



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza  
Diferenciación Celular y Cáncer  
Laboratorio de Inmunobiología

**Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino (CEM-CaCu) sobre la expresión de moléculas H-2Db en células tumorales TC-1 en un modelo tumoral en ratones de la cepa C57BL/6.**

T E S I S

Que para obtener el título de:  
**Biólogo**

Presenta:

**Cesar Antonio Montoro Barenas**

Director de tesis:

Dra. María de Lourdes Mora García.



México DF. 2014.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza, y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS y fue realizado gracias al apoyo financiero de los proyectos: DGAPA-PAPIITNo.IN217013 y FIS/IMSS/PROT/G09/762, 800 y 1014.

***“No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.”***  
Paulo Coelho.

***“La peor decisión es la indecisión”.***  
Benjamin Franklin

## **Agradecimientos**

A mi madre por su gran apoyo incondicional y sus consejos que me han llevado por el camino adecuado para llegar a concluir esta etapa de mi vida, por su paciencia, por su manera tan particular de convertir momentos de estrés en algo divertido, por hacerme pasar maravillosos e increíbles momentos a su lado y sobre todo por darme la vida y acompañarme a cada momento.

A mi padre y hermano por haberme ayudado a encontrar motivos para seguir esforzándome y superarme en cada momento y no decaer en ningún momento.

A mis abuelas y mis tías que me dan su amor incondicional y desde pequeño me han enseñado a ser una gran y buena persona.

A mis amigos de la prepa Erika, Damian, Alma, Cristina, Karla, Jenifer, Brenda, Veronica, Silvia, Liliana, Dulce, Michelle y Cynthia quienes siempre estuvieron para darme un buen consejo, para hacerme reír cuando más lo necesitaba, para pasar increíbles e inolvidables momentos, para apoyarme en todas mis locuras e ideas locas, para acompañarme en este camino tan complicado, que a pesar del tiempo transcurrido seguimos en contacto y seguimos siendo los grandes amigos que siempre fuimos a pesar de los muchos conflictos y mal entendidos.

A mis amigas Miroslava y Gabriela las cuales han sido una parte fundamental en estos 5 años de mi vida, en los cuales me apoyaron y soportaron todo el tiempo en todas mis locuras, siempre acompañándome a cada paso y levantándome en cada tropiezo, escuchándome y aconsejándome, sin su amistad no hubiera llegado hasta donde estoy ahora y les estoy muy agradecido por todo su apoyo y amistad incondicional.

A mi amiga y confidente Mitzi Xenia que es una de las mejores personas que he conocido y sin su ayuda y apoyo durante estos 5 años tan complicados no hubiera terminado la carrera ni este proyecto, gracias por esos momentos de risas incontrolables y locuras inolvidables, gracias por hacer tan amenos y soportables 4 años de carrera que sin ti hubieran sido muy difíciles, no tengo palabras para agradecer toda la ayuda proporcionada y la mejor forma que se me ocurre es plasmándolo en este trabajo.

A mis amigos de la FES Zaragoza con los cuales pase grandes momentos desde el primer día que los conocí, que me ayudaron a seguir adelante y llegar hasta el final con risas incontrolables y momentos inolvidables.

A Daniel Ramírez por enseñarme lo bello de esta carrera e introducirme al mundo de la biología sin saberlo.

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

A mis compañeros de laboratorio Victor, Itzel, Luis, Vianey, Oscar y Gabriela quienes siempre mostraron una sonrisa y me brindaron ayuda cuando la necesite en el proceso de este trabajo, en especial quiero dar un enorme agradecimiento a Azucena ya que sin su apoyo, explicaciones y conocimientos transmitidos no hubiera terminado este trabajo, junto con Sofía y Toño quienes hicieron del laboratorio un ambiente amigable de trabajo y siempre me recibieron con una sonrisa para aclarar y apoyarme en cualquier duda o problema en las técnicas empleadas.

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

A mis sinodales Dr. Benny Weiss Steider, Dra. María de Lourdes Mora García, Dr. Hugo López Muñoz, Dr. Edgar Ledesma Martínez y Biol. Carlos Martínez Montoya, ya que sus consejos y observaciones realizadas de manera tan acertada enriquecieron este trabajo.

## ÍNDICE

1. ABREVIATURAS .....	1
2. RESUMEN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. VPH.....	3
3.1.1. <i>Ciclo de vida</i> .....	4
3.1.2. <i>Infección por VPH</i> .....	6
3.2. SISTEMA INMUNE.....	7
3.2.1. <i>Inmunidad innata</i> .....	8
3.2.2. <i>Inmunidad adquirida</i> .....	8
3.2.3. <i>Inmunidad humoral y celular</i> .....	9
3.3. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC).....	10
3.3.1. <i>Vía endocítica (MHC II)</i> .....	13
3.3.3. <i>Vía citosólica (MHC I)</i> .....	14
3.3.5. <i>Polimorfismo del MHC</i> .....	15
3.4. CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (CEMs).....	16
3.5. INTERLEUCINA 10 (IL-10) .....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1. OBJETIVO GENERAL .....	26
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. CULTIVOS CELULARES.....	26
7.2. RATONES.....	27
7.3. INMUNIZACIÓN E INOCULACIÓN DE CÉLULAS PARA LA INDUCCIÓN DE TUMORES.....	27
7.4. MEDICIÓN DE TUMORES .....	28
7.4.1. <i>Análisis estadístico</i> .....	28
7.5. DETERMINACIÓN DE MOLÉCULAS H-2D <sup>B</sup> Y H-2K <sup>B</sup> EN LAS CÉLULAS TUMORALES CULTIVADAS.....	28
7.6. OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS DE TUMORES PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE IL-10 .....	29
8. RESULTADOS.....	31
8.1. INDUCCIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6 SIN PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA Y EN PRESENCIA DE CEMS.....	31
8.2. INDUCCIÓN DE CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6 CON PREVIA PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA Y EN PRESENCIA DE CEMS .....	33

8.3.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA H-2D <sup>B</sup> Y H-2K <sup>B</sup> EN CÉLULAS PROVENIENTES DE LOS TUMORES DE RATONES SIN PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA.....	35
8.4.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA H-2D <sup>B</sup> Y H-2K <sup>B</sup> EN CULTIVOS CELULARES PROVENIENTES DE LOS TUMORES DE RATONES CON PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA .....	36
8.5.	ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-10 EN SOBRENADANTES PROVENIENTES DE LOS CULTIVOS DE TUMORES DE RATONES SIN PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA.....	38
8.6.	ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-10 EN SOBRENADANTES PROVENIENTES DE LOS CULTIVOS DE TUMORES DE RATONES CON PROTECCIÓN INMUNOLÓGICA .....	40
9.	DISCUSIÓN.....	41
10.	CONCLUSIONES.....	50
11.	PERSPECTIVAS.....	51
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	52

## 1. ABREVIATURAS

VPH	-----	Virus de Papiloma Humano.
CaCu	-----	Cáncer Cérvico Uterino.
MHC	-----	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
CEMs	-----	Células Estromales Mesenquimales.
IL-10	-----	Interleucina 10.
HLA	-----	Antígeno Leucocitario Humano.
NK	-----	Célula Natural Killer.
DC	-----	Célula Dendrítica.
CEMs-CaCu	-----	CEMs humanas derivadas de Cáncer Cérvico Uterino.
CEMs-CNOR	-----	CEMs humanas derivadas Cérvix Normal.
CEMs-MON	-----	CEMs humanas derivadas de Medula Ósea Normal.
INF- $\gamma$	-----	Interferón gamma.
CPA	-----	Célula presentadora de antígeno.
TNF- $\alpha$	-----	Factor de Necrosis Tumoral alfa.

## 2. Resumen.

Según la OMS, el cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con 300.00 muertes al año. Casi todos los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de virus de papiloma humano (VPH); sin embargo, otros factores como los ambientales y propios del hospedero, contribuyen al proceso carcinogénico además del VPH.

Uno de los factores que están involucrados en la progresión de la enfermedad es la generación de un microambiente que favorece el desarrollo de células transformadas, la evasión y la regulación negativa del sistema inmune. Se ha demostrado que la presencia de Células Estromales Mesenquimales (CEMs) en el microambiente tumoral favorece de manera importante la proliferación, crecimiento y metástasis tumoral. Nuestro grupo de trabajo ha logrado aislar y caracterizar tres estirpes de CEMs, de las cuales se pudo observar que ejercen efectos inmunosupresores en la proliferación y actividad efectora de linfocitos T citotóxicos, además de favorecer el crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H-2D<sup>b</sup>) previamente inmunoprotegidos. Se encuentra en la literatura que las CEMs secretan factores solubles los cuales ayudan a sus propiedades inmunomodulatorias, entre estos se encuentran citocinas como la IL-10 que se ha visto que cuenta con grandes propiedades antiinflamatorias y con la capacidad de llevar a la baja la expresión de moléculas del MHC.

Por lo tanto en el presente trabajo se analizó el efecto que tienen las CEMs derivadas de CaCu en la expresión de las molécula H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup> del MHC I en un modelo tumoral de ratones de la cepa C57BL/6; en los resultados se observó que la presencia de las CEMs en los ratones que contaron con una protección inmunológica, ayudó al crecimiento tumoral; también se pudo ver que en los cultivos realizados de los tumores de estos ratones se dio una baja en la expresión de las moléculas H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup> de casi un 78%. En los sobrenadantes de estos cultivos tumorales también se detectó la presencia de la citocina antiinflamatoria IL-10. De acuerdo a los resultados se puede concluir que las CEMs juegan un papel importante en la supresión de la respuesta inmune, favoreciendo el desarrollo de tumores en los tratamientos, junto con la baja en la expresión de moléculas del MHC-I y la secreción de la citocina IL-10. Estos hallazgos nos ilustra sobre de la participación de las CEMs en el microambiente tumoral, mostrando que su presencia ayuda al escape de las células tumorales de reconocimiento inmune, bajando la expresión de moléculas de MHC-I e induciendo la secreción de IL-10, lo cual aporta información importante para establecer estrategias nuevas para combatir éste y otros tipos de cáncer.

### 3. Marco Teórico.

#### 3.1. VPH

Los virus del papiloma humano (VPH) pertenecen a la familia Papillomaviridae, están compuestos por ADN y tienen tropismo por el epitelio cutáneo y el epitelio de la mucosa. La familia papillomaviridae consta de más de 120 tipos de VPH diferentes, de los cuales aproximadamente 40 se transmiten por medio de relaciones sexuales (Johansson *et al*, 2013). La familia papillomaviridae tiene una taxonomía muy similar en el genoma que da una homología en secuencias de ADN, función biológica y efecto patológico (Crosbie *et al*, 2013).

La familia de los VPH se puede dividir en diferentes tipos virales que en función de su tropismo se clasifican en cutáneos y mucosales. Los cutáneos se detectan primordialmente en las verrugas cutáneas. En relación con su potencial oncogénico, los VPH mucosales se clasifican en tipos de alto, probable y de bajo riesgo oncogénico (Castellsagué *et al*, 2007).

Doce tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) están definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de alto riesgo carcinogénico y dos tipos adicionales (68, 73) se clasifican como "posiblemente" cancerígeno (Doorbar *et al*, 2012).

Los tipos de VPH-16 y -18, se encuentran en aproximadamente el 70% de todos los cánceres de cuello uterino. En etapas iniciales, el tipo 16 se ha detectado en aproximadamente el 24% de las mujeres con infección por el virus del papiloma humano; mientras que el tipo 18 se ha detectado en aproximadamente el 9% (Crosbie *et al*, 2013).

Estructuralmente, los VPHs son pequeños (aprox 50nm de diámetro) y están constituidos por una doble cadena de ADN. Aunque el genoma viral puede variar ligeramente entre los diferentes tipos de VPH. La cápside del virus está formada por dos proteínas L1 y L2; la proteína L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes. La proteína L2 es un componente menor del virión y se cree que puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión. La proteína L2 interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad.

La expresión de genes virales es mínima y en particular, la expresión de los oncogenes E6 y E7 están bajo un control muy estricto, y sus proteínas son discretamente detectables (Fig.1) (Zaldívar, 2012; Doorbar *et al*, 2012).

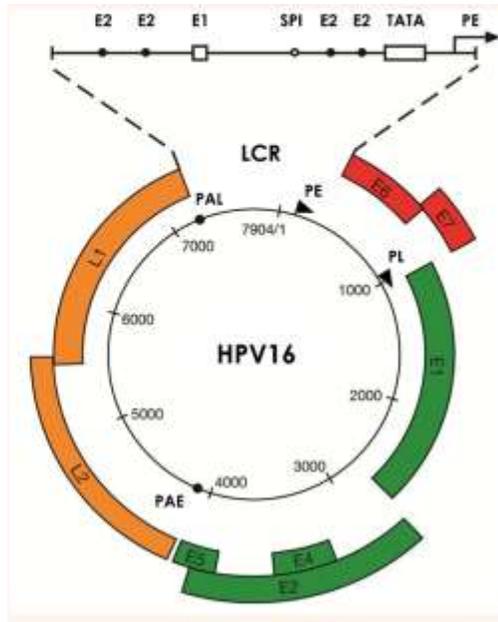


Figura. 1 Genoma viral del VPH 16; se muestra las regiones que codifican para proteínas tempranas y tardías, mostrando en rojo las que tienen una acción importante en la transformación celular y la generación del cáncer (Tomado de Doorbar *et al*, 2012).

### 3.1.1. Ciclo de vida

El virus del papiloma humano sólo infecta a células epiteliales y depende de la vía de diferenciación de las mismas para completar su ciclo de vida. La infección por el VPH se da probablemente por microabrasiones en la capa basal del epitelio; la internalización infecciosa toma varias horas, después de lo cual el ADN viral se libera de la cápside y se transporta en el núcleo como material genético libre. La diferenciación de las células que están destinadas para la madurez y la senescencia, se da en la capa suprabasal y por lo tanto no expresan la maquinaria replicativa que el virus necesita; para eludir este problema, el VPH codifica dos proteínas E6 y E7 que en conjunto promueven la proliferación celular, prolongan la progresión del ciclo celular y previenen la apoptosis. Las proteínas L1 y L2 de la cápside se expresan en las capas más superficiales del epitelio, donde tiene lugar el ensamblaje viral, y por último, las nuevas partículas virales infecciosas (viriones) se desprenden de la superficie epitelial (Fig.2) (Crosbie *et al*, 2013; Hellner *et al*, 2009).

Para completar el ciclo infeccioso del virus, la célula debe someterse a la diferenciación terminal, un requisito previo esencial para el ensamblaje y la liberación del virión. Sin embargo en algunas infecciones por VPH de alto riesgo las proteínas E6 y E7 son tan eficaces en el bloqueo de los reguladores negativos del ciclo celular que las células infectadas nunca maduran (Fig. 2) (Crosbie *et al*, 2013; Johansson *et al*, 2013).

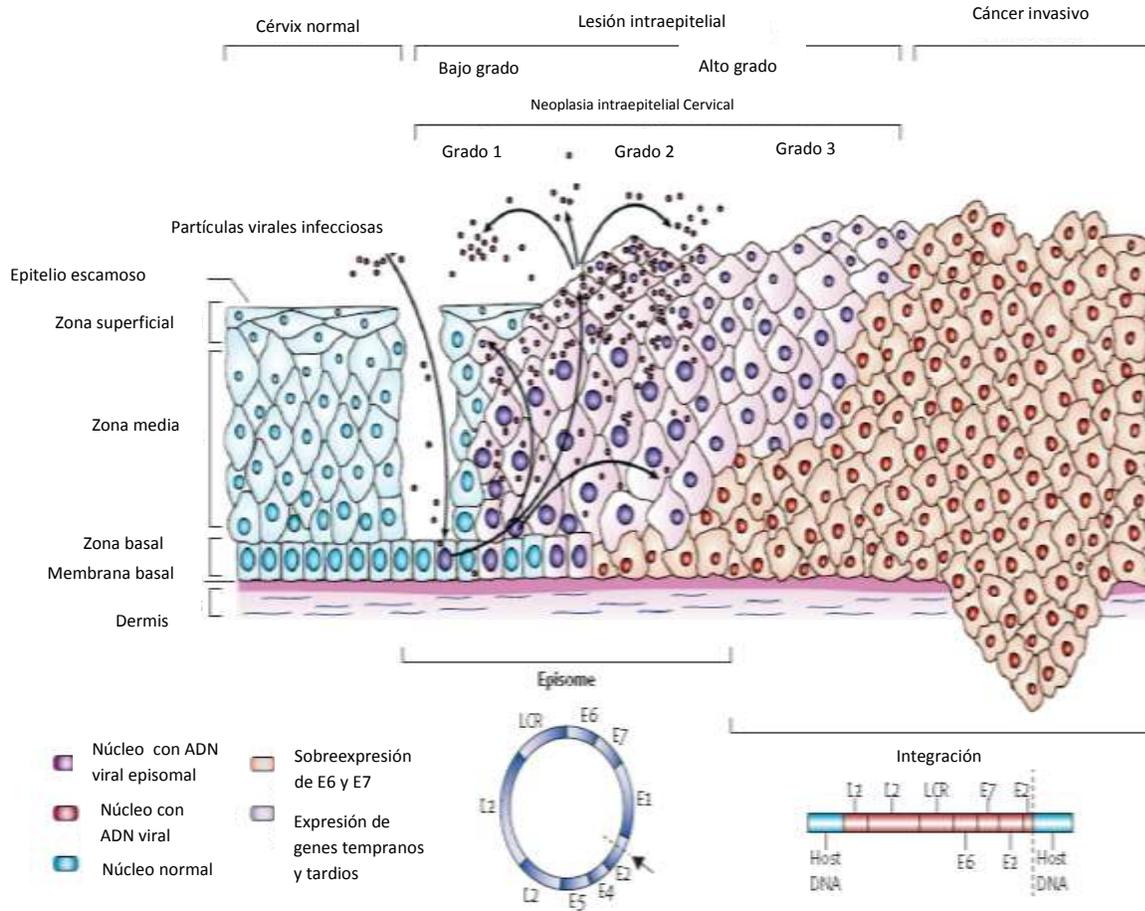


Figura. 2 Ciclo de vida del VPH. Donde se puede observar que los viriones entran a través de microabrasiones e infectan células bases; también se observan los diferentes estadios de la enfermedad con lesiones de bajo y alto grado y el estadio de cáncer avanzado; junto con la intervención del VPH encada una de estas etapas (Tomada de Crosbie *et al*, 2013).

### 3.1.2. Infección por VPH

Uno de los más importantes descubrimientos científicos de los últimos 30 años es el nexo entre la infección por virus del papiloma humano del cuello uterino y el cáncer cervical (Crosbie *et al*, 2013).

