



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Caracterización de las propiedades inmunomoduladoras
de las células estromales mesenquimales derivadas de
tumores de cáncer de mama**

TESIS

**Que para obtener el título de
Licenciada en biología**

PRESENTA

Elizabeth Téllez Rivera

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alexander Pedroza González

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis Padres

Isabel y Rubén, por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar, creer en mí y en mis expectativas cada día, pero sobre todo, por darme la vida, sus desvelos, su incondicional apoyo y su amor.

Agradecimientos

El trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero proporcionado por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyectos IA204515/RA204515 e IA208717.

Así mismo agradezco a la beca otorgada por el proyecto IA204515/RA204515.

1. Licenciatura/ Titulación 16/12/2017 31/08/18

Agradecimientos Personales

En primer lugar, quiero agradecer al Doctor Alexander Pedroza González, director de esta tesis, por haberme guiado con paciencia y enseñanzas a lo largo de todo este proyecto, con sus conocimientos y experiencia me ayudó y alentó para concluir esta investigación.

Así mismo, agradezco a todos mis profesores durante toda mi vida académica que han contribuido con sus enseñanzas, a ser la profesionista que soy. Gracias en especial a Santi, por sus consejos y por apoyarme a aclarar mis dudas en la realización de este proyecto. Gracias al Doctor Jiménez, por compartir su vasto conocimiento y por las sugerencias para mejorar día con día. Gracias a la Doctora Gina, por ser tan amable conmigo y por contar siempre con su apoyo y gracias al Doctor René por haber participado en la revisión y sus sugerencias a esta investigación.

Por otra parte, me da gusto agradecer a mis Padrinos, Leticia y Enrique por haberme apoyado de todas las formas posibles, no solo para terminar esta tesis, sino para culminar mi carrera y ser mis segundos Padres a los que aprecio con todo mi corazón. Gracias a toda mi hermosa familia, la cual me enorgullece pertenecer, este logro se lo dedico a ustedes.

También quiero agradecer a Mario, mi mejor amigo desde la secundaria por haberme apoyado, aconsejado, y sobre todo, por evitar que un explante de uno de mis pacientes muriera. Y aunado a su contribución a este proyecto, valoro bastante su permanencia y su amistad después de tantos años y con quien estoy muy feliz de compartir este logro.

Gracias a mis amigos del CCH que han permanecido a mi lado a pesar de escoger diferentes caminos y en quienes espero seguir contando con su amistad. Gracias Mitzi, Mauricio, Dante, Arturo y Alan.

De igual forma, quiero agradecer a mis amigas de la carrera con las que viví muchos momentos increíbles e inolvidables. Gracias a Itzel, por ser mi amiga y compañera (hasta novia según Gladys y Martín), por compartir su gusto por MUSE conmigo, por estar en las buenas y en las malas siempre. Gracias a Diana por ser tan buena amiga, por sus consejos, su apoyo y por las grandiosas experiencias., las aprecio mucho a las dos. Agradezco a D Aletsia (Alexia) por su apoyo y consejos para la escritura de esta tesis y por su hermosa amistad, gracias por ser mi querida Luna.

Por último, quiero agradecer a mis compañeros y amigos de laboratorio, a Diana y Álvaro por sus consejos y enseñanzas, por ser mis mentores durante la etapa de experimentación de este proyecto y por su amistad brindada. Gracias a Daniel por el apoyo, las risas y las experiencias compartidas y a todos los que colaboraron para que este proyecto se realizara. Gracias Fernanda, Antonio y Alejandro.

Para terminar me gustaría dedicar un Goya a mi amada Universidad, la que me acogió desde el bachillerato y la que me formó como profesionista para el servicio de mi querido México. ¡Gracias UNAM!

Índice

| | |
|---------------------------------|----|
| Abreviaturas..... | 1 |
| Resumen..... | 2 |
| Abstract..... | 3 |
| Introducción..... | 4 |
| Planteamiento del problema..... | 10 |
| Hipótesis..... | 11 |
| Objetivos..... | 12 |
| Estrategia experimental..... | 13 |
| Resultados..... | 16 |
| Discusión..... | 25 |
| Conclusiones..... | 28 |
| Perspectivas..... | 29 |
| Referencias..... | 30 |

Abreviaturas

Células asesinas naturales (Células NK)

Células dendríticas (DC)

Células estromales mesenquimales (MSCs)

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)

Indoleamina 2, 3 dioxigenasa (IDO)

Interferón gamma (IFN- γ)

Interleucina 1 (IL-1)

Ligando coestimulador inducible (ICOS-L)

Ligando 1 de muerte programada (PD-L1)

Linfocitos T reguladores (Tregs)

Linfopoyetina tímica estromal (TSLP)

Macrófagos asociados a tumores (TAM)

Sociedad internacional de Terapia celular (ISCT)

Resumen

El cáncer de mama es el carcinoma más frecuente en mujeres a nivel mundial. Ante las limitaciones actuales en tratamientos se ha sugerido a la inmunoterapia como alternativa, sin embargo se necesita de un mayor entendimiento de la regulación inmunitaria dentro del sitio de lesión para garantizar su éxito terapéutico. El microambiente tumoral es muy complejo debido a la constante interacción de células tumorales con células estromales mesenquimales (MSCs), fibroblastos y células de la respuesta inmunitaria. Las MSCs interactúan con células de la respuesta inmune para llevar a cabo sus funciones efectoras de modulación, presentan un tropismo muy característico hacia células tumorales y su presencia ha sido documentada en tumores mamarios y en modelos in vitro y se ha observado que favorecen el desarrollo tumoral. Sin embargo se conoce muy poco acerca de su contribución en el desarrollo de tumores humanos. Por ende, en el presente trabajo se aislaron y cultivaron MSCs a partir de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama para su posterior caracterización fenotípica y funcional. Se realizó un análisis fenotípico mediante citometría de flujo y se determinó su frecuencia en tumores de cáncer de mama, en el cual las células fueron negativas para los anticuerpos anti CD45 y CD24 y positivas para CD44, CD90, CD73 y CD105. Se realizaron ensayos funcionales para evaluar la expresión de las moléculas inmunoregulatoras, ICOS-L y PDL-1 y la producción de las citocinas linfopoyetina tímica estromal (TSLP) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) antes y después de estimular con las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF α . Se observó que la expresión de ICOS-L se vio ligeramente incrementada por los estímulos inflamatorios, mientras que no se observaron cambios significativos para PD-L1, además se detectó la producción de GM-CSF pero no de TSLP. Se concluye que las MSCs derivadas de tumores de cáncer de mama pueden jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune local en tumores mamarios a través de las moléculas PD-L1, ICOS-L y GM-CSF contribuyendo a un microambiente de inmunosupresión y probablemente de inducción de respuestas de tipo Th2 que favorecen el crecimiento tumoral.

Abstract

Breast cancer is the most prevalent carcinoma in women worldwide. Given the current limitations in treatments the use of immunotherapy is an attractive alternative. However, a better understanding of immune regulation within the site of injury is needed to guarantee therapeutic success. The dynamic interactions of cells that form part of the tumor microenvironment can determine the type of immune response produced. Mesenchymal stroma cells (MSCs) constitute an important component of tumor stroma and their presence favors tumor development in animal models. However, there is very scarce information about their contribution to the development of human tumors. Therefore, in the present work, we analyzed the presence and functional characteristic of MSCs isolated from primary breast tumors of patients with breast cancer. Using flow cytometric analysis we found that MSCs isolated from early breast tumor were CD45-CD24-CD44+CD90+CD73+CD105+ and they expressed the regulatory molecules ICOS-L and PDL-1. In response to the inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α , tumor derived MSCs produce the cytokine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), but not thymic stromal lymphopoietin (TSLP). It was observed that the expression of ICOS-L was slightly increased by the inflammatory stimuli, while no significant changes were observed for PD-L1. These observations suggest that MSCs derived from primary breast tumors can play an important role in the regulation of the local immune response through the expression of the molecules PD-L1, ICOS-L and GM-CSF contributing with an immunosuppressive microenvironment and probably the induction of Th2 type responses that favors tumor growth.

Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo una de las principales causas de mortalidad con casi nueve millones de decesos por año y unos 14 millones de nuevos casos diagnosticados (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017). Se calcula que dentro de dos décadas, habrá un aumento del 70% de casos nuevos en cáncer (OMS, 2015), por lo que las acciones para buscar su tratamiento y prevención han cobrado mayor importancia hoy en día. Entre las neoplasias con mayor afectación en la población, se encuentra el cáncer de mama, donde al menos en nuestro país, en el año 2002 ocupaba el segundo lugar como causa de mortalidad general dentro del grupo de mujeres mayores de 25 años, sólo siendo superado por el cáncer cérvico uterino. Sin embargo, en México a partir del año 2006, el cáncer de mama desplazó al cáncer cérvico uterino para ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer (Secretaría de salud, 2015) El riesgo de desarrollar un carcinoma invasor es del 12.6 %, lo que significa una mujer de cada 8 de todas aquellas que lleguen a vivir 80 años (Lozano et al., 2008).

En las últimas décadas, los avances en el tratamiento y diagnóstico temprano del cáncer de mama han permitido que muchos pacientes sanen y otros tantos controlen la enfermedad durante varios años (Lanari y Molinolo, 2003). Los recientes avances en la medicina básica han producido cambios en los paradigmas del manejo del cáncer, que actualmente se reconoce como una enfermedad crónica y con una prevalencia en aumento, y cuya complejidad lo hace difícil de controlar. Los tratamientos actuales además de ser muy agresivos para las pacientes, se limitan a estadios muy tempranos de la enfermedad, siendo ineficaces en etapas avanzadas (Pedroza et al., 2013). Como una alternativa, surge la inmunoterapia, que incluye diferentes estrategias como: nuevos anticuerpos monoclonales, vacunas terapéuticas, células activadas, células pulsadas, entre otros. Para todos los casos se requiere de una comprensión más profunda de los fenómenos fundamentales involucrados en la interacción entre el tumor y el sistema inmunitario (Lage y Crombet, 2011 y Pedroza et al., 2013).

Sin embargo, existen varios obstáculos que deben ser vencidos para permitir que este tipo de tratamiento pueda ser efectivo en la mayoría de las pacientes. Primero, el proceso de inmunización se ve afectado por múltiples factores como el estado de inmunosupresión

en que muchas pacientes se encuentran, producto de la carga tumoral, de la quimioterapia u otros factores aún no determinados. Otra dificultad, es la capacidad de los tumores de escapar al reconocimiento del sistema inmunitario. Estas estrategias de escape, van desde la inhibición de la presentación antigénica, hasta la producción de sustancias que pueden llegar a ser inmunosupresoras, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β por sus siglas en ingles), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las interleucinas 10 y 13 (IL-10, IL-13), (Salazar, 1999, Asford et al., 2007 y Pedroza et al., 2011).

Respuesta inmunitaria en cáncer de mama

Entre los mecanismos moleculares descritos en el cáncer de mama, se encuentran las células dendríticas expuestas a factores derivados del tumor, por ejemplo, la molécula TSLP, induce su maduración y la expresión de OX40L. Las DCs OX40L+ tienen la capacidad de activar a linfocitos T CD4 + para estimular la producción de IL-13 e IL-4 (Pedroza et al 2011). En este microambiente, la respuesta de los linfocitos que secretan IL-4 e IL-13 promueven el desarrollo tumoral directa o indirectamente a través de células mieloides que incluyen a los macrófagos. Los efectos directos incluyen la activación de vías anti-apoptóticas, además de promover la proliferación y diferenciación de los fibroblastos estromales. Los efectos indirectos incluyen la secreción de factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico) y proangiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular) por macrófagos asociados a tumores (TAM), así como la expresión de PDL-1 y la secreción de IL-10 que detienen la función efectora de las células T CD8 + (Palucka, et al. 2013). También es probable que las células cancerosas activen directamente a los linfocitos para que secreten IL-13. Los factores moleculares y celulares que contribuyen a la producción global de IL-13 en los cánceres epiteliales probablemente se extienden más allá de TSLP y son temas de amplio estudio (Oikhanud et al., 2011). Adicionalmente, otra citocina producida por las células tumorales es el GM-CSF, el cual también favorece la inducción de respuestas Th2 mediante la activación de DCs plasmacitoides (pDCs)(Ghirelli, et al. 2015).

El cáncer de mama y las neoplasias en general, pueden promover la expansión de linfocitos T reguladores (Tregs) para escapar de la citotoxicidad de las células T CD8+. Las células Treg se caracterizan por la expresión de las moléculas CD4, CD25 y FOXP3+,

y normalmente funcionan para proteger los tejidos de las enfermedades autoinmunes y representan del 5 al 10% de todos los linfocitos T en tejidos sanos (DeNardo y Coussens, 2007). Además, estudios recientes muestran que la eliminación de células Tregs pueden dar como resultado la disminución y erradicación de tumores en modelos murinos (Yu, et al., 2005). Asimismo, en pacientes con carcinoma invasivo, la presencia de un alto número de células Treg FOXP3+ predice el riesgo de una recaída tardía y la disminución en la supervivencia general del paciente (Gaynor, et al., 2006).

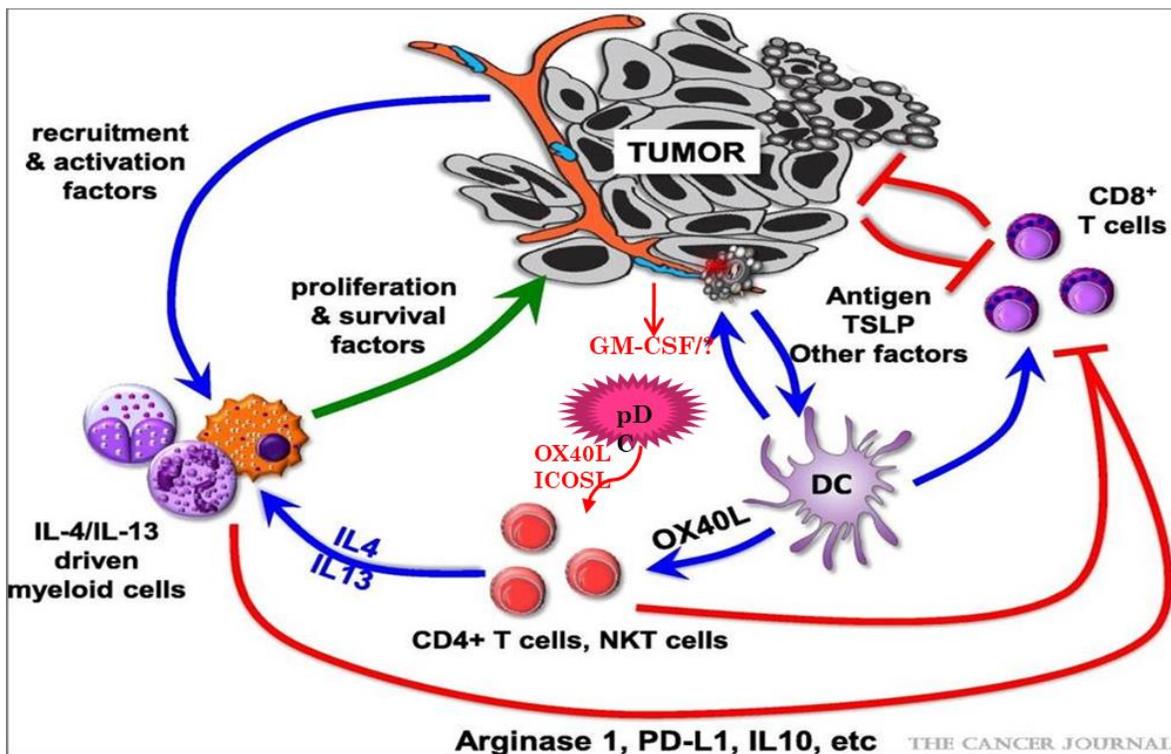


Figura 1. Circuito de citocinas en el cáncer de mama. Adaptado de *The Cancer Journal*, 2013.

Por ende, es crucial comprender los mecanismos de inmunosupresión que impiden el desarrollo de una respuesta inmunitaria anti-tumoral y obstaculizan el éxito de estrategias inmunoterapéuticas (Malvicini et al., 2010). Asimismo, es importante conocer el microambiente tumoral, en el cual las células tumorales están constantemente interaccionando con diferentes tipos celulares que incluyen células inflamatorias, células endoteliales y células estromales (Martínez, 2001; García et al., 2016).

Células estromales mesenquimales.

