en casos de trasplante o de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sasagawa et al, 2012).

Los KCs infectados por VPHar reprograman el microambiente inmunitario local, lo que sirve para promover la progresión de las lesiones precursoras hacia el cáncer invasivo. Las oncoproteínas E6 y E7 interfieren con las señales de PRR, inhiben la activación de Factor nuclear Kappa B, también evitan la producción de IFN-I, Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) e IL-8 y promueven la destrucción proteolítica de IL-1 β limitando el tráfico de células inmunitarias innatas y la activación de células efectoras específicas de antígeno. Sin embargo, otras citocinas derivadas de KCs infectados, como IL-6, IL-10, VEGF y PGE₂, reclutan células inmunes reguladoras en las lesiones cervicales por VPH, así aumentan la infiltración de Macrófagos M2, Tregs, entre otros (Estêvão et al, 2019; Richards et al, 2015; Smola, 2017; Stone et al, 2014; Yuan et al, 2021).

La regresión de la infección requiere una respuesta eficaz de linfocitos T que involucre linfocitos T CD8⁺ específico de antígeno y linfocitos Th1 que sean capaces de reconocer las oncoproteínas E6, E7 y E2 (Woo et al, 2008). La regresión de las lesiones por VPH16 se correlacionan con la presencia

intraepitelial de granzima B, CD8 y CD56, proveniente de células citotóxicas (linfocitos T y NK) (Visser et al, 2007).

Se ha demostrado que el avance de una lesión precursora epitelial se asocia con números bajos o ausencia de células T específicas de antígenos circulantes y un aumento de células Tregs (Visser et al, 2007). De igual manera, en linfocitos NK se regulan a la baja receptores activadores tales como NKp30, NKp44, NKp46 y NKG2D evitando su estimulación y limitando así la actividad antitumoral (Zhang et al, 2019).

Para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC) contra los KCs infectados, las células de Langerhans (LCs, *Langerhans cells*) deben iniciar y coordinar la respuesta inmunitaria. Las LCs son DCs especializadas de la epidermis, las oncoproteínas del VPHar suprimen la expresión de quimiocinas como CCL2, de CCL20 y CXCL14 de los KCs infectados, aunado a la reducción de los niveles de E-cadherina por parte de E7, limita la permanencia de LCs, DCs y otras células inmunes en el sitio de infección (Figura 6). Estudios in vitro han demostrado que E7 disminuye la expresión de CD40 y la secreción de IL-12 en LCs, además suprime la respuesta de LTC específica a TAA (Guess et al, 2005; Kleine-Lowinski et al, 2003; Le Boregne et al, 2006; Song et al, 2015; Zhang et al, 2018).

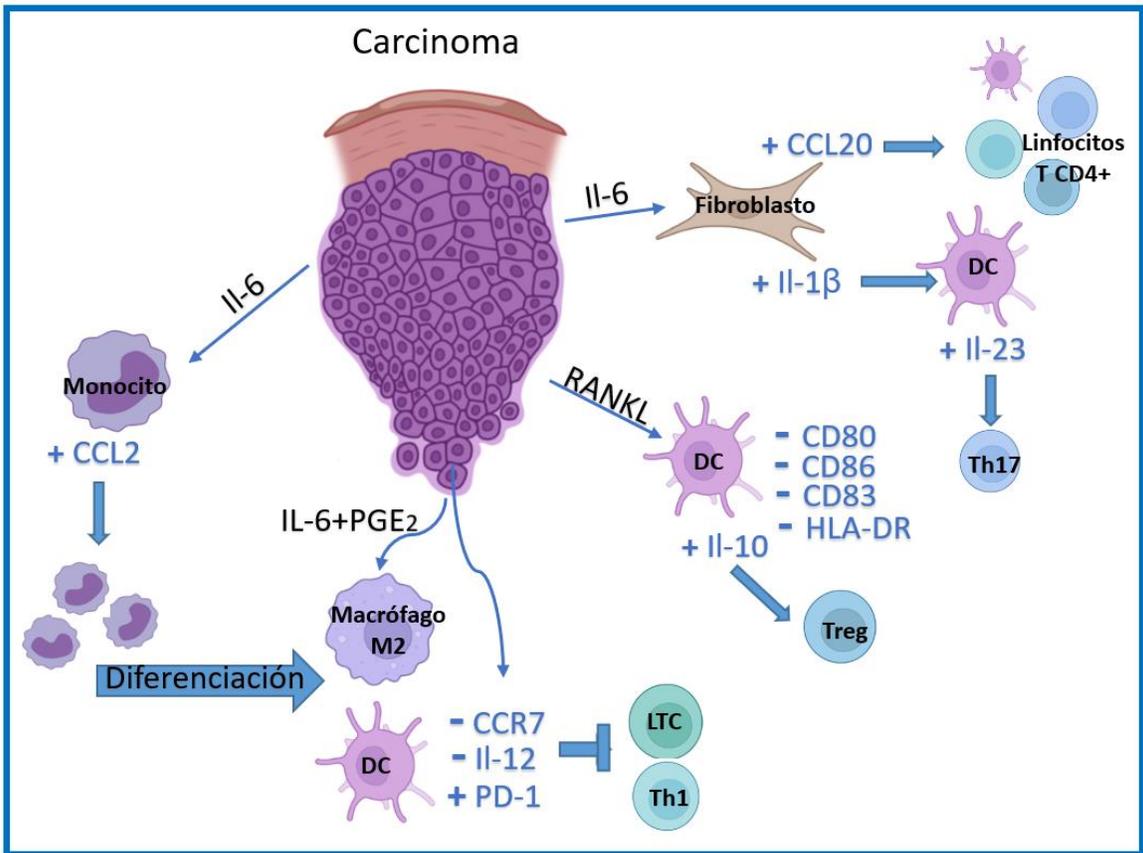
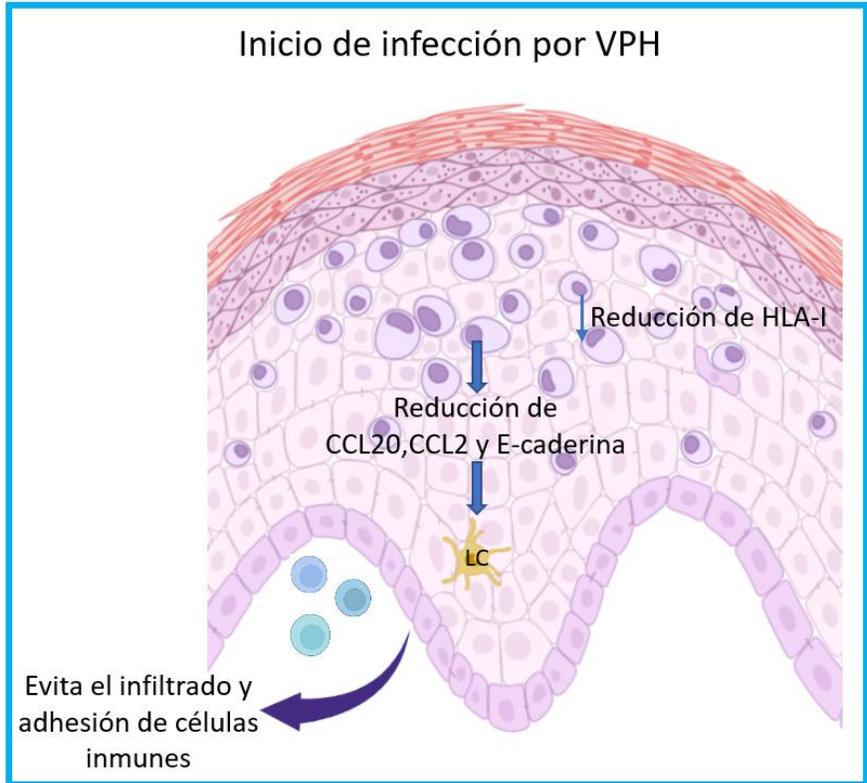


Figura 6. Papel de las DCs en el desarrollo de CaCu. Al principio de la infección por VPHar, los KCs reducen la expresión de CCL20, CCL2 y E-caderina, lo cual evita el infiltrado y adhesión de células inmunes, excluyendo a los LCs del infiltrado tumoral. Además las células tumorales reducen la expresión de HLA-I, con lo cual evaden el reconocimiento de LTC. En lesiones severas de carcinoma, existe una alta expresión de IL-6, por medio de ésta los monocitos son capaces de aumentar la secreción de CCL2, atrayendo a más monocitos. La IL-6 y PGE₂ de forma sinérgica actúan para diferenciar a los monocitos preferentemente a macrófagos M2. Aun así, las DCs se encuentran presentes en el infiltrado celular, pero tiene una baja expresión de CCR7 y una baja migración a órganos linfoides. Además, presentan una reducida secreción de IL-12 y una expresión incrementada de PD-1 evitando así la activación de LTC y Th1. RANKL induce una maduración incompleta en DCs, éstas presentan una alta secreción de IL-10 promoviendo a la generación de linfocitos Treg. La IL-6 también induce en los fibroblastos un perfil tolerogénico, aumenta la secreción de CCL20 e IL-1 β . CCL20 ayuda al reclutamiento de linfocitos T CD4+ y DCs. IL-1 β induce un aumento en la expresión de IL-23 en DCs, favoreciendo la proliferación de Th17 (Ashrafi et al, 2005; Campo et al, 2010; Demoulin et al, 2015; Estêvão et al, 2019; Guess et al, 2005; Heusinkveld et al, 2011; Kleine-Lowinski et al, 2003; Le Boregne et al, 2006; Pahne-Zeppenfeld et al, 2014; Schroer et al, 2011; Song et al, 2015; Walch-Rückheim et al, 2015; Walch-Rückheim et al, 2019; Wang et al, 2022; Zhang et al, 2018).

Adicionalmente, E5 y E7 son capaces de afectar el procesamiento y la presentación de antígenos: el producto genético temprano E7 se une al promotor del HLA-I, suprimiendo su transcripción; E5 limita la expresión de HLA-I y promueve su retención intracelular a través de interacciones con el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, reduciendo la susceptibilidad de KCs a la muerte mediada por LTC (Figura 6) (Ashrafi et al, 2005; Campo et al, 2010; Estêvão et al, 2019).

En etapas posteriores de la carcinogénesis cervical, se asocian con fuertes infiltrados inflamatorios en el estroma. Las células tumorales por medio de IL-6, activan el factor de transcripción STAT3 en monocitos, el cual conduce a una mayor producción de CCL2 atrayendo más monocitos. Estos monocitos también aumentan la producción de MMP-9 con lo cual se promueve la invasión de las células tumorales (Figura 6) (Schroer et al, 2011).

Las células tumorales de CaCu obstaculizan la diferenciación de DCs, induciendo preferentemente a macrófagos M2 que expresan PD-L1, esto a causa de PGE2 e IL-6 provenientes de células tumorales (Heusinkveld et al, 2011). Sin embargo, se ha confirmado la presencia de DCs positivas a CD83 en las biopsias de CaCu, aunque con una baja expresión de CCR7. A diferencia de CCR7, MMP-9 está potentemente expresada por DCs inmaduras y maduras presentes en el TME. Tanto la regulación de CCR7 como de MMP-9 están mediadas por IL-6 proveniente de células infectadas con VPH (Figura 6) (Pahne-Zeppenfeld et al, 2013).

Además, las DCs aumentan la expresión de PD-1 conforme al desarrollo del CaCu, dado que en estadios de más avanzados de la neoplasia hay mayor presencia de DCs positivas a PD-1 (Wang et al, 2022). Aunado a lo anterior las células tumorales de CaCu inducen una maduración incompleta a DCs al presentar una expresión reducida de CD80, CD86, CD83 y HLA-DR. Adicionalmente estas células presentan un perfil tolerogénico secretando IL-10 y reduciendo la secreción de IL-12, ello debido al ligando del receptor activador para Factor nuclear Kappa B (RANKL) producido por las células tumorales, ello conlleva a una disminución de la respuesta Th1, fomentando a los Treg (Figura 6) (Demoulin et al, 2015).

Los CAFs también participan en la evasión de la respuesta inmune en NIC de alto grado y en cánceres cervicales, los CAFs son capaces de producir CCL20 de manera dependiente a IL-6, lo que conlleva al reclutamiento principalmente de

linfocitos T CD4⁺ y DCs (Walch-Rückheim et al, 2015). Además, los CAFs inducen un aumento de IL-23 en mDCs, a través de IL-1 β inducida por IL-6; la IL-23 promueve la expansión de linfocitos Th17 (Figura 6) (Walch-Rückheim et al, 2019).

Los linfocitos Th17 exhiben propiedades inflamatorias y promotoras de tumores, este conjunto de células junto con los linfocitos Treg (FoxP3+) que son funcionalmente inmunosupresoras, aumentan en el infiltrado celular conforme se desarrolla el carcinoma (Hou et al, 2012; Lin et al, 2020; Zhang et al, 2011).

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. El escape inmunitario se asocia tanto con la regulación a la baja del sistema inmunitario a nivel local, aunque el desarrollo de la neoplasia con lleva inflamación, las células infectadas continúan evadiendo la vigilancia inmunológica por medio de un aumento de las células como macrófagos M2, Tregs y Th17, pérdida de la presentación de antígenos e incremento de moléculas de punto de control inmunitario. (Stanley y Sterling, 2014).