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

A nivel mundial los tipos más comunes de virus del papiloma humano en cáncer cervical son: 16 (57%), 18 (16%), 58 (5%), 33 (5%), 45 (5%), 31 (4%), 52 (3%), y 35 (2%) (Crosbie *et al*, 2013) (Fig. 3).

La respuesta inmune del huésped es importante para el control del crecimiento neoplásico. La prevalencia de la infección por el VPH y la progresión de las lesiones del cuello uterino es más frecuente en mujeres inmunodeficientes que en mujeres inmunocompetentes (Chagas *et al*, 2013; Yang *et al*, 2013).

La persistencia del VPH en el tracto genital se relaciona con la falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos; así como por la inducción de linfocitos T reguladores antígeno-específicos, su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser *et al*, 2007; Molling *et al*, 2007; Nakamura *et al*, 2007; Piersma, *et al*, 2007; Adurthi *et al*, 2008; Welters *et al*, 2008).

Los VPH de alto riesgo han desarrollado varios mecanismos que reducen la función del sistema inmune y provocan una regulación a la baja en la expresión de citocinas proinflamatorias, mientras que las citocinas anti-inflamatorias que impiden la migración de las células inmunitarias al sitio de la infección son reguladas positivamente (como la IL-10) (Crosbie *et al*, 2013).

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

Figura. 3 Tipos más comunes de VPH que se encuentran en lesiones cancerosas en el mundo. Donde se puede observar que el tipo 16 y 18 ocupan los principales puestos (Tomada de Crosbie *et al*, 2013).

La respuesta de las células T específicas para el VPH se ha detectado mediante la medición de liberación de citocinas, proliferación y citotoxicidad; pero la prevalencia de las células T específicas para el virus del papiloma humano en sangre periférica de mujeres con lesiones intraepiteliales es muy bajo (Crosbie *et al*, 2013). Sin embargo, un número importante de lesiones que contienen VPH de alto riesgo no progresa a tumores malignos; por lo tanto deben existir cofactores genéticos y ambientales que están involucrados en la predisposición a la enfermedad (Chagas *et al*, 2013; Yang *et al*, 2013).

### 3.2. Sistema inmune

El sistema inmune tiene múltiples funciones y evolucionó para proteger a los animales de la invasión de los microorganismos patógenos y el cáncer. Tiene la capacidad de generar una enorme variedad de células y moléculas que pueden reconocer y eliminar de forma específica una diversidad casi ilimitada de invasores extraños (Goldsby *et al* 2004). Este sistema permite que a pesar de vivir en un ambiente densamente poblado de agentes microbianos potencialmente patógenos, sólo en pocas ocasiones suframos procesos infecciosos evidentes desde el punto de vista clínico (Fainboim & Gafner 2005).

Desde el punto de vista funcional, una reacción inmunitaria puede dividirse en dos actividades vinculadas: reconocimiento y respuesta. Este sistema está capacitado para reconocer diferencias químicas sutiles que distinguen un agente patógeno extraño de otro. Más aún, el sistema inmunitario incorpora diversas células y moléculas para oponer una respuesta apropiada, la llamada reacción efectora que suprima o neutralice el agente patógeno (Goldsby *et al*, 2004).

Aunque la inmunidad es única, sus componentes se suelen asignar a dos grandes bloques que trabajan en coordinación para mantener nuestra integridad, que son la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Regueiro, 2011).

### **3.2.1. Inmunidad innata**

La inmunidad innata o inespecífica, que tienen en mayor o menor medida todos los seres vivos, carece de memoria inmunológica pero en cambio es rápida-Innata significa que nacemos con ella-. La inmunidad innata es, por lo tanto, capaz de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio y durante sus primeras fases. Inespecífica hace referencia a que no identifica patógenos concretos, sino más bien grupos de patógenos (Regueiro, 2011) (Fig. 4).

### **3.2.2. Inmunidad adquirida**

La inmunidad adaptativa, específica o adquirida, es exclusiva de vertebrados. Tarda una semana en desarrollarse y es la responsable de la memoria inmunológica - adaptativa significa que se adapta al patógeno-. Específica alude a que identifica patógenos muy concretos, a los que reconoce por sus antígenos (Regueiro, 2011).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar microbios de distintos tipos (Abbas, 2004).

### 3.2.3. Inmunidad humoral y celular

La inmunidad humoral cuenta con moléculas presentes en la sangre y en las mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos, producidas por unas células denominadas linfocitos B. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas, debido a que los anticuerpos segregados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción (Abbas, 2004).

La inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T; los microbios intracelulares como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped (Abbas, 2004) (Fig. 4).

Los linfocitos T no producen anticuerpos, los receptores para el antígeno son moléculas de membrana distintas de ellos, pero con una estructura afín. Estas células presentan una especificidad restringida hacia los antígenos; no reconocen más que los de tipo peptídico después de unirse a unas proteínas del huésped codificadas por los genes pertenecientes al complejo principal de histocompatibilidad (Abbas, 2004).

Muchos virus comúnmente dan una baja en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I esto ayuda a evitar la respuesta de las células T citotóxicas (Brestovac *et al*, 2013).

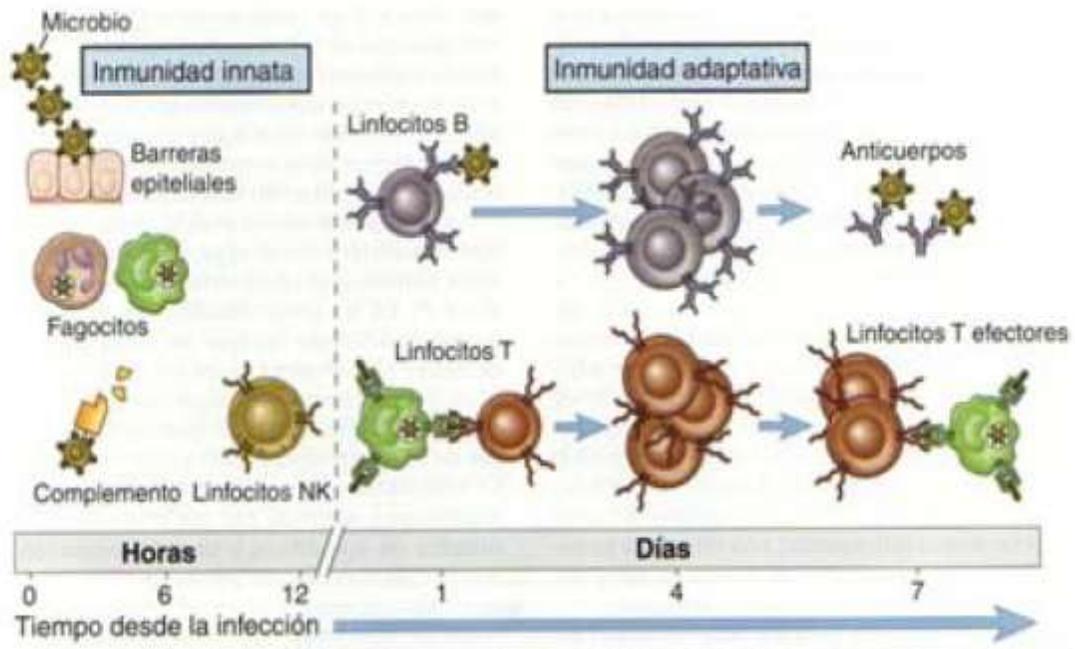


Figura. 4 Tipos de inmunidad; donde se hace referencia a los dos tipos de inmunidad existentes en el cuerpo. (Tomada de Abbas, 2004).

### 3.3. Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es parte del genoma que codifica para moléculas que son importantes en el reconocimiento inmunitario lo que incluye interacciones entre células linfoides y otros tipos celulares (Weir *et al*, 1993).

El MHC fue estudiado inicialmente y llamado así como un complejo genético que influye en la capacidad de un organismo para aceptar o rechazar tejido trasplantado de otro miembro de la misma especie. En diferentes estudios se vio que las moléculas codificadas por el MHC tienen un papel fundamental en la determinación de las inmunoreacciones adaptativas, junto con el conjunto específico de moléculas MHC expresadas por un individuo influye en el repertorio de antígenos a los cuales las células T CD4+ y T CD8+ de ese individuo pueden reaccionar; el MHC influye en la reacción de un individuo a diversos antígenos de microorganismos infecciosos y por tanto se le ha implicado en la susceptibilidad a enfermedades, así como en el desarrollo de la autoinmunidad (Kindt *et al*, 2007).

Las células y factores humorales del sistema inmunitario innato en mayor parte, han evolucionado para reconocer carbohidratos o marcadores de lípidos distintivos que se encuentran en muchos tipos de patógenos, pero no en el huésped normal (Stites *et al*, 2000).

El sistema inmunitario adquirido, en contraste tiene como blancos, principalmente, antígenos peptídicos derivados de proteínas extrañas. Este énfasis sobre los péptidos refleja la especificidad a antígenos de los linfocitos T, cuyos receptores de antígeno (TCR) sólo reconocen los complejos formados por los péptidos enlazados a las proteínas del MHC sobre las superficies de las células huésped (Stites *et al*, 2000) (Fig. 5). El conocimiento reciente de que las células asesinas naturales expresan receptores para antígenos del MHC de clase I y el hecho de que la interacción entre el receptor y el MHC puede dar lugar a la inhibición o activación, amplían las funciones conocidas de esta familia de genes (Kindt *et al*, 2007).

La función de las moléculas del MHC es unirse a fragmentos peptídicos derivados de agentes patógenos y desplegarlos sobre la superficie celular para su reconocimiento por las células T apropiadas (Murphy *et al*, 2008).

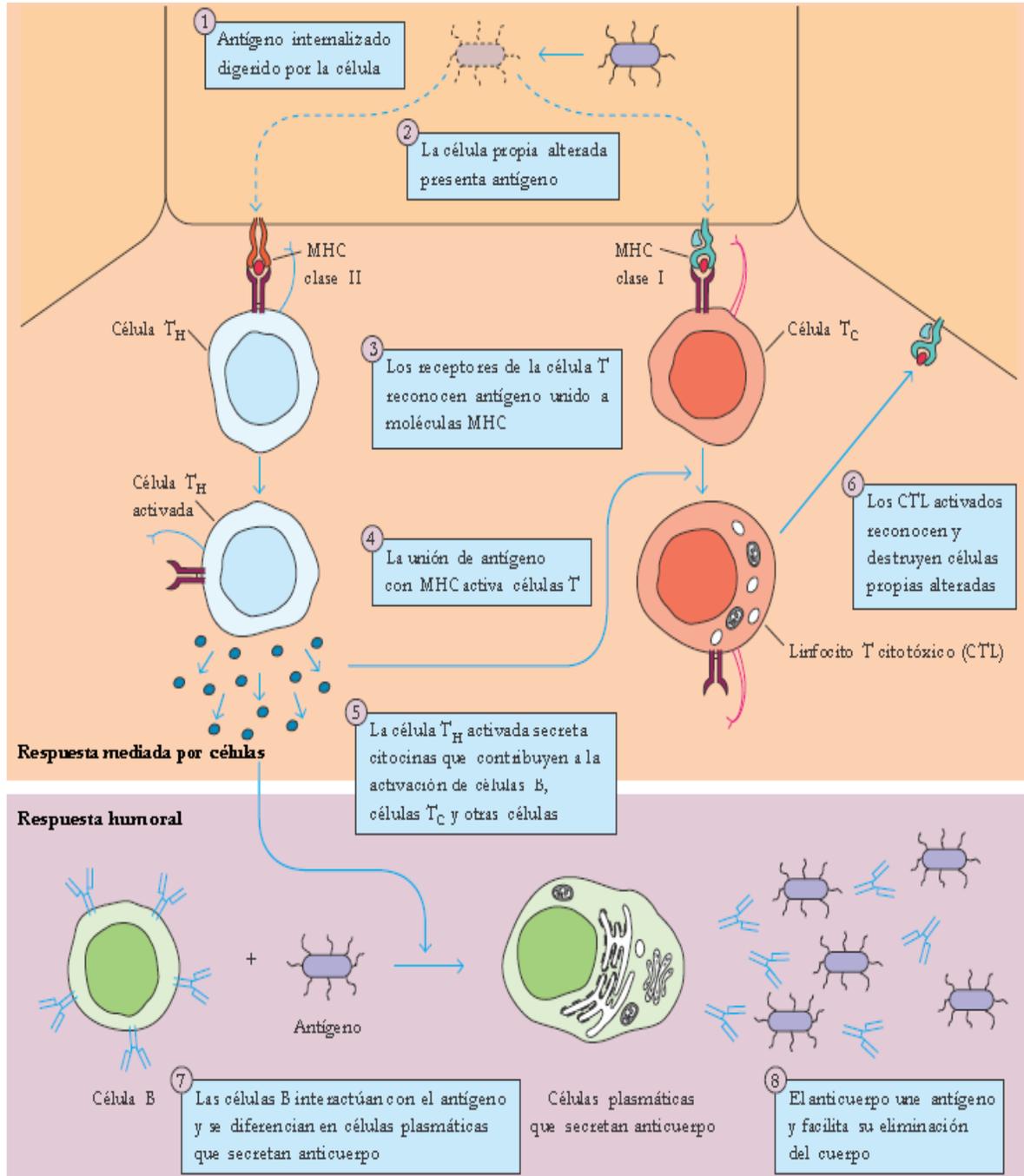


Figura. 5 Vías del MHC; se puede observar dos rutas de presentación de antígenos la que presenta antígenos a células TCD+4 y TCD8+ a través de sus moléculas correspondientes (Tomada de Kindt *et al*. 2007).

El sistema inmunitario del ser humano y de otros mamíferos ha evolucionado a mecanismos para muestrear las muchas proteínas en sus ambientes y romperlas en péptidos (secuencia llamada transformación de antígeno) y en seguida hacer a estos péptidos accesibles para reconocimiento por las células T (Stites *et al*, 2000).

Para funcionar como antígeno de célula T las proteínas deben transformarse en péptidos que puedan vincularse con moléculas de las células del MHC del huésped. Según el origen del antígeno, su transformación se puede producir a través de cualquiera de dos vías principales: la endocítica y la citosólica (Stites *et al*, 2000) (Fig.5).

### 3.3.1. Vía endocítica (MHC II)

La vía endocítica suministra los péptidos antigénicos usados por células presentadoras de antígeno especializadas para activar células T cooperadoras (Stites *et al*, 2000) (Figs. 5 y 6).

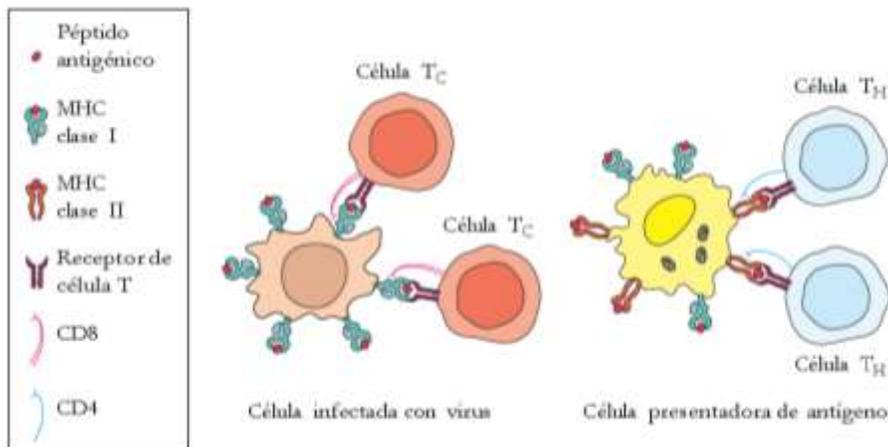


Figura. 6 Presentación de antígenos a células T; se puede observar que el MHC de clase I sólo presenta antígenos a células T CD8+ (Tc) y las moléculas de MHC de clase II presentan a células T CD4+ (Th o TH) (Tomada de Kindt *et al*. 2007).

### 3.3.3. Vía citosólica (MHC I)

Las proteínas antigénicas también pueden derivar de patógenos que viven dentro de células infectadas del huésped. Esta categoría incluye a los virus que dependen de la maquinaria sintética de proteínas del huésped, los antígenos de estos patógenos intracelulares se transforman a través de una secuencia de eventos que participa en el recambio normal de las proteínas. En el proceso de ruptura de la proteína se libera una gran cantidad de péptidos cortos, algunos de estos péptidos se vinculan luego con proteínas del MHC de clase I y se llevan a la superficie celular para su presentación a los linfocitos T CD8+ (Fig.7); las proteínas del MHC de clase I, se expresan en la mayoría de las células nucleadas humanas y aseguran que cualquier célula infectada pueda presentar antígenos a las células T citotóxicas (Stites *et al*, 2000; Zhang, 2013) (Fig. 5).

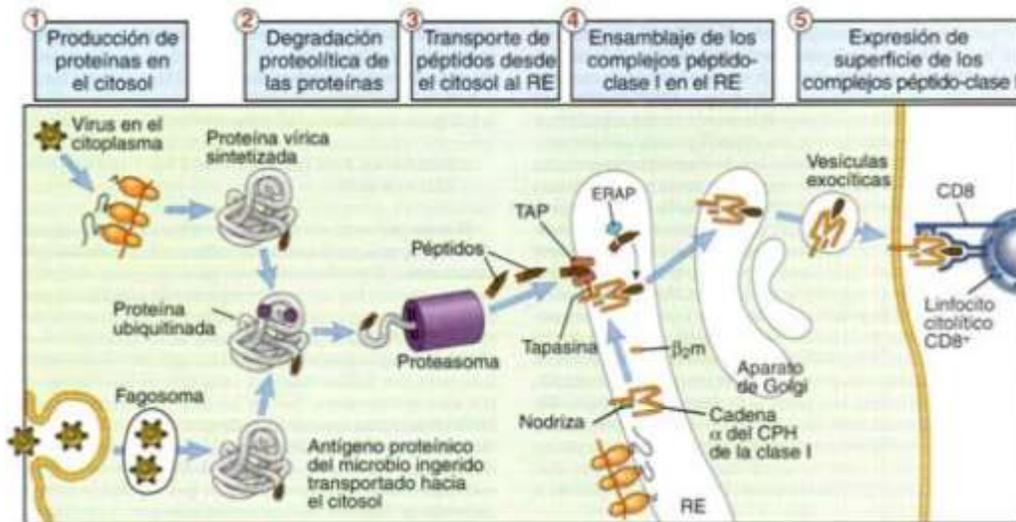


Figura. 7 Procesamiento de antígeno; se puede ver el proceso por el cual se captura, se cortan los péptidos y se presentan a los linfocitos T CD8+ (Tomada del Abbas, 2004).

