



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES  
ONCOLÓGICAS DEL HOSPITAL DE ONCOLOGÍA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y CÁNCER**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA ECTO  
ENZIMA CD73 EN CÉLULAS TUMORALES DE  
CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y SU EFECTO EN LA  
PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE LA VÍA  
ADENOSINÉRGICA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A**

**IVONNE JACKELINE TITLA VILCHIS**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA.  
ASESORA INTERNA: Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**



México, D.F. 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

- El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas, **UIMEO Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS** y en el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, **UMIEZ FES-Zaragoza UNAM** gracias al apoyo y financiamiento de los proyectos de investigación: **FIS/IMSS/PROT/ 957, DGAPA PAPIIT No.223010 y CONACyT No. 106591** bajo la Dirección del Dr. Alberto Monroy García y la asesoría de la Dra. María de Lourdes Mora García.

**ABREVIATURAS.**

<b>ADA</b>	Desaminasa de Adenosina.
<b>ADO</b>	Adenosina.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato.
<b>Ags</b>	Antígenos.
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico.
<b>APC</b>	(Antigen presenting cell) Célula presentadora de antígenos.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>AR</b>	Alto riesgo.
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato.
<b>BR</b>	Bajo riesgo.
<b>CaCu</b>	Cáncer cérvico uterino.
<b>CFSE</b>	(Carboxyfluorescein succinimidyl ester) 5,6-carboxi-fluoresceína diacetato succinimidyl ester.
<b>fM</b>	Fentomolar
<b>FSC</b>	(Forward scatter) Dispersión hacia adelante.
<b>GPI</b>	Glicosil fosfatidil inositol
<b>INF-γ</b>	Interferón gamma.
<b>IL-</b>	Interleucina.
<b>kDa</b>	kilodalton.
<b>IME</b>	Intensidad media de expresión.
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia.
<b>I-VPH</b>	Infección por virus del Papiloma humano.
<b>LGL</b>	Linfocitos granulares grandes.
<b>LRC</b>	(Large region control) Región larga de control.
<b>MHC</b>	(Major histocompatibility complex) Complejo principal de histocompatibilidad.
<b>mM</b>	miliMolar.
<b>μM</b>	microMolar.
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical.
<b>NKC</b>	(Natural Killer Cells) Células asesinas naturales.
<b>NKT</b>	(T Natural killer) Células T asesinas naturales.
<b>nm</b>	Nanómetro.
<b>nM</b>	nanoMolar
<b>PIE</b>	Porcentaje de Intensidad de expresión.
<b>SI</b>	Sistema Inmune
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.
<b>SSC</b>	(Side scatter) Dispersion lateral
<b>TAPs</b>	(Transporter associated with antigen processing) Transportadores asociados con la presentación de antígenos.
<b>TLR</b>	(T cell receptor) Receptor de células T.
<b>TGF</b>	(Transforming growth factor) Factor de crecimiento transformante.
<b>Thc</b>	(T helper cells) Células T cooperadoras.
<b>TNF</b>	(Tumor necrosis factor) Factor de necrosis tumoral.
<b>ORFs</b>	(Open reading frames) Marcos de lectura abierta.
<b>VLPs</b>	(Virus like particles) Partículas semejantes a virus.
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma humano.

## RESÚMEN

El carcinoma del cuello uterino (CaCu) y sus lesiones precancerosas constituyen la segunda causa de muerte relacionada al cáncer en mujeres a nivel mundial, representando en México un grave problema de salud pública responsable de más de 4 000 muertes cada año. La infección con tipos oncogénicos del virus del papiloma humano (I-VPH) es considerada como el factor etiológico principal para el desarrollo de tumores malignos en el cuello uterino, relacionado hasta en un 99.7% de los casos. Se han identificado hasta hoy más de 200 genotipos virales, de los cuales alrededor de 30 causan infecciones ano genitales, sin embargo, otros factores como los ambientales y propios del hospedero, contribuyen al proceso carcinogénico además del VPH.

Aun cuando en personas jóvenes la I-VPH es muy frecuente, la mayoría de las mujeres la resuelven espontáneamente indicando que la eficiente respuesta inmune es un factor importante para evitar el desarrollo y progresión de la enfermedad, sin embargo durante la carcinogénesis, las células tumorales desarrollan múltiples mecanismos para evadir al sistema inmune y suprimir la respuesta antitumoral, como son: defectos en la función inmunoestimuladora mediante citocinas y moléculas coestimuladoras de células dendríticas, la expresión defectuosa y disminuida de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y de los transportadores asociados al procesamiento de antígenos, así como la asociación de ciertos alelos HLA clase I y clase II que conducen a una deficiente presentación de antígenos al linfocito T. Recientemente se ha propuesto que la vía adenosinérgica, mediante la producción de adenosina extracelular por la enzima 5'-ectonucleotidasa (CD73) expresada en células tumorales puede ser un factor importante en la evasión de la respuesta inmune al inhibir la activación de linfocitos T debido a la interacción de adenosina con los receptores específicos A1, A2A, A2B y A3; no obstante, se desconoce si la adenosina producida por las células tumorales puede influir sobre sus propias funciones biológicas.

En consecuencia, el presente trabajo se realizó con el objetivo de analizar la expresión de CD73 y el efecto de adenosina sobre la proliferación de células tumorales de CaCu derivadas de las líneas celulares: HeLa e INBL (VPH-18+), CaSki y SiHa (VPH -16+), C-33 A y ViBo (VPH -). Mediante citometría de flujo e Inmunocitoquímica, se determinó la expresión de CD73 y el receptor A2A en las 6 líneas celulares; además se analizó el efecto de Adenosina y Adenosina monofosfato (AMP) sobre la proliferación de las células tumorales marcadas con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) en presencia y ausencia de cafeína, un agente bloqueador de los receptores de adenosina. Los resultados muestran una mayor expresión de CD73 y del receptor A2A en las líneas celulares VPH+ tanto en membrana, citoplasma y núcleo respecto a las líneas celulares VPH-. La adición de adenosina y de AMP inhibió parcialmente la proliferación de las líneas celulares en un amplio intervalo de concentraciones, el mayor efecto inhibitorio se observó en las líneas celulares VPH+, 50-60% con adenosina y de 45-60% en presencia de AMP; mientras que en las líneas VPH-, la inhibición fue de 35-45% con adenosina y de 30-35% con AMP. El bloqueo de los receptores A2A con cafeína, restableció parcialmente la proliferación de las líneas celulares cultivadas en presencia de adenosina o AMP.