Las células mesenquimales estromales (MSC, por sus siglas en inglés “Mesenchymal stromal cells”) son una población celular con propiedades especiales, como plasticidad, autorenovación y funciones inmuno-reguladoras (García *et al.*, 2016; Hernanda *et al.*, 2014). Estas células han sido objeto de estudio a partir de la década de los años 70's cuando Friednestein *et al.*, las aisló por primera vez. Las MSC tienen una alta capacidad de proliferación, ya que se pueden expandir de manera efectiva in vitro y cuentan con una alta capacidad de diferenciación para hueso, cartílago, tejido adiposo e incluso neuronas (Owen, *et al.*, 1988 y Muguruma, *et al.*, 2006). Además, las MSC poseen la capacidad de reconstituir el microentorno hematopoyético tras el trasplante in situ (Muguruma *et al.*, 2006 y Saccetti, *et al.*, 2007) y son potentes moduladoras inmunitarias in vitro e in vivo (Le Blanc, 2005). Estas características han despertado considerable interés en MSC como candidatos para los enfoques de terapia celular, por lo que el propósito actual para los investigadores es aislar MSCs y usarlas como fuente de reparación tisular en diversas patologías (Le Blanc, 2012). Para esto es necesario su expansión y caracterización biológica in vitro.

Caracterización de MSC

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés “Inernational Society of Cell Therapy”) estableció criterios para poder denominar a una célula como MSC. En primer lugar, las MSC deben ser adherentes al plástico cuando se mantiene en condiciones de cultivo celular estándar. El 95% de la población de MSC expresan las moléculas CD105, CD73 y CD90, y carecen de la expresión de CD45, CD 14, CD 19 y CD 34. Por último, las células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos in vitro (Dominici, 2016). Aunque, en otros estudios se ha reportado que estas células son capaces de diferenciarse a neuronas y miocitos (Shih, *et al.*, 2002 y Pittenger, 2004), este tipo de diferenciación no se han establecido como general para las MSC.

La identificación de las MSCs es un tanto complicada debido a su baja frecuencia y aunque existe una amplia gama de marcadores positivos descritos para MSCs, hasta

ahora ni un solo marcador específico ha sido identificado. Algunos de los marcadores de superficie más comunes expresados por MSCs incluyen, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 y CD146, mientras que estas células son negativas para CD31, CD34, CD45, CD80 y CD86 (Vasconcellos et al., 2013).

.

Las células estromales mesenquimales en cáncer.

Las MSCs presentan un tropismo muy característico hacia células tumorales y su presencia ha sido documentada en tumores mamarios (Zhao et al., 2012; Vasconcelos et al., 2013). En modelos in vitro y animales se ha observado que favorecen el desarrollo tumoral, sin embargo no se conoce su participación en el desarrollo de tumores humanos (Hogan, 2012). Los mecanismos utilizados aparentemente son diferentes en cada especie como lo muestra un estudio comparativo en donde las MSC humanas ejercen un efecto inmunosupresor dependiente de la acción de la enzima indoleamina-2,3 dioxigenasa (IDO), la cual es inducida en presencia de IFN- γ . La enzima IDO es requerida para la inhibición de células Th1 productoras de IFN- γ y junto a la PGE2 bloquea la actividad de las células NK, contrario a las células derivadas de ratones que actúan principalmente por medio del óxido nítrico (Ren, et al., 2009).

Por otro lado, se ha reportado que las células de cáncer de mama in vitro tienen la capacidad de atraer MSC derivadas de médula ósea mediante la liberación de varios factores como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (Dwyer et al. 2007), el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) (Klopp, 2007). Las MSC presentes en el microambiente tumoral, podrían ser atraídas desde la médula ósea o ser MSC residentes ya que participan en el desarrollo de la glándula mamaria y permanecen presentes en el tejido mamario (Patki et al 2010, Cui et al 2014). Se ha demostrado que las MSC pueden promover el desarrollo de tumores mediante diversos mecanismos, que incluyen la inducción de la proliferación y migración en las células cancerosas, la modulación de la respuesta inmune local y la inducción de angiogénesis (Hernanda et al. 2014, Mathew et al. 2016, Zhao et al. 2012).

Las MSCs pueden regular la respuesta inmune in vitro al inhibir la maduración de las células dendríticas, así como al suprimir la proliferación y la función de los linfocitos T y B (Machado et al. 2013). Pueden promover la progresión tumoral al afectar la función de las células inmunitarias. Se ha demostrado que pueden polarizar el fenotipo de macrófagos asociados al tumor (TAM) en macrófagos de tipo M2 que producen IL-10 y que favorecen la supresión inmune local (Mathew et al. 2016). También pueden suprimir la actividad de las células NK y así promover la metástasis pulmonar en modelos animales (Gazdic et al. 2017). Además, se ha observado que la activación in vitro con interferón gamma (IFN γ) y lipopolisacárido (LPS) induce la expresión de moléculas inmunoreguladoras en las MSC como PDL-1 e IDO (Laranjeira et al. 2015, English et al. 2007).

Las propiedades inmunomoduladoras de las MSC las convierten en una fuente atractiva a emplear en la terapia celular, si bien para la regeneración de tejidos o para establecer la homeostasis en sitios con estados inflamatorios crónicos patogénicos. Sin embargo, su capacidad de migrar preferencialmente a sitios de inflamación crónica incluyendo tumores ha generado opiniones controversiales sobre su aplicación clínica (Uchibori, 2009), debido al potencial riesgo de favorecer el desarrollo de tumores.

Planteamiento del problema

Se ha documentado que las células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea, son capaces de promover el crecimiento tumoral en modelos animales de cáncer de mama. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las MSC inducen el desarrollo de tumores no se conocen por completo y se ha sugerido que puede ser mediado en parte por sus propiedades inmunoregulatoras. Adicionalmente, hay muy pocos estudios con MSC derivadas de tumores. Por ende, se requieren estudios adicionales para explorar la posibilidad de que las MSC derivadas de tumores humanos son capaces de modular la función de la respuesta inmune dentro del microambiente tumoral. Es por ello que en el presente estudio evaluamos la expresión de algunas moléculas inmunoregulatoras en MSC aisladas de tumores primarios de pacientes mexicanas con cáncer de mama. Así mismo, evaluamos su capacidad para producir citocinas implicadas en al patogenia del cáncer de mama como TSLP y GM-CSF en respuesta a estímulos inflamatorios.

Hipótesis

Las células estromales mesenquimales derivadas de tumores de cáncer de mama expresan moléculas capaces de regular la respuesta inmune local para inducir un estado de inmunosupresión en el microambiente que favorezca el desarrollo tumoral.

Objetivo general

Caracterizar la presencia de 3 moléculas inmuno-moduladoras en células estromales mesenquimales (MSC) derivadas de tumores mamarios de pacientes con cáncer de mama.

Objetivos particulares

1. Aislar y cultivar MSCs a partir de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama.
2. Analizar la capacidad de diferenciación de MSCs tumorales hacia osteoblastos y adipocitos, como prueba definitiva a MSC.
3. Caracterizar el inmunofenotipo de las MSCs tumorales por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti CD45, CD90, CD44, CD105 y CD73.
4. Realizar cultivos de MSCs para ensayos funcionales que permitan evaluar la expresión de las moléculas inmunoreguladoras GITRL, ICOSL y PDL-1 antes y después de estimular a las células con las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF α .
5. Evaluar la producción de las citocinas GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) y TSLP (linfopoyetina tímica estromal) ante estímulos inflamatorios como IL-1 (interleucina 1) y TNF α (factor de necrosis tumoral alfa).

Estrategia experimental

Muestras biológicas.

Se colectaron muestras de tejido tumoral y de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, provenientes del Hospital de Gineco-obstetricia del Centro Médico la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Las pacientes fueron de recién diagnóstico y la toma de muestras se obtuvo previa a cualquier tratamiento anti-cáncer. Así mismo, se consiguió el consentimiento informado de cada paciente previo a la donación de tejidos.

Tejido mamario. Los explantes se obtuvieron por medio de biopsias o mastectomía parcial o total. El tejido se colocó en un recipiente estéril con solución salina o medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) a 4° C para su transporte al laboratorio.

Aislamiento de MSCs de tumores de mama.