El MHC de clase I integra la degradación y la preparación de los péptidos para ser cargados para su presentación en moléculas de MHC, por lo tanto la regulación de estas moléculas se produce en múltiples niveles y tienen implicados numerosos componentes de la maquinaria de presentación de antígenos (Wang *et al*, 2013) (Fig. 7).

### 3.3.5. Polimorfismo del MHC

El MHC contiene un número amplio de genes individuales que pueden agruparse en tres clases con base en la estructura y función de sus productos. Los productos de estos genes a menudo se denominan antígenos MHC porque se definieron primero mediante análisis serológicos, es decir, por medio del uso de anticuerpos (Weir *et al*, 1993).

Los estudios sobre este grupo génico se originaron cuando se descubrió que el rechazo de tejido ajeno es el resultado de una reacción inmunitaria a moléculas de la superficie celular, ahora llamada antígenos de histocompatibilidad (Kindt *et al*, 2007).

Las moléculas de histocompatibilidad pueden influir en la capacidad de respuesta inmunitaria frente a antígenos particulares moldeando el repertorio de células T maduras, llamadas en su conjunto como genes de histocompatibilidad. Las moléculas codificadas por los genes de histocompatibilidad en humanos son conocidas como antígenos leucocitario humanos (HLA) mientras que en ratón son denominados como antígenos H-2 (Rojas *et al*, 2001; Anibal *et al*, 1996; Guizar, 2001). Aunque la disposición de los genes es un poco distinta en las dos especies, en ambos casos los genes del MHC se organizan en regiones que codifican tres clases de moléculas (Kindt *et al*, 2007).

Existen al menos tres familias de antígenos codificados por genes situados en la región MHC: los antígenos de clase I, II, III. Dos de estas familias de antígenos MHC corresponden a los antígenos principales de histocompatibilidad (clase I y II) por ser las que participan en la comunicación entre células (célula-linfocito o linfocito-linfocito), la presentación de antígenos, regulación inmune y vigilancia inmunológica, entre otros (Anibal, 1996).

En el hombre existen tres HLA de clase I distintas, éstas son HLA-A HLA-B y HLA-C, mientras que en ratón sus equivalentes son H-2K H-2D y H-2L; todas ellas cumplen la función de presentación de péptidos a los linfocitos TCD8+ (Roitt, 2008; Stites *et al*, 2000). Un análisis más cuidadoso del H-2 con numerosas cepas murinas demostró que al sistema aloantigénico lo forman numerosos y diferentes alelos, los cuales se designaron por pequeñas letras en la parte superior derecha (Zambrano, 1994). La

organización del MHC humano presenta diferencias morfológicas con el H-2 del ratón; no obstante su función y sus productos parecen análogos (Zambrano, 1994).

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

Un mecanismo de escape de la vigilancia inmune del huésped, a menudo relacionado con tumores, es una alteración en la expresión de las moléculas MHC-I en células tumorales. Por lo tanto, una pérdida completa de moléculas MHC-I da como resultado una resistencia a linfocitos T citotóxicos, pero que a su vez hace que las células tumorales sean susceptibles a las células Natural Killer (NK). Se ha informado de la pérdida total o parcial de la expresión de moléculas MHC-I en diferentes tipos de tumores humanos (Rodríguez *et al*, 2012; Hage *et al*, 2013).

La baja expresión de moléculas de MHC de clase I ha sido un hallazgo frecuente e importante en el CaCu (Brestovac, *et al*, 2013).

### **3.4. Células Estromales Mesenquimales (CEMs)**

Entre los componentes celulares en el microambiente tumoral se encuentran varias células no inmunes, tales como las células estromales mesenquimales (CEMs) que se han convertido en jugadores críticos en el crecimiento tumoral, neovascularización, invasión y metástasis (Tchou *et al*, 2013; Bernardo & Fibbe, 2013).

La médula ósea contiene células madre que son capaces de diferenciarse en diversos linajes hematopoyéticos. También existen células de médula ósea con distinta capacidad de pluripotencialidad a diferenciarse a células no hemapotopoyéticas; éstas son denominadas células madre mesenquimales (Takeuchi *et al*, 2007)

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

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

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

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios fundamentales para definir a las CEMs: primero, adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo; segundo, expresión de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, la capacidad de diferenciación *in vitro* a osteocitos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Páez *et al*, 2007; Hung *et al*, 2004).

En las últimas dos décadas las CEMs han ganado considerablemente atención por su uso potencial como agentes regenerativos en una serie de enfermedades agudas y crónicas (Duffy *et al*, 2011).

Además de sus propiedades de células madre, las CEMs han demostrado poseer grandes habilidades inmunoregulatoras, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras, además se ha observado que tienen la capacidad de influir en la respuesta inmune innata y adaptativa; en algunos estudios se asocia con la inhibición de la activación de células T efectoras con o sin un aumento en el número de células T reguladoras. Hallazgos recientes han demostrado que las CEMs interactúan activamente con componentes del sistema inmune innato y a través de esto muestran efectos anti-inflamatorios (Duffy *et al*, 2011; Bernardo & Fibbe, 2013).

Se ha de mostrado que las CEMs tienen una gran capacidad para ejercer sus efectos antiinflamatorios en una serie de modelos *in vivo* incluyendo la enfermedad injerto contra huésped, encefalomiелitis autoinmune y enfermedades de las vías respiratorias. Dados todos estos datos que apoyan el papel antiinflamatorio y pro-reparador de las CEMs, estas se han utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias (English, 2013; Kim *et al*, 2011).

Un gran número de estudios *in vitro* han proporcionado información sobre los efectos de las CEMs en la respuesta inmune innata y adaptativa; se ha visto que tienen la capacidad de interferir con muchos componentes del sistema inmune innato incluyendo el complemento, receptores tipo Toll, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y células NK (English, 2013).

En lo que respecta a la respuesta inmune adaptativa las CEMs pueden inhibir directamente la función de las células T, cambiar el equilibrio de los linfocitos T cooperadores e inducir células T reguladoras funcionales. Se sabe poco del efecto de las CEMs sobre las células B, pero algunos estudios sugieren que también pueden modular su proliferación, así como su función (English, 2013; Kim *et al*, 2011)

Diversos estudios demuestran que las CEMs inhiben la proliferación de células dendríticas, así como la maduración de linfocitos T y también atenúan a células NK. Varios factores han sido asociados con estas propiedades inmunomoduladoras como es el TGF- $\beta$ , PGE-2, IL-10, IDO e IFN- $\gamma$  (Tse *et al*, 2003; Waterman *et al*, 2010; Kim *et al*, 2011)

A pesar de los muchos beneficios terapéuticos potenciales de las CEMs, se ha encontrado que tienen varios efectos adversos, especialmente en el contexto de su participación directa e indirecta en diferentes tipos de cáncer. Básicamente, el papel de las CEMs en el cáncer se puede dividir en la implicación indirecta a través del efecto modulador del tumor y la participación directa a través de la transformación maligna de las propias CEMs (Wong, 2011). Las CEMs también tienen efectos inmunomoduladores complejos, pueden contrarrestar la inflamación mediante la supresión de la respuesta inmune del huésped y la prevención de la fibrosis (Klopp *et al*, 2011).

Se ha visto que cuando las CEMs son trasplantadas o inyectadas, tienen la capacidad de migrar a una variedad de órganos y tejidos, esta capacidad se ve incrementada en sitios de inflamación y ciertas patologías debido a su capacidad de reparación y remodelación de tejidos (Chapel *et al*, 2003; Albarenque *et al*, 2011) (Fig. 8).

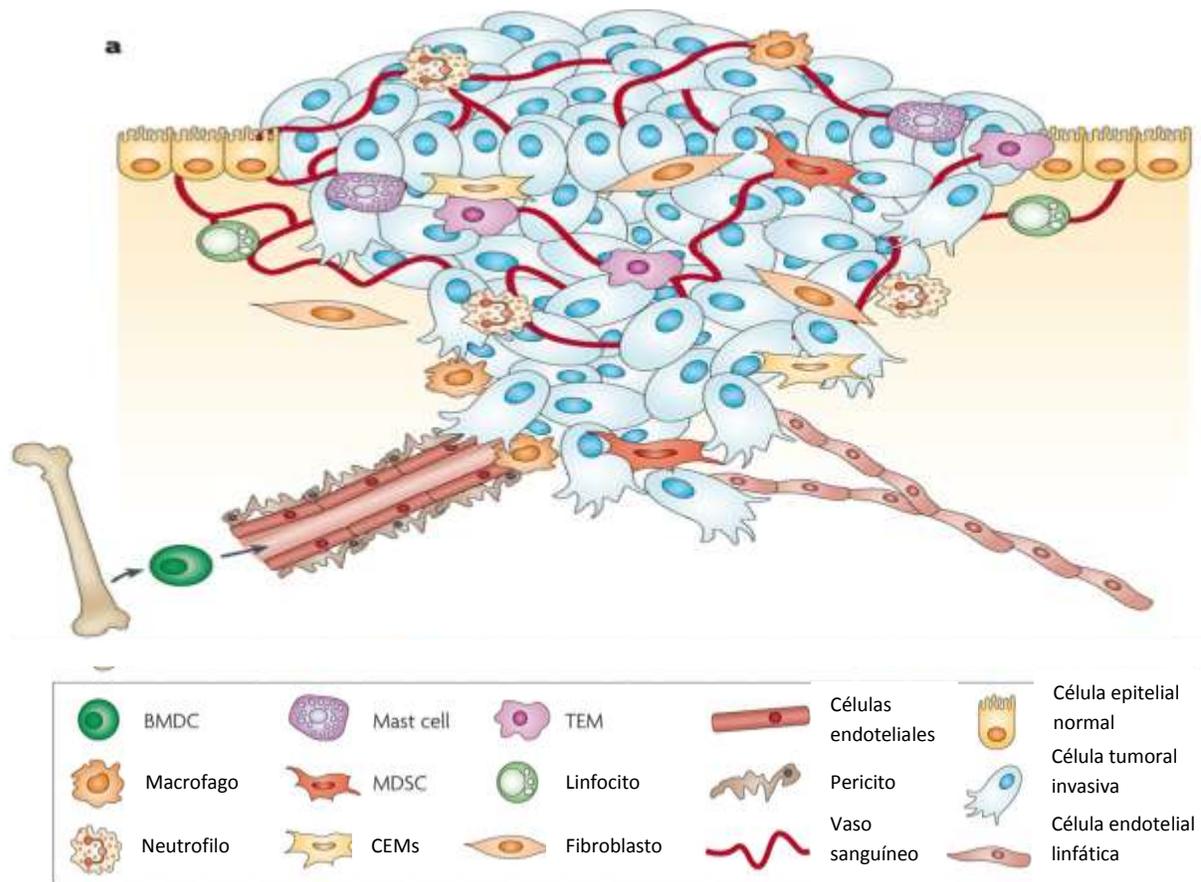


Figura 8. Imagen que representa un tejido tumoral donde se puede observar las diversas células que lo conforman; se ve que este microambiente tumoral está conformado por diversas células tanto inmunes como no inmunes, incluyendo las CEMs (Tomada de Joyce & Pollard, 2009).

Las CEMs administradas por vía intravenosa son capaces de injertarse en los tejidos tumorales. El medio inflamatorio producido por tumores juega un papel importante en el desarrollo de tropismo tumoral de las CEMs (Usha *et al*, 2013) (Fig. 8).

En el caso particular de los tumores, se ha demostrado que existen mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral similares a los producidos en heridas que proveen las condiciones propicias para el arribo de CEMs. Algunos estudios han mostrado que favorecen el implante y crecimiento tumoral, debido a sus propiedades inmunomoduladoras, inmunoregulatoras y pro-angiogénicas (Yen & Yen, 2008; Karnoub *et al*, 2007; Djouad *et al*, 2003; Lin *et al*. 2013; Bernardo & Fibbe, 2013; Freitas, 2013) (Fig. 9).

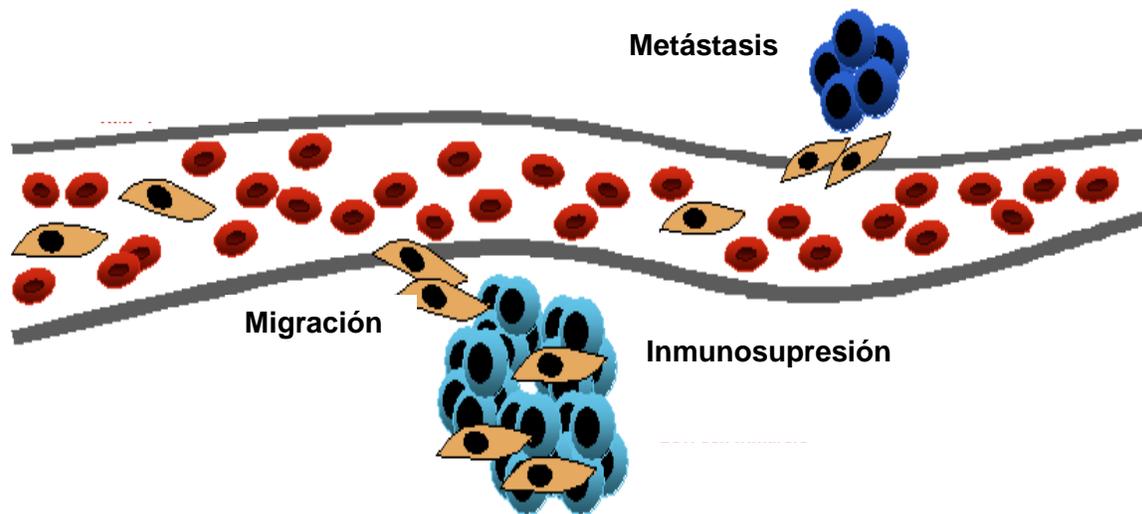


Figura 9. Se observa que las CEMs migran al sitio donde se encuentran las células tumorales, así como a tejidos metastásicos, viajando por el torrente sanguíneo (Tomada de Yen & Yen, 2008).

Las CEMs en los tumores muy probablemente toman las funciones que ejercen en la cicatrización de las heridas y se diferencian en fibroblastos, endotelio y adipocitos y también secretan citocinas que pueden aumentar la proliferación de las células tumorales (Klopp *et al*, 2011; Freitas, 2013).

Se ha reportado que CEMs aisladas de diversas fuentes suprimen la proliferación de células T CD4+ y T CD8+ de manera dependiente de la concentración; ha sido reportado que tanto en el contacto célula-célula como en la liberación de factores solubles juegan un papel importante en la supresión de células T (Di Nicola *et al*, 2002; Tse *et al*, 2003; Duffy *et al*, 2011; Bernardo & Fibbe, 2013).

Se ha dado un debate sobre el papel de las CEMs en la modulación del tumor. Algunos estudios han apoyado que las CEMs pueden suprimir el crecimiento tumoral, mientras que otros creen que pueden contribuir a la protección del tumor a través de efecto antiapoptótico, proliferación tumoral, metástasis y resistencia a fármacos de las células cancerígenas. Aunque en trabajos se ha demostrado un efecto antiproliferativo ejercido por las CEMs en células cancerosas, también en muchos se ha visto un efecto antiapoptótico (Wong, 2011; Kucerova *et al*, 2010).

Sobre células dendríticas (DC) las CEMs son capaces de regular la disminución de la expresión de moléculas co-estimuladoras, inhibir la diferenciación *in vitro* de DC, reducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias y aumentar la secreción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 (Morandi *et al*, 2008; Liu *et al*, 2006; Liu *et al*, 2013).

Las propiedades de modulación inmune de las CEMs parece ser bastante complejas, ya que se ha visto que esta modulación es atribuible a la secreción de factores solubles, pero también que depende del contacto celular con las células inmunes. (Di Nicola *et al*, 2002; Waterman *et al*, 2010)

Varios estudios han utilizado CEMs humanas para evaluar sus efectos en el crecimiento tumoral en modelos de ratón debido a la facilidad de expansión en modelos de xenoinjertos. Sin embargo en estos modelos el estroma se compone de células de ratón, mientras que las células tumorales y las CEMs son de origen humano. Por lo que a causa de los linajes mixtos de células, los efectos de las CEMs en el crecimiento del tumor pueden ser afectado por interacciones desconocidas (Suzuki *et al*. 2011).

La modulación de la respuesta inmune está mediada a través de una serie de diversos mecanismos, sin embargo, la mayoría de éstos implican la producción de factores solubles con propiedades inmunosupresoras. Diferentes estudios *in vitro*, así como en modelos *in vivo*, demuestran claramente la capacidad de las CEMs para cambiar el equilibrio de un perfil pro-inflamatorio Th1 para un perfil antiinflamatorio Th2 que secreta niveles elevados de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 entre otras (English, 2013; Kucerova *et al*, 2010).

En diversos estudios se ha encontrado que después de la administración de las CEMs hubo un incremento en la concentración de IL-10 e IL-13 y el aumento de células T reguladoras, así como una reducción directa de INF- $\gamma$  (Duffy *et al*, 2011; Bernardo & Fibbe, 2013).

### **3.5. Interleucina 10 (IL-10)**

La interleucina 10 (IL-10) procede de células con perfil Th2, células T CD8+, monocitos, células dendríticas, queratinocitos y células B activadas. Se llamaba originalmente factor inhibidor de la síntesis de citocina debido a su propiedad de inhibir la producción de citocina por linfocitos T activados. La IL-10 inhibe la producción de citocinas como IL-12 y INF- $\gamma$ , por parte de células Th1 junto con el GM-CSF, además de disminuir la expresión de MHC-I (Yue *et al*, 1997; Hussain *et al*, 2012; Soleymaninejadian *et al*, 2012; Liu *et al*, 2006; Liu *et al*, 2013), junto con la producción de citocinas dada por las células NK y los macrófagos. De hecho, la supresión de la actividad Th1 parece deberse a un efecto indirecto causado por supresión de la expresión del MHC de clase II y al deterioro consecuente de las funciones celulares accesorias de macrófagos y de DC's (Stites *et al*, 2000).

Las citocinas son moléculas que son importantes en la defensa de los organismos contra las infecciones virales. Son producidas por macrófagos, monocitos y linfocitos, y actúan de forma indirecta mediante la determinación de un patrón de respuesta inmune. La capacidad de secretar diferentes citocinas parece ser importante en la respuesta inmune (Chagas *et al*, 2013).

Los inmunólogos tumorales han descubierto muchos mecanismos celulares y moleculares que median el escape del tumor de las células inmune de vigilancia. La falta de señales necesarias para activar el sistema inmune, el aumento de la concentración de factores inmunosupresores y la acumulación de células inmunosupresoras en el microambiente tumoral indican que la regulación inmune tiene un papel activo en la progresión del cáncer. La identificación de moléculas específicas y vías de señalización que regulan el microambiente del tumor proporcionara importantes objetivos para la inmunoterapia del cáncer (Yu *et al*, 2007).