Estos resultados nos permiten concluir que la adenosina generada mediante la ectoenzima CD73 expresada en las células tumorales, puede tener un efecto inhibitorio transitorio sobre su proliferación celular. De tal forma que la mayor expresión de CD73 y de receptores para adenosina en las líneas celulares de CaCu HPV+, puede ser una condición favorable de las mismas células tumorales para sobrevivir en situaciones de estrés fisiológico.

## INTRODUCCIÓN

### ● CÁNCER.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, esta enfermedad se produce cuando células normales sufren la alteración de su ciclo celular e inhibición de la apoptosis debido a mutaciones ocasionadas por factores físicos, químicos o biológicos, por infecciones con algunos virus y proliferan sin control. Estas células pueden dividirse hasta formar tumores que posteriormente pueden llegar a invadir tejidos vecinos mediante metástasis (Chen and Fokuda, 2006).

Existen muchos tipos de cáncer, entre los más frecuentes se encuentran: el cáncer de mama, pulmón, cuello uterino, próstata, colon, ovario y estómago entre otros (American Cancer Society, 2009). Casi todos los tipos de cáncer son causados por anomalías en el material genético de las células transformadas. Estas alteraciones pueden deberse a los efectos de sustancias cancerígenas como el benceno y otros químicos, el consumo excesivo de alcohol, fumar, exposición excesiva a la luz solar o toxinas ambientales, radiación, virus, agentes infecciosos, obesidad, mala alimentación, falta de ejercicio etc. (Thun, 2007). Otro tipo de promotor de cáncer y las anomalías genéticas puede adjudicarse a los errores al azar en la replicación del ADN, que son heredadas y por tanto, están presentes en todas las células desde el nacimiento. La heredabilidad del cáncer es por lo general afectada por complejas interacciones entre los agentes carcinógenos y el genoma del huésped (Moscow and Cowan, 2007).

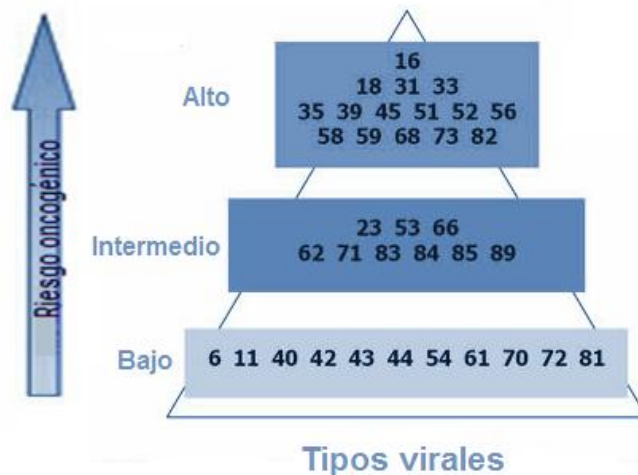
### ● CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo. En México el CaCu es una de las principales causas de mortalidad de mujeres entre 35- 59 años de edad (Sosa *et al.*, 2009) y es responsable de alrededor de 5 000 muertes cada año (INEGI, 2008). Este cáncer es el resultado de la progresión de leves anomalías epiteliales llamadas displasias o neoplasias intraepiteliales (NIC), que son un diagnóstico frecuente en mujeres entre los 20 y 30 años, pasando por carcinoma *in situ*, entre los 25 y 35 años, a carcinoma invasivo en mujeres mayores de 40 años (Hunter *et al.*, 2008).

Como todas las neoplasias malignas, el carcinoma de cérvix es consecuencia de una serie de alteraciones en genes que regulan la proliferación celular y apoptosis, (Rivera *et al.*, 2006). Los reportes epidemiológicos señalan que el ADN del VPH se presenta en 99.7% de los casos positivos CaCu y en estudios nacionales se ha reportado que la presencia de VPH de alto riesgo aumenta 78 veces la probabilidad de presentar CaCu (Hernández *et al.*, 2002; Tirado *et al.*, 2005). Actualmente se han identificado más de 200 genotipos de VPHs, de los cuales alrededor de 30 tipos causan infecciones ano genitales (Joura *et al.*, 2007), 15 serotipos se consideran de alto riesgo (Muñoz *et al.*, 2004) siendo los tipos 16, 18, 31 y 45 los más frecuentes, de los cuales dos de éstos, (16 y 18) originan 70% de los casos de CaCu (Bosch *et al.*, 2008).

Los tipos de VPH se dividen en virus de bajo y alto riesgo oncológico (AR y BR) dependiendo de su capacidad de causar enfermedades malignas en el epitelio infectado (Muñoz *et al.*, 2006) (**Fig. 1**). Estudios epidemiológicos han demostrado que los tipos VPH-6, -11, de BR, inducen verrugas genitales, los cuales no desarrollan ningún cáncer, mientras los tipos 16 y 18 son responsables de aproximadamente el 80% de los casos de cáncer cervical (Herrero *et al.*, 2005).

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El tipo histológico comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está frecuentemente asociado al VPH 16. El adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH tipo 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente en este tipo de tumores (Reimers *et al.*, 2009). La Infección por virus de Papiloma humano (I-VPH) puede también ser causa de carcinomas como el de orofaringe (D'Souza *et al.*, 2007), pene (Muñoz *et al.*, 2012), vagina (Schiffman *et al.*, 2007), vulva (Kumar *et al.*, 2009) y ano (Parkin and Brays, 2006).