4. Células estromales mesenquimales en cáncer de cérvix

Nuestro grupo de investigación demostró la presencia de MSCs en tumores de pacientes con CaCu (CaCu-MSCs), las cuales cumplieron con los criterios mínimos de identificación (Anexo, figuras 16 y 17). Las CaCu-MSCs disminuyeron

la expresión de HLA-I en las células tumorales mediante el incremento en la expresión de IL-10, lo cual disminuyó el reconocimiento de linfocitos citotóxicos en contra de las células tumorales (Figura 7) (Montesinos et al, 2013). De igual manera, en otro estudio nuestro grupo demostró que las CaCu-MSCs inducen un aumento de expresión de TGF- β en células tumorales y dicha citocina también participa en la disminución del HLA-I y por tanto en la evasión de la citotoxicidad de los linfocitos CD8⁺ sobre células tumorales, favoreciendo un mecanismo de regulación autocrina en dichas células (Figura 7) (García-Rocha et al, 2015).

Por otra parte, se ha encontrado que las CaCu-MSCs tiene una mayor expresión de CD39 y CD73 que las CN-MSCs, estas moléculas producen adenosina a partir de ATP, adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP). La adenosina inhibe la proliferación y activación de linfocitos citotóxicos (T y NK), lo cual se observó en experimentos con el medio condicionado de CaCu-MSCs cultivadas con ATP y ADP, mismo que inhibió la proliferación de células CD8⁺ (Figura 7) (Mora-García et al, 2016). Además, las CaCu-MSCs inducen a un aumento de la expresión CD73 en células tumorales y con ello promueven la formación de un ambiente inmunosupresor rico en adenosina (Figura 7) (Ávila-Ibarra et al, 2019).

Estudios realizados por nuestro grupo evidenciaron que las CaCu-MSCs presentan la molécula secuencia A/B relacionada al MHC-I (MIC-A/B) y con la cual son propensas a ser lisadas por linfocitos NK. Sin embargo, algo interesante que observamos es que la expresión MIC-A/B disminuye al co-cultivarse con linfocitos

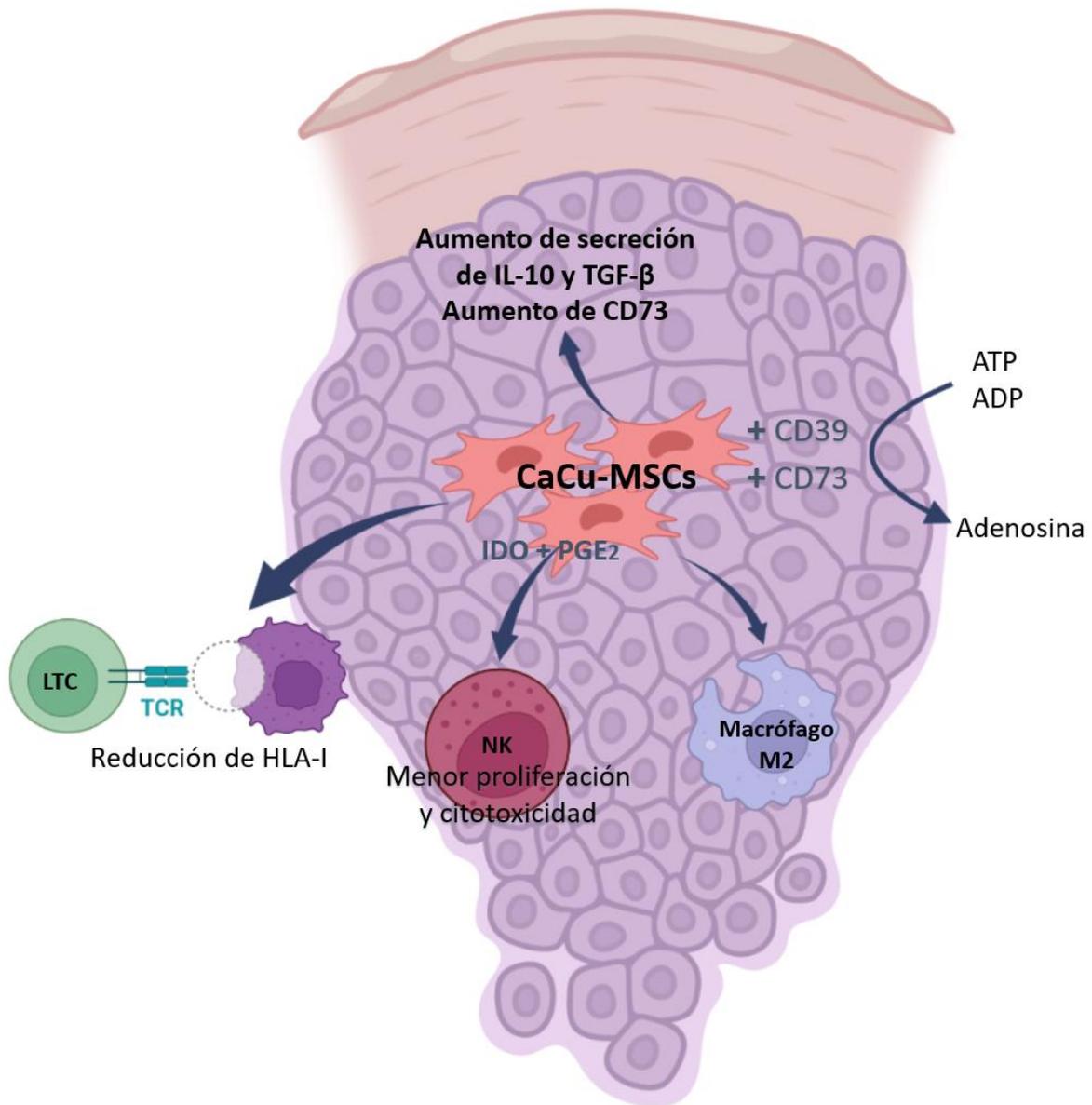


Figura 7. MSCs en CaCu. Las CaCu-MSCs reducen la expresión de HLA-I en células tumorales, ayudando a la evasión de los LTC. Además, ayudan a aumentar la secreción de las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β en células tumorales, también inducen un aumento de CD73. Las CaCu-MSCs tiene una expresión aumentada de CD39 y CD73, lo cual ayuda a la producción de adenosina, que inhibe a los linfocitos citotóxicos. Las CaCu-MSCs inducen un fenotipo M2 en macrófagos, y por medio de IDO y PGE₂, reducen la proliferación y citotoxicidad de linfocitos NK (Ávila-Ibarra et al, 2019; Cortes-Morales, 2023; García-Rocha et al, 2015; Montesinos et al, 2013; Mora-García et al, 2016; Serrato-López, 2019)

NK activados. Además, las CaCu-MSCs disminuyen de manera significativa la proliferación y capacidad citotóxica de las células NK por medio del incremento en la producción de IDO y PGE₂ (Figura 7) (Serrato-López, 2019). También las CaCu-MSCs favorecen el fenotipo M2 en macrófagos y estos presentan una capacidad aumentada de fagocitosis y para generar linfocitos Tregs (Figura 7) (Cortes-Morales, 2023).

Hay evidencia de la participación de las MSCs para regular la respuesta de diferentes componentes del sistema inmune en contra del tumor, a la fecha no se conoce la capacidad inmunosupresora de las CaCu-MSCs sobre las DCs, las cuales en el contexto de respuesta y amplificación de la respuesta inmune antitumoral, representan componentes celulares importantes para mediar una respuesta inmune adquirida específica en dicho contexto.

Planteamiento del problema

El cáncer de cérvix sigue siendo un importante problema de salud pública que afecta a las mujeres de mediana edad, especialmente en los países con menos recursos, a pesar de los métodos de prevención existentes como la vacunación y detección oportuna de VPH. En el 2020 se estimaron 9,439 casos nuevos de CaCu y 4,335 muertes por CaCu tan solo en México, siendo el segundo cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina mexicana (GLOBOCAN, 2020).

Nuestro grupo ha demostrado la presencia de MSCs en el cérvix de pacientes con CaCu y que estas células disminuyen la actividad citotóxica de los linfocitos CD8⁺ en contra de las células tumorales a través de la disminución de la expresión de HLA clase I en las mismas (Montesinos et al, 2013). Además, detectamos disminución de la actividad antitumoral de las células NK, a través de aumentar la producción de IDO y PGE2 (Serrato-López, 2019), y determinamos que las CaCu-MSCs tienen la capacidad de inducir un fenotipo M2 antiinflamatorio en macrófagos (Cortes-Morales, 2023). No obstante estos resultados, a la fecha no se conoce cuál es la capacidad inmunosupresora de las CaCu-MSCs sobre las DCs, las cuales desempeñan un papel importante en conectar la respuesta inmune innata con la adaptativa, pudiendo producir una respuesta inmune inflamatoria o inducir a la inmunotolerancia, por lo cual estas células son cruciales para mediar la inmunidad antitumoral (Wang et al, 2020).

Con la idea de profundizar en los mecanismos biológicos en los que se involucran las CaCu-MSCs para favorecer el desarrollo tumoral, en este trabajo evaluamos la capacidad de las CaCu-MSCs para disminuir la diferenciación y maduración de las DCs, las cuales son elementos importantes que participan en la activación de la respuesta inmune en contra de las células tumorales.

Hipótesis

Las MSCs provenientes de CaCu, a diferencia de las MSCs de cérvix normal, inhibirán la diferenciación y maduración de las células dendríticas y debido a ello disminuirán su capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T, fagocitosis y generación de linfocitos Tregs.

Objetivos

Objetivo general

Evidenciar la capacidad inmunosupresora de las MSCs provenientes de cáncer cervicouterino sobre las células dendríticas.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de las CaCu-MSCs sobre la diferenciación y maduración de las células dendríticas mediante la expresión de marcadores inmunofenotípicos.
- Evaluar el efecto de las CaCu-MSCs sobre la capacidad de las células dendríticas para fagocitar, inducir la proliferación de linfocitos T y la generación de linfocitos Tregs.

Metodología

1. Obtención de células estromales mesenquimales

Para el proyecto se usaron MSCs de MO de individuos sanos (MO-MSCs), de cérvix normal (CN-MSCs) y de carcinoma epidermoide de cérvix (CaCu-MSCs). Todas las MSCs provenientes de las fuentes a evaluar se obtuvieron mediante consentimiento informado incluido en el protocolo con número de registro R-2011-3602-24, aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Salud del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS y se tienen crio-preservadas. Previo a su crio-preservación, las MSCs fueron caracterizadas mediante determinación de su inmunofenotipo y capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica, tal como nuestro grupo de investigación ha publicado previamente (Anexo) (Montesinos et al, 2013).

Brevemente, para determinar el inmunofenotipo, se analizó la expresión de moléculas de superficie mediante citometría de flujo. Las células fueron positivas a CD105, CD90, CD73, HLA-I y CD13; y negativas a HLA-DR, CD45, CD14, CD34 y CD31 (Anexo, figura 17). Para determinar su capacidad de diferenciación, se cultivaron en presencia de medio osteogénico, condrogénico o adipogénico, durante tres semanas. Después de ese 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) (Anexo, figura 16) (Montesinos et al, 2013).

Las MO-MSCs se obtuvieron de muestras de 5 ml de MO, de donadores adultos hematológicamente sanos (n=5) 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 sembradas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco bajo en glucosa (DMEM-Ig) (Gibco, California, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, California, USA), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycinina 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.

Las muestras de CN se obtuvieron de donadoras sin lesiones ni cáncer de cérvix que fueron sometidas a histerectomías (n=3) y las muestras de CaCu de biopsias de pacientes en estadios IIB, IIIA y IIIB (escala FIGO, 2012) (n=5) 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, California, USA) y mecánica, después se sembraron las células en medio DMEM-Ig suplementado al 10% SFB (Gibco, California, USA), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycinina y 2 mM de L-glutamina. Se obtuvieron las células adherentes y se caracterizaron como se describe anteriormente.

2. Obtención de monocitos

Para obtener monocitos, se utilizaron PBMC separadas por gradiente de densidad (Lymphoprep, Stem Cell Technologies), de donadores sanos. Posteriormente se obtuvieron las células CD14+ por selección positiva utilizando perlas CD14+ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se evaluó el porcentaje de células CD14+ obtenidas mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD14/BV510 (Biolegend, San Diego, California, USA). Se obtuvieron el 91.7±4.5% de células positivas.

3. Inducción de diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras

Para la diferenciación de monocitos a DCs se utilizaron co-cultivos de MSCs de los diferentes estromas y células CD14+. Se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, New York, USA). Se colocaron 20,000 MSCs por pozo, con DMEM-Ig (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado al 10% con SFB (Biowest, Nuaille, Francia) y con penicilina, estreptomina y L-glutamina en las concentraciones antes descritas. A las 24 h en cuanto las células formaron monocapa, se retiró el medio y se adicionó medio de co-cultivo, el cual consistió de 50% DMEM-Ig (Biowest, Nuaille, Francia) y 50% RPMI (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado al 10% con SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Sobre la monocapa se sembraron 100,000 células CD14+ por pozo provenientes de sangre periférica y se estimularon con 50ng/ml de GM-CSF (Peprotech) y 50ng/ml de IL-4 (Peprotech) durante 4 días.