La alteración en los niveles de citocinas en la infección de cuello uterino por VPH es un factor importante en la evaluación la progresión de lesiones malignas que se cree que influye en la persistencia o la eliminación de la infección (Yang *et al.* 2013). Hay una gran cantidad de literatura que muestra un cambio en los perfiles de citocinas de Th1 a Th2, específicamente una disminución de IL-12 y un aumento en la IL-10 con la persistencia de la infección por VPH y el aumento del grado de la enfermedad cervical (Rodríguez *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2012).

Existen varios factores asociados a los tumores que son bien conocidos por suprimir la maduración de células inmunes, éstos incluyen la IL-6, VEGF, HGF, prostaglandina E2, óxido nítrico y la IL-10, y se cree tienen un papel crucial en el microambiente tumoral con respecto a la respuesta inmunológica (Yu *et al.*, 2007; Soleymaninejadian *et al.*, 2012). La IL-10 se puede expresar por una gran variedad de células, por lo general en respuesta a un estímulo de activación (Moore *et al.*, 2011).

La IL-10 es de particular interés en relación con el cáncer, ya que tiene propiedades inmunosupresoras (Chagas *et al.*, 2013). La IL-10 también reduce fuertemente la proliferación de células T específicas por la disminución de la capacidad de presentar antígenos a través de la regulación a la baja de la expresión del MHC de clase II (Tsurma *et al.*, 1998).

Existen reportes que sugieren que algunas células tumorales pueden evadir la respuesta inmune del huésped mediante la producción de IL-10, sin embargo se tiene poca información del mecanismo por el cual se secreta localmente la IL-10 (Tsurma *et al.*, 1998).

Los profundos efectos inmunosupresores de la IL-10 han llevado a numerosos estudios de su expresión y función en el cáncer, trasplante de medula ósea y de órganos sólidos. La expresión elevada de IL-10 ha sido reportada en ciertos tipos de cáncer como por ejemplo de ovario, varios carcinomas, melanoma y en linfoma/mieloma; se reporta que esta elevación puede ocurrir por varias razones; como el ser secretada por las mismas células tumorales por la supresión de la respuesta antiinflamatoria. En otros casos se ha reportado que la IL-10 puede ser producida por las células activas que intervienen en una reacción antitumoral del anfitrión y podría ser un indicador de una respuesta inflamatoria potente en lugar de la inmunosupresión (Moore *et al.*, 2011). Una posibilidad sería que la IL-10 en las proximidades de un tumor obstaculizaría la inducción o la función

efectora de una respuesta inmune antitumoral, ya que se ha visto que la IL-10 es capaz de inhibir la función de DC's, lo que podría debilitar la inducción de una respuesta contra las células tumorales (Moore *et al*, 2011).

En los estudios de la expresión y función de la IL-10 en el cáncer muestra resultados muy diferentes en función de tiempo, dosis y la ubicación de la expresión, y en algunos escenarios se observan las actividades inmunosupresoras esperadas, mientras que en otros la IL-10 aumenta la respuesta inmune o inflamatoria. Los mecanismos celulares que subyacen a estos fenómenos no son claros y su elucidación es importante para un uso exitoso de esta citocina en la medicina clínica (Moore *et al*, 2011).

Información reciente demuestra que la IL-10 es producida por una variedad amplia de células de tumores sólidos y hematopoyéticos (Tsurma *et al*, 1998). En un trabajo realizado *in vitro* con líneas celulares de CaCu y CEMs se observó que la secreción de IL-10 baja la expresión de moléculas HLA-I (Montesinos *et al*, 2013).

#### **4. Planteamiento del problema y justificación.**

El cáncer de cérvix (CaCu) es un problema de salud pública en todo el mundo, representa el 9% de las neoplasias malignas en mujeres a nivel mundial (529,800 casos) y 8% (275, 100) de las muertes por cáncer en mujeres (Montalvo *et al*, 2011). En México es una de la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres y cada año se diagnostican alrededor de 12,000 casos nuevos de CaCu invasor (INEGI, 2011).

Esta enfermedad se encuentra fuertemente asociada (cerca al 100%) con la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, en donde el VPH-16 es el tipo de papiloma carcinogénico más comúnmente encontrado en los tumores de cuello uterino a nivel mundial (Walboomers *et al*, 1999).

Se ha reportado que durante el desarrollo de la neoplasia cervical, varios factores inmunosupresores pueden intervenir para evitar la respuesta inmune celular de manera eficiente, ya que las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento inmune (Tindle, 2002). Los tumores de CaCu muestran comúnmente una disminución en la expresión de moléculas de MHC y en las moléculas del procesamiento de antígenos, lo cual está asociado con un bajo o nulo reconocimiento mediado por células T (Mehta *et al*, 2008). Este fenómeno está relacionado con la infiltración de células inmunosupresoras en el microambiente tumoral, tal como las

células T reguladoras y células estromales mesenquimales (CEMs), así como con la secreción de citocinas antiinflamatorias (Crosbie *et al*, 2013).

Nuestro grupo de investigación ha obtenido y caracterizado CEMs de tejidos normales de cuello uterino (CEM-CNOR) y de tumores avanzados de CaCu (CEM-CaCu). En estudios *in vitro* se encontró que las CEM-CaCu co-cultivadas con células tumorales de CaCu, favorecen la disminución en la expresión de moléculas HLA clase I en las células tumorales, evitando el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. Además la producción de IL-10 fue asociada con la disminución en la expresión de moléculas MHC clase I en las células tumorales (Montesinos *et al*, 2013).

Por otra parte en estudios *in vivo* se ha reportado que las CEMs favorecen de manera significativa el crecimiento tumoral cuando los ratones están protegidos contra este reto tumoral, junto con esto se encontró un incremento importante en la infiltración de linfocitos T con perfil regulador en el sitio del tumor, así como la disminución en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos al péptido RAHYNIVT en células obtenidas de bazo. Asimismo se logró observar en cultivo celular de los tumores el crecimiento de CEMs inoculadas lo que confirmó que estas células son capaces de arribar al sitio del tumor siendo inoculadas vía caudal (Contreras, 2011). En otro estudio *in vivo* se logró observar un ligero incremento de citocinas inmunosupresoras con perfil Th2 durante el crecimiento tumoral (Don, 2010).

En este estudio se plantea analizar en un modelo tumoral *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6, el efecto de células estromales mesenquimales obtenidas de tumores de cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu) sobre la expresión de moléculas MHC-I en células tumorales y su participación en el crecimiento tumoral. Los resultados de este estudio pueden ayudar a establecer estrategias terapéuticas que permitan contrarrestar la supresión inmunológica ejercida por las CEMs y mejorar la respuesta inmune antitumoral.

## 5. Hipótesis.

Se espera que en un modelo tumoral *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6, al inocular CEM-CaCu y células tumorales TC-1 (haplotipo H-2D<sup>b</sup>) la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> disminuya en las células tumorales y este fenómeno se asocie con un incremento en la concentración de IL-10 y por lo tanto en un mayor crecimiento tumoral.

## **6. Objetivos.**

### **6.1. Objetivo general**

Analizar el efecto CEM-CaCu sobre la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> en células tumorales TC-1 en un modelo tumoral en ratones de la cepa C57BL/6.

### **6.2. Objetivos particulares**

- ✓ Inocular ratones de la cepa C57BL/6 con células tumorales TC-1 en presencia y ausencia de protección inmunológica y de CEMs.
- ✓ Evaluar las cinéticas de crecimiento tumoral en los ratones inoculados.
- ✓ Evaluar la presencia de IL-10 en los cultivos de los tumores.
- ✓ Evaluar la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> en las células tumorales de los ratones tratados.

## **7. Materiales y métodos.**

### **7.1. Cultivos celulares**

Para la inducción de tumores se utilizaron células tumorales TC-1 derivadas de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6, las cuales expresan de manera permanente los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 junto con el gen Ras, además de ser histocompatibles a este modelo de ratón por presentar moléculas H-2D (Lin et al 1996). Estas células se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, USA) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 10%. También se emplearon estirpes de CEMs (humanas), las cuales se obtuvieron de Médula Ósea Normal (CEMs-MON), Cérvix Normal (CEMs-CNOR) y de Cáncer Cérvico Uterino (CEMs-CaCu). Estas estirpes celulares fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN SXXI. Todas las estirpes de CEMs utilizadas en este proyecto se caracterizaron por nuestro grupo de investigación con base en los parámetros morfológicos, fenotípicos y de diferenciación establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Montesinos et al, 2013). Posteriormente las CEMs se cultivaron con medio de cultivo consistente en DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con SFB al 15%. Antes de ser inoculadas, todas las células se cultivaron en condiciones de esterilidad y fueron mantenidas bajo condiciones

reguladas en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturante.

## **7.2. Ratones**

Para la inducción de tumores se emplearon 10 grupos de 6 ratones hembra cada uno de la cepa C57BL/6 (Haplotipo H2-D<sup>b</sup>) de 6-8 semanas de edad, se mantuvieron en condiciones estándar de Bioterio, con alimento y agua conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001.

## **7.3. Inmunización e inoculación de células para la inducción de tumores**

Para inducir protección inmunológica en los ratones C57BL/6, se emplearon 5 grupos de 6 ratones cada uno y se inmunizaron con tres dosis de péptido RAHYNIVTF (derivado de la proteína E7 de VPH16) (Invitrogen, USA) de 100µg cada una, vía cavidad peritoneal. El péptido aplicado se disolvió en PBS (Solución Salina de Fosfatos) y se emulsionó con adyuvante completo de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1 para la primera dosis. En las dos dosis subsecuentes se utilizaron 100µg del péptido emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, USA) en proporción 1:1, el tiempo transcurrido entre cada inmunización fue de aproximadamente de 10-12 días. El volumen total de antígeno y adyuvante fue de 100µl.

Los cinco grupos de ratones sin protección inmunológica y los cinco grupos que recibieron previamente protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF, fueron tratados 10 días después, con células tumorales TC-1 y CEMs, como se indica en la Tabla 1.

Tratamientos	No Inmunizados	INMUNIZADOS CON PÉPTIDO RAHYNIVTF
	TC-1:CEMs	TC-1:CEMs
	0:0	0:0
(-)	100,000:0	100,000:0
CEMs-MON	100,000:100,000	100,000:100,000
CEMs-CNOR	100,000:100,000	100,000:100,000
CEMs-CaCu	100,000:100,000	100,000:100,000

Tabla 1. Esquema de Inoculación de células tumorales y CEMs

Se les dio a los ratones un refuerzo de células tumorales TC-1 10 días después de iniciado el tratamiento.

#### 7.4. Medición de tumores

El tamaño de los tumores fue evaluado cada tercer día, posterior a la aplicación del refuerzo de células tumorales. El volumen del tumor se calculó en cada momento tras medir el largo y ancho del tumor con ayuda de un vernier y aplicando la siguiente fórmula  $v=(r1*r2^2)/2$  donde r1 y r2 son los valores obtenidos a partir de la medición perpendicular del tumor (Paz de la Rosa *et al*, 2009). Los ratones fueron sacrificados cuando el desarrollo de su tumor alcanzó un volumen de 2cm<sup>3</sup>.

##### 7.4.1. Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a la prueba estadística de Dunnett para probar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los volúmenes tumorales de los diferentes grupos.

#### 7.5. Determinación de moléculas H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup> en las células tumorales cultivadas

Después de evaluar el crecimiento tumoral, los ratones fueron sacrificados y los tumores extirpados. Los tumores fueron cortados en fragmentados pequeños (explantes), posteriormente fueron sembrados en una caja Petri mediante adherencia empleando una pequeña cantidad de SFB. Una vez adheridos los explantes, se adiciono una cantidad suficiente (para cubrir los explantes) de medio de cultivo DMEM bajo en glucosa GibcoBRL (Life Technologies, USA) más el 15% de SFB y medio de cultivo RPMI 1640

suplementado con SFB al 10%; en proporción 3:2. Una vez que se observó crecimiento celular en la periferia del explante, se realizaron cambios parciales de medio de cultivo cada tercer día, se retiraron 2mL de medio y se sustituyeron por medio fresco.

Cuando se obtuvo una población importante de células alrededor del explante, las células fueron cosechadas para determinar la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup> en la membrana celular mediante citometría de flujo. Esto se realizó con  $5 \times 10^5$  células; se incubaron con 100µl de sobrenadante del hibridoma anti-H-2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup> durante 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 2000RPM a 5°C durante 5min, para eliminar el sobrenadante. Las células se lavaron con PBS-4%SFB dos veces y se adicionó 1µl del anticuerpo secundario cabra anti-ratón marcado con FITC IgG-Fab (Sigma, USA). Las células se incubaron a 4°C por 20 min. Posteriormente se lavaron y se procedió a leerlas en un citómetro de flujo (FACS-Aria BD. USA).

#### **7.6. Obtención de sobrenadantes de los cultivos de tumores para determinar la concentración de IL-10**

De los cultivos celulares se tomó 2ml cada tercer de medio y se incorporó 2 mL de medio fresco, para determinar el contenido de IL-10 en los sobrenadantes. La concentración de IL-10 se determinó mediante un ensayo de ELISA (Murine IL-10 Development Kit, Pepro Tech., USA). Este ensayo consiste en la técnica de sándwich de un inmunoensayo enzimático.

En una placa para ELISA de 96 pozos (Costar USA), se colocaron por triplicado 100µl de un anticuerpo monoclonal específico para IL-10 a una concentración de 2.0µg/mL y se dejó incubando durante toda la noche. Al día siguiente, la placa se lavó 4 veces con 300µl de una solución de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) y se bloquearon los espacios vacíos con una solución de bloqueo (BSA-PBS 1%) por 1h. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar 4 veces con 300µl de solución de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) y se añadió 100µl de una muestra estándar en diferentes concentraciones (3000-46.8) en unos pozos y la muestra problema se colocó dentro de otros pozos y se incubó por 2h. Una vez transcurrido este tiempo se lavó 4 veces la placa con 300µl de una solución de lavado (PBS-Tween 0.05%) y a continuación se adicionaron 100µl de un anticuerpo específico para IL-10 y ligado a la enzima peroxidasa a una concentración de 0.5µg/mL dejándolo en incubación por 2h (este anticuerpo fue diluido en una solución de PBS-0.05%Tween-20 y 0.1% BSA). Después se realizaron 4 lavados con 300µl de una

solución de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) para remover el anticuerpo ligado a enzima que no se unió; después se adicionó una solución de avidin-HRP conjugada 1:2000 colocando 100µl por pozo y se incubó por 30min. Pasando esto se lavó 4 veces con 300µl de una solución de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) y se añadió 100µl de substrato ABTS (2,2'azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid-SIGMA) a temperatura ambiente; se monitoreó el desarrollo de color cada 10min durante 1h. La intensidad del color verde fue determinada en un lector de placas de ELISA (Molecular Device Emax) a una longitud de onda de 405nm con una corrección a 650nm.

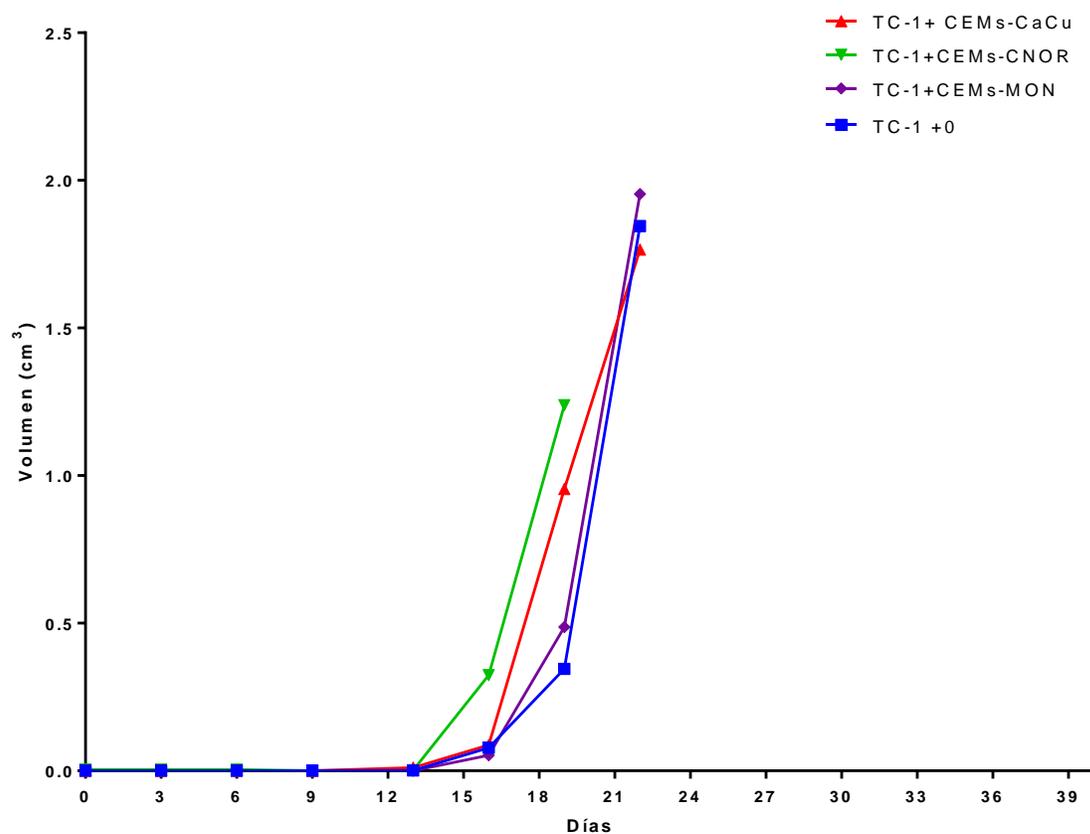
## 8. Resultados.

### 8.1. Inducción de crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 sin protección inmunológica y en presencia de CEMs

Entre los componentes celulares del microambiente tumoral se encuentran las Células Estromales Mesenquimales (CEMs), las cuales interactúan con células tumorales a través de la liberación de diversos factores tales como citocinas, quimiocinas y proteasas entre otras (Udagaw *et al*, 2006; Koyama *et al*, 2008). Algunos estudios han mostrado que las CEMs favorecen el implante y crecimiento tumoral, debido a sus propiedades inmunomodulatorias y pro-angiogénicas (Yen & Yen, 2008; Karnoub *et al*, 2007; Djouad *et al*, 2003; Lin *et al*, 2013; Tchou *et al*, 2013).