De muestras frescas de tumores mamarios se tomó un pequeño fragmento de aproximadamente 0.3 x 0.3 x 0.3 cm. El tejido se lavó con medio DMEM y con antibióticos por 30 minutos. Posteriormente el tejido (explante) se transfirió a una placa de cultivo de 24 pozos y se agregó medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, L-glutamina al 2mM y con 100 UI/mL de penicilina. El explante tumoral se mantuvo a 37 °C en una atmosfera de CO₂ al 5%, en una incubadora (NUAIRE). Cada tercer día se realizaron cambios de medio fresco al cultivo, donde a partir del primer cambio de medio se sustituyó el FBS convencional por un suero certificado para el crecimiento de células estromales mesenquimales. (MSC FBS, Gibco). Los cultivos se mantuvieron hasta la aparición de células adherentes con morfología característica de MSC (aproximadamente de 2 a 4 semanas). Una vez que las células crecieron por todo el pozo se transfirieron a cajas de 25 mm², y se dejaron crecer hasta alcanzar el 80% de confluencia. Finalmente, cuando se obtuvo un número suficiente de células se analizó su fenotipo por citometría de flujo y se utilizó para ensayos funcionales.

Análisis fenotípico de MSCs en cultivo celular.

Adicionalmente al cultivo celular se analizó la presencia y frecuencia de MSCs de acuerdo al fenotipo reportado en la literatura (CD45-CD90+CD44+CD105+CD73+) por citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando el citometro FACSCanto II (BD Biosciences) donde 10 000 eventos fueron colectados para su análisis, utilizando el software FlowJo versión 7.6 y 10.

Pruebas para diferenciación de MSCs

Diferenciación osteogénica. Se cultivaron 10, 000 células/ml en placas de 24 pozos para las pruebas de diferenciación hacia Osteoblastos. Se preparó el medio de diferenciación de Osteoblastos, utilizando el kit de diferenciación STEMPRO (Gibco, cat. A1007201) donde se utilizaron 2.9 mL de suero para osteogenesis, 100 µl de suplemento para osteoblastos y 30 µl de antibiótico. En cuanto a los controles negativos se colocó el medio normal para cultivo de MSCs. De igual manera, se le cambió el medio cada tercer día por 21 días. Consecuentemente, se fijaron con paraformaldehído (PFA AL 10%) y se tiñeron preparando una solución de detección de depósitos de calcio (Alizarin Red S al 0.2%) y se observaron por microscopio óptico.

Diferenciación adipogénica. Se cultivaron 10 000 células en 1 ml de medio por pozo en placas de 24 pozos y se cultivaron durante dos días en medio basal. Luego, los medios se reemplazaron con medio de diferenciación adipogénico, conteniendo DMEM suplementado con 4,5 g / ml de glucosa, 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U / ml de penicilina y 100 µg / ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 10 µg / ml de insulina humana (Roche cat. 11376497001), 0,1 mM de indometacina (Sigma-Aldrich cat. 18280), 0,5 mM de IBMX (Sigma-Aldrich cat. I7018) y 1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich cat. D4902). Los medios se cambiaron cada 3-4 días y, después de 3 semanas, las células se fijaron con paraformaldehído al 10%. La diferenciación se evaluó mediante la tinción de las vacuolas lipídicas con aceite rojo.

Ensayos funcionales

Las MSCs se cultivaron en placas de cultivo de 24 pozos con una densidad inicial de 10 000 células/mL. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 90 %, se procedió a activarlas con 20 ng/mL de TNF α , IL-1, la combinación de ambas ó 50 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). La activación se realizó por 48 hrs, y posteriormente se colectaron los sobrenadantes de los cultivos. Los niveles de TSLP y GM-CSF se midieron en los sobrenadantes del cultivo mediante kits de ELISA (Cat. 434204 y 432004, Biolegend). Después de remover los sobrenadantes, las células se colectaron utilizando PBS con 2 mM de EDTA. Las suspensiones de células individuales obtenidas de los cultivos se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos durante 10 minutos a temperatura ambiente y a oscuridad total. Posteriormente, las células se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo y se analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa y los datos se analizaron con el software Flowjo. Los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo: anti-CD24-FITC (e-Biosciences, 11-0247-42, eBIOSN3) y anti-GITRL (sistemas de I + D); Anti-ICOS-L-PE (MIH12, Cat.12-5889, e-Biosciences), anti-CD105 (BioLegend, 323206, 43A3) y anti-PD-L1 (Cat. 12-5983-42, e-Biosciences); Anti-CD44-PerCP (TONBO biosciences, 65-0441-U100, IM7); Anti-CD90-APC (BioLegend. 328114, 5610); Anti-CD73-PeCy7 (e-Bioscience, 25-0739-42, AD2) y anti-CD45-V450 (HI30, Cat. 48-0459-42 e-Bioscience).

Resultados

Pacientes

En el estudio se incluyeron 14 pacientes femeninas con cáncer de mama con una edad promedio de 54 años (36-87). El principal subtipo de cáncer observado fue ductal infiltrante con un 78.5 % (11/14), y el resto correspondió a carcinoma lobular infiltrante (tabla 1). Los estadios observados fueron IA (50%), IIA (21.4%), IIB (21.4%) y IIIA (7.1%), los cuales son considerados como tempranos de acuerdo a la “National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology version 1.2018”. Seis pacientes tuvieron afección de ganglios axilares. Características clínico patológicas adicionales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características clínico patológicas

| Característica | Frecuencia |
|-------------------------|------------|
| Edad | 54 (36-87) |
| Grado del tumor* | |
| Grade 1 | 5 |
| Grade 2 | 4 |
| Grade 3 | 3 |
| Tamaño del tumor** | |
| T1 | 9 |
| T2 | 4 |
| T3 | 0 |
| T4 | 0 |
| Afección de ganglios*** | |
| N0 | 8 |
| N1 | 4 |
| N2 | 1 |
| N3 | 0 |
| Estadio | |
| IA | 7 |
| IIA | 3 |
| IIB | 3 |
| IIIA | 1 |

*Dos de las pacientes no tenían reporte

** Una paciente no tenía reporte

*** Una paciente no tenía reporte

Caracterización morfológica y fenotípica de células mesenquimales estromales derivadas de muestras tumorales.

Las células se aislaron mediante el cultivo de tejidos tumorales frescos (explantes). Después de 2 semanas de cultivo, se observaron células adherentes especialmente alrededor de los explantes de tejido. La morfología temprana de las células en cultivo mostró una forma triangular o en forma de estrella (figura 2), a medida que las células se expandían en los cultivos, se observaban alargadas y de forma similar a fibroblastos.

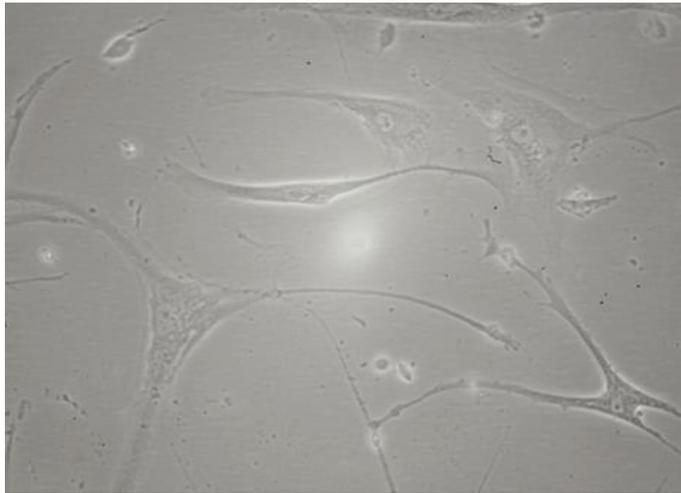


Figura 2. Morfología de las MSCs derivadas de tejido tumoral de mama en cultivo celular. Se observan células de morfología triangular adherentes al plástico en las primeras semanas de cultivo. Magnificación 200X.

Una vez que los cultivos fueron confluentes se analizó el fenotipo de las células por citometría de flujo utilizando marcadores que se han reportado para la identificación de MSC. Medimos la expresión de las moléculas CD44, CD45, CD90, CD73 y CD105. Como se observa en la figura 3 las células cultivadas fueron negativas para CD45, pero positivas para CD44, CD90, CD73 y CD105.