Después de este tiempo, se evaluó la diferenciación y expresión de moléculas co-activadoras, para lo cual se utilizaron los anticuerpos anti-CD14/BV510 (BioLegend, San Diego, California, USA), anti-CD11b/BV421 (BD Biosciences), anti-CD11c/BB515 (BD Biosciences), anti-CD80/PE (BD Biosciences), anti-CD86/APC (BD Biosciences), anti-CD83/PE-Cy5 (BD Biosciences), anti-HLA-DR/PE-Cy7 (BioLegend, San Diego, California, USA) y Ghost Dyes/APC-Cy7 (BD Biosciences) para medir viabilidad. Se realizó su lectura en el citómetro FACS-Canto II (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El análisis se realizó con el programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregón USA)

4. Inducción de maduración desde monocitos a células dendríticas maduras

Las células CD14+ se colocaron en co-cultivo con MSCs en proporción 1:5 (MSCs-CD14), estimuladas con GM-CSF (Peprotech) e IL-4 (Peprotech) en medio con 50% DMEM-Ig y 50% RPMI suplementado al 10% con SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina por cuatro días. Posteriormente se agregaron 20 ng/ml de LPS y se mantuvo el cultivo por tres días más. Las células se tiñeron con los marcadores anti-CD14/BV510 (BioLegend, San Diego, California, USA), anti-CD11b/BV421 (BD Biosciences), anti-CD11c/BB515 (BD Biosciences), anti-CD80/PE (BD Biosciences), anti-CD86/APC (BD Biosciences), anti-CD83/PE-Cy5 (BD Biosciences), anti-HLA-DR/PE-Cy7 (BioLegend, San Diego, California, USA) y Ghost Dyes/APC-Cy7 (BD Biosciences) para medir viabilidad. Se realizó su lectura en el citómetro FACS-

Canto II (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El análisis se realizó con el programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregón USA).

5. Fagocitosis

Se usaron iDCs provenientes de los co-cultivos con MSCs. En una placa de 96 pozos (Corning, New York, USA), se colocaron 20,000 MSCs por pozo sobre una membrana permeable con un poro de 0.4 μm (Transwell) (Corning, New York, USA). Después de 24 h se agregaron 100,000 células CD14+ en cada pozo estimuladas con GM-CSF e IL-4 y se dejaron en co-cultivos por 4 días. Se retiró la membrana permeable y se agregaron biopartículas conjugadas para fagocitosis pHrodo Green E. Coli (Thermo Fisher). Las biopartículas se dejaron incubando a 37° con 5% CO₂ por 45 min. Las células se lavaron con solución salina y se realizó su lectura en el citómetro FACS-Canto II (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El análisis se realizó con el programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregón USA)

5. Generación de linfocitos T-reguladores

Se utilizó una placa de 96 pozos (Corning) en donde se colocaron 20,000 MSCs por pozo sobre una membrana permeable con un poro de 0.4 μm (Transwell Corning). Después de 24 h se agregaron 100,000 células CD14+ en cada pozo estimuladas con GM-CSF e IL-4, al cuarto día de cultivo se agregó LPS, se mantuvo el cultivo por tres días más. Trascurrido ese tiempo se retiró la membrana permeable y se colocaron células enriquecidas con perlas CD4+ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) obtenidas de PBMC de individuos

sanos a una concentración de 100,000 células por pozo que se estimularon con perlas de anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). El cultivo se mantuvo por tres días. Posteriormente, la fracción celular no adherente fue teñida con los respectivos anticuerpos para los marcadores CD4/FITC (BD Biosciences), CD25/PE (BD Biosciences), FoxP3/PE-Cy7 (Thermo Fisher) y GhostDye/APC-Cy7 (BD Biosciences). Se realizó la lectura de los marcadores en el citómetro FACS CANTO II BD (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Con ayuda del programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregón USA) se evaluó la generación de linfocitos T con fenotipo CD4+CD25+Foxp3+.

6. Proliferación de linfocitos T

Para medir la proliferación de linfocitos T se utilizó un sistema de co-cultivo sin contacto. Se utilizó una placa de 96 pozos (Corning, New York, USA), en donde se colocaron 20,000 MSCs por pozo sobre una membrana permeable con un poro de 0.4 μm (Transwell) (Corning, New York, USA). Después de 24 h se agregaron 100,000 células CD14+ en cada pozo estimuladas con GM-CSF e IL-4, al cuarto día de cultivo se agregó LPS y se mantuvo por tres días adicionales. Posteriormente, se retiró la membrana permeable con MSCs y se agregaron linfocitos T en una proporción 1:1 (iDCs:T).

Los linfocitos T, se aislaron de PBMC de individuos sanos por selección positiva de perlas CD3+ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Los linfocitos T se tiñeron con Succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) a una concentración de 5 μM y se

agregaron a una densidad de 100,000 células en los pozos con presencia de DCs. Se adicionaron al co-cultivo perlas de activación cubiertas con anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 (Milteyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y se mantuvieron en cultivo por 3 días. Se colectó la fracción celular no adherente y se tiñó con el anticuerpo anti-CD3/PE (BD Biosciences) y 7-aminoactinomicina D (7AAD) (BD Biosciences) para medir viabilidad. Se detectó la incorporación de CFSE en las poblaciones de linfocitos T CD3+ mediante citometría de flujo.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 9, mediante ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey, tomando como nivel de significancia los valores menores a 0.05.

Resultados

1. Las células estromales mesenquimales disminuyeron la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas inmaduras.

Al medir el efecto de las MSCs sobre la diferenciación de DCs, se utilizaron células CD14⁺ a las cuales se indujo la diferenciación a iDCs en presencia de MSCs durante 4 días. Como control se usaron células CD14⁺ diferenciadas (iDC). Se evaluaron los marcadores CD14, CD11b, CD11c, HLA-DR, CD80 y CD86. Para nuestros resultados se tomó en cuenta el porcentaje de células positivas para cada marcador y la expresión de las moléculas en las membranas celulares por medio de la Intensidad media de fluorescencia (MFI, *Mean fluorescence intensity*)

Encontramos que el marcador CD14, un marcador presente en monocitos y ausente en iDCs, efectivamente había un bajo porcentaje en iDCs ($6.7 \pm 5.3\%$) de células que lo expresaron, el porcentaje de células CD14⁺ en los co-cultivos en contacto con MSCs de las tres fuentes fue significativamente mayor (MO-MSCs: $79.4 \pm 19.3\%$, CN-MSCs: $76.6 \pm 15.7\%$ y CaCu-MSCs: $56.7 \pm 19.4\%$), al igual que la MFI (iDCs MFI: 789 ± 601 , MO-MSCs MFI: 2960 ± 1624 , CN-MSCs MFI: 3660 ± 1010 y CaCu-MSCs MFI: 2563 ± 504) (Figura 8 a, b y c).

La media de CD11b fue de más del 75% en todas las condiciones (iDCs: $96.9 \pm 1.64\%$, MO-MSCs: $77.5 \pm 20.8\%$, CN-MSCs: $75.4 \pm 17.2\%$ y CaCu-MSCs: $79.5 \pm 14.4\%$). Sin embargo, la MFI en presencia de MSCs de las diferentes fuentes

evaluadas (MO-MSCs MFI:1077±699, CN-MSCs MFI: 1086±683 y CaCu-MSCs MFI: 1086±239) fue significativamente menor que la MFI del control (iDCs MFI: 2271±355) (Figura 8 a, b y c).

Así mismo, para el marcador CD11c la media fue de más del 90% en todos los cultivos (iDCs: 98.7±1.094%, MO-MSCs: 92.1±9.29%, CN-MSCs: 92.6±7.09% y CaCu-MSCs: 91±9.62%). Sin embargo, la MFI de los cultivos con MSCs de las diferentes fuentes evaluadas (MO-MSCs MFI: 11460±7218, CN-MSCs MFI: 12422±7817 y CaCu-MSCs MFI: 16605±7693) fue significativamente menor respecto al control (iDCs MFI: 30521±10043) (Figura 8 a, b y c).

En la expresión de HLA-DR, no hubo cambios significativos en ninguna de las condiciones (iDCs: 91.7±8.4% MFI: 1501±770, MO-MSCs: 70.4±24.8% MFI: 1482±1040, CN-MSCs: 57.6±21.6% MFI: 800±530 y CaCu-MSCs: 71±15.9% MFI: 1224±825) (Figura 9 a, b y c).

De la misma forma la molécula co-estimuladora CD80 no se encontraron cambios significativos en ninguna de las condiciones (iDCs: 28.5±10.4% MFI: 786±120, MO-MSCs: 47.8±34.7% MFI: 918±469, CN-MSCs: 34.3±23.4% MFI: 691±256 y CaCu-MSCs: 41.7±25.7% MFI: 770±228) (Figura 9 a, b y c).

En cambio, CD86 en los cultivos con MSCs de las tres fuentes disminuyó significativamente el porcentaje de células positivas (MO-MSCs: 41.7±11.9%, CN-MSCs: 11.6±8.5% y CaCu-MSCs: 16±9.4%) y de la MFI (MO-MSCs MFI: 383±218, CN-MSCs MFI: 105±56.2 y CaCu-MSCs MFI: 154±120) en comparación con el

control de iDCs ($63.7 \pm 24.7\%$, MFI: 954 ± 489) (Figura 9 a, b y c). Estos resultados nos indican que la presencia de MSCs de las tres fuentes disminuyen la diferenciación de los monocitos CD14+ hacia iDCs.

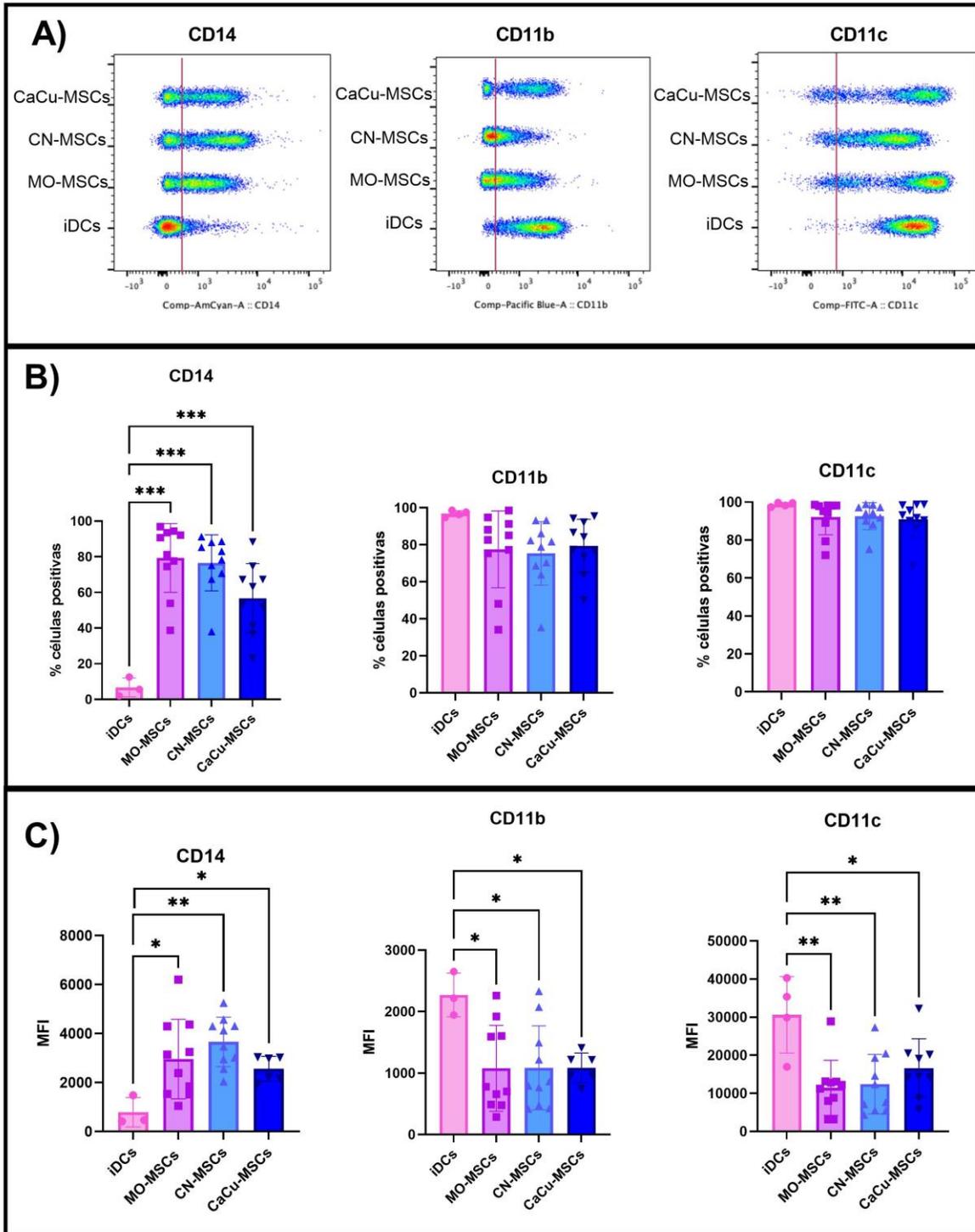


Figura 8. Marcadores CD14, CD11b y CD11c en ensayo de diferenciación a) Gráficas de puntos representativas de la fluorescencia de CD14, CD11b y CD11c. b) Gráficas de porcentaje de células positivas a marcadores de linaje mieloide. c) Gráficas de la MFI correspondiente a cada marcador. Las gráficas muestran la media \pm SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$.