**Fig. 1 Riesgo oncológico asociado a los diferentes genotipos virales causantes del CaCu.** Entre los de bajo riesgo destacan los tipos VPH -6 y - 11 y en los de alto riesgo los VPH tipo -16 y - 18. Modificado de: Markowitz *et al.*, 2007.

Aun cuando en personas jóvenes la infección por VPH es muy frecuente, la mayoría de las mujeres la resuelven espontáneamente (alrededor del 90%), persistiendo sólo en una pequeña fracción de la mujeres infectadas, (Stanley, 2010) indicando que otros factores están implicados en la progresión de la infección, como lo son tipo viral y variaciones intra-tipo de VPHs de alto riesgo, integración del genoma viral al celular y probablemente carga viral. Otros factores adicionales incluyen la alta paridad, tabaquismo (Castellsague *et al.*, 2003), una dieta pobre en vitaminas y minerales (García *et al.*, 2005; Castellsague *et al.*, 2011), el número de parejas sexuales y el uso prolongado de anticonceptivos orales (Parra *et al.*, 2011). Todas las evidencias indican que la inmunosupresión, es decir, la deficiente respuesta inmune del hospedero, también juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Patel and Chiplunkar, 2009).

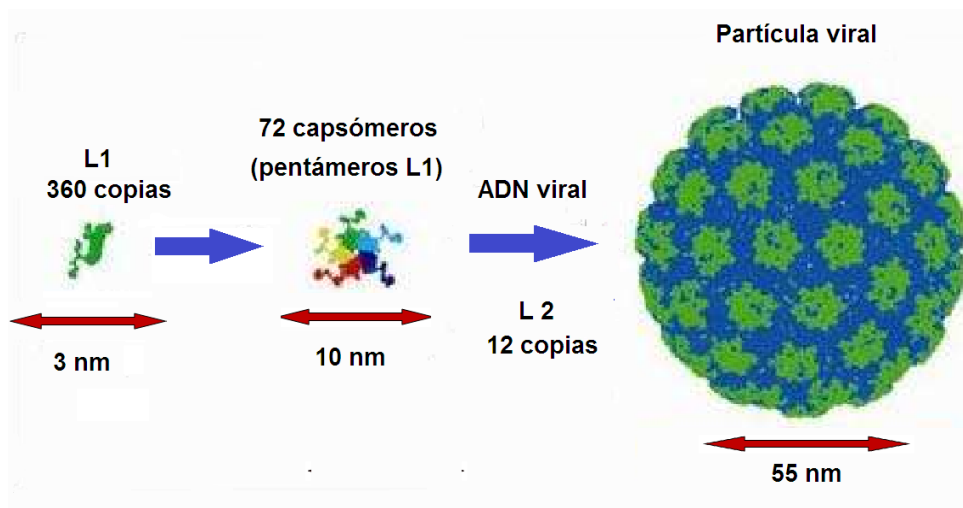


En México y en la mayoría de los países en vías de desarrollo, la I-VPH y la incidencia de CaCu se incrementan día a día, debido a que ésta es asintomática y se mantiene latente por períodos largos de tiempo. Se ha estimado que cerca del 60% de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de VPH, por lo que el contagio se propaga constantemente (Muñoz *et al.*, 2003). De igual forma la prevalencia de VPH por grupos de edad muestra una distribución similar a su incidencia, siendo esta alta en mujeres jóvenes presentando además infecciones con múltiples tipos virales, mientras que hay una menor incidencia en mujeres pre y post-menopáusicas (Moscicki *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2008).

Actualmente se ha desarrollado la primera generación de vacunas profilácticas contra el VPH, que incluyen a la vacuna bivalente Cervarix® (GlaxoSmithKline) que protege contra los tipos virales 16 y 18, así como la tetravalente: Gardasil® (Merck Sharp & Dohme) contra los tipos virales 16, 18, 6 y 11 (FDA, 2010). Estas vacunas han mostrado una reducción significativa en el desarrollo de lesiones de cérvix, vagina, vulva y la región anogenital, sin embargo, para determinar su eficacia en la incidencia y mortalidad por CaCu, se requiere de un seguimiento a largo plazo (Medeiros *et al.*, 2009).

### ● EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

El virus del Papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV) (De Villiers *et al.*, 2004). Estos pequeños virus (diámetro de 55 nm), replican su genoma dentro del núcleo de las células del huésped infectado, carecen de envoltura y poseen una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) (Knipe *et al.*, 2006) (**Fig.2**).



**Fig. 2 Estructura de una partícula de VPH.** Las partículas de VPH presentan un diámetro aproximado de 55 nm y se componen de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) que están formados en un 95% por la proteína L1 y un 5% por la proteína L2. Modificado de: Pagliusi and Aguado, 2004.

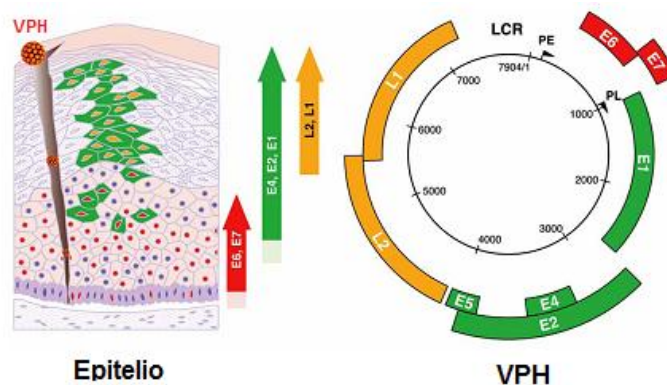


### ● GENOMA DEL VPH.

En el interior de la cápside se encuentra un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases (Santin *et al.*, 2005), constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante, la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedero, necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación (Lupiani and Fraga, 2008).

El genoma del VPH, está conformado de dos tipos de genes, aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E (del inglés Early = temprano), y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo de replicación del mismo, conocidos como L (del inglés Late = tardío). Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6, E7 y dos tardíos: L1 y L2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Por otro lado los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Lupiani and Fraga, 2008).