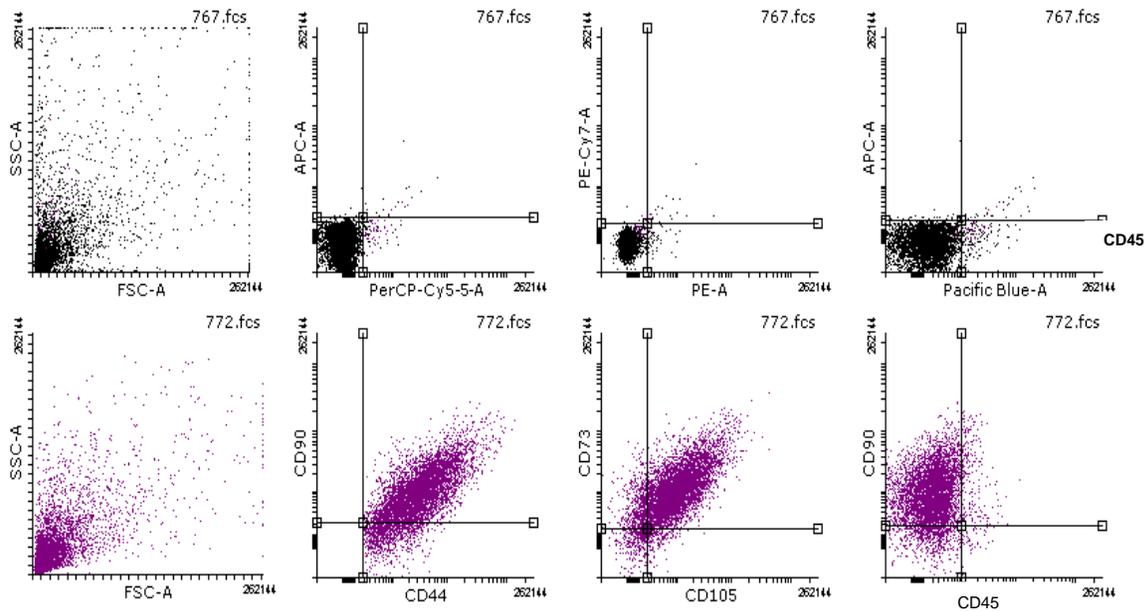


Figura 3. Análisis fenotípico de células aisladas por cultivo de explantes tumorales.

Explantes de tejido tumoral fueron cultivados hasta la aparición de células adherentes, las cuales fueron expandidas en cultivos celulares y cuando se obtuvo un número suficiente se despegaron de las cajas de cultivo con EDTA y se analizaron por citometría de flujo para la expresión de CD44, CD45, CD73, CD90 y CD105. En las gráficas superiores se muestran los controles negativos de tinción para cada fluorescencia.

Potencial de diferenciación

Adicionalmente se evaluó el potencial de diferenciación in vitro para verificar la identidad de las MSC. Las células en condiciones de diferenciación presentaron cambios morfológicos durante su crecimiento en cultivo y, después de 18 días, se confirmó la capacidad de diferenciación osteogénica de las MSCs derivadas de tumores mediante la mineralización de calcio observada con la tinción de rojo de alizarina (figura 4 B). Por otro lado la diferenciación a adipocitos fue evidente después de tres semanas de inducción en el medio especial para ello. Al final de la tercera semana, las células fueron capaces de diferenciarse a adipocitos donde se detectaron cambios morfológicos y la acumulación de vacuolas lipídicas que se detectaron claramente en las células mediante tinción con rojo oleoso (figura 4 D). En los controles negativos, las células cultivadas con medio basal, no mostraron cambios en su morfología y no se observaron depósitos de calcio (figura 4A), ni vacuolas de lípidos después de la tinción (figura 4C).

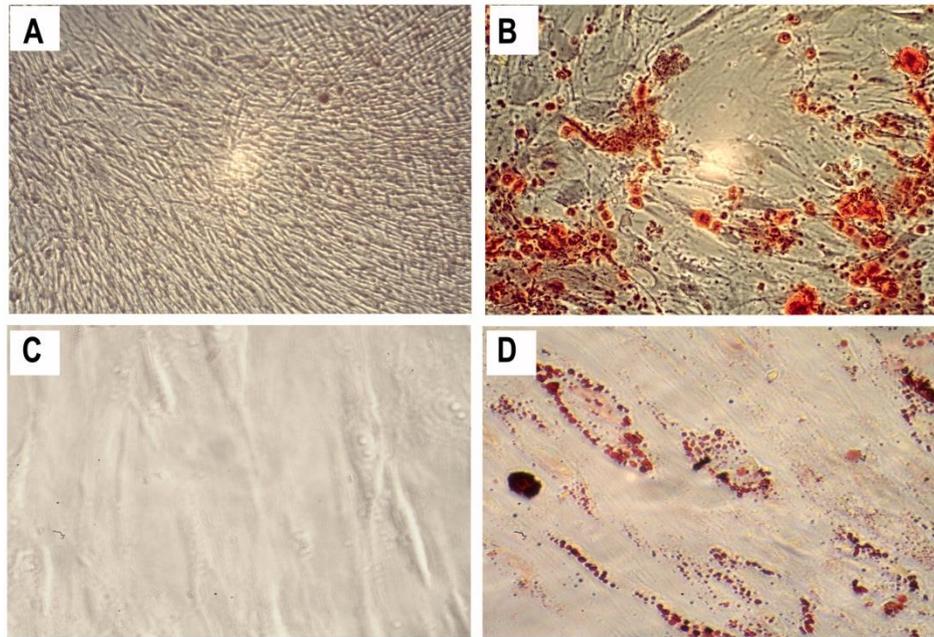


Figura 4. Potencial de diferenciación de las MSC derivadas de tumores. Después de tres semanas de cultivo en medio osteogénico (B) o adipogénico (D), las células se tiñeron con rojo de alizarina para la mineralización de calcio o con rojo de aceite para vacuolas lipídicas, respectivamente. Los controles se cultivaron con medio basal y se tiñeron con rojo de alizarina (A) o rojo oleoso (C). Ampliaciones 200X para A-B y 400X para C-D.

Propiedades inmunoreguladoras

Para corroborar las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs derivadas de tumores, evaluamos la expresión de moléculas reguladoras en células de cultivos primarios tratadas con las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α . Se evaluó la expresión de GITRL, ICOS-L y PD-L1 antes y después de la estimulación con dichas citocinas. En la figura 5 se observa que las MSC tumorales no expresan GITRL de forma basal o bajo estímulos inflamatorios. Mientras que PD-L1 e ICOS-L se expresaron antes de la activación y el nivel de expresión no cambió durante la estimulación inflamatoria (figura 6 y 7). Con respecto a la producción de citocinas, las MSC tumorales en condiciones inflamatorias produjeron GM-CSF, pero no TSLP (figura 7 y 8). Aunque las MSC no produjeron TSLP en respuesta a IL-1 β y TNF α , si liberan TSLP después de la estimulación con PMA, lo que demuestra su capacidad para producir esta citocina (figura 8).

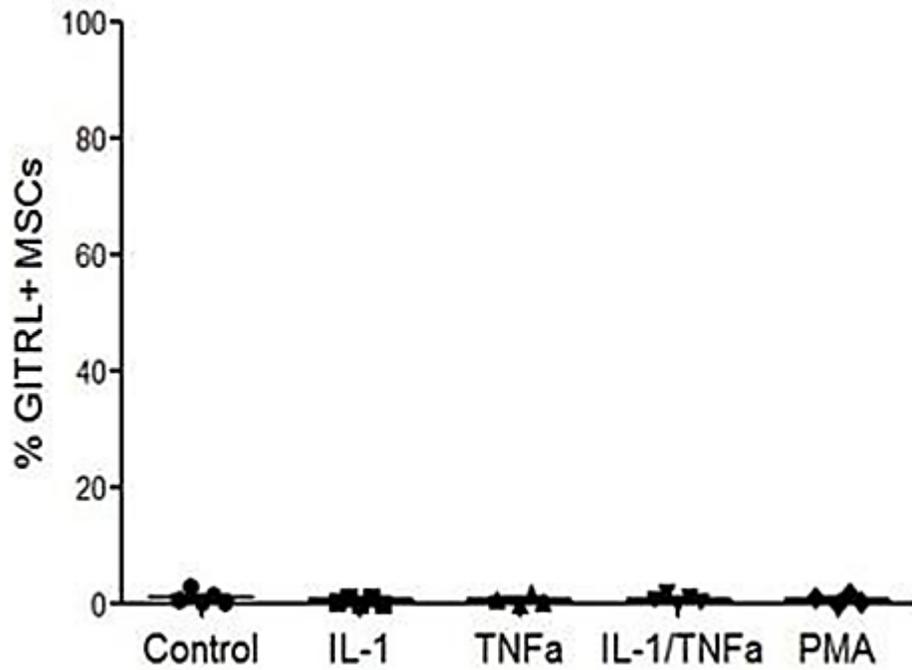


Figura 5. Expresión de la molécula inmunoreguladora GITRL en MSC derivadas de tejido tumoral mamario. Se evaluó la presencia de GITRL por citometria de flujo antes y después de la estimulación con las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α . Como control positivo de la activación, las células se trataron con 50 ng / ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