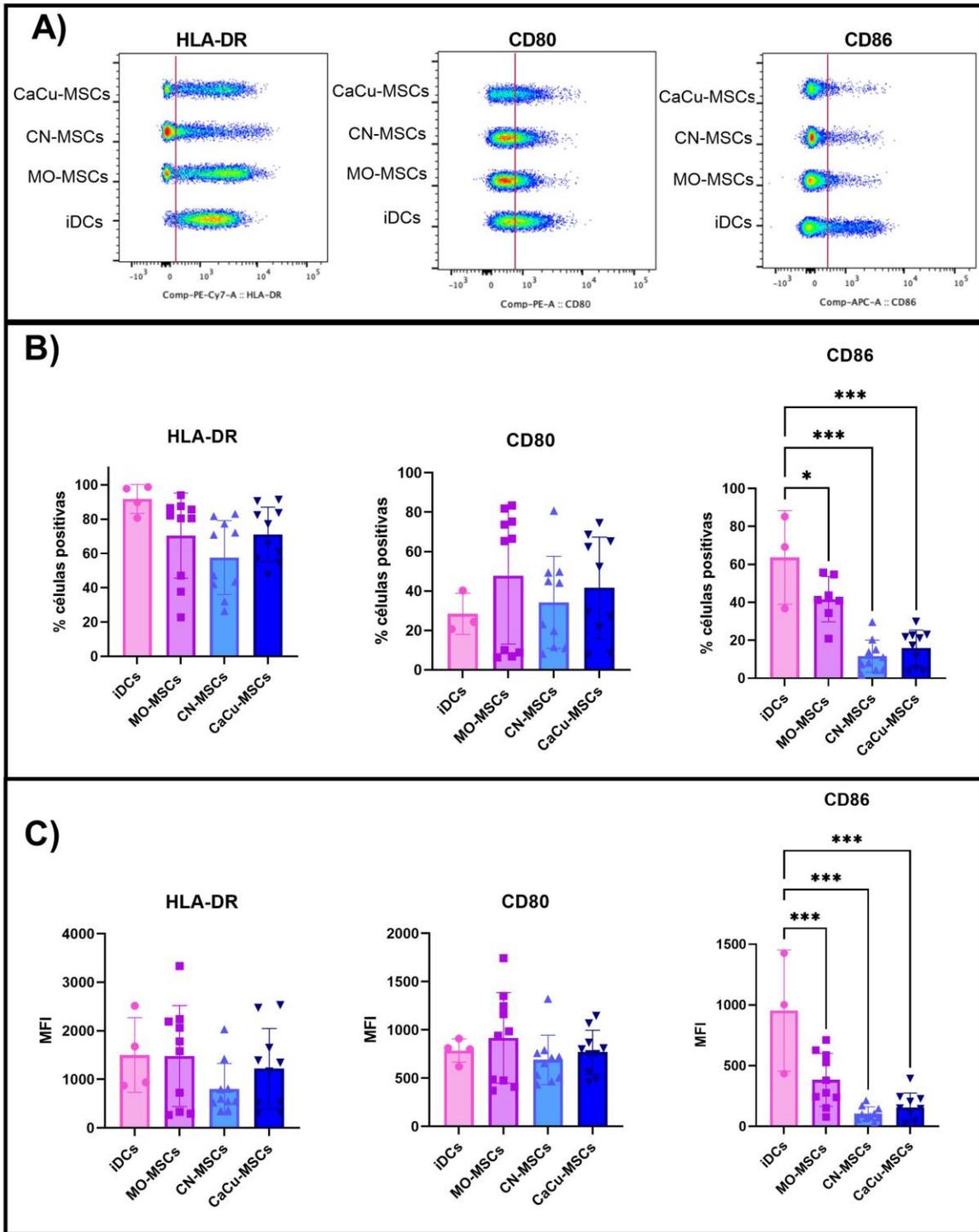


Figura 9. Cuantificación de HLA-DR y moléculas co-estimuladoras en ensayo de diferenciación. a) Gráficas de puntos representativas de la fluorescencia de moléculas co-estimuladoras y HLA-DR. b) Gráficas de porcentaje de células positivas a HLA-DR, CD80 y CD86. c) Gráficas de la MFI correspondiente a cada marcador. Las gráficas muestran la media±SD; *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005.

2. Las células estromales mesenquimales disminuyeron la maduración de las células dendríticas.

Para evaluar si las MSCs de las tres fuentes afectan la maduración de la DCs se usaron células CD14⁺ en co-cultivos con MSCs, a las cuales, se indujo la diferenciación y maduración. Como control se usaron DCs maduras (mDCs). Se evaluaron los marcadores CD14, CD11b, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86 y CD83. Se analizó el porcentaje de células positivas para cada marcador y la expresión de las moléculas en las membranas celulares por medio de la MFI.

Al inducir maduración se encontró un mayor porcentaje de células de CD14⁺ en los co-cultivos en presencia de las MSCs de las tres fuentes (MO-MSCs: 78.2±13.3%, CN-MSCs: 71.8±16.7% y CaCu-MSCs: 73.5±13.1%), ello comparado con el control de mDCs (40±27%). En los valores de MFI también se observa un aumento significativo en los co-cultivos en presencia de las MSCs de las tres fuentes (MO-MSCs MFI: 4034±958, CN-MSCs MFI: 4701±1125 y CaCu-MSCs MFI: 3939±906) en comparación con el control (mDCs MFI: 2202±332) (Figura 10 a, b y c).

En estos resultados no observamos cambios significativos en los valores en el porcentaje de células positivas e MFI para el marcador CD11b en los co-cultivos de las tres fuentes (MO-MSCs: 71.6±25.9%, MFI: 917±573, CN-MSCs: 70.9±19.1%, MFI: 1051±764 y CaCu-MSCs: 81.5±10.3%, MFI: 1312±502) en

comparación con el control (mDCs: $93.2 \pm 2.5\%$, MFI: 1101 ± 201) (Figura 10 a, b y c).

Al igual que en los ensayos anteriores de diferenciación, observamos en los valores de MFI para la expresión del marcador CD11c, una disminución significativa en las DCs inducidas a maduración en presencia de las MSCs de las tres fuentes (MO-MSCs MFI: 8700 ± 5999 , CN-MSCs MFI: 10181 ± 6396 y CaCu-MSCs MFI: 16996 ± 6133) en comparación con el control de mDCs (MFI: 41403 ± 18099), en cuanto al porcentaje de células positivas no hubo diferencias significativas (mDCs: $98.2 \pm 1.2\%$, MO-MSCs: $79.2 \pm 18.3\%$, CN-MSCs: $82.8 \pm 12.6\%$ y CaCu-MSCs: $89.7 \pm 4.73\%$) (Figura 10 a, b y c).

No observamos diferencias significativas en los porcentajes de células positivas y en los valores de MFI de HLA-DR en las DCs en presencia de las MSCs (MO-MSCs: $70.8 \pm 21.6\%$, MFI: 1610 ± 1094 , CN-MSCs: $63.1 \pm 26.9\%$, MFI: 841 ± 505 y CaCu-MSCs: $85.4 \pm 7.76\%$ MFI: 1646 ± 697) en comparación con el control (mDCs: $93.3 \pm 5\%$, MFI: 974 ± 91.1) (Figura 11 a, b y c).

Respecto a CD80, CD86 y CD83, la expresión de los tres marcadores en las DCs disminuyó en presencia de las MSCs de las tres fuentes. Así, observamos una disminución significativa en el porcentaje de células positivas para CD80 en los co-cultivos con MO-MSCs ($65.8 \pm 14.8\%$) CN-MSCs ($53.3 \pm 16.5\%$) y CaCu-MSCs ($69.7 \pm 7.75\%$) en comparación con el control de mDCs ($91.4 \pm 6.65\%$). De igual manera, los valores de MFI de la expresión de CD80 en los co-cultivos con

las diferentes MSCs, disminuyó significativamente (MO-MSCs MFI: 1628 ± 885 , CN-MSCs MFI: 1376 ± 582 y CaCu-MSCs MFI: 2608 ± 552) en comparación con mDCs (MFI: 6730 ± 6730) (Figura 11 a, b y c).

De la misma forma observamos una disminución significativa en el porcentaje de células positivas para CD86 en los co-cultivos con MO-MSCs ($43.8 \pm 23.3\%$), CN-MSCs ($29.3 \pm 21.6\%$) y CaCu-MSCs ($52.8 \pm 18.8\%$), en comparación con el control de mDCs ($89.4 \pm 7.3\%$). Así mismo, también observamos una disminución significativa en los valores de MFI para este marcador en presencia de las diferentes MSCs (MO-MSC MFI: 423 ± 257 , CN-MSC MFI: 238 ± 167 y CaCu-MSC MFI: 667 ± 285) en comparación con mDCs (MFI: 1994 ± 867) (Figura 11 a, b y c).

Para la expresión de CD83, observamos un comportamiento similar en el porcentaje de células positivas (MO-MSCs: $21.7 \pm 13.5\%$, CN-MSCs: $24.1 \pm 15.9\%$ y CaCu-MSCs: $24.8 \pm 11.1\%$) y en los valores de MFI (MO-MSCs MFI: 163 ± 66.6 , CN-MSCs MFI: 189 ± 77.4 y CaCu-MSCs MFI: 216 ± 76.6) con respecto al control (mDCs: $62.8 \pm 30.2\%$ y la MFI: 944 ± 683) (Figura 11 a, b y c). Estos resultados nos indican que las DCs disminuyen su maduración en presencia de las MSCs de las tres fuentes.

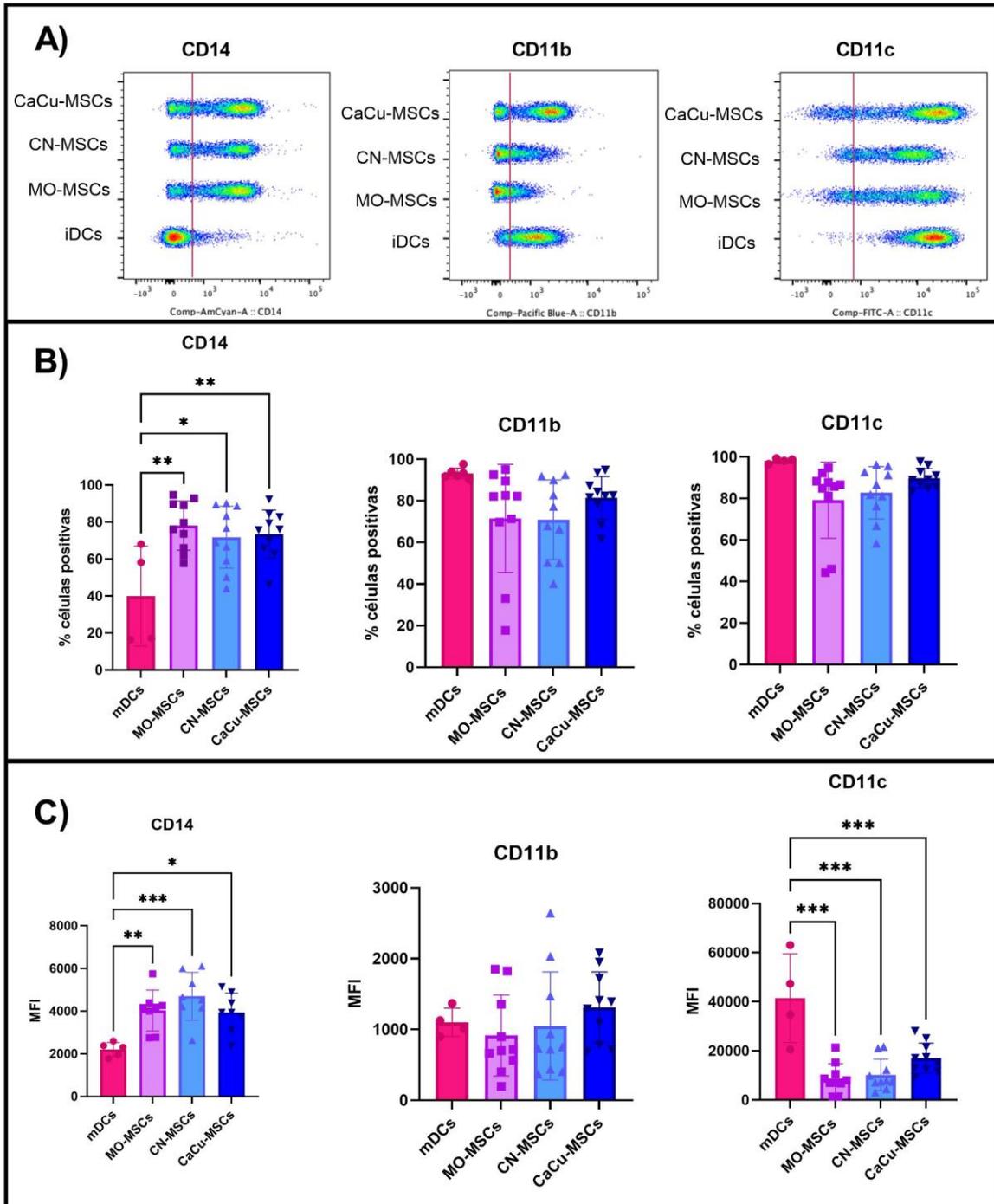


Figura 10. Marcadores CD14 y CD11b/c en ensayo de maduración. a) Gráficas de puntos representativas de la fluorescencia de CD11b, CD11c y CD14. b) Gráficas de porcentaje de células positivas marcadores de linaje mielóide en ensayo de maduración. c) Gráficas de la MFI correspondiente a cada marcador. Las gráficas muestran la media \pm SD; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$.