Una región de aproximadamente 4000 pares de bases codifica las proteínas para la replicación viral y la transformación celular; otra región que posee 3000 pares de bases codifica proteínas estructurales de las partículas virales y finalmente una región de 1000 pares de bases que no codifica y contiene los elementos reguladores de la replicación y transcripción del ADN viral (Hopman *et al.*, 2005)(Fig. 3).



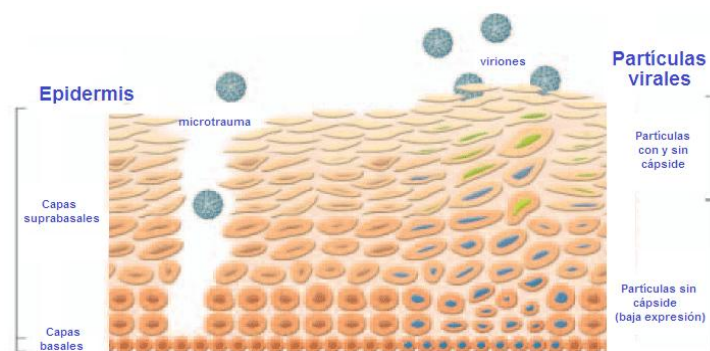
**Fig. 3 Organización del genoma del VPH y la secuencia viral de la expresión de genes a través de la diferenciación de los queratinocitos en el epitelio cervical estratificado.** Del lado derecho se muestran las regiones del genoma viral y sus principales proteínas, mientras que del lado izquierdo se observa la expresión de éstas en el estrato cervical. Modificado de: Doorbar, 2006.

### ● CICLO DE VIDA DEL VPH.

El ciclo del VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El virus inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, micro-heridas y abrasiones del tejido (Burchell *et al.*, 2006).

Una vez ocurrida la infección, el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El DNA viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular (Baseman and Koutsky, 2005), de tal forma que las células epiteliales basales cambian del estado proliferativo al de diferenciación y se mueven hacia la luz cervical (Doorbar, 2006) (**Fig. 4**).

El análisis de las moléculas de ARN mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas demuestra que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos más superficiales, donde también ocurre el ensamblado de las cápsides virales que dan lugar a la formación de viriones (Baseman and Koutsky, 2005), sin embargo, la producción de éstos es tan sutil que no alcanza a haber una lisis importante en las células, este estado puede permanecer casi inalterado por varios años, produciendo algunas alteraciones celulares en forma de displasia (Doorbar, 2006) que al parecer, siguen fases bien definidas pero variables en la infección transitoria y en el desarrollo de lesiones pre malignas y malignas del cuello uterino (Clifford *et al.*, 2005).

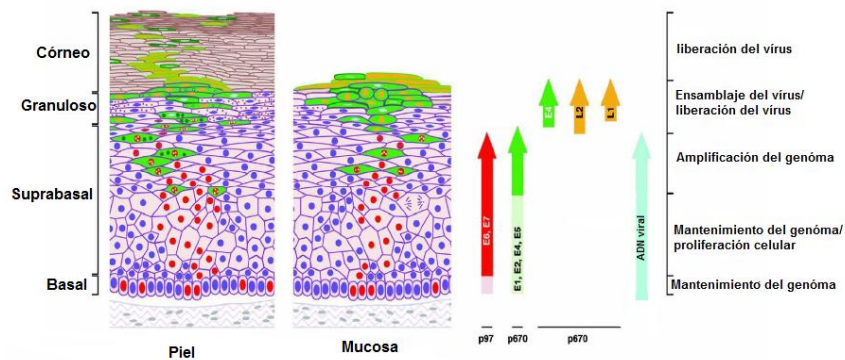


**Fig. 4 Ciclo de vida del papillomavirus.** La replicación y expresión viral se produce en las capas superiores, induciendo alteraciones en el epitelio que incluyen papilomatosis, paraqueratosis y coilocitosis. Las nuevas partículas virales se liberan con la descamación de las células más superficiales y diferenciadas del epitelio escamoso. (Lowy and Schiller, 2006).

Los VPH, aprovechan la maquinaria celular para replicarse, son epitelio tróficos y una vez que alcanzan las células basales pueden permanecer en forma episomal, en estado latente, o abandonar esa latencia y aprovechar la diferenciación celular propia del epitelio cervical. De forma paralela a la maduración del epitelio cervical. El VPH expresa sus genes de forma secuencial: en primer lugar los genes tempranos (E1-E7) en las capas basales y posteriormente, en las capas superficiales del epitelio más diferenciado, expresando sus proteínas tardías (L1 y L2) que forman la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que repetirán el ciclo (Moodley, 2005).

En determinadas circunstancias fisiológicas de “permisividad inmunológica”, tras un período de persistencia de la infección, generalmente largo, las partículas de ADN viral que se encuentran en forma episomal sufren un proceso de integración dentro del genoma celular (Bosch *et al.*, 2008).

La expresión de los oncogenes virales E6 y E7 del VPH 16 da como resultado la integración del genoma del VPH en cromosomas celulares (Moodley, 2005), que puede ocurrir de manera aleatoria. Cuando esto sucede, el genoma del VPH tiende a seccionarse en los marcos de lectura abierta de E1 y E2. Si la ruptura ocurre dentro de la región de E2, esta deja de producirse. E2 regula negativamente la expresión de E6 y E7, así que su ausencia da como resultado una vigorosa expresión de estas proteínas y con ello una serie de acontecimientos que conducen a un proceso de bloqueo de otras proteínas con funciones importantes en el ciclo celular (p53 y Rb), causando alteraciones en el crecimiento normal y en la diferenciación del epitelio cervical, generando un acumulo de errores genéticos que son la base de la transformación tumoral (Bosch *et al.*, 2008) (Fig.5).