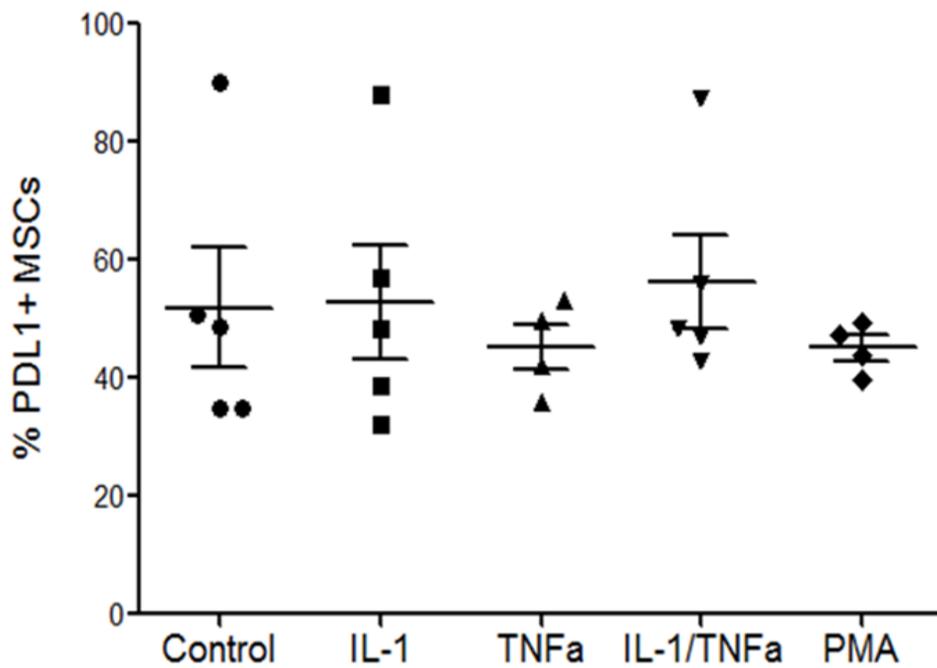


Figura 6. Expresión de la molécula inmunoreguladora PD-L1 en MSCs derivadas de tejido tumoral. Las MSC aisladas de tejidos tumorales de mama se cultivaron en la presencia de 10 ng/ ml de IL-1 β ó TNF α o la combinación de ambas. Se evaluó la expresión de PD-L1 mediante citometría de flujo. Como control positivo de la activación, las células se trataron con 50 ng / ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

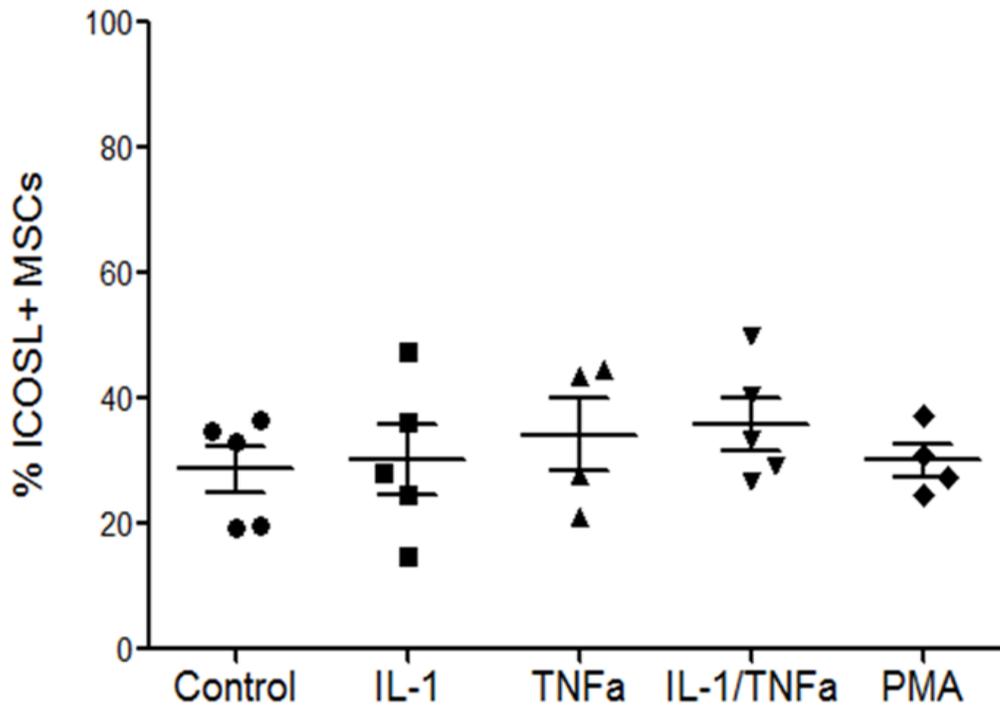


Figura 7. Expresión de la molécula inmunoreguladora ICOS-L en MSCs de tejido tumoral mamario. Se evaluó la presencia de ICOS-L antes y después de la inducción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α por citometría de flujo. Como control positivo de la activación, las células se trataron con 50 ng / ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

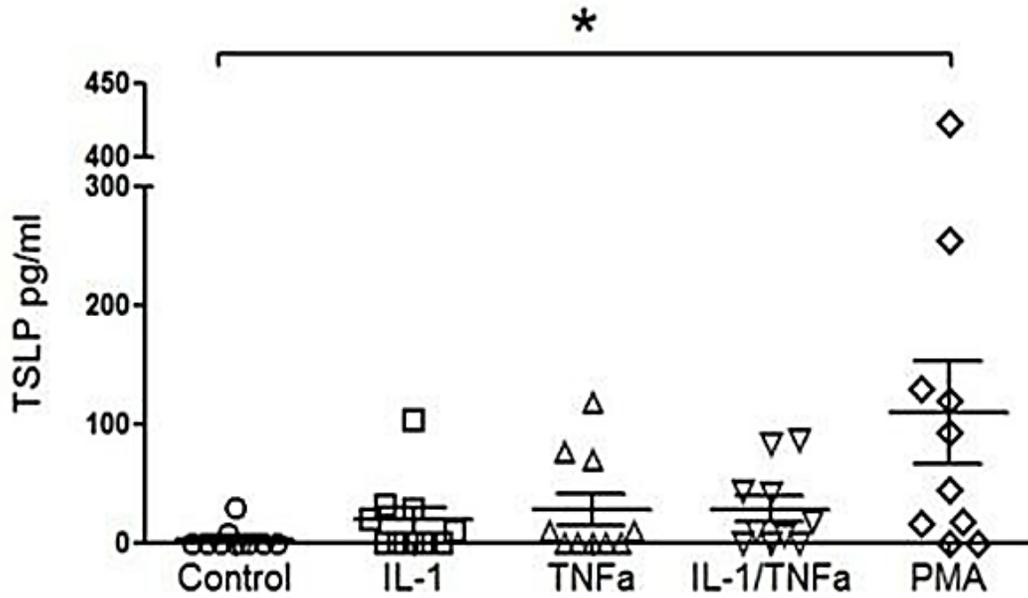


Figura 8. Expresión de la citocina TSLP en las MSCs derivadas de tumores. Se evaluaron los niveles de TSLP mediante ensayos de ELISA, donde se observaron bajas concentraciones de esta citocina en los cultivos de MSCs, antes y después de haber sido activados con las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α .