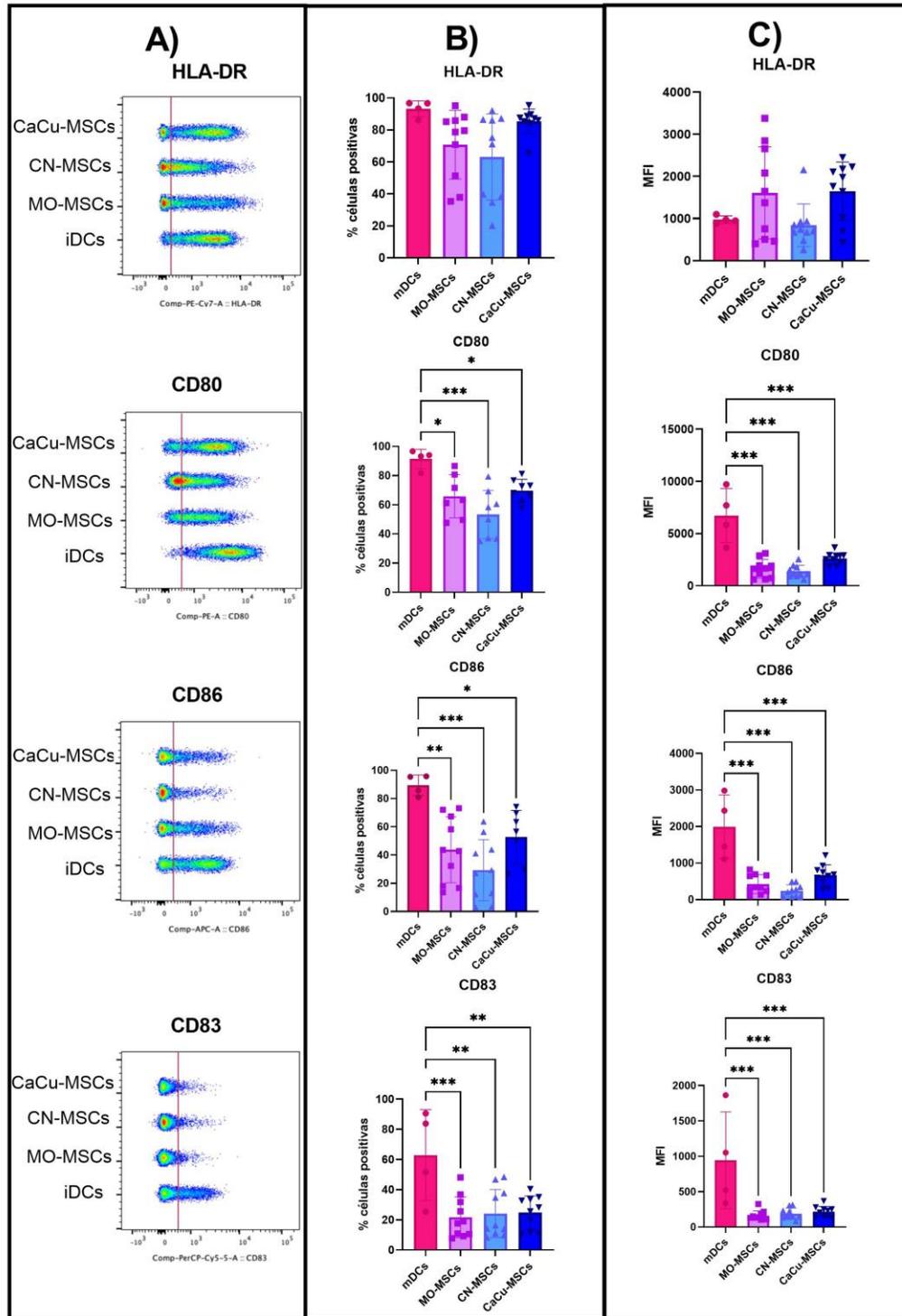


Figura 11. Moléculas HLA-DR y CD80, CD86, CD83 en ensayo de maduración. a) Gráficas de puntos representativas de la fluorescencia correspondiente a cada marcador. b) Gráficas de porcentaje de células positivas a moléculas co-estimuladoras, CD83 y HLA-DR en ensayo de maduración. c) Gráficas de la MFI a CD80, CD86, CD83 y HLA-DR. Las gráficas muestran la media±SD; *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005.

3. Las células estromales mesenquimales favorecieron la capacidad fagocítica de las células dendríticas inmaduras.

Para evaluar fagocitosis se usaron células CD14+ inducidas a diferenciación de iDCs en presencia de las MSCs. Como control se usan células CD14+ inducidas a diferenciación en ausencia de MSCs (iDCs). Posterior al cultivo se agregaron biopartículas conjugadas para fagocitosis.

En nuestros resultados se observa que el $84.1 \pm 10.7\%$ la iDCs fagocitaron las biopartículas. De manera interesante, observamos un incremento significativo en el porcentaje de células fagocíticas en los cultivos en presencia de las tres fuentes de MSCs (MO-MSCs: $92.8 \pm 4\%$, CN-MSCs: $94.1 \pm 4\%$ y CaCu-MSCs: $94.7 \pm 4.1\%$) (Figura 12 a y b). Estos resultados nos indican que en presencia de las MSCs de las tres fuentes las iDCs aumentan su capacidad de fagocitosis.

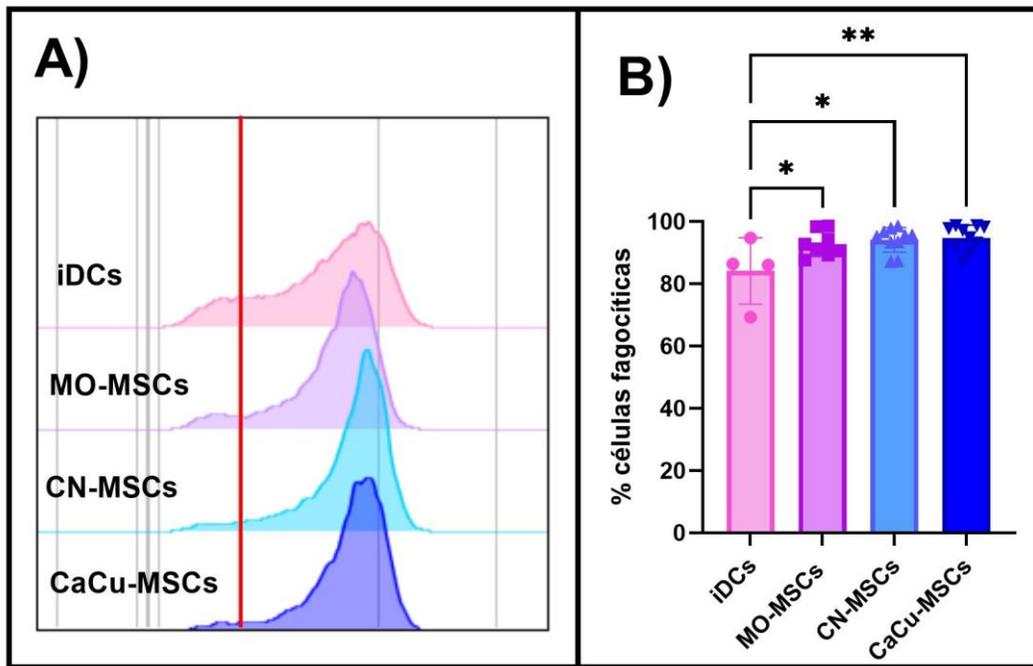


Figura 12. Ensayo de fagocitosis. a) Histogramas representativos de ensayo de fagocitosis. **b)** Gráficas de porcentaje de células fagocíticas. Las gráficas muestran la media±SD; *P<0.05, **P<0.005.

4. Las células estromales mesenquimales incrementaron la capacidad de las células dendríticas para generar linfocitos T-reguladores.

Para evaluar el incremento de Tregs se usaron células CD14+ inducidas a diferenciación de iDCs en presencia de las MSCs. Posterior se retiraron las MSCs y se adicionaron linfocitos CD4+. Como control se usó la proliferación de linfocitos T en contacto con iDCs que se diferenciaron en ausencia de MSCs. Se evaluó la generación de linfocitos T con fenotipo regulador CD4+CD25+FoxP3+.

Observamos que las iDCs en ausencia de co-cultivo con MSCs generaron un $6\pm 2.6\%$ de linfocitos con inmunofenotipo CD4+CD25+Foxp3+. En dichos co-cultivos el valor de MFI de FoxP3 en células CD4+, CD25+ y FoxP3+ fue de 1520 ± 65.8 , mientras que las iDCs que estuvieron en presencia de las MSCs de las tres fuentes, aumentaron significativamente el porcentaje de células Tregs (MO-MSCs: $12.1\pm 1\%$, CN-MSCs: $14.2\pm 1.3\%$ y CaCu-MSCs: $19.1\pm 1.5\%$) y los valores de la MFI (MO-MSCs MFI: 1736 ± 48.4 , CN-MSCs MFI: 1701 ± 55 y CaCu-MSCs MFI: 1788 ± 58.5) (Figura 13 a, b y c). Estos resultados nos indican que las iDCs después de estar en co-cultivo con MSCs de las tres fuentes presentan mayor capacidad de generar Tregs en comparación con las iDCs diferenciadas sin MSCs.

Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+)

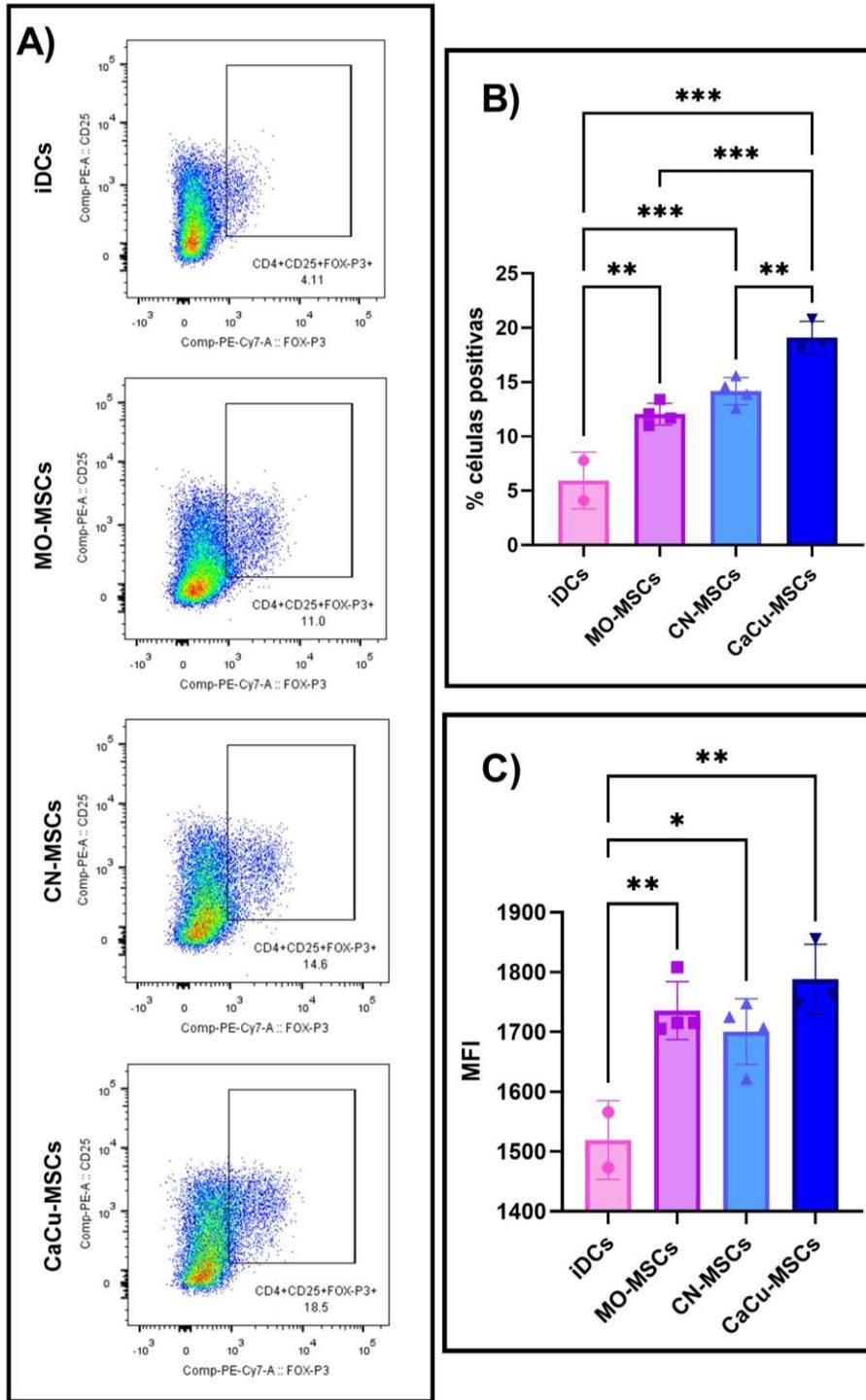


Figura 13. Linfocitos Treg generados con DCs proveniente de cultivos con MSCs.
a) Gráficas de puntos representativas de linfocitos Treg. **b)** Gráficas de porcentajes de células positivas a CD4, CD25 y FoxP3. **c)** Gráficas de la MFI de FoxP3 en células CD4+, CD25+ y FoxP3+. Las gráficas muestran la media±SD; *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005.

5. Las células estromales mesenquimales disminuyeron la capacidad de las células dendríticas maduras para inducir proliferación de linfocitos T.

Para medir la proliferación de los linfocitos T se usaron mDCs inducidas a diferenciación y maduración en presencia de las MSCs. Después se retiraron las MSCs y se colocaron linfocitos CD3+ teñidos con CFSE. Como control se usó la proliferación de linfocitos T CD3+ estimulados con perlas CD3/CD28/CD2, el porcentaje de proliferación del control fue tomado como el 100%.

Se observó que en presencia de mDCs que no tuvieron contacto con ninguna fuente de MSCs el porcentaje de proliferación de linfocitos T aumento a un $131 \pm 10.5\%$. El porcentaje de proliferación de linfocitos T en contacto con las DCs previamente cultivadas con MSC, disminuyó significativamente (MO-MSCs: $43.3 \pm 12.1\%$, CN-MSCs: $72.1 \pm 5.1\%$ y CaCu-MSCs: $85.3 \pm 6\%$) respecto a las mDCs (Figura 14 a y b). Estos resultados nos indican que las MSCs disminuyen la capacidad de las mDCs para inducir la proliferación de linfocitos T CD3+.