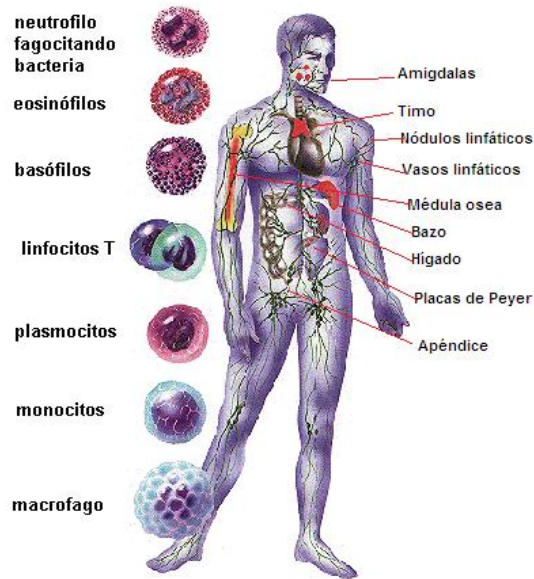
**Fig.5 Ensamblaje de partículas virales y liberación del VPH.** Muestra la expresión de las proteínas de VPH desde el estrato basal y su migración hacia la luz cervical. Modificado de: Doorbar, 2006.

Las proteínas E6 y E7 tienen la capacidad de inmortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica (Von Knebel, 2002). La expresión continua de estos genes es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, involucrados en procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (Von Knebel, 2002). Se considera que el proceso de integración del genoma del VPH al genoma de la célula hospedera es el evento fundamental en la progresión a cáncer (Jayshree *et al.*, 2009), pues la integración y la persistencia de su ADN en la célula hospedera son una condición necesaria aunque no suficiente para la transformación celular (Doorbar, 2006).

## ● EL SISTEMA INMUNE.

El sistema inmune es la defensa de un organismo contra microorganismos infecciosos y sustancias extrañas. (Abbas and Lichtman 2009). Este cuenta con elementos tales como células, moléculas, órganos linfoides, la circulación linfática (Fig. 6), proteínas sanguíneas, miembros del complemento y otros mediadores de la inflamación además de proteínas llamadas citocinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de la inmunidad innata y adaptativa, para reaccionar contra el agente extraño (Delves, 2000).

El sistema inmune tiene cuando menos tres propiedades funcionales principales que permiten la defensa del cuerpo. La primera es su extrema especificidad, con la propiedad de reconocer y distinguir un número grande de moléculas blanco distintas y responder (o no hacerlo), la segunda, efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, y la tercera es que posee una memoria con la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas con un agente patógeno (Roitt *et al.*, 2008). por lo tanto, su funcionamiento normal es crítico para la supervivencia del organismo en un ambiente lleno de patógenos, así como para hacer frente a factores de riesgo internos como neoplasias y enfermedades autoinmunes (Wu and Meydani, 2008).



**Fig. 6 Principales componentes del sistema inmune.** Los linfocitos, junto con otros tipos celulares, órganos y circulación linfoide así como citocinas y otras proteínas son los principales componentes de defensa contra los patógenos. Modificado de: National Cancer Institute, visual online, 2008.

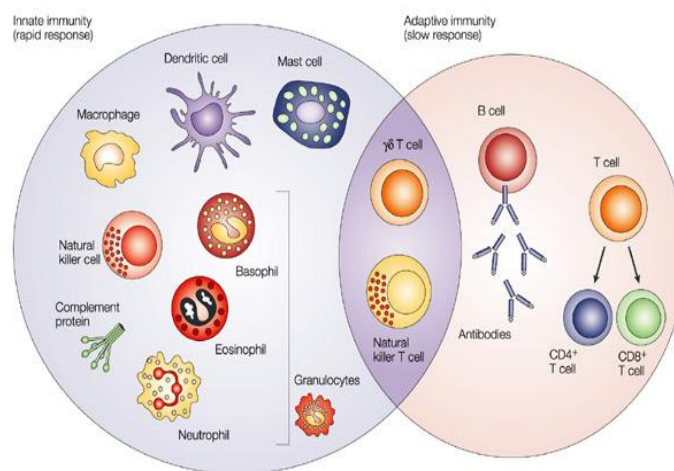
## ● INMUNIDAD INNATA.

El sistema inmunitario se divide en inmunidad innata o natural, e inmunidad adquirida o adaptativa. Ambas son específicas, la primera reconoce los elementos infecciosos no propios y la segunda distingue todos los antígenos no propios. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa inmunológica y se caracteriza por poseer mecanismos efectores, como fagocitos, complemento y péptidos antimicrobianos, los cuales se activan en forma rápida y vigorosa frente a un antígeno (Janeway *et al.*, 2010). La inmunidad innata (o natural) se refiere a cualquier resistencia existente al nacimiento que se presenta la primera vez que se enfrenta a un patógeno. Estos incluyen a las barreras físicas y a tres categorías de células inmunológicas que son granulocitos, monocitos, macrófagos y linfocitos (Janeway *et al.*, 2010) (**Fig. 6-7**). La inmunidad innata es fundamental para controlar activar la respuesta de la inmunidad adaptativa ante la mayoría de las infecciones o agresiones cutáneas (Janeway *et al.*, 2010).



## ● INMUNIDAD ADAPTATIVA.

La inmunidad adaptativa gira alrededor de los linfocitos T y B, los cuales poseen receptores altamente específicos y variados que se unen a sus antígenos y disparan la activación y proliferación celular que activa una respuesta inmunitaria eficiente, pero lenta, tomando entre 4-6 días para generar linfocitos efectoras (**Fig. 7**). Las células presentadoras de antígenos (APC), como son los macrófagos y células dendríticas, son las encargadas de rellenar el hueco existente entre las respuestas protectoras innatas y las respuestas protectoras específicas de antígenos (Roitt *et al.*, 2008). A través de la liberación de citocinas, las células T desempeñan un papel central en la activación y el control de las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Las células T son asimismo muy importantes en la eliminación de las células tumorales y de las células infectadas por virus (Nizar *et al.*, 2009).



**Fig. 7 Principales células de la inmunidad Innata y adaptativa.** Al entrar al cuerpo, un microorganismo, activa los mecanismos de la inmunidad innata que por medio de sus componentes lo puede eliminar en un lapso de horas. Sin embargo, si esto no es suficiente y el microorganismo persiste, se activan el mecanismo de la inmunidad celular que lo elimina por medio de la producción de anticuerpos y/o células efectoras en pocos días, produciendo una respuesta de memoria contra este antígeno: Nature Review Cancer, online, 2012.