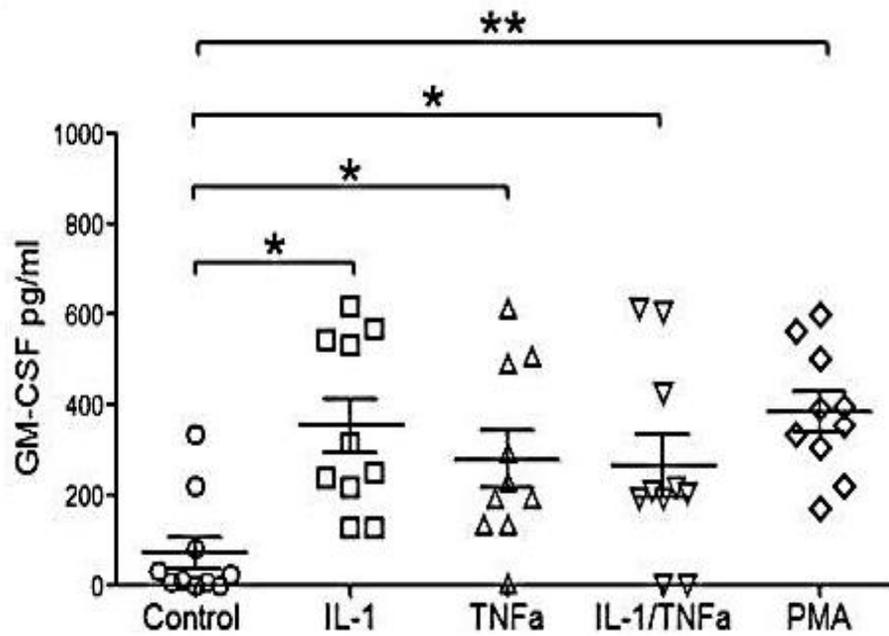


Figura 9. Expresión de la citocina GM-CSF en MSCs derivadas de tumores de mama. Se analizó mediante ensayos de ELISA la producción de GM-CSF en MSC después de haber sido activadas con las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α . Se observó que esta citocina si se expresa en la MSC después de un estímulo proinflamatorio, así como en el control positivo con PMA.

Discusión

Durante los últimos años, se ha buscado respaldar el papel de las células estromales mesenquimales derivadas de tumores en la progresión del cáncer de mama, sin embargo, hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han basado en MSCs de origen no mamario. Actualmente, existen algunas investigaciones que reportan la presencia de MSCs en las regiones tumorales, como es el caso de ratones implantados con MSCs derivadas de tejido mamario adiposo, donde contribuyen a la progresión del cáncer de mama de tipo basal, al estimular el crecimiento y la invasión, pero no la vasculogénesis o la angiogénesis. Así mismo, se han aislado de tumores de mama humanos para observar sus efectos sobre ciertas líneas celulares de cáncer de mama (Yan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Lazennec *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no se tiene planteado su presencia y las propiedades de estas células en el microambiente tumoral en diferentes etapas de la enfermedad. En el presente estudio, hemos analizado la presencia de MSC en tumores de pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas. Se encontró que las MSCs estaban presentes en casi el 90% de los tumores analizados, lo que indica su participación desde las fases iniciales del desarrollo del tumor (Reyes, 2017).

En nuestro estudio encontramos que las MSCs infiltrantes de tumores tienen una morfología y un fenotipo similares a los ya reportados para las MSCs de médula ósea, que son células CD45-CD24-CD44+CD90+CD73+CD105+ (Dominici, 2006). Dos estudios previos también informaron la similitud entre las MSC derivadas de tumores de mama y las de medula ósea (Yan *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2013). Las MSC tumorales que se aislaron, cumplen con las características mínimas establecidas por la ISCT para las células estromales mesenquimales humanas (Dominici, 2006), ya que además de presentar una morfología estrellada parecida a los fibroblastos e inmunofenotipo descrito para esta estirpe celular, fueron adherentes al plástico en cultivos celulares y tienen un potencial de diferenciación multipotente como se demostró en los ensayos de diferenciación adipogénica y osteogénica.

En cuanto a las MSC derivadas de tejido adiposo y de médula ósea en condiciones basales, se ha reportado que expresan niveles muy bajos de PD-L1, y solo después de la activación con estímulos inflamatorios, presentan una importante expresión de esta molécula, mientras que las MSC derivadas de amígdalas e hígado expresan concentraciones más altas de PD-L1 de forma basal, lo que indica que el microambiente local determina el nivel de expresión de esta molécula (Bredemeijer et al. 2015, Kim et al. 2018). Así mismo, la expresión de PD-L1 se ha reportado ampliamente en células tumorales y leucocitos infiltrantes de tumores (Zhou et al. 2017), pero no hay reportes en MSC tumorales. La molécula PD-L1 en las MSC les otorga capacidad supresora sobre células de la respuesta inmunitaria como las células NK y linfocitos T (Augello et al. 2005, Bredemeijer et al. 2015, Chen et al. 2018), por lo que las MSC en tumores con PD-L1 + pueden contribuir a inducir un ambiente tolerogénico en el microambiente tumoral del cáncer de mama.

Una de las funciones inmunomoduladoras de las MSC implica la inducción de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Tregs) por factores solubles y dependientes del contacto celular. La expresión que observamos de ICOS-L en las MSC tumorales sugiere que podría ser responsable de la inducción de células Tregs en el tejido tumoral de la mama ya que en las células presentadoras de antígenos, ICOS-L actúa como una molécula coestimuladora que puede inducir Tregs a partir de células T vírgenes, siendo esta una condición que se ha observado en este tipo de cáncer (Sisirak et al. 2012 y 2013). Asimismo, en apoyo de este supuesto, se ha informado que la expresión de ICOS-L en MSC humanas derivadas de médula ósea, promueve la inducción de células T reguladoras (Lee et al. 2017). Además de las FoxP3⁺ Tregs clásicas, el eje ICOS-ICOSL puede inducir una subpoblación de células T reguladoras especializadas en producir grandes cantidades de IL-10, las células T reguladoras tipo 1 (Tr-1), que desempeñan un papel importante en la patogénesis del cáncer de hígado (Pedroza et al. 2011), por lo tanto, es posible que las PD-L1⁺ MSC tumorales también pueda inducir a esta población en los tumores mamarios, un hecho que debe investigarse en futuros estudios.

Por otro lado, encontramos que las MSC tumorales en respuesta a IL-1 β y TNF α producen GM-CSF, una citocina que se ha reportado en cáncer de mama para favorecer la inducción de respuestas celulares de tipo Th2 a través de la activación de células

dendríticas plasmocitoides y que favorecen el desarrollo temprano del tumor (Pedroza et al. 2011, Ghirelli et al. 2015). La producción de GM-CSF se había descrito para células tumorales (Ghirelli et al. 2015), pero ahora con nuestro estudio podemos observar que las MSC tumorales también contribuyen a este eje de inmunomodulación que favorece la progresión tumoral. Finalmente observamos que bajo la estimulación con TNF α e IL-1 las MSCs tumorales no producen TSLP. Sin embargo, no se puede descartar que bajo otros estímulos que pudieran estar presentes en el microambiente tumoral lo puedan hacer dado que en la presencia de PMA, que es un fuerte activador celular, las MSCs tumorales si liberaron TSLP.

Conclusiones.

1. En tumores humanos primarios de cáncer de mama se encontró la presencia de MSC aun en etapas muy tempranas.
2. Las células estromales mesenquimales presentes en tumores mamarios pueden ser aisladas y cultivadas en el laboratorio.
3. Las células aisladas in vitro se diferenciaron a osteoblastos y adipocitos, confirmando su linaje como MSC.
4. El inmunofenotipo observado en nuestros cultivos celulares, fue similar al reportado para MSC siendo CD45⁻CD44⁺CD90⁺CD73⁺CD105⁺.
5. Las MSC derivadas de tumores de cáncer de mama expresan las moléculas inmunoregulatoras PD-L1 y ICOS-L, contribuyendo con el microambiente inmunosupresor local descrito para este tipo de cáncer.
6. Las MSC derivadas de tumores mamarios expresan la citocina GM-CSF, que posiblemente, induce una respuesta de tipo Th2 que favorezca el crecimiento tumoral.
7. El entendimiento de cómo funcionan las MSC en el microambiente tumoral es esencial para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Perspectivas

Realizar ensayos funcionales para evaluar si las MSC son capaces de inhibir la función de las células efectoras, como son las NK y CD8, asimismo saber si mediante el bloqueo de las moléculas reguladoras como PD-L1, dicha actividad puede ser revertida.