Nuestro grupo de trabajo ha obtenido y caracterizado CEMs-CNOR y CEMs-CaCu, así como de médula ósea normal (CEMs-MON). Recientemente hemos encontrado que las CEMs-CaCu protegen a células tumorales del reconocimiento inmune, cuando son co-cultivadas *in vitro*, a través de la disminución de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I, sugiriendo que podrían favorecer el crecimiento tumoral (Montesinos *et al.*, 2013). Por tal motivo, en el presente trabajo se analizó la participación de CEMs-CaCu, así como de CEM-CNOR en el crecimiento de tumores, empleando un modelo de tumor *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo del complejo principal de histocompatibilidad clase I H-2D<sup>b</sup>) y células tumorales TC-1, las cuales comparten el mismo haplotipo H-2D<sup>b</sup> con la cepa del ratón. Para analizar el efecto de la co-inoculación de CEMs y TC-1 se establecieron 4 grupos de 6 ratones cada uno teniendo los siguientes tratamientos: 1) TC-1+CEMs-CaCu, 2) TC-1+CEMs-CNOR, 3) TC-1+CEMs-MON y 4) TC-1 solas (TC1+0). Las células TC-1 fueron inoculadas en la parte dorsal de los animales en una cantidad de 100,000 células, en los grupos tratados con las CEMs, estas fueron administradas por la vena caudal en una cantidad de 100,000 células (Djouad *et al*, 2003).

Al evaluar el crecimiento tumoral en los cuatro grupos de tratamientos, se observó que el grupo de ratones TC-1+0 alcanzó un tamaño promedio de  $2\text{cm}^3$  a los 19 días después de inoculadas las células; mientras que los grupos de ratones que recibieron inoculación de células TC-1+CEMs-CaCu o TC-1+CEMs-MON alcanzaron el mismo volumen tumoral 3 días después (Fig.10). En el caso del grupo de ratones inoculado con TC-1+CEMs-CNOR se observó que el tamaño de tumor alcanzó un volumen de  $2\text{cm}^3$  por el día 21. Al realizar el análisis estadístico de las cinéticas de crecimiento de los tumores entre los cuatro grupos de tratamientos, no se encontró diferencia estadística significativa entre los diferentes grupos. Estos resultados sugieren que la CEMS de CaCu favorecen el implante y crecimiento del tumor.

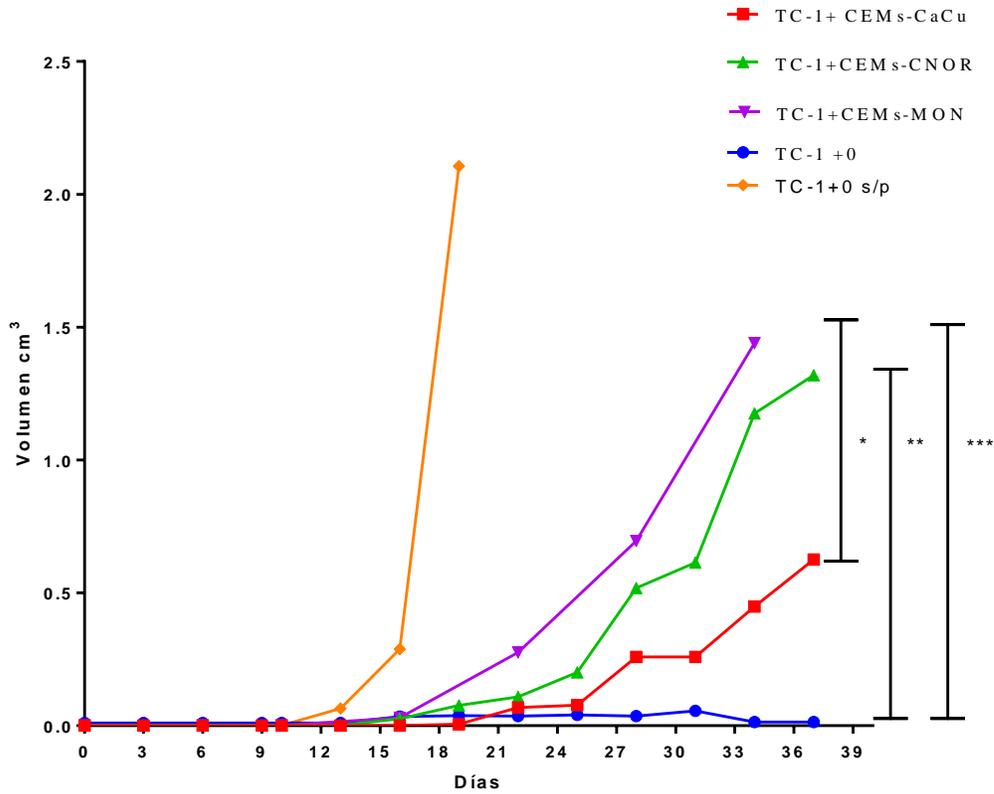


**Figura. 10** Cinética de crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 y con CEMs bajo condiciones normales.  $10^5$  células TC-1 fueron inoculadas vía subdérmica en el dorso de un grupo de ratones C57BL/6 en ausencia de CEMs (TC-1+0), o de manera simultánea vía vena caudal con  $10^5$  CEMs derivadas de Medula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérnix Normal (TC-1+CEMs-NOR) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC-1+CEMs-CaCu). N=6, por cada grupo de animales. Se muestra el volumen tumoral. El análisis estadístico arroja que no existe diferencia estadísticamente significativa. ( $P>0.001$ )

## 8.2. Inducción de crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 con previa protección inmunológica y en presencia de CEMs

Tomando en consideración que las CEMs desarrollan un papel fundamental e importante en el crecimiento tumoral debido a que tienen un efecto inmunosupresor e inmunomodulador (Atsuta *et al*, 2013; Lin *et al*, 2013; Usha *et al*, 2013), en el presente trabajo se procedió a analizar si en ratones previamente inmunizados con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF (derivado de la oncoproteína E7 de HPV 16), que se sabe protege a ratones del crecimiento tumoral inducido por las células tumorales TC-1 (Paz *et al*, 2009), se inmunizaron cuatro grupos de 6 ratones C57BL/6 con este péptido y 10 días después de la tercera inmunización, se inocularon las células tumorales TC-1 ya sea solas (TC-1+0), o de manera simultánea con las diferentes CEMs (TC-1+CEMs-CaCu, TC-1+CEMs-CNOR, y TC-1+CEMs-MON). A un grupo de ratones no inmunizado, se le inocularon células tumorales.

Como se pudo observar, el grupo de ratones que no fue inmunizado y que recibió células tumorales TC-1, desarrolló tumores en los primeros 16 días del experimento, mientras que el grupo que recibió inmunización con el péptido y posteriormente fue inoculado con las células tumorales, no desarrolló crecimiento tumoral durante los 37 días del experimento. De manera interesante, los grupos de ratones que recibieron células TC-1 y CEMs desarrollaron tumores palpables a partir del día 18 y crecieron gradualmente hasta el término del experimento (Fig. 11). Cabe mencionar que los ratones que recibieron células tumorales TC-1+CEMs-MON y TC-1+CEMs-CNOR desarrollaron tumores de un tamaño significativamente mayor ( $1.5\text{cm}^3$ ) a aquellos que recibieron CEMs-CaCu ( $0.5\text{cm}^3$ )  $p < 0.05$  al término del experimento. Los grupos de ratones que fueron tratados con TC-1+CEMs-CNOR y TC-1+CEMs-MON mostraron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo que no fue tratado con ningún tipo de CEMs (TC-1+0).



**Figura. 11** Cinética de crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 y con CEMs bajo condiciones de protección inmunológica con el péptido RAHYNIVTF. Cuatro grupos de ratones (n=6) de la cepa C57BL/6 fueron inmunizados durante tres ocasiones con 100ug/ml del péptido inmunogénico RAHYNIVTF y un grupo no (TC-1+0 s/p; control positivo de crecimiento tumoral). Diez días posteriores a la tercera inmunización,  $10^5$  células TC-1 fueron inoculadas vía subdérmica en el dorso de ratones C57BL/6 en ausencia de CEMs (TC-1+0); o de manera simultánea vía vena caudal, con  $10^5$  CEMs derivadas de Medula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-NOR) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC-1+CEMs-CaCu). Diferencias significativas, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### **8.3. Análisis de la expresión de la molécula H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup> en células provenientes de los tumores de ratones sin protección inmunológica**

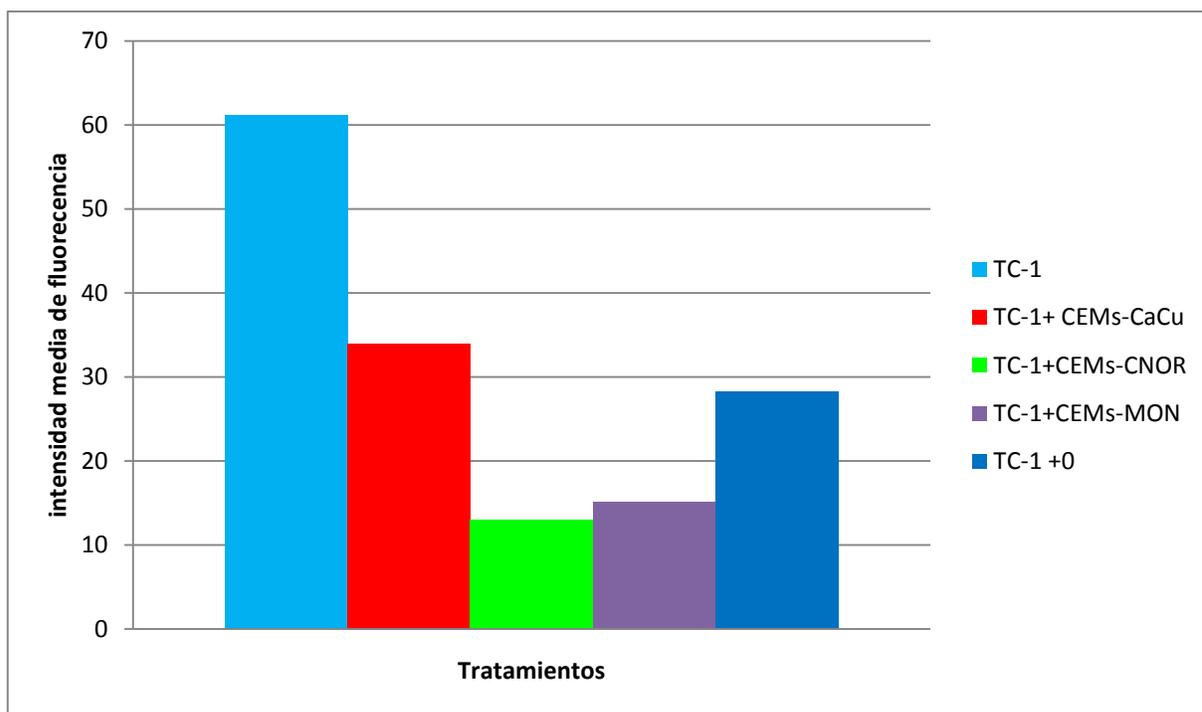
Una estrategia de evasión inmune que los tumores utilizan para evitar el reconocimiento inmune por linfocitos T citotóxicos, es la regulación a la baja de moléculas del MHC tanto de clase I como de clase II (Nair *et al*, 2013; Clerici *et al*, 1997; Patersson *et al*, 1998; Matsuda *et al*, 1994)

Las CEMs median actividades inmunoregulatoras mediante la inhibición de funciones de diferentes células inmunes. Para ello se ha estudiado el efecto sobre los linfocitos T en la expresión de moléculas de MHC-I y II, junto con la capacidad de inducir la formación de células T reguladoras (Morandi *et al*, 2008). Las CEMs parecen funcionar como potentes inmunomoduladores ya que se ha visto que aquellas provenientes de médula ósea cuando son transplantadas no provocan una respuesta inmunológica, debido a que bajan la expresión de moléculas de MHC-I y II (Horton *et al*, 2013).

Teniendo en cuenta que en estudios previos hemos encontrado que el co-cultivo de CEMs con células tumorales de CaCu induce *in vitro* disminución de la expresión de moléculas HLA clase I, en este trabajo se analizó si células provenientes de tumores de ratones tratados con células TC-1 y CEMs, disminuía la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup>. Los tumores de los ratones inoculados con células TC-1 solas (TC1+0) o con TC-1+CEMs-CaCu, TC-1+CEMs-CNOR y TC-1+CEMs-MON fueron cultivados por la técnica de explante, y las células que proliferaron fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup>.

Como puedo observarse, las células provenientes de los tumores de los ratones inoculados con las células tumorales TC-1 solas (TC-1+0) disminuyeron en aproximadamente el 50% la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> respecto a la expresión basal encontrada en la línea celular TC-1 (Fig. 12). Por otro lado este análisis arrojó resultados muy interesantes respecto a los tumores provenientes de los ratones tratados con CEMs, ya que se pudo observar que tienen una disminución de la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup>; en los cultivos provenientes de los tumores de los ratones tratados con CEMs-CaCu, la disminución fue del 44.41%, con CEMs-CNOR del 78.30%, siendo estas las que mostraron una mayor disminución. De los ratones a los cuales se les inoculó las CEMs-

MON, su disminución de la expresión de estas moléculas fue del 75.30% en comparación con la expresión de la línea celular TC-1, lo que nos puede llegar a sugerir que la presencia de las CEMs en el sitio del tumor baja la expresión de una manera importante.

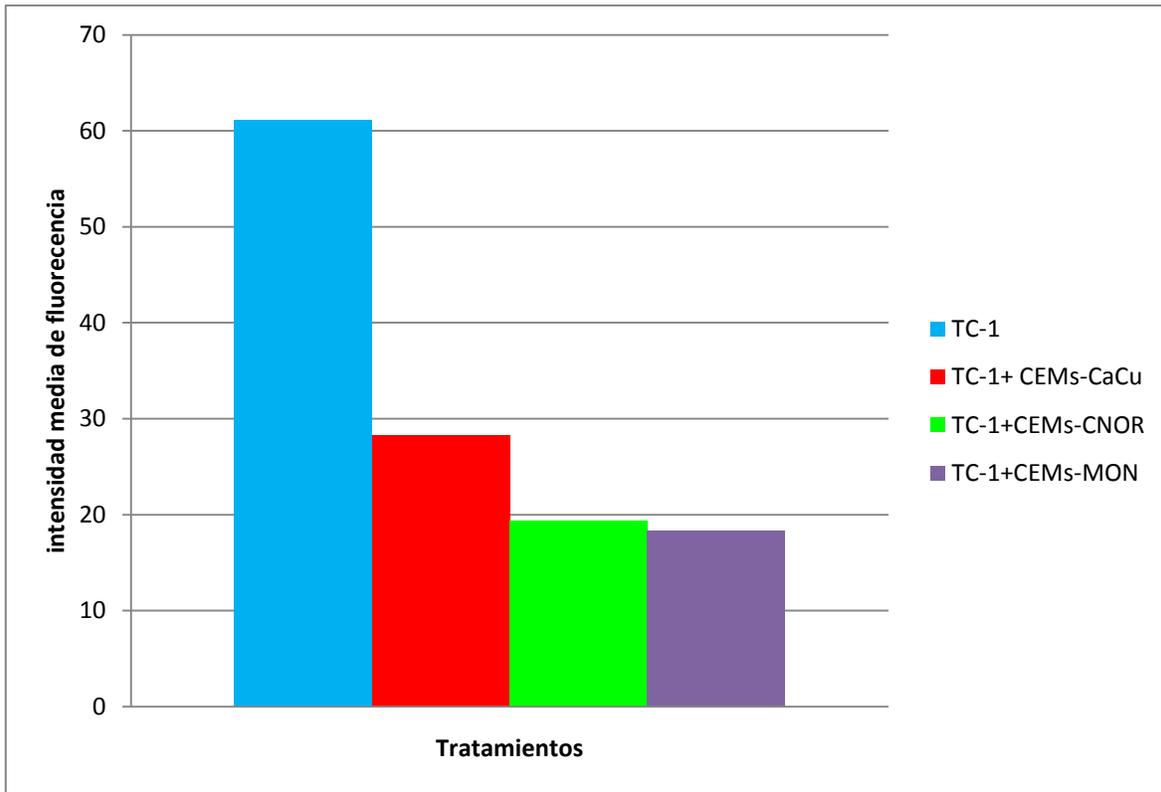


**Figura 12.** Expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup> en células tumorales de ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 y con CEMs bajo condiciones normales. Células provenientes del cultivo de tumores de ratones inoculados con TC-1 solas (TC1+0), o de ratones inoculados con TC-1+CEMs-MON; TC-1+CEMs-NOR; TC-1+CEMs-CaCu, comparados con aquella de la línea celular TC-1 (TC-1) fueron analizadas mediante citometría de flujo para evaluar la expresión de moléculas H2-D<sup>b</sup>.

#### 8.4. Análisis de la expresión de la molécula H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup> en cultivos celulares provenientes de los tumores de ratones con protección inmunológica

En las células provenientes de tumores de ratones que previamente recibieron inmunización con el péptido RAHYNIVFT y fueron tratados con las 3 estirpes diferentes de CEMs: CEMs-CaCu, CEMs-CNOR, CEMs-MON, los cultivos realizados de estos tumores mostraron una disminución en la expresión de las moléculas H-2D<sup>b</sup> y H-2K<sup>b</sup>. En los cultivos de los tumores provenientes del tratamiento con CEMs-CaCu se observó una

disminución del 53.68%, con CEMs-CNOR su disminución fue del 68.36% y con CEMs-MON se pudo observar una disminución del 69.98%, siendo esta disminución muy parecida entre estos grupos, comparados con respecto a la expresión de estas moléculas en la línea celular TC-1 provenientes de condiciones normales de cultivo (Fig. 13).