Las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa son las que hacen frente a estos microorganismos. Las células y las moléculas de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo identifican y eliminan los microorganismos que han superado las barreras físicas y químicas y han logrado entrar en los tejidos blandos. (Abbas and Lichtman, 2009).

Para responder a la infección el Sistema inmune emplea mecanismos innatos que son rápidos pero limitados y mecanismos adaptativos que se inician con lentitud pero que finalmente son poderosos y de memoria rápida. Además los vertebrados han desarrollado la defensa adicional de las respuestas inmunitarias adaptativas, que incluyen la participación de linfocitos T y B (Roitt *et al.*, 2008). Los linfocitos T se subdividen en poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejores definidas son las células T colaboradoras y las células T citolíticas (o citotóxicas) (Abbas and Lichtman, 2009).

Dentro de las funciones más importantes de los linfocitos T están la defensa frente a microorganismos intracelulares y la activación de otras células, como macrófagos y linfocitos B (Roitt *et al.*, 2008). Tanto los linfocitos T cooperadores, como los citotóxicos (CTL) tienen una especificidad limitada para los antígenos, ya que sólo reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan en la superficie de células blanco (Stites *et al.*, 2000).

Las moléculas del MHC desempeñan funciones importantes en el reconocimiento intercelular y la diferenciación de lo propio y lo extraño. Tanto los genes como sus productos, participan en el desarrollo de las respuestas inmunitarias, ya sea humoral o celular. Debido a que las moléculas del MHC son las estructuras responsables de la presentación del antígeno, el grupo particular de estas estructuras que un individuo expresa, influye en el repertorio de antígenos a los que los linfocitos T colaboradores y citotóxicos de éste pueden responder (López *et al.*, 2005).

### ● RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

La historia natural de un tumor incluye las fases de crecimiento *in situ*, invasión, extravasación y metástasis (Laconi and Sonnenschein, 2008). Durante esas fases, las células tumorales interactúan con su microambiente tolerogénico y son influenciadas por señales que provienen del estroma, del endotelio vascular y del sistema inmunitario. En este contexto, los tumores sólidos están infiltrados por diferentes tipos celulares, como linfocitos, macrófagos y mastocitos. Generalmente se ha asociado a estos últimos con la producción de factores relacionados con la inflamación crónica y la progresión tumoral (Coussens and Werb, 2002), mientras que el infiltrado de sub-poblaciones de linfocitos B y T, células NK y células dendríticas (CD) se ha relacionado con el control de la enfermedad y mejor pronóstico en muchos tipos de cáncer como en el melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, ovario y de cuello uterino así como en carcinomas urotelial y de colon (Sato *et al.*, 2005).

El Sistema inmune se encuentra íntimamente relacionado con el desarrollo tumoral a través del papel protector ejercido por ciertas poblaciones celulares y otras implicadas en la promoción del tumor (Salama *et al.*, 2007), de manera que puede reconocer y eliminar de forma natural las células tumorales, ejerciendo cierta presión selectiva que los tumores deben evadir para poder crecer (Dong *et al.*, 2002).

La teoría de la inmuno edición propone un proceso de 3 fases: 1) Eliminación, mediante la cual el SI puede reconocer y deshacerse de las células tumorales recientemente originadas, 2) Equilibrio, donde el SI puede seleccionar y/o promover variantes de células tumorales que sobrevivan al control inmunológico y 3) Escape, en la cual el tumor, a través del desarrollo de mecanismos de resistencia, puede evadir la respuesta inmunitaria. (Dunn, 2002). Entre los principales mecanismos utilizados por los tumores para evitar el reconocimiento inmunológico se encuentran la inducción de una presentación antigénica inadecuada, la expresión de galectina-17 y la activación de las señales negativas de co-estímulo entre otras (Rivoltini *et al.*, 2002).



Las células tumorales pueden promover la expansión, activación y migración de ciertos tipos de células reguladoras capaces de suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral, tales como linfocitos T reguladores (Tregs), células supresoras mieloides, macrófagos asociados al tumor (TAM) y distintos subtipos de CD maduras e inmaduras (Zou, 2006). En el caso de la I-VPH, en las etapas iniciales, los viriones pueden ser reconocidos y neutralizados por anticuerpos, no obstante, cuando los virus se integran en las células epiteliales o de mucosa, los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos, entonces la respuesta inmune mediada por células T es la responsable de reconocer y eliminar a las células infectadas o células transformadas (Rivoltini *et al.*, 2002).

La capacidad del SI para limitar el desarrollo del CaCu ha sido evaluada desde hace varios años, mediante el uso de modelos experimentales *in vitro*, o modelos animales determinando las respuestas específicas contra antígenos de VPH. Las estrategias empleadas incluyen la caracterización de péptidos antigénicos de proteínas virales de VPH, el uso de células dendríticas como adyuvantes en la generación de la respuesta inmune y la inmunización con péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, ADN plasmídico, y partículas tipo virales (VLPs) (Rudolf *et al.*, 2001; Salit *et al.*, 2002; Stern, 2005).

Este conocimiento ha conducido a la propuesta de desarrollar vacunas contra el virus. (Moodley, 2005). Estas vacunas pueden ser profilácticas y terapéuticas: por un lado, en las aproximaciones profilácticas, el uso de partículas tipo virales (VLPs), se constituyen como la opción de difusión masiva más próxima. Estas partículas, formadas principalmente por la proteína L1, presentan la ventaja de mimetizar adecuadamente la estructura del VPH, sin los efectos nocivos que implican su genoma (Moodley, 2005).