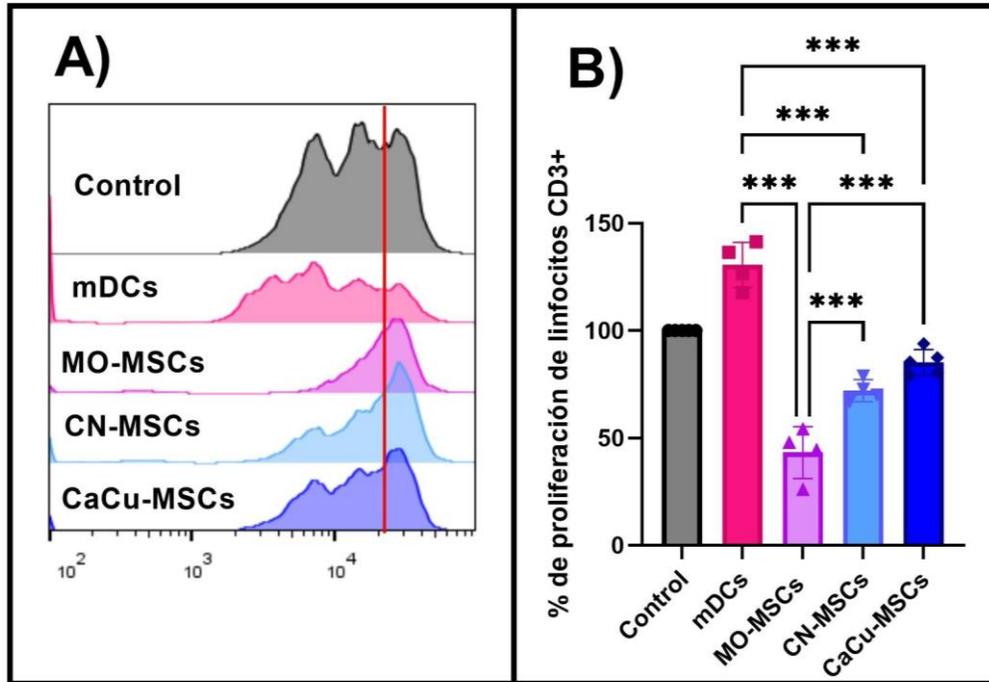


Figura 14. Proliferación de linfocitos T (CD3+). a) Histogramas representativos de la proliferación de linfocitos T en co-cultivos con DCs. b) Media normalizada de porcentaje de proliferación de linfocitos T con perlas CD3/CD28/CD2; como control se usaron linfocitos T (CD3+) activados con perlas en ausencia de DCs, su porcentaje de proliferación se tomó como el 100%. La proliferación de linfocitos T disminuyó significativamente en co-cultivos con DCs que provenían de cultivos con MO-MSCs, CN-MSCs y CaCu-MSCs respecto a las mDCs que no estuvieron en contacto con ninguna fuente de MSCs. Las gráficas muestran la media±SD; ***P<0.0005.

Discusión

En 2018, dada la carga global sustancial del cáncer cervicouterino, la Organización Mundial de la Salud hizo un llamado a la acción global para eliminar el CaCu (Sung et al, 2020). Pese a los métodos de prevención existentes, en México sigue siendo el segundo cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina mexicana (GLOBOCAN, 2020). Un mejor entendimiento de los procesos celulares y moleculares implicados en la progresión del CaCu podría impulsar el establecimiento de diagnósticos más precisos y al desarrollo de nuevos enfoques de tratamiento.

Las MSCs en cáncer tienen un perfil biológico que ayudan a promover la carcinogénesis (Coffman et al 2018). Nuestro equipo de trabajo ha demostrado que las MSCs provenientes de CaCu ayudan a evadir la actividad de LTC a través de la reducción de la expresión de HLA-I en células tumorales (Montesinos et al, 2013), además disminuyen la proliferación y citotoxicidad de linfocitos NK (Serrato-López, 2019) y polarizan a los macrófagos hacia un fenotipo M2 (Cortes-Morales et al, 2023). Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito el efecto de estas MSCs sobre las DCs, las cuales son de suma importancia para desarrollar una adecuada respuesta de LTC específica contra antígenos tumorales.

Se ha evidenciado que las MO-MSCs pueden inhibir la diferenciación de monocitos a DCs, al mantener la expresión de CD14 (Jiang et al, 2005; Nauta et al, 2006; Spaggiari et al, 2009). El CD14 es un PRR que reconoce LPS y dicho

marcador se evalúa para el reconocimiento de la población monocítica (Wu et al, 2019). Los macrófagos mantienen la expresión de CD14, mientras que las moDCs reducen la expresión de CD14 al ser inducidas a diferenciación (Amón et al, 2008).

Por este motivo, decidimos evaluar si las MSCs de cérvix (normal y CaCu) también podían inhibir la diferenciación de monocitos a DCs. En nuestros resultados al inducir la diferenciación de monocitos hacia iDCs en presencia de MSCs de cérvix, se conservó la expresión de CD14. Además, CD11c y CD11b, moléculas presentes en monocitos que aumenta su expresión en la membrana celular al diferenciarse hacia moDCs (Amón et al, 2000; Tang-Huau y Segura, 2018), tuvieron una menor expresión al inducir la diferenciación de los monocitos hacia iDCs en presencia de MSCs de cérvix en comparación con su inducción a la diferenciación en ausencia de MSCs. Estos resultados indican que tanto CN-MSCs como CaCu-MSCs son capaces de disminuir la diferenciación de monocitos hacia DCs.

Las MO-MSCs también tienen la capacidad de afectar la expresión de los marcadores CD80, CD86, CD83 y HLA-DR característicos de las moDCs cuando se inducen a maduración y además dichas MSCs disminuyen la capacidad efectora de las mDCs para activar a linfocitos T (Jiang et al, 2005; Nauta et al, 2006). Con base en ello, decidimos evaluar el efecto de las MSCs de cérvix sobre la expresión de estos marcadores en monocitos inducidos a maduración en sistemas de co-cultivo. Nuestros resultados demostraron que al igual que MO-MSCs, las CN-MSCs y CaCu-MSCs redujeron significativamente el porcentaje de

células positivas y la MFI de las moléculas CD80, CD86 y CD83 en mDCs. Estos resultados indican que tanto CN-MSCs como CaCu-MSCs son capaces de disminuir la maduración de monocitos hacia DCs.

Se ha publicado que las MSCs afectan la capacidad fagocítica de las iDCs (Zhao et al, 2012a) y dado que nuestros resultados indicaron que las MSCs de cérvix fueron capaces de afectar la diferenciación de iDCs, decidimos evaluar su funcionalidad y para ello analizamos su capacidad fagocítica. De manera interesante, observamos que al inducir la diferenciación de los monocitos hacia DCs en presencia de CN-MSCs y CaCu-MSCs, en la población de DCs se incrementó el porcentaje de células capaces de fagocitar, en comparación con la población de iDCs en ausencia de MSCs. Este resultado está acorde con la publicación del grupo de Zhao (Zhao et al, 2012a) en donde MO-MSCs inhiben la diferenciación de DCs y aumentan su potencial fagocítico, lo cual podría estar relacionado a que las MSCs mantienen a los monocitos inducidos hacia DCs en etapas indiferenciadas y debido a ello pueden presentar una mejor capacidad de fagocitosis.

Por su parte, también se ha reportado que las MO-MSCs mejoran la capacidad de iDCs de generar linfocitos Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) (Aggarwal y Pittenger, 2005; Li et al, 2008; Zhao et al, 2012a; Zhao et al, 2012b) y estos linfocitos ayudan al desarrollo del cáncer suprimiendo la respuesta inflamatoria (Arneth, 2020; Labani-Motlangh et al, 2020). Debido a lo anterior, decidimos determinar si las iDCs inducidas a diferenciación en presencia de MSCs de cérvix

tenían el potencial de generar linfocitos Tregs (CD4+ CD25+ FoxP3+). Observamos que los linfocitos T CD4+ cultivados con iDCs que provenían de cultivos con CN-MSCs y CaCu-MSCs, tenían una mayor expresión de CD25 y FoxP3, que aquellos puestos con iDCs que no tuvieron contacto con MSCs. Estos resultados indican que las CN-MSCs y CaCu-MSCs inciden sobre la capacidad de las iDCs para favorecer la generación de Tregs, lo cual podría estar relacionado al aumento de esta población de linfocitos en CaCu, el mismo aumento se ha visto en otros tipos de cáncer, donde linfocitos Tregs disminuyen la respuesta inflamatoria, por lo tanto apoyan el desarrollo y progresión de las células tumorales (Fu y Aimin, 2018; Visser et al, 2007; Wculek et al, 2019).

Por otra parte, se sabe que las mDCs tienen la capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T (Chancellor et al, 2018; Rhijn y Le Nours, 2021), debido a ello decidimos evaluar cuál es el efecto de las MSCs de cérvix en dicha capacidad de las mDC. Los resultados indican que las mDCs en presencia de MSCs de cérvix, disminuyen su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos T CD3+ en comparación a la ausencia de MSCs. Este resultado confirma la posible participación de las MSCs en la disminución de la respuesta inmune mediada por las células linfoides en contra de las células tumorales, debido al efecto negativo sobre la proliferación clonal de células citotóxicas que eliminan a las tumorales, mecanismo que se ha descrito como uno de los más importantes para la progresión del cáncer (Hinshaw y Shevde, 2019; Woo et al, 2008).

En resumen, nuestros resultados indican que las iDCs y las mDCs en presencia de las MSCs de las tres fuentes, disminuyen su capacidad de diferenciación y maduración además de aumentar su capacidad fagocítica y de generación de Tregs y lo anterior aunado a la disminución de su capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T en el caso de las mDCs, nos indica que las MSCs como parte del microambiente tumoral representan a poblaciones celulares que pueden incidir de manera positiva en el desarrollo y progresión de las células tumorales, ello a través de mecanismos que impiden el adecuado funcionamiento del sistema inmune.

El tracto reproductivo femenino necesita generar una respuesta inmunitaria específica para los retos inmunológicos que se presentan en esta zona anatómica y debido a ello necesita activar mecanismos inmunes para la protección de infecciones y otras agresiones ambientales nocivas. No obstante, también se ha descrito que de manera opuesta es necesario mantener en este órgano un mutualismo simbiótico con microorganismos comensales, además de una tolerancia inmunológica a los espermatozoides alogénicos, así como a los fetos semialogénicos (Barrios De Tomasi et al, 2019).

El cérvix en específico tiene características inmunológicas únicas y sufre alteraciones específicas durante diferentes condiciones fisiológicas como la menstruación, el embarazo, el posparto y el envejecimiento, por ello tiene una respuesta inmune compleja y sumamente controlada, ya que la desregulación de dicha respuesta conlleva a diversas complicaciones clínicas, como vaginosis

bacteriana, candidiasis vaginal, infecciones, trabajo de parto prematuro y en algunos casos al desarrollo de CaCu (Barrios De Tomasi et al, 2019).

Probablemente debido a estos mecanismos de protección es que las MSCs de cérvix presentan un perfil inmunosupresor hacia DCs derivadas de monocitos, evitando su diferenciación, maduración y afectando su funcionalidad hacia linfocitos T. Numerosos estudios in vivo han reportado que los monocitos se diferencian a DCs en casos de inflamación. Sin embargo, su diferenciación también se ha observado en ausencia de procesos inflamatorios, aunque en menor porcentaje. El incremento en la presencia de poblaciones de DCs derivadas de monocitos en tejidos podría llevar a una respuesta inmune exacerbada, como se muestra en modelos de enfermedades autoinmunes en donde se encuentran proporciones incrementadas de dicha población de DCs (Eguilu-Garcia et al, 2016; Segura y Amigorena, 2013; Tang-Huau y Segura, 2018; Zaba et al, 2009).

La capacidad de las CN-MSCs de mantener en un estado indiferenciado e inmaduro a las DCs, podría ser un punto de control para preservar la homeostasis en tejidos sanos. Sin embargo, en el caso del desarrollo de CaCu, la falta de respuesta inmune a la infección de VPH ayuda a la progresión a carcinomas y se ha descrito que las células tumorales obstaculizan la diferenciación de monocitos hacia DCs e inducen una maduración incompleta de estas células presentando así un perfil tolerogénico (Wang et al, 2022). Por lo cual, este comportamiento de las MSCs de CN podría ser modificado en presencia de células infectadas con VPH o citocinas inflamatorias para montar una respuesta inmune adecuada. Contrario a

lo anterior en el caso de MSCs de CaCu, se puede pensar que en presencia de células tumorales podría seguir conservando su fenotipo inmunosupresor como se ha observado en MSCs de otros estromas tumorales, o en las mismas CaCu-MSCs que se han estudiado en nuestro grupo con relación a su efecto hacia otros tipos celulares como los linfocitos NK (Serrato-López, 2019), macrófagos (Cortes-Morales, 2023) y linfocitos T (Montesinos et al, 2013).

Conclusiones

En los ensayos realizados, no se encontraron diferencias entre las MSCs de MO, con las de cérvix normal o las obtenidas de pacientes con CaCu.

Las MSCs de cérvix, tanto normal con de CaCu disminuyeron la diferenciación de monocitos hacia iDCs, al mantener la expresión y porcentaje de células CD14+, reducir la expresión de CD11b/c y disminuir el porcentaje de células positivas a CD86 (Figura 15).

La presencia de ambas MSCs de cérvix disminuyó la maduración de DCs, lo cual se reflejó en la disminución de la expresión y porcentaje de células positivas a CD80, CD86 y CD83 (Figura 15).

En presencia de CN-MSCs y CaCu-MSCs las iDCs aumentaron su capacidad de fagocitosis (Figura 15).

Las mDCs después de estar en cultivos con MSCs de cérvix tanto normal como de CaCu, presentaron una menor capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T alogénicos (Figura 15).