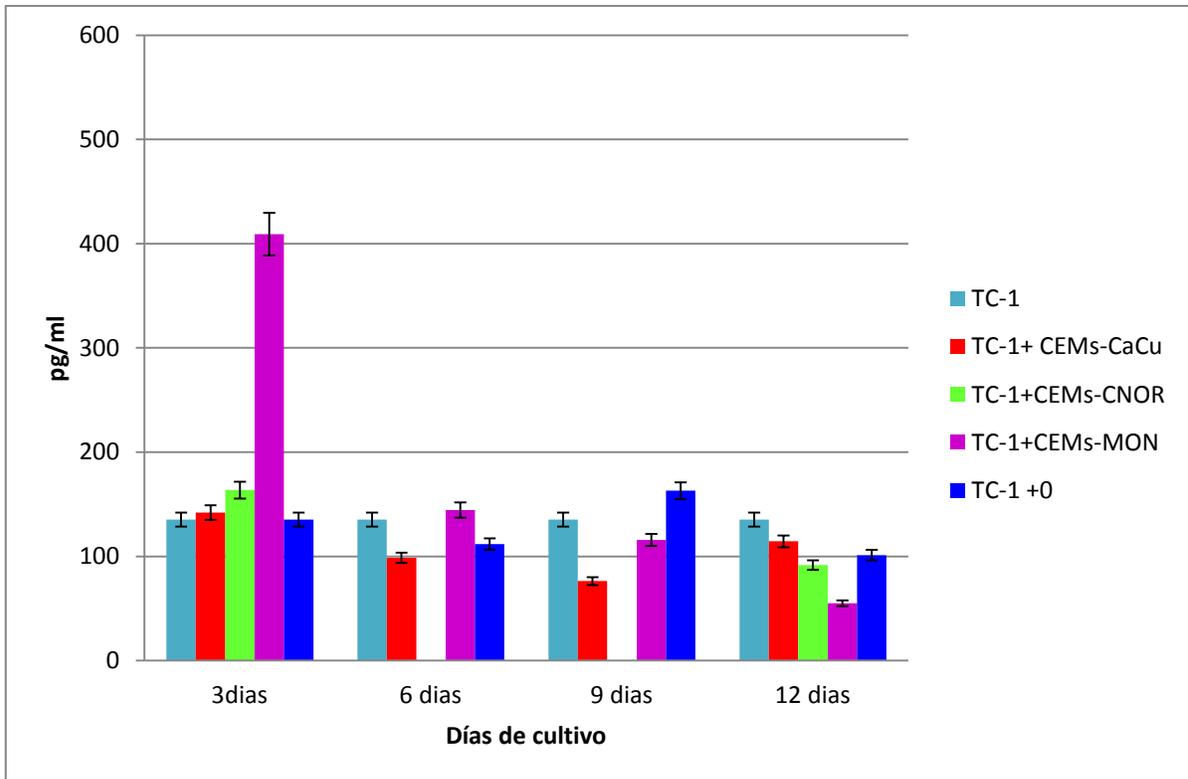


**Figura 13. Expresión de moléculas H2-D<sup>b</sup> en células tumorales de ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido RAHYNIVTF e inoculados con células TC-1 + CEMs.** Células provenientes del cultivo de tumores de ratones inoculados con TC-1+CEMs-MON, TC-1+CEMs-NOR y TC-1+CEMs-CaCu, comparado con aquella de la línea celular TC-1 (TC-1), fueron analizadas mediante citometría de flujo para evaluar la expresión de moléculas H2-D<sup>b</sup>.

### **8.5. Análisis de la concentración de IL-10 en sobrenadantes provenientes de los cultivos de tumores de ratones sin protección inmunológica**

Se ha reportado que las CEMs son células multipotentes que muestran la capacidad de adaptarse al medio en el cual se encuentran, la mayoría de las CEMs median procesos de reparación y esto lo logra mediante la liberación de moléculas solubles (Altaner *et al*, 2013). Las CEMs secretan una gran cantidad de factores solubles con actividades inmunosupresora, así mismo, son capaces de alterar el perfil de secreción de varios componentes celulares de la respuesta inmune para inducir un fenotipo antiinflamatorio o tolerante, con un incremento en la secreción de IL-10, IL-4 y TGF- $\beta$  y un decremento en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-17 e INF- $\gamma$  (Djouad *et al* 2007; English, 2013; Kucerova *et al*, 2010). Asimismo, recientemente hemos reportado que la IL-10 producida en co-cultivos de CEMs con células tumorales induce disminución en la expresión de células tumorales de CaCu (Montesinos *et al*, 2013).

Puesto que las células tumorales provenientes de tumores de ratones inoculados con células TC-1 + CEMs mostraron disminución en la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup>, se procedió a analizar si sobrenadantes provenientes de estos cultivos a los 3, 6, 9 y 12 días contenían IL-10. La concentración de IL-10 detectada a los primeros 3 días del cultivo en sobrenadantes de la línea celular TC-1 fue de 135 pg/mL; muy similar a la encontrada en células provenientes de tumores de ratones inoculados con células TC-1 (TC-1+0) (Fig. 14). Asimismo las células tumorales de ratones que recibieron células TC-1 +CEMs-CaCu o TC-1+ CEMs-CNOR mostraron una concentración de IL-10 de 142 pg/mL y 164 pg/mL respectivamente. Durante este tiempo de cultivo, sólo el sobrenadante de células tumorales de ratones tratados con células TC-1+CEMs-MON contenía una cantidad importante de IL-10 (409 pg/mL). Es de notar que las concentraciones de IL-10 encontradas en los cultivos a los días 6, 9 y 12 fue similar a la concentración basal encontrada en las células TC-1.



**Figura. 14. Concentración de IL-10 detectada en cultivos de células obtenidas de tumores provenientes de ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células tumorales TC-1 y con CEMs bajo condiciones normales.**  $10^5$  células TC-1 o células obtenidas de tumores de ratones inoculados TC-1 solas (TC-1+0) o de manera simultánea con CEMs de Medula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-NOR) y de Cáncer Cérvico-uterino (TC-1+CEMs-CaCu) fueron cultivadas *in vitro* y cada 3 días se tomaron muestras de los sobrenadantes para determinar mediante ELISA la concentración de IL-10.

### 8.6. Análisis de la concentración de IL-10 en sobrenadantes provenientes de los cultivos de tumores de ratones con protección inmunológica

En los cultivos de células derivadas de tumores de ratones que fueron inoculados con células TC-1 y CEMs, se encontró un incremento importante durante los primeros 3 días de cultivo en la producción de IL-10, respecto a la concentración basal de IL-10 producida por células de la línea parental TC-1 (135 pg/mL). Las células derivadas de tumores de ratones inoculados con células TC-1+ CEMs-CaCu, CEMs-CNOR y CEMs-MON produjeron 343 pg/mL, 487 pg/mL y 560 pg/mL respectivamente (Fig.15). En los días de cultivo 6, 9 y 12, también se detectaron concentraciones de IL-10 similares a la producida por la línea parental TC-1.

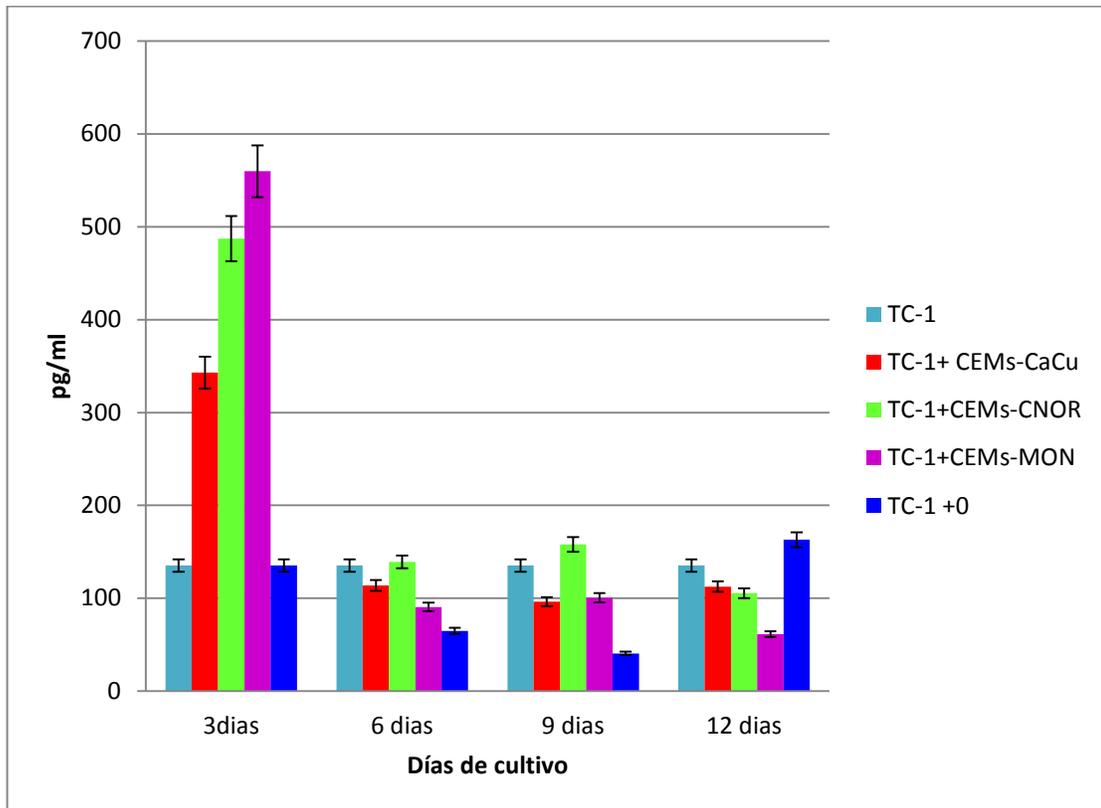


Figura. 15. Concentración de IL-10 detectada en cultivos de células obtenidas de tumores provenientes de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con el péptido RAHYNIVTF e inoculados con células TC-1 + CEMs.  $10^5$  células TC-1 o células obtenidas de tumores de ratones inoculados TC-1 y CEMs de Medula Ósea Normal (TC-1+CEMs-MON), de Cérvix Normal (TC-1+CEMs-NOR) o de Cáncer Cérvico-uterino (TC-1+CEMs-CaCu) fueron cultivadas *in vitro* y cada 3 días se tomaron muestras de los sobrenadantes para determinar mediante ELISA la concentración de IL-10.

## 9. Discusión.

En los últimos años la inmunología tumoral ha centrado su atención sobre los mecanismos celulares y moleculares que median el escape del tumor ante las células de la vigilancia inmune natural y adaptativa. Como resultado de ello, se ha descubierto que la falta de señales necesarias para activar una respuesta inmune efectiva, la presencia de factores inmunosupresores y la acumulación de células inmunosupresoras en el microambiente tumoral, son algunos de los elementos que favorecen la tolerancia inmune durante el desarrollo de los tumores. Un importante esfuerzo ha sido el de comprender como las células cancerosas efectúan una baja en la expresión de moléculas que estimulan al sistema inmune, tales como moléculas co-estimuladoras y citocinas en el microambiente del tumor (Yu *et al*, 2007).

De hecho, las células neoplásicas se localizan inmersas en un microambiente celular denominado estroma tumoral, el cual está compuesto de matriz extracelular, vasos sanguíneos, tejido conectivo, células de la respuesta inmune y células con capacidad inmunosupresora, dentro de las cuales destacan: células T reguladoras, macrófagos asociados a tumores, células dendríticas mieloides y estromales mesenquimales (CEMs), que responden a factores producidos por las células tumorales y proveen de componentes necesarios para la sobrevivencia del tumor, incluyendo soporte estructural, vasculatura y matriz extracelular (Albini *et al*, 2007; Altaner *et al*, 2013).

En los últimos años, las células estromales mesenquimales han sido objeto de diversos estudios para dilucidar las interacciones que existen entre éstas y las células tumorales. Hasta ahora se ha demostrado que CEMs derivadas de médula ósea tienen capacidad de modular el microambiente y el comportamiento tumoral (Stagg, 2008). Las CEMs producen citocinas con acción proangiogénica, pueden dar lugar a células tipo endoteliales o tipo pericitos que aportan a la formación de vasos sanguíneos y la estabilización del lugar de la formación del tumor (Roorda *et al*, 2009). En ensayos experimentales realizados en modelos *in vivo*, se ha demostrado que las CEMs aumentan el potencial metastático de células de cáncer de mama o de carcinoma de colon, cuando son inoculadas de manera conjunta en ratones (Karnoub *et al*, 2007; Zhu *et al*, 2006). Asimismo, las CEMs ejercen un efecto inmunosupresivo por efecto de la interacción con casi todas las células del sistema inmune innato y sistema inmune

adaptativo, y estas interacciones pueden mejorar la habilidad de algunos tumores para evadir la vigilancia tumoral (Apparailly *et al*, 2008).

También se ha visto recientemente que existe evidencia que muestra que las CEMs al ser inyectadas promueven el crecimiento tumoral y la neovascularización en modelos de ratón singénicos a través del apoyo directo para crear angiogénesis, lo que sugiere que en algunas condiciones específicas las CEMs juegan un papel importante en la progresión tumoral (Atsuta *et al*, 2013; Freitas, 2013; Keramidas *et al*, 2013).

Tomando en consideración lo anterior, en el presente trabajo se analizó la capacidad de CEMs obtenidas de tumores de cáncer cérvico-uterino (CEM-CaCu) sobre la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (H-2D<sup>b</sup>) en células tumorales TC-1, empleando un modelo tumoral en ratones de la cepa C57BL/6. De manera paralela, también se emplearon CEMs obtenidas de Cérvix Normal (CEMs-CNOR) y CEMs de Médula Ósea Normal (CEMs-MON) como “estándar de oro”. El análisis se realizó en ratones de la cepa C57BL/6 bajo condiciones normales y con previa protección inmunológica proporcionada por el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de VPH-16.

De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que: 1) El desarrollo de tumores en ratones C57BL/6 con células tumorales TC-1 no fue modificado de manera significativa por la inoculación simultánea de las diferentes CEMs en animales bajo condiciones normales; sin embargo, en ratones que contaban con la protección inmunológica, la inoculación con las diferentes CEMs indujo crecimiento tumoral a diferencia de aquellos ratones que solo recibieron células tumorales TC-1; 2) Las células tumorales obtenidas del cultivo de todos los tumores, tanto en los animales inmunizados como en los no inmunizados, mostraron una disminución importante en la expresión de moléculas H2-D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup> respecto a la detectada de manera basal por la línea celular TC-1; 3) en los sobrenadantes de los cultivos de tumores de los ratones que contaban con la protección inmunológica y fueron tratados con TC-1 + CEMs, se detectó un aumento en la concentración de IL-10, en comparación con el detectado en el cultivo de la línea celular. Estas observaciones permiten sugerir que las CEMs participan de una manera importante en la evasión de la respuesta inmune.

En nuestro modelo experimental se encontró que la co-inoculación de células tumorales TC-1 con CEMs en proporción 1:1 en ratones de la cepa C57BL/6, no modificó el crecimiento tumoral en relación con aquel observado en ratones donde sólo se inocularon las células tumorales TC-1. Sin embargo, en ratones previamente inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, la respuesta inmune protectora que proveía el péptido ante el reto tumoral fue revertida cuando las diferentes CEMs fueron co-inoculadas en los ratones, dando lugar al desarrollo del tumor en un tiempo posterior en relación a los ratones en donde no se dio inmunización previa con el péptido RAHYNIVTF, sugiriendo que la presencia de las CEMs en los animales inmunizados suprime la respuesta inmune antitumoral y favorece el establecimiento del tumor.

Cabe mencionar que la propiedad de las CEMs para favorecer el crecimiento tumoral ha sido reportada recientemente en modelos tumorales experimentales, por ejemplo el grupo de Karnoub *et al*, 2007, al co-inyectar CEMs humanas derivadas de médula ósea junto con células de cáncer de mama marcadas con proteína verde fluorescente en una proporción 3:1 en ratones inmunocomprometidos, observó que las CEMs aceleraron el crecimiento tumoral de la línea MCF/Ras. En otro experimento, las CEMs derivadas de médula ósea fueron capaces de incrementar *in vivo* el crecimiento de tumores inducidos por células de cáncer de colon, linfoma y células de melanoma (Djouad *et al*, 2003; Zhu *et al*, 2006; Maby-El *et al*, 2007). Otro ejemplo en el cual se sugiere que la presencia de CEMs suprime la respuesta inmune para dar paso al crecimiento tumoral, fue el experimento en donde al trasplantar células de melanoma B16 en ratones inmunocompetentes, se logró inducir crecimiento tumoral sólo cuando estas células tumorales fueron co-inoculadas con CEMs derivadas de médula ósea (Djouad *et al*, 2003). Un estudio más donde se observó que en líneas de cáncer de pulmón y CEMs derivadas de médula ósea normal se vio un aumento en el crecimiento tumoral con respecto a los tratamientos sin CEMs (Suzuki *et al*, 2011) y en otro estudio donde se vio que las CEMs de médula ósea pueden prolongar la supervivencia de trasplantes alogénicos (Nuta & Fibbe, 2007).

Aunque en el presente estudio no se identificó la presencia de CEMs en el tejido tumoral, en estudios previos hemos observado que CEMs marcadas con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e inoculadas a través de la vena caudal migran hacia el sitio del tumor, lo cual sugiere que las CEMs pudieran participar en favorecer el crecimiento del

tumor *in situ*, a través de su capacidad inmunosupresora sobre las células efectoras de la respuesta inmune (Contreras, 2011). En otro estudio realizado por el equipo de trabajo se encontraron resultados similares con respecto al crecimiento tumoral en presencia de CEMs (Don, 2010). Esto sugiere que la presencia de estas células participa de una manera importante en el crecimiento tumoral por diversos mecanismos. Aunque no se encontró una diferencia estadística entre el grupo de CEMs-CaCu y el control, se pudo observar que tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa con el grupo tratado con CEMs-CNOR, lo cual sugiere que el grupo de CEMs-CaCu y el de CEMs-CNOR tuvieron un crecimiento similar, también se vio una diferencia estadística entre los grupos de CEMs-MON y CEMs-CaCu; todos estos resultados sugieren que la presencia de estas células juega un papel importante en el crecimiento tumoral.

Las CEMs pueden inducir cambios en la maduración y la función de las células presentadoras de antígenos (CPAs) a través de la reducción de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, así como de moléculas co-estimuladoras, para dar lugar a CPAs que no pueden apoyar la respuesta inmune específica mediada por linfocitos T auxiliares y citotóxicos (Apparailly *et al*, 2008). La regulación a la baja de las moléculas del MHC clase I es un evento muy frecuente encontrado en las células tumorales, lo cual les permite escapar del reconocimiento inmune (Romero *et al*, 2005). Los defectos en la expresión de las moléculas MHC clase I pueden ser ocasionados por múltiples mecanismos, los cuales pueden ser intrínsecos, tales como aquellos que incluyen la deficiente expresión y/o función de los componentes de la maquinaria del procesamiento de antígenos (Koopman *et al*, 1999; Brady *et al*, 2000), o aquellos extrínsecos, en los cuales las condiciones del micro ambiente tumoral pueden influenciar para su desregulación, tal como la presencia de citocinas inmunoregulatoras como IL-10 y TGF- $\beta$ , que tienen efectos sobre la disminución de la expresión de moléculas MHC clase I (Matsuda *et al*, 1994; Ma & Niederkorn, 1995).