La protección contra infecciones transitorias o persistentes por VPH-16, debido a la generación de anticuerpos neutralizantes (Koutzky *et al.*, 2002; Billich *et al.*, 2003; Lowy and Schiler, 2006; Joura *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008) y activación de poblaciones de linfocitos T ha sido demostrada en estudios de fase clínica II y III, aunque su aplicación requerirá de mayor tiempo para tener un impacto en la disminución de la tasa de incidencia de CaCu en las poblaciones que lo padecen. (Pinto *et al.*, 2005).

Por otro lado, con base en los conceptos moleculares manejados actualmente, se espera que las vacunas terapéuticas tengan como blanco potencial a las proteínas E6 y E7, puesto que se ha demostrado que su expresión es una condición necesaria para el mantenimiento del estado transformado de la célula y por tanto funcionarían como antígenos tumorales específicos (Salit *et al.*, 2002).

A la fecha han sido evaluadas posibles intervenciones terapéuticas dirigidas principalmente contra las proteínas E6 y E7, usando diversas formas para inducir inmunogenicidad, ya sea por medio de péptidos (Salit *et al.*, 2002), proteínas de fusión (De Jong *et al.*, 2002), VLPs (Zhang *et al.*, 2000) o de polinucléotidos (Sheets *et al.*, 2003), los cuales fueron realizados con o sin adyuvantes, o bien usando vectores como el virus *vaccinia* (Baldwin *et al.*, 2004).

## MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.

A pesar que la I-VPH es conocida por generar respuesta inmune, ésta es generalmente débil y varios mecanismos involucrados contribuyen a esta evasión, como es el hecho de que el VPH no es citopático, es decir, el virus no destruye, lo que causa proliferación celular en vez de destrucción celular y por lo tanto no desencadenan respuesta inflamatoria inmune (Longworth and Laimins, 2004).

El patrón de infección, crónica o latente y la aparición de brotes con efectos citopáticos, es totalmente dependiente de las condiciones celulares del huésped. La persistencia de la infección viral requiere la evasión de la detección y eliminación de las células virales por el sistema inmune (Longworth and Laimins, 2004). El VPH sólo infecta células epiteliales o de mucosas, lo que facilita la evasión al sistema inmune, ya que viriones completos de VPH se encuentran solamente en células escamosas terminalmente diferenciadas en las capas exteriores del epitelio genital, separadas por varias capas de epitelio mucoso de los centros germinales linfocíticos de la submucosa, quienes están involucrados en la generación de la respuesta inmune (Williamson *et al.*, 2005).

Existen varios mecanismos que conducen a la evasión y supresión de la respuesta inmune en los tumores cervicales, entre los que se encuentran los defectos en la función inmunoestimuladora mediante citocinas y moléculas coestimuladoras de células dendríticas (Gabrilovich *et al.*, 2001; Tuyaert *et al.*, 2007), la expresión defectuosa y/o disminuida de HLA y de los transportadores asociados al procesamiento de antígenos TAPs (Brady *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001) y a la asociación de ciertos alelos HLA clase I y clase II que conducen a una deficiente presentación de antígenos al linfocito T citotóxico (Wang and Wang, 2007; Guermonprez *et al.*, 2002).

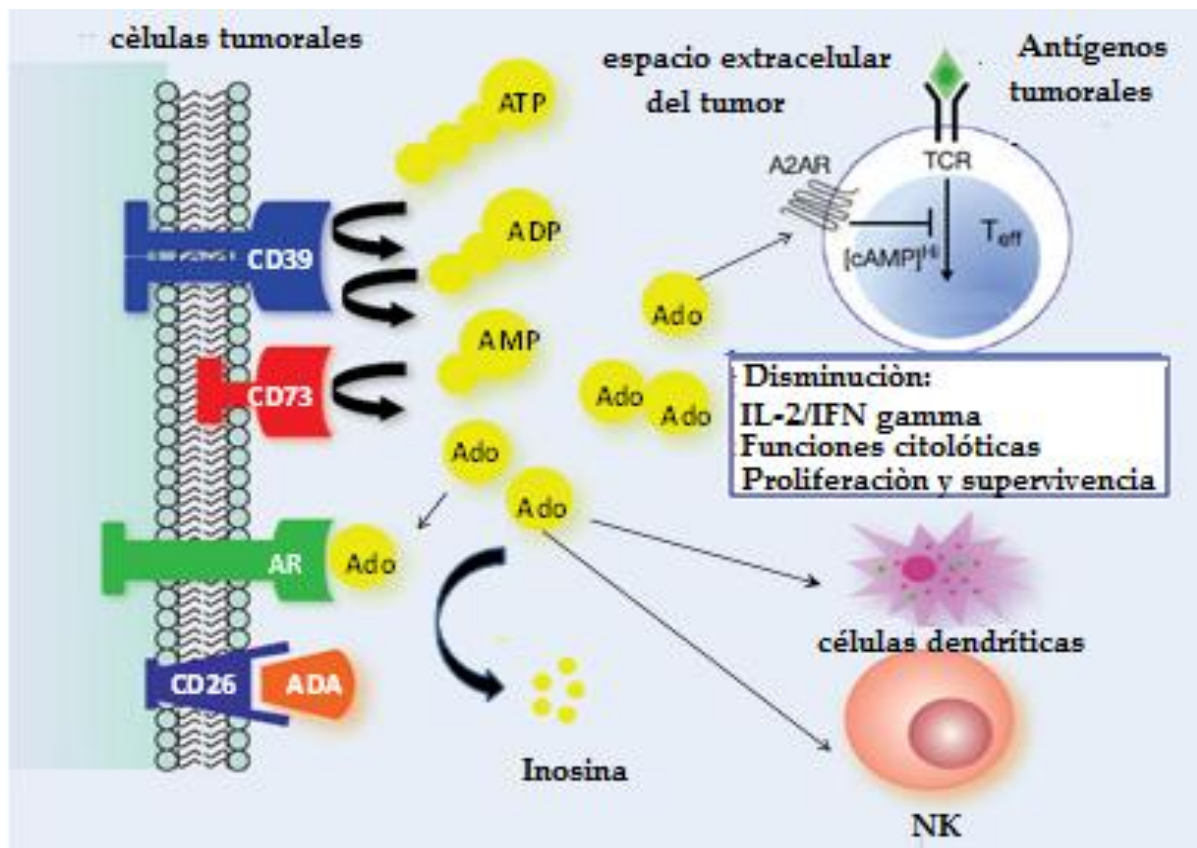
Sumado a este hecho, la propia heterogeneidad antigénica dentro del tumor puede impedir la generación de una respuesta inmune antitumoral eficaz, ya que las células que no expresan los antígenos tumorales escapan del reconocimiento por los CTLs específicos (Carretero *et al.*, 2008). Las células tumorales pueden suprimir la respuesta inmune celular a través de la producción de citocinas inmunosupresoras que incluyen factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) y la interleucina 10 (IL-10) (Weiner, 2001). el factor de necrosis tumoral (TNF), o por los ligandos de Fas (García *et al.*, 2009) y pequeñas moléculas inhibitoras como la prostaglandina E2 (Castellone *et al.*, 2005). Asimismo, se ha demostrado que células T reguladoras inmersas en el microambiente tumoral participan de manera activa en la desregulación de la respuesta inmune efectora (Wang and Wang, 2007; Nizar *et al.*, 2009).