Las iDCs en presencia de CN-MSCs y CaCu-MSCs incrementaron su capacidad para generar linfocitos T reguladores con el inmunofenotipo CD4+CD25+FoxP3+ (Figura 15).

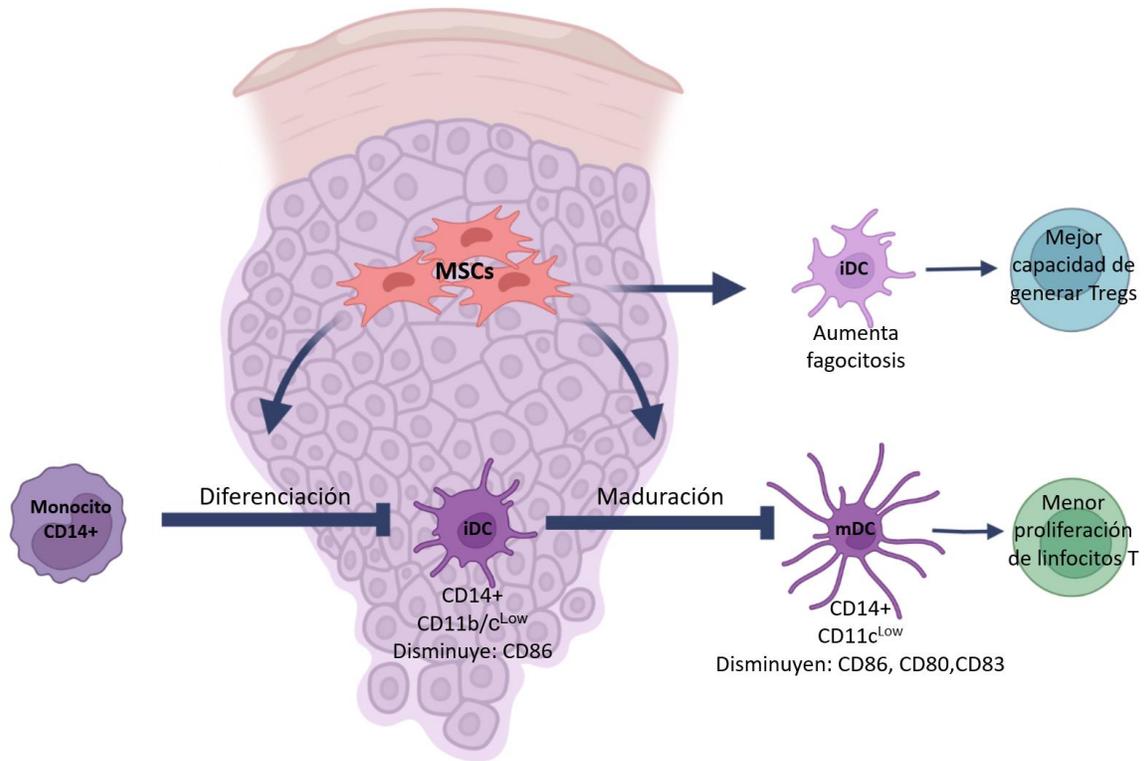


Figura 15. Interacción MSCs con DCs en el cérvix. Las MSCs evitan la diferenciación y maduración de DCs. Aumentan su capacidad fagocítica, mejoran su capacidad de generar linfocitos Tregs, y reducen su potencial de inducir proliferación de linfocitos T (CD3+).

Perspectivas

Dado que en el presente estudio no se observó diferencias entre MSCs de CN y CaCu sería interesante evaluar la participación de la interacción de las CaCu-MSCs y las células tumorales para determinar si las primeras modifican su capacidad inmunosupresora sobre las células dendríticas.

Evaluar si las MSCs de cérvix pueden cambiar el perfil de citocinas de DCs, ya que esto ayudaría a saber si se comportan de forma tolerogénica o qué tipo de respuesta podrían estar induciendo en linfocitos T.

Evaluar el perfil de citocinas en MSCs de cérvix sería adecuado para discernir las vías que utilizan estas células para disminuir la diferenciación y maduración de las moDCs.

Diferenciar DCs antes de poner en co-cultivos con MSCs de cérvix y evaluar su funcionalidad.

Evaluar la capacidad inmunoreguladora de las MSCs de cérvix hacia otros componentes del sistema inmune como los linfocitos B.

Referencias

- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>.
- Ammon, C., Meyer, S. P., Schwarzfischer, L., Krause, S. W., Andreesen, R., & Kreutz, M. (2000). Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, *100*(3), 364–369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00056.x>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current biology : CB*, *30*(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Ashrafi, G. H., Haghshenas, M. R., Marchetti, B., O'Brien, P. M., & Campo, M. S. (2005). E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *International journal of cancer*, *113*(2), 276–283. <https://doi.org/10.1002/ijc.20558>
- Arneth B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *56*(1), 15. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
- Ávila-Ibarra, L. R., Mora-García, M. L., García-Rocha, R., Hernández-Montes, J., Weiss-Steider, B., Montesinos, J. J., Lizano Soberon, M., García-López, P., López, C., Torres-Pineda, D. B., Chacón-Salinas, R., Vallejo-Castillo, L., Pérez-Tapia, S. M., & Monroy-García, A. (2019). Mesenchymal Stromal Cells Derived from Normal Cervix and Cervical Cancer Tumors Increase CD73 Expression in Cervical Cancer Cells Through TGF- β 1 Production. *Stem cells and development*, *28*(7), 477–488. <https://doi.org/10.1089/scd.2018>.
- Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., & Kaur, G. (2019). Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicine (Kaunas, Lithuania)*, *55*(7), 384. <https://doi.org/10.3390/medicina55070384>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Barrios De Tomasi, J., Opata, M. M., & Mowa, C. N. (2019). Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *Journal of immunology research*, *2019*, 7693183. <https://doi.org/10.1155/2019/7693183>
- Bravo, I. G., & Félez-Sánchez, M. (2015). Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, medicine, and public health*, *2015*(1), 32–51. <https://doi.org/10.1093/emph/eov003>

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

Cascio, S., Chandler, C., Zhang, L., Sinno, S., Gao, B., Onkar, S., Bruno, T. C., Vignali, D., Mahdi, H., Osmanbeyoglu, H. U., Vlad, A. M., Coffman, L. G., & Buckanovich, R. J. (2021). Cancer-associated MSC drive tumor immune exclusion and resistance to immunotherapy, which can be overcome by Hedgehog inhibition. *Science advances*, *7*(46), eabi5790. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abi5790>

Castro-Manreza, M. E., Mayani, H., Monroy-García, A., Flores-Figueroa, E., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, V., Santiago-Osorio, E., & Montesinos, J. J. (2014). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem cells and development*, *23*(11), 1217–1232. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0363>

Castro-Manreza, M. E., y Montesinos, J. J. (2015). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research*, *2015*, 394917. <https://doi.org/10.1155/2015/39491>

Chancellor, A., Gadola, S. D., & Mansour, S. (2018). The versatility of the CD1 lipid antigen presentation pathway. *Immunology*, *154*(2), 196–203. <https://doi.org/10.1111/imm.12912>

Chen, W., Li, F., Mead, L., White, H., Walker, J., Ingram, D. A., & Roman, A. (2007). Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior. *Virology*, *367*(1), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.030>

Coffman, L. G., Pearson, A. T., Frisbie, L. G., Freeman, Z., Christie, E., Bowtell, D. D., & Buckanovich, R. J. (2019). Ovarian Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem Cells Arise from Tissue-Specific Normal Stroma. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *37*(2), 257–269. <https://doi.org/10.1002/stem.2932>

Cortes-Morales, V. A., Chávez-Sánchez, L., Rocha-Zabaleta, L., Espíndola-Garibay, S., Monroy-García, A., Castro-Manreza, M. E., Fajardo-Orduña, G. R., Aprese-García, T., Gutierrez-de la Barrera, M., Mayani, H., & Montesinos, J. J. (2023). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Cervical Cancer Promote M2 Macrophage Polarization. *Cells*, *12* (7):1047. <https://doi.org/10.3390/cells12071047>

Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)*, *382*(9895), 889–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)

Demoulin, S. A., Somja, J., Duray, A., Guénin, S., Roncarati, P., Delvenne, P. O., Herfs, M. F., & Hubert, P. M. (2015). Cervical (pre)neoplastic microenvironment promotes the

emergence of tolerogenic dendritic cells via RANKL secretion. *Oncoimmunology*, 4(6), e1008334. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008334>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. j., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Eguíluz-Gracia, I., Bosco, A., Dollner, R., Melum, G. R., Lexberg, M. H., Jones, A. C., Dheyauldeen, S. A., Holt, P. G., Bækkevold, E. S., & Jahnsen, F. L. (2016). Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(6), 1872–1881.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.025>

Estêvão, D., Costa, N. R., Gil da Costa, R. M., & Medeiros, R. (2019). Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1862(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.01.001>

Fernandes, A., Viveros-Carreño, D., Hoegl, J., Ávila, M., & Pareja, R. (2022). Human papillomavirus-independent cervical cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 32(1), 1–7. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-003014>

Fu, C., & Jiang, A. (2018). Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*, 9, 3059. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03059>

Fullár, A., Dudás, J., Oláh, L., Hollósi, P., Papp, Z., Sobel, G., Karászi, K., Paku, S., Baghy, K., & Kovalszky, I. (2015). Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC cancer*, 15, 256. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1272-3>

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., & Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80059-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80059-8)

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4), 331–340. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>

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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.089>

García-Rocha, R., Moreno-Lafont, M., Mora-García, M. L., Weiss-Steider, B., Montesinos, J. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.09.001>

GLOBOCAN, Global Cancer Observatory (2020). Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

Guess, J. C., & McCance, D. J. (2005). Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. *Journal of virology*, 79(23), 14852–14862. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14852-14862.2005>

Heusinkveld, M., de Vos van Steenwijk, P. J., Goedemans, R., Ramwadhoebe, T. H., Gorter, A., Welters, M. J., van Hall, T., & van der Burg, S. H. (2011). M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4⁺ Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(3), 1157–1165. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100889>

Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer research*, 79(18), 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>

Hou, F., Li, Z., Ma, D., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, T., Kong, B., & Cui, B. (2012). Distribution of Th17 cells and Foxp3-expressing T cells in tumor-infiltrating lymphocytes in patients with uterine cervical cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(23-24), 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.07.012>

Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D., & Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), 4120–4126. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0586>

Johann, P. D., Vaegler, M., Gieseke, F., Mang, P., Armeanu-Ebinger, S., Kluba, T., Handgretinger, R., & Müller, I. (2010). Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC cancer*, 10, 501. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-501>

Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A. L., Polyak, K., Tubo, R., & Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557–563. <https://doi.org/10.1038/nature06188>

Kleine-Lowinski, K., Rheinwald, J. G., Fichorova, R. N., Anderson, D. J., Basile, J.,

Münger, K., Daly, C. M., Rösl, F., & Rollins, B. J. (2003). Selective suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in human cervical epithelial and epidermal cells. *International journal of cancer*, *107*(3), 407–415. <https://doi.org/10.1002/ijc.11411>

Klopp, A. H., Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Woodward, W. A., Munshi, A., Meyn, R. E., Cox, J. D., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2007). Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer research*, *67*(24), 11687–11695. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1406>

Labani-Motlagh, A., Ashja-Mahdavi, M., & Loskog, A. (2020). The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Frontiers in immunology*, *11*, 940. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00940>

Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., Caux, C., Ait-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D., & Dubois, B. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity*, *24*(2), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01>

Li, Y. P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, J. P., Stoltz, J. F., Miossec, P., & Eljaafari, A. (2008). Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(3), 1598–1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1598>

Lin, W., Zhang, Hl., Niu, Zy. (2020)The disease stage-associated imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg in uterine cervical cancer patients and their recovery with the reduction of tumor burden. *BMC Women's Health* *20*, 126. <https://doi.org/10.1186/s12905-020-00972-0>

Liu, Y., Han, Z. P., Zhang, S. S., Jing, Y. Y., Bu, X. X., Wang, C. Y., Sun, K., Jiang, G. C., Zhao, X., Li, R., Gao, L., Zhao, Q. D., Wu, M. C., & Wei, L. X. (2011). Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *The Journal of biological chemistry*, *286*(28), 25007–25015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213108>

Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(4), 2080–2087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2080>

MacDonald, K. P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J., & Hart, D. N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*, *100*(13), 4512–4520. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0097>

Maffey, A., Storini, C., Diceglie, C., Martelli, C., Sironi, L., Calzarossa, C., Tonna, N.,

Lovchik, R., Delamarche, E., Ottobri, L., & Bianco, F. (2017). Mesenchymal stem cells from tumor microenvironment favour breast cancer stem cell proliferation, cancerogenic and metastatic potential, via ionotropic purinergic signalling. *Scientific reports*, 7(1), 13162. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13460-7>

Martínez-Ramírez, I., Carrillo-García, A., Contreras-Paredes, A., Ortiz-Sánchez, E., Cruz-Gregorio, A., & Lizano, M. (2018). Regulation of Cellular Metabolism by High-Risk Human Papillomaviruses. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1839. <https://doi.org/10.3390/ijms19071839>

Mathew, E., Brannon, A. L., Del Vecchio, A., Garcia, P. E., Penny, M. K., Kane, K. T., Vinta, A., Buckanovich, R. J., & di Magliano, M. P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 18(3), 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.01.005>

Mazibrada, J., Rittà, M., Mondini, M., De Andrea, M., Azzimonti, B., Borgogna, C., Ciotti, M., Orlando, A., Surico, N., Chiusa, L., Landolfo, S., & Gariglio, M. (2008). Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecologic oncology*, 108(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.095>

McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K., Bai, S., Cabrera, L., Keller, E., McCauley, L., Cho, K. R., & Buckanovich, R. J. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of clinical investigation*, 121(8), 3206–3219. <https://doi.org/10.1172/JCI45273>

Montesinos, J. J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., Flores-Guzmán, P., Hernández-Estévez, E., Fajardo-Orduña, G., Orozco, S., & Mayani, H. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*, 11(2), 163–176. <https://doi.org/10.1080/1465324080258207>

Montesinos, J. J., Mora-García, M., Mayani, H., Flores-Figueroa, E., García-Rocha, R., Fajardo-Orduña, G. R., Castro-Manreza, M. E., Weiss-Steider, B., & Monroy-García, A. (2013). In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem cells and development*, 22(18), 2508–2519. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0084>

Mora-García, M. L., García-Rocha, R., Morales-Ramírez, O., Montesinos, J. J., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., Ávila-Ibarra, L. R., Don-López, C. A., Velasco-Velázquez, M. A., Gutiérrez-Serrano, V., & Monroy-García, A. (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), 302. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1057-8>

Okunade K. S. (2020). Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 40(5), 602–608. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>

Olusola, P., Banerjee, H. N., Philley, J. V., & Dasgupta, S. (2019). Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*, 8(6), 622. <https://doi.org/10.3390/cells8060622>

Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., & Gluckman, J. C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(9), 4587–4595.