En este contexto, en nuestro estudio encontramos que las células obtenidas de los cultivos de los tumores presentaron una disminución importante en la expresión de moléculas H2-D<sup>b</sup> en relación a la expresión basal de la línea celular TC-1, independientemente de la inoculación conjunta con CEMs, o de la protección inmune dada por la inoculación con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF, aunque una mayor disminución de la expresión de moléculas H2-D<sup>b</sup> fue encontrada en las células derivadas

de tumores de los ratones que recibieron CEMs-MON y CEMs-CNOR. Teniendo una disminución de hasta un 69% de la expresión en tratamientos con previa protección y un 78% en los tratamientos no inmunocompetentes.

Nuestros resultados son similares con los obtenidos en otros estudios donde se vio que en células de melanoma, donde existe un incremento en la concentración de IL-10, también existe una disminución en la expresión de moléculas de HLA de clase I y II (Yue *et al*, 1997; Xue *et al*, 2013).

Los resultados obtenidos, respecto de la expresión de estas moléculas en los tratamientos con la presencia de CEMs, puede sugerir que estas células tienen un papel importante en la baja expresión de estas moléculas; sin embargo como se encontró en los tratamientos que no contaron con CEMs la reducción de estas moléculas, lo que sugiere que existen diversos mecanismos por el cual las células tumorales evaden el sistema inmune, aunque estos resultados pueden llegar a sugerir que la presencia de CEMs influyen de manera importante en la baja de la expresión de moléculas de MHC de clase I, lo cual ayuda a la evasión del sistema inmune, ya que sin la expresión de estas moléculas el reconocimiento por linfocitos T CD8+ es bajo.

Es conocido que los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas del MHC de clase I y por lo tanto es esencial para la destrucción de las células infectadas por virus y células tumorales (Duffy *et al*, 2011; Kim *et al*, 2011; Liu *et al*, 2013). En diversos estudios se ha reportado que la IL-10 tiene la capacidad de inhibir las funciones efectoras de las células Th1 y que tiene efecto inhibitor sobre la expresión de moléculas que participan en la vía del procesamiento y presentación de antígenos en las células presentadoras de antígeno (Moore *et al.*, 2001; Dennis *et al* 2013; Liu *et al*, 2013; Urosevic *et al*, 2001; Matsuda *et al.* 1994; Lui *et al*, 2012); además, altas concentraciones de IL-10 se correlacionan con disminución de la expresión de moléculas del MHC clase I y II en distintos tipos celulares (Breitbart *et al*, 2013; Luheshi *et al*, 2013; Liu *et al*, 2013). Los roles de protección de la IL-10 en el cáncer sugieren nuevas funciones de esta citocina (Yue *et al*, 1997). La IL-10 es ahora reconocida como la citocina antiinflamatoria más potente que ayuda al escape de la vigilancia inmune (Song *et al*, 2012). Se ha visto un aumento de IL-10 en co-cultivos de

CEMs y este aumento ha sido la pauta para decir que esta citocina es una de las principales causas de los efectos supresores de estas células (Nuta & Fibbe, 2007).

En nuestro estudio se encontró que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de los tumores obtenidos de ratones co-inoculados con células TC-1 y CEMs, particularmente en los grupos de ratones inmunizados con el péptido RAHYNIVTF, la IL-10 producida por las células tumorales incrementó entre 2-4 veces en relación a la detectada en los sobrenadantes de la línea celular TC-1, obteniendo concentraciones de IL-10 de hasta 342 pg/mL en los cultivos de los tumores de los tratamientos de CEMs-CaCu, 487pg/mL en la presencia de CEMs-CNOR y en los cultivos de los tumores que provenían de los tumores de los ratones tratados con CEMs de MON se encontraron concentraciones de hasta 560pg/mL (Figura 14). Estos resultados son correspondientes a 3 días después de extirpados los tumores y sembrados en los platos de cultivo; pasados los días de cultivo no se encontraron niveles similares de IL-10, esto muy probablemente porque la IL-10 es secretada o inducida por diversas células que se encuentran en el micro-ambiente tumoral. Nuestros resultados concuerdan con un estudio en el cual se encontró que las CEMs provenientes de médula ósea normal aumentan la concentración de IL-10 en co-cultivos con células cancerígenas (Bernardo & Fibbe, 2013); también existe evidencia que en varias líneas de cánceres humanos se ha encontrado una alta concentración de esta citocina (Matsuda *et al*, 1994).

Si bien, la IL-10 fue detectada en los sobrenadantes, es factible que la presencia de CEMs en el estroma tumoral también pudiera participar en la liberación de factores solubles tales como la indoleamina 2,3-dioxygenasa (IDO), que actúa acumulando metabólicos tóxicos del triptófano (Ghannam *et al*, 2010; Meisel *et al*, 2004; Maby-El *et al*, 2009; Ryan *et al*, 2007); la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS), que tiene un papel importante en la inhibición de linfocitos T (Sato *et al*, 2007); la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que actúa inhibiendo la mitogénesis y la producción de IL-2 (Aggarwal & Pittenger, 2005), además de estimular la producción de IL-10 de manera indirecta por las mismas células tumorales TC-1.

En este sentido, se ha reportado que las CEMs son capaces de generar grandes cantidades de adenosina en un microambiente de hipoxia, como lo es el microambiente tumoral, debido a que las CEMs sobre-expresan la enzima 5'-

ectonucleotidasa (CD73), la cual es capaz de hidrolizar nucleósidos como el AMP a adenosina. Se ha reportado que la interacción de adenosina con receptores específicos, tal como A2bR, en la células blanco, es capaz de inducir la producción de IL-10 (Saldanha *et al*, 2011). En consecuencia, el cultivo primario de las células provenientes de los tumores de ratones que fueron co-inoculados con TC-1 y CEMs, pudiera mantener la capacidad de producción de IL-10, sobre todo en los primeros días del cultivo, tal como fue observado. La mayor producción de IL-10 encontrada en los cultivos de células provenientes de tumores de animales inmunizados respecto a los no inmunizados, puede asociarse con una posible activación *in situ* de las CEMs, debido a que la presencia de factores proinflamatorios inducidos durante el proceso de inmunización, los cuales son capaces de incrementar el potencial inmunosupresor de las CEMs, siendo una de ellas la vía adenosinérgica a través de CD73. Otro aspecto importante que podría influir en la mayor producción de IL-10 en el cultivo de tumores de ratones que recibieron CEMs, es la capacidad que estas células para inducir y reclutar células T reguladoras. En modelos de rata los efectos protectores observados después de la administración de las CEMs se asocia con un aumento de citocinas como la IL-10 e IL-13 junto con el aumento de linfocitos con fenotipo T regulador (CD4+ FOXP3+), además de una reducción directa de IFN- $\gamma$  (Duffy *et al*, 2011; Lui *et al*, 2012). En co-cultivos de CEMs con DC's, también se ha observado un aumento de IL-10, ya sea con contacto o sin contacto entre estos tipos celulares. (Liu *et al*, 2013). También en un estudio previo, observamos que la co-inoculación de células TC-1 con CEMs en ratones C57BL/6 favoreció la presencia de células con fenotipo CD4+ CD25+FOXP3+ en los tumores generados, a diferencia de los tumores que sólo recibieron células TC-1 (Contreras, 2011).

Nuestros resultados sugieren que la presencia en el microambiente tumoral de las CEMs provoca un alza en la secreción de esta citocina antiinflamatoria (IL-10), lo cual puede conllevar a la evasión de la respuesta inmune, ya que en el grupo que no contó con la presencia de CEMs, no se vio un incremento notable como en los grupos que si contaron con la presencia de estas células. Respecto a que sólo se encontró una concentración considerable de IL-10 al tercer día de cultivo, se puede sugerir que es por la falta de diversas células presentes en el microambiente tumoral, que en el cultivo celular ya no se encuentran presentes, sin embargo el encontrar niveles considerables al tercer día, sugiere que en el sitio del tumor existe una alta concentración de esta citocina proporcionada por diversas células como podrían ser las CEMs.

En conjunto todos estos resultados permiten decir que las CEMs juegan un papel importante en el microambiente tumoral, ya que se pudo observar que participan en la secreción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-10, que junto con la baja expresión de moléculas pertenecientes al MHC-I de las células tumorales, favorecen de manera importante la evasión por estas células a la respuesta inmune, favoreciendo tanto la implantación del tumor como su crecimiento. En diferentes estudios realizados, cómo el echo en células de melanoma, se encontró un aumento en la concentración de IL-10 en cultivos celulares, el cual fue asociado con un mayor crecimiento tumoral, ya que en los tratamientos a los cuales se les bloquearon los receptores para IL-10, no se observó un crecimiento tumoral considerable (Yue *et al*, 1997). Los defectos observados comúnmente en el MHC-I en tumores constituyen un problema potencial para las inmunoterapias basadas en células T, puesto que se han reportado en varios tipos de cánceres, como melanoma, de próstata y cérvico uterino causado por infección de VPH, una baja en la expresión de MHC-I y II y una progresión en el crecimiento tumoral (Lampen & Hall, 2011).

En este trabajo se vio que el efecto que pueden tener las CEMs en la baja de la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup> es importante, pues favorece al crecimiento tumoral y al escape de la respuesta inmune, ya que bajan la expresión de estas moléculas las cuales son de suma importancia para la presentación de antígenos, para la acción de linfocitos TCD8+. Se ha sugerido que la IL-10 puede regular negativamente la expresión de HLA de clase I en la superficie de las células del tumor, lo que permite el escape de la lisis de las células tumorales. En estudios en pacientes con CaCu se ha asociado que en algunos casos al encontrar una alta concentración de IL-10 existe una baja en la expresión de HLA-I (Rodríguez *et al*, 2012; Patersson *et al*, 1998), lo que concuerda con los resultados de este estudio, ya que se pudo observar que en los cultivos realizados de los tumores de los ratones que fueron co-inoculados con CEMs, aparte de la baja en la expresión de moléculas de HLA-I, se presentan una concentración representativa de IL-10 en los grupos que contaron con la presencia de estas células, lo cual permite sugerir que las CEMs tienen un papel importante en el crecimiento tumoral mediante la posible inducción de secreción de factores solubles inmunosupresores, los cuales ayudan al escape de las células de la respuesta inmune antitumoral mediante la baja en la expresión de moléculas del MHC-I.

Consideramos posible sugerir que la presencia de CEMs en el microambiente tumoral participa de manera importante en la evasión de la respuesta inmune antitumoral en el modelo estudiado, ya sea a través de la liberación de varios factores con capacidad inmunosupresora (IDO, PGE2, óxido nítrico etc), o a través de la inducción de citocinas que participan en la disminución de moléculas H2-D<sup>b</sup> tal como IL-10 y TGF- $\beta$  por parte de las células tumorales. Será de interés en estudios posteriores, analizar *in situ*, la presencia de algunos de estos factores para conocer la participación tanto de las CEMs, como de las células tumorales en el microambiente tumoral.

## 10. Conclusiones.

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

- Las CEMs utilizadas en este estudio (CEMs-CaCu, CEMs-CNOR, CEMs-MON) son capaces de revertir la protección inmune antitumoral en animales que fueron inmunizados previamente con el péptido inmunogénico RAHYNIVTF.
- En los tratamientos que no contaron con ninguna clase de protección inmunológica se vio un rápido crecimiento tumoral y mayor al del grupo protegido inmunológicamente.
- Las células tumorales obtenidas de los cultivos de los ratones inoculados, ya sea con TC-1 o TC-1 + CEMs disminuyeron fuertemente la expresión de moléculas H-2D<sup>b</sup> en la membrana celular. Las CEMs-CNOR, CEMs-MON indujeron una mayor disminución de la expresión de estas moléculas.
- En los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales provenientes de ratones que contaron con protección inmunológica y que fueron co-inoculados con células TC-1 + CEMs, se encontraron mayores niveles de IL-10, que en aquellos que recibieron solo células TC-1, o en aquellos que no fueron inmunizados con el péptido RAHYNIVTF.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que las CEMs tienen una participación importante en la evasión de la respuesta inmune antitumoral mediante diferentes mecanismos que ayudan a la implantación y crecimiento del tumor, entre ellos: desregular la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (H-2D<sup>b</sup>) y producir factores inmunomoduladores como la IL-10 que favorecen la supresión inmunológica.

## 11. Perspectivas.

Los resultados de este estudio permiten sugerir que las CEMs tienen un papel importante en la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor al reducir la expresión de moléculas del MHC de clase I y la secreción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10, favoreciendo el crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes. Con la finalidad de esclarecer varios de los mecanismos de las CEMs para favorecer la evasión de la respuesta inmune antitumoral en el modelo estudiado, será importante evaluar la participación de la IL-10 en este modelo tumoral, junto con la evaluación de si existe *in situ* la presencia de esta citocina en concentraciones importantes y su capacidad de reducir la expresión de moléculas del MHC-I en las células tumorales. Además de analizar la capacidad de las CEMs para suprimir de manera específica la respuesta efectora mediada por linfocitos T citotóxicos.

## 12. Bibliografía.

- Abbas A, Lichtman A. 2004. **Inmunología Celular y Molecular**. 6ª ed. Ed. Elsevier. España. 563 pp.
- Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna U, Devi U, Jayshree R. 2008. **Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma**. Am J Reprod Immunol. 60:1. 55-65.
- Aggarwal S and Pittenger M. 2005. **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses**. Blood. 105. 1815-1822.
- Albarenque Maris Stella, Zwacka Michael Ralf, Mohr Andrea. 2011. **Both human and mouse mesenchymal stem cells promote breast cancer metastasis**. Stem Cell Research 7. 163–171.
- Albini A and Sporn M. 2007. **The tumor microenvironment as a target for hemoprevention**. Nat Rev Cancer. 7. 139-147.
- Altaner C, Altanerova V, Cihova M, Hunakova L, Kaiserova K, Klepanec Andrej, Vulev Ivan, Madaric Juraj. 2013 **Characterization of Mesenchymal Stem Cells of “No-Options” Patients with Critical Limb Ischemia Treated by Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells**. PLoS ONE 8:9. 1-9.
- Aníbal M. 1996. **Inmunología e inmunoquímica fundamentos**. 5ta ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 593-605.
- Apparailly F, Jorgensen C, Lazennec G. 2008. **Multipotent stromal cells: controversial impact on tumor development and metastasis**. MedSci. 6:4. 350-360.
- Atsuta Ikiru, Liu Shiyu, Miura Yasuo, Kentaro Akiyama, Chen Chider, An Ying, Shi Songtao, Chen Fa-Ming. 2013. **Mesenchymal stem cells inhibit multiple mieloma cells via the Fas/Fas ligand pathway** Stem Cell Research & Therapy. 4:5:111. 1-9.
- Bernardo Ester M, Fibbe W. 2013. **Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation**. Cell Stem Cell. 13:4. 392-402.
- Breitbart William, Rosenfeld Barry, Tobias Kristen, Pessin Hayley, Ku Y. Geoffrey, Yuan Jianda, Wolchok Jedd. 2013. **Depression, cytokines, and pancreatic cancer**. Psycho-Oncology. 10.1002. 1-7.
- Brestovac Brian, Wong E. Michelle, Tjendera Rayomond, Costantino J Paul. Mamotte Cyril, Witt S Campbell. 2013. **Human papillomavirus, high-grade intraepithelial neoplasia and killer immunoglobulin-like receptors: a Western Australian cohort study**. Infectious Agents and Cancer. 8:33. 1-5.
- Castellsagué X, Bosch F. 2007. **Vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH): incorporación del pediatra en la lucha contra el cáncer de cuello uterino**. rev pediátr Aten Primaria. 93S. 21-42.
- Chagas Simas B, Gurgel D. A. P. A., Da cruz A. L. Heidi, Medeiros Amaral C M, Vinicius Cardoso M, Silva Neto da Costa J, Ferreira da Silva L A, Bezerra de Albuquerque M E, Cartaxo Muniz T M, de Freitas C. A. 2013. **An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women**

**infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives.** Infection, Genetics and Evolution 19. 32–37.

- Chapel A, Bertho J, Bensidhoum M, Fouillard L, Young R, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin N, Gourmelon P, Thierry D. 2003. **Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome.** Gene Med. 5:12. 1028-1038.

- Clerici Mario, Merola Marina, Ferrario Enrica, Trabattoni Daria, Villa Luisa Maria, Srefanon Bernardina, Venzon J. David, Shearer M. Gene, De Palo Giuseppe, Clerici Enrico. 1997. **Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection.** Journal of the National Cancer Institute, 89:3. 245-250

- Contreras Landeros S. Y. 2011. **Análisis de la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por Células Estromales Mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino.** Tesis de licenciatura.

- Crosbie Emma J, Einstein Mark H, Franceschi Silvia, Kitchener Henry C. 2013. **Human Papillomavirus and Cervical Cancer.** Lancet. 7:382. 889-899.

- Dennis L. Kristen, Blatner Nichole R., Gounari Fotini, Khazaia Khashayarsha. 2013. **Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer.** Curr Opin Oncol. 25. 637-645.

- Di Nicola Massimo, Carlo-Stella Carmelo, Magni Michele, Milanese Marco, Longoni D. Paolo, Matteucci Paola, Grisanti Salvatore, Gianni M. Alessandro. 2002. **Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocytes proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.** Blood. 99:10. 3838-3843.

- Djouad F, Charbonnier L, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. 2007. **Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an IL-16 dependent mechanism.** Stem Cells. 10:1634. 2025-2032.

- Djouad F, Pence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. 2003. **Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals.** Blood. 102:10. 3837-3844

- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** Cytotherapy. 8:4. 315-317.

- Don López C. A. 2010. **Efecto de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino en la inducción del crecimiento tumoral en ratones de la cepa C57BL/6.** Tesis de licenciatura.

- Doorbar J, Quint W, Bnaks, Bravo I. G., Stoler Mark, Broker T. R., Stanley Margaret A. 2012. **The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses.** Vaccine 30S. 56-59.

- Duffy M. M, Ritter T, Ceredig R, Griffin D. M. 2011. **Mesenchymal stem cell effects on T cell effector pathways** Stem Cell Research & Therapy. 2:34. 1-9.