Referencias

Aspord, C., A. Pedroza G., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., Palucka, K. 2007. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development; 204(5):1037-47.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, *et al.* 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by 13 activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*; 35(5):1482-14.

Chen D., Tang P., Liu L., Wang F., Xing H., Sun L. *et al.* 2018. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote cell proliferation of multiple myeloma through inhibiting T cell immune responses via PD-1/PD-L1 pathway. *Cell Cycle*: 1-21.

Cui SE, Li HM, Liu DL, Nan H, Xu KM, Zhao PR, *et al.* 2014. Human breast adipose derived stem cells: characterization and differentiation into mammary gland like epithelial cells promoted by autologous activated plateletrich plasma. *Mol Med Rep*; 10(2):605-14.

De Mare-Bredemeijer EL, Mancham S, Verstegen MM, de Rooter PE, van Gent R, O'Neill D, *et al.* 2015. Human graft-derived mesenchymal stromal cells potently suppress alloreactive T-cell responses. *Stem Cells Dev*; 24(12):1436-47.

DeNardo, D. G., Coussens LM. Inflammation and breast cancer. 2007. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*; 9(4):212.

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. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315-7

Dwyer RM1, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. 2007. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*; 13(17):5020-7.

English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. 2007. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, 110(2):91-100.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *ExpHematol*; 2: 83–92.

García-Romo G. S., K. G. Garcia-Castillo, A. Diaz-Rodríguez, D. Reyes-Hernández y A. Pedroza-González. 2016. Principales mecanismos inmuno-reguladores que favorecen el desarrollo del cáncer de mama. *Gaceta Médica de México*.

Gaynor J. Bates, Stephen B. Fox, Cheng Han, Russell D. Leek, José F. Garcia, Adrian L. Harris, Alison H. 2006. Banham Quantification of Regulatory T Cells Enables the Identification of High-Risk Breast Cancer Patients and Those at Risk of Late Relapse. *Journal of Clinical Oncology*; 34:5373-5380.

Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Misirkic-Marjanovic M, Djonov V, Jakovljevic V, *et al.* 2017. Mesenchymal Stem Cells Promote Metastasis of Lung Cancer Cells by Downregulating Systemic Antitumor Immune Response. *Stem Cells Int*: 62947 17.

Ghirelli C, Reyat F, Jeanmougin M, Zollinger R, Sirven P, Michea P, *et al.* 2015. Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. *Cancer Res*; 75(14):2775-87

Hernanda PY, Pedroza-Gonzalez A, Sprengers D, Peppelenbosch MP, Pan Q. 2014. Multipotent mesenchymal stromal cells in liver cancer: implications for tumor biology and therapy. *Biochim Biophys Acta*; 1846(2):439-45.

Hogan N, Dwyer R, Joyce M, Kerin M. 2012. Mesenchymal stem cells in the colorectal tumor microenvironment: recent progress and implications. *Int J Cancer*; 131:1-7.

Kim JY, Park M, Kim YH, Ryu KH, Lee KH, Cho KA, *et al.* 2018. Tonsil-derived mesenchymal stem cells (T-MSCs) prevent Th17-mediated autoimmune response via regulation of the programmed death-1/programmed death ligand-1 (PD-1/PD-L1) pathway. *J Tissue Eng Regen Med*; 12(2):e1022-e33.

Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. 2011. 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cell*; 29(1):11-9.

Lage A. y T. Crombet. 2011. Control of advanced cancer: the road to chronicity. *IntJ Environ Res Public Health*; 8(3):683–97.

Lanari, C. y A. Molinolo. 2003. Progestágenos y cáncer de mama: Desarrollo de un modelo experimental. *Química viva*; 2:111-121.

Laranjeira P, Gomes J, Pedreiro S, Pedrosa M, Martinho A, Antunes B, *et al.* 2015. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Differentially Inhibit Cytokine Production by Peripheral Blood Monocytes Subpopulations and Myeloid Dendritic Cells. *Stem Cells*; 8190 84.

Lazennec G, Lam PY. 2016. Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions. *Biochim Biophys Acta*: 1866(2):290-9.

Le Blanc K, Ringden O. 2005. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*; 11(5):321-34.

Le Blanc, K., D. Muigiakakos. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*; 12:383-384 pp

Lee HJ, Kim SN, Jeon MS, Yi T, Song SU. 2017. ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes induction of regulatory T cells. *Sci Rep*; 7:44486.

Lozano R, F. M. Knaul, H. Gómez-Dantés, H. Arreola-Ornelas y O. Méndez. 2008. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Fundación Mexicana para la Salud.

Machado Cde V, Telles PD, Nascimento IL. 2013. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter*; 35(1):62-7.

Malvicini, M., G.Puchulo, P.Matar y G.Mazzolini. 2010. Inmunoterapia del cáncer. Importancia de la inmunosupresión. 70(6).565-566 pp.

Martínez-Arias A. 2001. Epithelial Mesenchymal Interactions in Cancer and Development. *Cell*; 105: 425–431.

Mathew E, Brannon AL, Del Vecchio A, Garcia PE, Penny MK, Kane KT, *et al.* 2016. Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages. *Neoplasia*; 18(3):142-51.

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J. 2006. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*; 107(5):1878-87

Olkhanud PB, Rochman Y, Bodogai M, Malchinkhuu E, Wejksza K, Xu M, Gress RE, Hesdorffer C, Leonard WJ, Biragyn A. 2011. Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J Immunol*; 186(10):5656-62.

Owen M, Friedenstein AJ. 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium*; 136: 42–60.

Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. 2010. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*; 23(2):35-40.

Palucka, K., Coussens, L. M., & O'Shaughnessy, J. 2013. Dendritic cells, inflammation, and breast cancer. *The Cancer journal*;19(6), 511-6.

Pedroza-Gonzalez A., J. Kwekkeboomand D. Sprengers. 2013. T-cell suppression mediated by regulatory T cells infiltrating hepatic tumors can be overcome by GITRL treatment. *Oncoimmunology*; 2(1):e22450.

Pedroza-Gonzalez A., Xu K, Wu TC, C. Aspord, S. Tindle, F. Marches, M. Gallegos, E. C. Burton, D.Savino, T. Hori, Y. Tanaka, S. Zurawski, G. Zurawski, L. Bover, YJ. Liu, J. Banchereau, A. K. Palucka. 2011. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation; 208(3):479-90.

Pittenger MF, Martin BJ. 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*; 95: 9–20.

Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, *et al.* 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*; 27(8):1954-62.

Reyes, D., & Pedroza, G. 2017. Caracterización de células estromales mesenquimales presentes en tumores de cáncer de seno. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Estudios superiores Iztacala. UNAM. México.

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*; 131(2):324-36.

Salazar-Onfray F. 1999. Interleukin-10: a strategy used by tumors to escape from immune surveillance. *Med Oncol*; 16: 86-94.

Shih-Chieh Hung, Nien-Jung C, Shie-Liang H, Hung L, Hsiao-Li M, Wai-Hee L. 2002. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*; 20: 249-58.

Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, *et al.* 2012. Impaired IFN-1 alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res*; 72(20):5188-97.

Sisirak V, Faget J, Vey N, Blay JY, Menetrier-Caux C, Caux C, *et al.* 2013. Plasmacytoid dendritic cells deficient in IFN alpha production promote the amplification of FOXP3 (+) regulatory T cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncoimmunology*; 2(1):e22338.

Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, *et al.* 2009. Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J Gene Med*; 11(5):373-81

Vasconcellos, M. C., T. P. Dias da Silva, N. I. Oliveira. 2013. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 35(1):62-7.

Yan XL, Fu CJ, Chen L, Qin JH, Zeng Q, Yuan HF, *et al.* 2012. Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. *Breast Cancer Res Treat*; 132(1):153-64.

Yu P, Lee Y, Liu W, *et al.* 2005. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*; 201:779-791

Zhang C, Zhai W, Xie Y, Chen Q, Zhu W, Sun X. 2013. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line in vitro. *Oncol Lett*; 6(6):1577-82.

Zhao M, Sachs PC, Wang X, Dumur CI, Idowu MO, Robila V, *et al.* 2012. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. *Cancer Biol*; 13(9):782-92.

Zhou G, Sprengers D, Boor PPC, Doukas M, Schutz H, Mancham S, *et al.* 2017. Antibodies Against Immune Checkpoint Molecules Restore Functions of Tumor- Infiltrating T Cells in Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology*; 153(4):1107-19.