Pahne-Zeppenfeld, J., Schröer, N., Walch-Rückheim, B., Oldak, M., Gorter, A., Hegde, S., & Smola, S. (2014). Cervical cancer cell-derived interleukin-6 impairs CCR7-dependent migration of MMP-9-expressing dendritic cells. *International journal of cancer*, 134(9), 2061–2073. <https://doi.org/10.1002/ijc.28549>

Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS medicine*, 5(1), e19. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050019>

Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., Baik, G. H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K. S., Friedman, R., Varro, A., Tycko, B., & Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell*, 19(2), 257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>

Randolph, G., Angeli, V. & Swartz, M. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5, 617–628 (2005). <https://doi.org/10.1038/nri1670>

Richards, K. H., Wasson, C. W., Watherston, O., Doble, R., Eric Blair, G., Wittmann, M., & Macdonald, A. (2015). The human papillomavirus (HPV) E7 protein antagonises an Imiquimod-induced inflammatory pathway in primary human keratinocytes. *Scientific reports*, 5, 12922. <https://doi.org/10.1038/srep12922>

Rossi, M., & Young, J. W. (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(3), 1373–1381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1373>

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., & Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology*, 28(9), 2760–2769. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N)

Sasagawa, T., Takagi, H., & Makinoda, S. (2012). Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 18(6), 807–815. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0485-5>

Schröer, N., Pahne, J., Walch, B., Wickenhauser, C., & Smola, S. (2011). Molecular pathobiology of human cervical high-grade lesions: paracrine STAT3 activation in tumor-instructed myeloid cells drives local MMP-9 expression. *Cancer research*, 71(1), 87–97. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2193>

Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., Stanley, M. A., & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>

Segura, E., & Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in immunology*, 34(9), 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>

Serrato-López AG (2019). Análisis de la capacidad inmunosupresora sobre células NK de Células Estromales Mesenquimales proveniente de pacientes con cáncer de cérvix. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/VUQMJE1KXE2ERA4FQCAC4ERD348P444I6TG1L9L1QRPIET1E34-23118?func=full-set-set&set_number=703536&set_entry=000007&format=999

Shortman, K., & Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology*, 2(3), 151–161. <https://doi.org/10.1038/nri746>

Smola S. (2017). Immunopathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy. *Viruses*, 9(9), 254. <https://doi.org/10.3390/v9090254>

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. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3295>

Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., & Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*, 113(26), 6576–6583. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203943>

Spurgeon, M. E., den Boon, J. A., Horswill, M., Barthakur, S., Forouzan, O., Rader, J. S., Beebe, D. J., Roopra, A., Ahlquist, P., & Lambert, P. F. (2017). Human papillomavirus oncogenes reprogram the cervical cancer microenvironment independently of and synergistically with estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(43), E9076–E9085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712018114>

Stanley, M. A., & Sterling, J. C. (2014). Host responses to infection with human papillomavirus. *Current problems in dermatology*, 45, 58–74. <https://doi.org/10.1159/000355964>

Stone, S. C., Rossetti, R. A., Lima, A. M., & Lepique, A. P. (2014). HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. *Immunity, inflammation and disease*, 2(2), 63–75. <https://doi.org/10.1002/iid3.21>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Suzuki, K., Sun, R., Origuchi, M., Kanehira, M., Takahata, T., Itoh, J., Umezawa, A., Kijima, H., Fukuda, S., & Saijo, Y. (2011). Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(7-8), 579–587. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00157>

Szabolcs, P., Park, K. D., Reese, M., Marti, L., Broadwater, G., & Kurtzberg, J. (2003). Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 21(3), 296–303. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-3-296>

Szabowski, N. M., Stark, H. J., & Fusenig, N. E. (2000). Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, 114(6), 1075–1084. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00987.x>

Tang-Huau, T. L., & Segura, E. (2019). Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in cell & developmental biology*, 86, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.018>

Van Doorslaer K. (2013). Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>

Van Rhijn, I., & Le Nours, J. (2021). CD1 and MR1 recognition by human $\gamma\delta$ T cells. *Molecular immunology*, 133, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.12.008>

Visser, J., Nijman, H. W., Hoogenboom, B. N., Jager, P., van Baarle, D., Schuurin, E., Abdulahad, W., Miedema, F., van der Zee, A. G., & Daemen, T. (2007). Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clinical and experimental immunology*, 150(2), 199–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03468.x>

Walch-Rückheim, B., Mavrova, R., Henning, M., Vicinus, B., Kim, Y. J., Bohle, R. M., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E. F., & Smola, S. (2015). Stromal Fibroblasts Induce CCL20 through IL6/C/EBP β to Support the Recruitment of Th17 Cells during Cervical Cancer Progression. *Cancer research*, 75(24), 5248–5259. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0732>

Walch-Rückheim, B., Ströder, R., Theobald, L., Pahne-Zeppenfeld, J., Hegde, S., Kim, Y. J., Bohle, R. M., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E. F., & Smola, S. (2019). Cervical Cancer-Instructed Stromal Fibroblasts Enhance IL23 Expression in Dendritic Cells to Support Expansion of Th17 Cells. *Cancer research*, 79(7), 1573–1586. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1913>

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

Wang, Y. M., Qiu, J. J., Qu, X. Y., Peng, J., Lu, C., Zhang, M., Zhang, M. X., Qi, X. L., Lv, B., Guo, J. J., Guo, C. Y., Li, G. L., & Hua, K. Q. (2022). Accumulation of dysfunctional tumor-infiltrating PD-1+ DCs links PD-1/PD-L1 blockade immunotherapeutic response in cervical cancer. *Oncoimmunology*, 11(1), 2034257. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2034257>

Wang, Y., Xiang, Y., Xin, V. W., Wang, X. W., Peng, X. C., Liu, X. Q., Wang, D., Li, N., Cheng, J. T., Lv, Y. N., Cui, S. Z., Ma, Z., Zhang, Q., & Xin, H. W. (2020). Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00939-6>

Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 20(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>

Woo, Y. L., Sterling, J., Damay, I., Coleman, N., Crawford, R., van der Burg, S. H., & Stanley, M. (2008). Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 115(13), 1616–1622. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01936.x>

Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z., & Lei, P. (2019). CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 48, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.06.003>

Yang, W., Song, Y., Lu, Y. L., Sun, J. Z., & Wang, H. W. (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. <https://doi.org/10.1111/imm.12101>

Yuan, Y., Cai, X., Shen, F., & Ma, F. (2021). HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. *Cancer letters*, *497*, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.034>

Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N. J., Abello, M. V., Novitskaya, I., Pierson, K. C., Gonzalez, J., Krueger, J. G., & Lowes, M. A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology*, *129*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.194>

Zhang, J., Burn, C., Young, K., Wilson, M., Ly, K., Budhwani, M., Tschirley, A., Braithwaite, A., Baird, M., & Hibma, M. (2018). Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response. *Scientific reports*, *8*(1), 2373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20779-2>

Zhang, J., Jin, S., Li, X., Liu, L., Xi, L., Wang, F., & Zhang, S. (2019). Human Papillomavirus Type 16 Disables the Increased Natural Killer Cells in Early Lesions of the Cervix. *Journal of immunology research*, *2019*, 9182979. <https://doi.org/10.1155/2019/9182979>

Zhang, Y., Ma, D., Zhang, Y., Tian, Y., Wang, X., Qiao, Y., & Cui, B. (2011). The imbalance of Th17/Treg in patients with uterine cervical cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *412*(11-12), 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.01.015>

Zhao, Z. G., Xu, W., Sun, L., You, Y., Li, F., Li, Q. B., & Zou, P. (2012a). Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunological investigations*, *41*(2), 183–198. <https://doi.org/10.3109/08820139.2011.607877>

Zhao, Z. G., Xu, W., Sun, L., Li, W. M., Li, Q. B., & Zou, P. (2012b). The characteristics and immunoregulatory functions of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with chronic myeloid leukaemia. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, *48*(12), 1884–1895. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.11.003>

Anexo: Caracterización de las células estromales mesenquimales

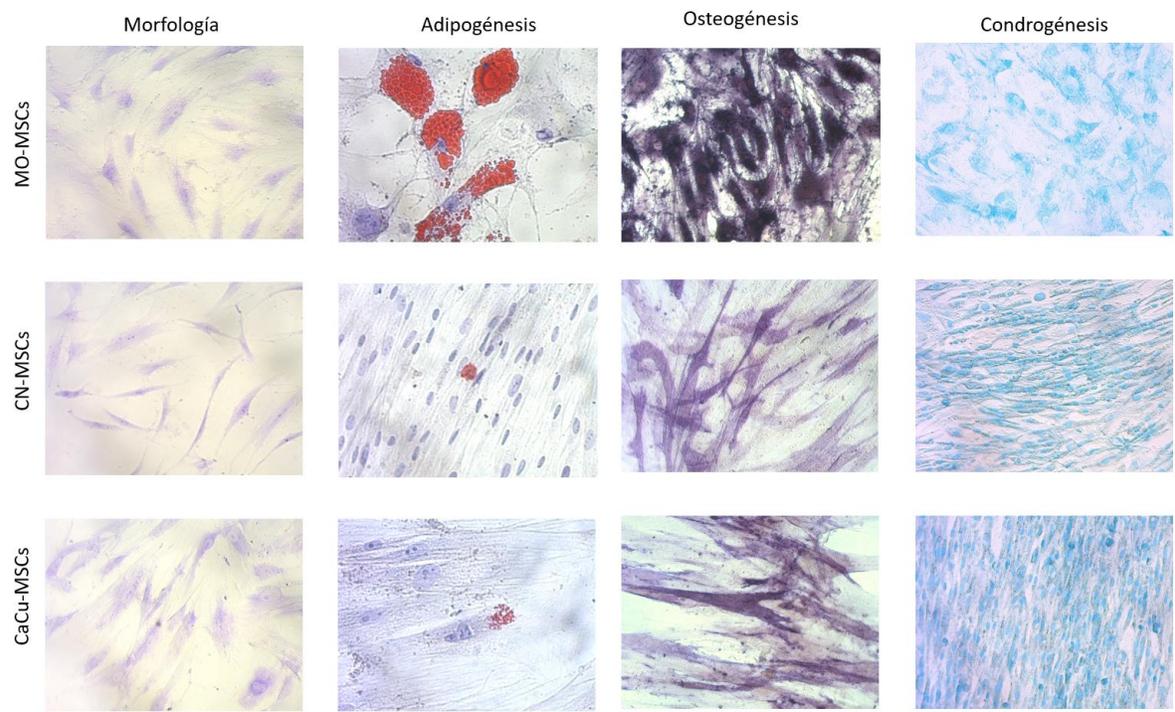


Figura 16. Diferenciación de MO-MSCs, CN-MSCs y CaCu-MSCs. Las MSCs de las diferentes fuentes fueron cultivadas en presencia de medio osteogénico, condrogénico o adipogénico durante tres semanas. Después de ese periodo se comprobó la diferenciación mediante la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina (osteogénesis), o las tinciones de rojo oleoso (adipogénesis) y azul alciano (condrogénesis).

Ag	MO-MSCs	CN-MSCs	CaCu-MSCs
CD105	89 ± 12	99 ± 0.2	97 ± 1
CD73	97 ± 3	99	98 ± 0.8
CD90	85 ± 14	99 ± 0.3	94 ± 5
CD13	98 ± 0.9	99	99 ± 0.1
HLA-ABC	94 ± 9	99 ± 0.4	97 ± 1
CD29	95 ± 7	99 ± 0.6	96 ± 1
CD44	89 ± 13	99 ± 0.5	99 ± 0.2
CD49b	50 ± 14	99 ^a	99 ± 0.1 ^a
CD58	75 ± 32	98 ± 1	87 ± 12
CD166	92 ± 11	99 ± 0.1	95 ± 6
CD14	2 ± 2	1 ± 0.5	3 ± 1
CD34	0.1 ± 0.2	4 ± 3	1 ± 0.6
CD45	0.5 ± 0.5	2 ± 0.5	1 ± 0.1
CD31	1 ± 0.7	1 ± 0.6	1 ± 0.1
CD133	1.4 ± 0.4	1.7 ± 1	0.8 ± 0.1
CD62L	0.3 ± 0.3	1 ± 0.2	1
HLA-DR	2 ± 3	1 ± 1	1 ± 0.1
CD54	25 ± 17	80 ± 16 ^a	64 ± 6 ^a

Figura 17. Perfil de expresión de antígenos en MO-MSCs, CN-MSCs y CaCu-MSCs.
(tomado de Montesinos et al, 2013)