- English K. 2013. **Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation.** Immunology and Cell Biology 91. 19–26.
- Fainboim L., & Geffner J. 2005. **Introducción a la inmunología humana.** 5ta ed., Ed. Medica Panamericana, Argentina, 484pp.
- Freitas G. M. C. 2013. **The dual role of mesenchymal stem cells in tumor progression.** Stem Cell Research & Therapy. 4:2. 42.
- Friedenstein A, Chailakhyan R, Latsinik N, Panasyuk A, Keiliss-Borok I. 1974. **Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo.** Transplant. 17. 331-340.
- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. 2010. **Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications.** StemCellResTher. 15:1. 1-11.
- Giordano A, Galderisi U, Marino I. 2007. **From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells.** J Cell Physiol 211:1. 27-35.
- Guizar J. 2001 **Genética Clínica. Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias.** 3er ed. Manual Moderno. México. 763-779.
- Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2004. **Inmunología.** 5ta ed. Mc Graw Hill. Interamericana, México D.F 1-9.
- Hage El. F, Durgeau A, Mami-Chouaib F. 2013. **TAP expression level in tumor cells defines the nature and processing of MHC class I peptides for recognition by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 1283. 75–80.
- Hellner K, Mar J, Fang F, Quackenbush J, Münger K. 2009. **HPV16 E7 Oncogene Expression in Normal Human Epithelial Cells Causes Molecular Changes Indicative of an Epithelial to Mesenchymal Transition.** Virology. 39. 57-58
- Hung Shih-Chieh, Yang Den-Mei, Chang Ching-Fang, Lin Ruey-Jen, Wang Jih-Shiuan, Ho Larry Low-Tone, Yang Wen K. 2004. **Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes.** Int. J. Cancer. 110. 313-314.
- Hussain K. Shehnaz, Madeleine M. Margaret, Johnson G. Lisa, Du Qin, Galloway A. Denise, Daling R. Janet, Malkki Mari, Petersdorf W. Effie, Schwartz M. Stephen. 2012. **Nucleotide variation in IL-10 and IL-12 and their receptors and cervical and vulvar cancer risk: A hybrid case–parent triad and case–control study.** Int. J. Cancer. 133. 201–213.
- Horton A. Jason, Hudak E. Kathryn, Chung Joo Eun, White O. Ayla, Scroggins T. Bradley, Burkeen F. Jeffrey. Citrin E. Deborah. 2013. **Mesenchymal Stem Cells Inhibit Cutaneous Radiation-Induced Fibrosis by Suppressing Chronic Inflammation.** Stem Cells 31. 2231-2241.
- Johansson C, Schwaetz S. 2013. **Regulation of Human Papillomavirus Gene Expression By Splining And Polyadenylation.** Microbiology. 11. 239-243.
- Joyce A. Johanna, Pollard W. Jeffrey. 2009. **Microenvironmental regulation of metastasis.** Nat Rev Cancer. 9:4. 239–252.

- Karnoub A, Dash A, Vo AP, Sullivan A, Brooks M, Bell G, Richardson A, Polyak K, Tubo R, Weinberg R. 2007. **Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis.** Nature. 449. 557-563.
- Keramidas Michell, De Fraipont Florence, Karageorgis Anstassia, Moisan Anaick, Persoons Virginie, Richard Marie-Jeanne, Coll Jean-Luc, Rome Claire. 2013. **The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis.** Stem Cell Research & Therapy. 4:41. 1-12.
- Kim Yang-Hee, Wee Yu-Mee, Choi Monica-Y, Lim Dong-Gyun, Kim Song-Cheol, Han Duck-Jong. 2011. **Interleukin (IL)-10 induced by CD11b+ cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts.** Mol Med. 17:7-8. 697-708.
- Kindt J. T, Goldsby A. R, Osborne A. Barbara. 2007. **Inmunología de Kuby.** 6ta ed. Mc Graw Hill. México DF. pp 15,16,216
- Klopp H. A, Gupta A, Spaeth E, Andreeff, Marin F. 2011. **Concise Review: Dissecting a Discrepancy in the Literature: Do Mesenchymal Stem Cells Support or Suppress Tumor Growth?.** STEM CELLS. 29. 11–19.
- Koyama H, Kobayashi N, Harada M, Takeoka M, Kawai Y, Sano K, Fujimori M, Amano J, Ohhashi T, Kannagi R, Kimata K Taniguchi S, Itano N. 2008. **Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment.** Pathol. 172. 179-193.
- Kucerova Lucia, Matuskova Miroslava, Hlubinova Kristina, Altanerova, Altaner Cestmir. 2010. **Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells.** Molecular Cancer. 9:129. 2-15
- Lampen H. Margit, Hall van Thorbald. 2011. **Strategies to counteract MHC-I defects in tumor.** Current Opinion in Immunology. 23. 293–298.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O’Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC (1996) **Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen.** Cancer Res. 56. 21–26.
- Lin Siang-Yo, Dolfi C. Sonia, Sohrabamiri, Li Jaidong, Budak-Apldogan Tulin, Lee Kuo-Cheieh, Derenzo Christopher, Nerjee Ba Debabrata, Glod John. 2013. **P53 regulates the migration of mesenchymal stromal cells in response to the tumor microenvironment through both CXCL12-dependent and -independent mechanisms.** International Journal of Oncology. 2109. 2-7
- Liu Hua, Kemeny Michael David, Heng Chin Boon, Ouyang Wei Hong, Melendez J. Alirio, Cao Tong. 2006. **The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells.** Journal of Immunology. 176. 2864-2871.
- Liu Wen-Hua, Liu Jing-jin, Wu Jian, Zhang Lu-Lu, Liu Fang, Yin Li, Zhang Mao-Mao, Yu Bo. 2013 **Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells via Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway.** PLoS ONE. 8:1. 1-13.

- Liu Hua, Lu kai, MacAry Paul Anthony, Wong Loon Kok, Heng Alexis, Cao Tong, Kemeny Michael David. 2012. **Soluble molecules are key in maintaining the immunomodulatory activity of murine mesenchymal stromal cell.** Journal of cell science. 125. 200-208.
- Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. 2007. **Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?.** Hematol. 92. 872-873.
- Luheshi Nadia, Davies Gareth, Poon Edmund, Wiggins Kimberley, McCourt Matthew, Legg James. 2013. **Th1 cytokines are more effective than Th2 cytokines at licensing anti-tumour functions in CD40 activated human macrophages in vitro.** Eur J Immunol. 00.1-11
- Ma D, Niederkorn JY. 1995. **Transforming growth factor-beta down-regulates major histocompatibility complex class I antigen expression and increases the susceptibility of uveal melanoma cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity.** Immunology. 86:2. 263-269.
- Maby-El Hajjami H, Ame-Thomas P, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, Bescher N, Monvoisin C, Dulong J, Lamy T, Fest T, Tarte K. 2009. **Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase.** CancerRes. 69. 3228-3237.
- Matsuda Masanori By, Salazar Flavio, Petersson Max, Masucci Giuseppe, Hansson Johan, Pisa Pavel, Zhang Qian-Jin, Masucci G. Maria, Kiessling Rolf. 1994. **Interleukin 10 Pretreatment Protects Target Cells from Tumor- and Allo-specific Cytotoxic T Cells and Downregulates HLA Class I Expression.** J Exp Med. 180. 2371-2376.
- Mehta AM, Jordanova ES, Kenter GG, Ferrone S, Fleuren GJ. 2008. **Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma.** Cancer Immunol Immunother. 57. 197-206.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. 2004. **Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation.** Blood. 103. 4619-4621.
- Molling J, de Gruijl T, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer C, van den Eertwegh A, Scheper R, von Blumberg M, Bontkes H. 2007. **CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia.** Int J Cancer. 121:8. 1749-1755.
- Montalvo Esquivel G, Coronel Martínez J. A, Alvarado Zermeño A, Cantú de L. D. F, Flores Alatraste D, Ortega Rojo A, González Enciso A, Isla Ortiz D, Muñoz Gonzáles D. E, Robles Flores J. U, Solorza L. G, Mota García A, Gallardo Rincón D, Morales Vásquez F, Centina Pérez M. L, Herrera Gómez Á. 2011. **Cáncer Cervicouterino.** Cancerología, Oncoguía. 6:11. 61-69.

- Montesinos JJ, Mora-García MD, Mayani H, Flores-Figueroa E, García-Rocha R, Castro-Manreza M, Fajardo-Orduña G, Weiss-Steider B, Monroy-Garcia A. **In vitro evidence of the presence of Mesenchymal Stromal Cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity.** Stem Cells Dev. 22:18. 2508-2519
- Moore W. Kevin, Malefyt de Waal Rene, Coffman L. Robert, O'Garra Anne. 2001. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** Annu. Rev. Immunol. 19. 683–765.
- Morandi Fabio, Raffaghello Lizzia, Bianchi Giovanna, Meloni Francesca, Salis Annalisa, Millo Enrico, Ferrone Soldano, Bamaba Vincenzo, Pistoia Vito. 2008. **Immunogenicity of human Mesenchymal stem cells in HLA-class I restricted T cell responses against viral or tumor-associated antigens.** Stem Cells. 26:5. 1275-1287.
- Murphy Kenneth, Travers Paul, Walport Mark. 2008. **Immunobiología.** 7<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill. México DF. 87-90pp
- Nair Smita, Aldrich J. Amy, McDonnell Eoin, Cheng Quing, Aggarwal Anshu, Patel Pujan, Williams M. Monique, Boczkowski David, Lysterly Kim H., Morse A. Michael, Devi R. 2013 **Immunologic Targeting of FOXP3 in Inflammatory Breast Cancer Cells.** PLoS ONE 8:1. 1-5.
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. 2007. **Expression of ondoleamine 2, 3-dioxigenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development of progression of uterine cervical cancer.** Cancer Sci. 98:6. 874-881.
- Nauta J. Alma, Fibbe E. Willem. 2007. **Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells.** The American Society of Hematology 110:10. 3499-3506.
- Páez D, Arévalo J, Rodríguez Y. 2007. **Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea.** NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 5. 101-212.
- Paunescu Virgil, Bojin M. Florina, Tatu A. Calin, Gavriliuc I. Oana, Rosca Adriana, Griia T. Aezandra, Tanasie Gabriela, Bunu Caremen, Crisnic Daniela, Gherghiceanu Mihaela, Tatu R. Fabian, Tatu S. Carmen, Vermasan Simona. 2011. **Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences.** J. Cell. Mol. Med.15:3. 635-646.
- Paz de la Rosa G, Monroy A, Mora M, Reynaga C, Hernandez J, Weiss B, Gomez M. 2009. **An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice.** Virol J 6:2. 1-11.
- Petersson Max, Charo Jehad, Onfray Salazar Flavio, Noffz Gabriele, Mohaup Mariette, Quin Zhihai, Klein George, Blankenstein Thomas, Kiessling Rolf. 1998. **Constitutive IL 10 Production Accounts for the High NK Sensitivity, Low MHC Class I Expression, and Poor Transporter Associated with Antigen**

**Processing (TAP)-1/2 Function in the Prototype NK Target YAC-1.** The Journal of Immunology. 161. 2099–2105.

- Piersma S, Jordanova E, Van Poelgeest M, Kwappenberg K, Van der Hulst M, Drijfhout J, Melief C, Kenter G, Fleuren G, Offringa R, van der Burg S. 2007. **High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early cervical cancer.** Cancer Res. 67:1. 354-361.

- Regueiro González J. R., López Larrea C., González Rodríguez S, Martínez Naves. 2011. **Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune.** 4ª ed. Medica Panamericana. Madrid. 247pp.

- Rodríguez Antonia J, Galeano L, Palacios M. D, Gómez C, Serrano L. M, Bravo M. M, Combata L. A. 2012. **Altered HLA Class I and HLA-G Expression Is Associated with IL-10 Expression in Patients with Cervical Cancer.** Pathobiology. 79. 72–83.

- Roitt IM Delves P, Martin SJ and Burton DR. 2008. **Inmunología Fundamentos.** 11ª ed. México D.F. Médica Panamericana 140pp.

- Rojas Espinosa O. 2001. **Inmunología (de memoria).** 2ª ed. Médica Panamericana. México D.F. 256-267.

- Roorda BD, Ter Elsta A, Diks SH, Meeuwssen-de Boer TG, Kamps WA, Bont ES. 2009. **PTK787/ZK 222584 inhibits tumor growth promoting mesenchymal stem cells: kinase activity profiling as powerful tool in functional studies.** Cancer boil ther. 4:13. 1239-1248.

- Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. 2007. **Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells.** Clin Exp Immunol. 149. 353-363.

- Saldanha-Araujo F, Ferreira FI, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RH, Covas DT, Zago MA, Panepucci RA. 2011. **Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes.** Stem Cell Res. 7:1. 66-74.

- Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. 2007. **Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells.** Blood. 109. 228-234.

- Stagg J. 2008. **Mesenchymal stem cells in cancer.** Stem Cell Rev. 4. 119-24.

- Stites Daniel, Terr Abba, Parslow Tristan. 2000. **Inmunología básica y clínica.** 9ª ed. El manual moderno. México. 91-103pp.

- Suzuki Kazuhiro, Sun Ruowen, Origuchi Makoto, Kanehira Masahiko, Takahata Takenori, Itoh Jugoh, Umezawa Akihiro, Kijima Hiroshi, Fukuda Shinsaku, Saijo Yasuo. 2011. **Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth through the Enhancement of Neovascularization.** M O L M E D 1 7:7 – 8. 5 7 9 - 5 8 7.

- Soleymaninejadian Ehsan, Pramanik Krishna, Samadian Esmaeil. 2012. **Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors.** Am J Reprod Immunol; 67: 1–8.

- Song Shuxia, Wang Yue, Wang Junxia, Lian Weiguang, Liu Shufeng, Zhang Zhengzheng, Liu Fuying, Wei Lin. 2012. **Tumour-derived IL-10 within tumour microenvironment represses the antitumour immunity of Socs1-silenced and sustained antigen expressing DCs.** European J. of Cancer 48. 2252-2259.
- Takeuchi Masao, Takeuchi Kikuko, Kohara Arihiro, Satoh Motonobu, Shioda Setsuko, Ozawa Yutaka, Ohtani Azusa, Morita Keiko, Hirano Takashi, Terai Masanori, Umezawa Akihiro, Mizusawa Hiroshi. 2007. **Chromosomal instability in human mesenchymal stem cell immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes.** invitrocell. 43. 130-137.
- Tindle R. 2002. **Immune Evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer.** Nature rev. 2. 1-7.
- Tchou Julia, Zhang J. Paul, Bi Yingtao, Satija Celine, Marjundar Rajrupa, Stephen L. Tom, Lo Albert, Chen Haiying, Mies Carolyn, June H. Carl, Conejo-Garcia Jose, Puré Ellen. 2013. **Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor associated macrophages in human breast cancer.** Human Pathology. 06.016. 1-9
- Tse T. William, Pendleton D. John, Beyer M Wendy, Egalka C. Matthew, Guinan C. Eva. 2003. **Suppression of allogeneic T-Cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation.** Journal of Cancer Molecules. 75. 389-397.
- Tsuruma Tetsuhiro, Yagihashi Atsuhito, Torigoe Toshihiko, Sato Noriyuki, Kikuchi Kokichi, Watanabe Naoki Hirata Koichi. 1998. **Interleukin-10 Reduces Natural Killer Sensitivity and Downregulates MHC Class I Expression on H-ras-Transformed Cells.** Cellular Immunology 184. 121–128.
- Udagawa T, Puder M, Wood M, Schaefer B, D'amato R. 2006. **Analysis of tumor-associated stromal cells using SCID GFP transgenic mice: contribution of local and bone marrow-derived host cells.** FASEB. 20. 95-102.
- Urosevic Mirjana, Kurrer O. Michael, Kamarashev Jivko, Mueller Beatrix, Weder Walter, Burg Guenter, Stahel A. Rolf, Dummer Reinhard, Trojan Andreas. 2001. **Human Leukocyte Antigen G Up-Regulation in Lung Cancer Associates with High-Grade Histology, Human Leukocyte Antigen Class I Loss and Interleukin-10 Production.** American Journal of Pathology. 159:3. 817-824.
- Usha L, Rao G, Christopherson II K, Xu X 2013 **Mesenchymal Stem Cells Develop Tumor Tropism but Do Not Accelerate Breast Cancer Tumorigenesis in a Somatic Mouse Breast Cancer Model.** PLoS ONE 8:9. 1-11.
- Visser J, Nijman H, Hoogenboom B, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee A, Daemen T. 2007. **Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia.** Clin Exp Immunol. 150:2. 199-209.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Munos N. 1999. **Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide.** Pathol. 189. 12-19.

- Wang Bei, Niu Dandan, Lai Liyun Ren Chee Ee. 2013. **p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1.** Nature Communications 4:2359. 1-12.
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM 2010 **A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype.** PLoS ONE 5:4. 1-14.
- Weir Donal M., Stewart John, 1993, **Inmunología**, 2da Ed. El Manual Moderno, México DF. 74-81pp.
- Welters M, Kenter G, Piersma S, Vloon A, Löwik M, Berends-van der Meer D, Drijfhout J, Valentijn A, Wafelman A, Oostendorp J, Fleuren G, Offringa R, Melief C, van der Burg S. 2008. **Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine.** Clin Cancer Res. 14:1. 178-187.
- Wong S., Y. Rebeca. 2011. **Mesenchymal StemCells: Angels or Demons?.** Journal of Biomedicine Biotechnology. 2011. 459-510.
- Xue Shao-An, Gao Liquan, Ahmadi Maryam, Ghorashian Sara, Barros D. Rafael, Pospori Constandina, Holler Angelika, Wright Graham, Thomas Sharyn, Topp Max, Moeis C. Emma, Srauss J. Hans. 2013. **Human MHC Class I restricted high avidity CD4+ T cells generated by co-transfer of TCR and CD8 mediate efficient tumor rejection in vivo.** OncoImmunology 2:1. 1-12.
- Yang Wen, Song Yan, Lu Yun-Long, Sun Jun-Zhong, Wang Hong-Wei. 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. 513–522.
- Yen B, Yen M. 2008. **Mesenchymal stem cells and cancer- for better or for worse.** Cancer Mol. 4. 5-9.
- Yen Linjo B., Yen Men-Luh. 2008. **Mesenchymal Stem Cells and Cancer for Better or for Worse?** Journal of Cancer Molecules. 4:1. 5-9.
- Yu Hua, Kortylewski Marcin, Pardoll Drew. 2007. **Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.** Nature Reviews. 7. 41-51.
- Yue Yun Feng, Dummer Reinhard, Geertsen Ralf Hofbauer Günther, Laine Elisabeth, Manolio Silvana. 1997. **Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class II and ICAM-1 molecules.** Int. J. Cancer. 71. 630–637.
- Zaldívar Lelo de Larrea Guadalupe, Martín Molina Francisco, Sosa Ferreyra Carlos francisco, Ávila Morales Javier, Llorete Rivas Miguel, Román Lara Monserrat, Vega Malagón Genaro.2012. **Cáncer Cérvicouterino y Virus del Papiloma Humano.** Rev Chil Obstet Ginecol. 77:4. 316-320.
- Zambrano Sergio A, 1994. **Inmunología.** Nueva Editorial Interamericana. México DF. 142-147pp.

- Zhang Wu Xue. 2013. **A combination of epitope prediction and molecular docking allows for good identification of MHC class I restricted T-cell epitopes.** Computational Biology and Chemistry. 45. 30-35.
- Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. 2006. **Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo.** Exp Mol Pathol. 80. 267-274.