Recientemente se han descrito factores epigenéticos tales como la hipermetilación y desacetilación de histonas que en conjunto inhiben la transcripción y traducción de varios genes que participan en el procesamiento y presentación de antígenos (Transportadores asociados al procesamiento de antígenos, enzimas proteolíticas, cadenas pesadas del MHC, etc.) y por tanto en la presentación antigénica para el reconocimiento por linfocitos (Tomasi *et al.*, 2006).

Otro mecanismo inmunosupresor recientemente propuesto es la vía adenosinérgica (**Fig. 8**), mediante la producción de adenosina extracelular, la cual es un potente inmunosupresor que se acumula durante el crecimiento del tumor (Stagg *et al.*, 2010). La adenosina es un compuesto generado a partir de nucleósidos extracelulares catalizados por ectonucleotidasas como CD39 y CD73 (Kobie *et al.*, 2006; Deaglio *et al.*, 2007) que está presente en concentraciones inmunosupresoras en el microambiente del tumor sólido y puede ser un factor importante en la evasión inmune por las células tumorales (Ohta *et al.*, 2006).

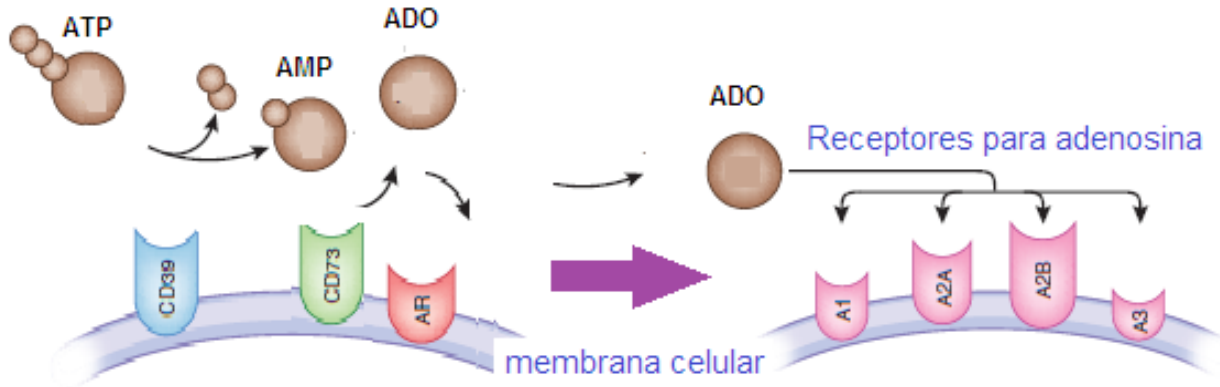
### ● VÍA ADENOSINÉRGICA.

Durante las condiciones de limitada disponibilidad de oxígeno, inflamación, o lesión aguda, las células liberan varios nucleótidos, particularmente en la forma de ATP y adenosina difosfato (ADP). Las concentraciones Intracelulares de ATP son relativamente altas (> 5 mM) y durante condiciones perjudiciales ATP intracelular es liberado de la apoptosis o necrosis celular (Starcevic *et al.*, 2001). Por medio de la vía adenosinérgica el ATP y AMP generan adenosina a través de fosfohidrólisis enzimática (Eltzschig *et al.*, 2003) (**Fig. 8**).



**Fig. 8** Esquema del metabolismo de la adenosina extracelular inducida por el tumor en la supresión inmune. Muestra una vía principal de generación extracelular de adenosina en el microambiente tumoral, el aumento de la actividad de CD39-CD73 y la disminución de la ecto-adenosina desaminasa (ADA), que en las células humanas pueden estar enlazados a la superficie celular por CD26, contribuyen a los elevados niveles de adenosina extracelular durante progresión del tumor. Modificada de Zhang *et al.*, 2010.

La generación de adenosina extracelular está determinada por la ectoenzima ENTPD1 (ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa-1) o CD39 que hidroliza ATP / UTP y ADP / UDP a los nucleósidos respectivos, tales como AMP extracelular. Estos monofosfatos nucleósidos son a su vez, degradados rápidamente a otros nucleósidos, como la adenosina por la acción de la ecto-5'-nucleotidasa ó CD73 (Mizumoto *et al.*, 2002; Eckle *et al.*, 2007) (**Fig. 9**).



**Fig. 9 ATP es convertido en AMP y AMP a adenosina.** La ecto-nucleósido-trifosfato-diphosphohidrolasa (E-NTPDase1 o CD39) convierte ATP en AMP y posteriormente CD73 convierte el AMP en adenosina. La adenosina se genera en el espacio extracelular a través de fosfohidrólisis de AMP por la ecto enzima ecto-5'-nucleotidasa CD73 que actúa con 4 receptores específicos: A1, A2A, A2B y A3. Modificado de: Yap and Thomas 2012.

### ● ECTO-5'-NT, CE 3.1.3.5. (CD73).

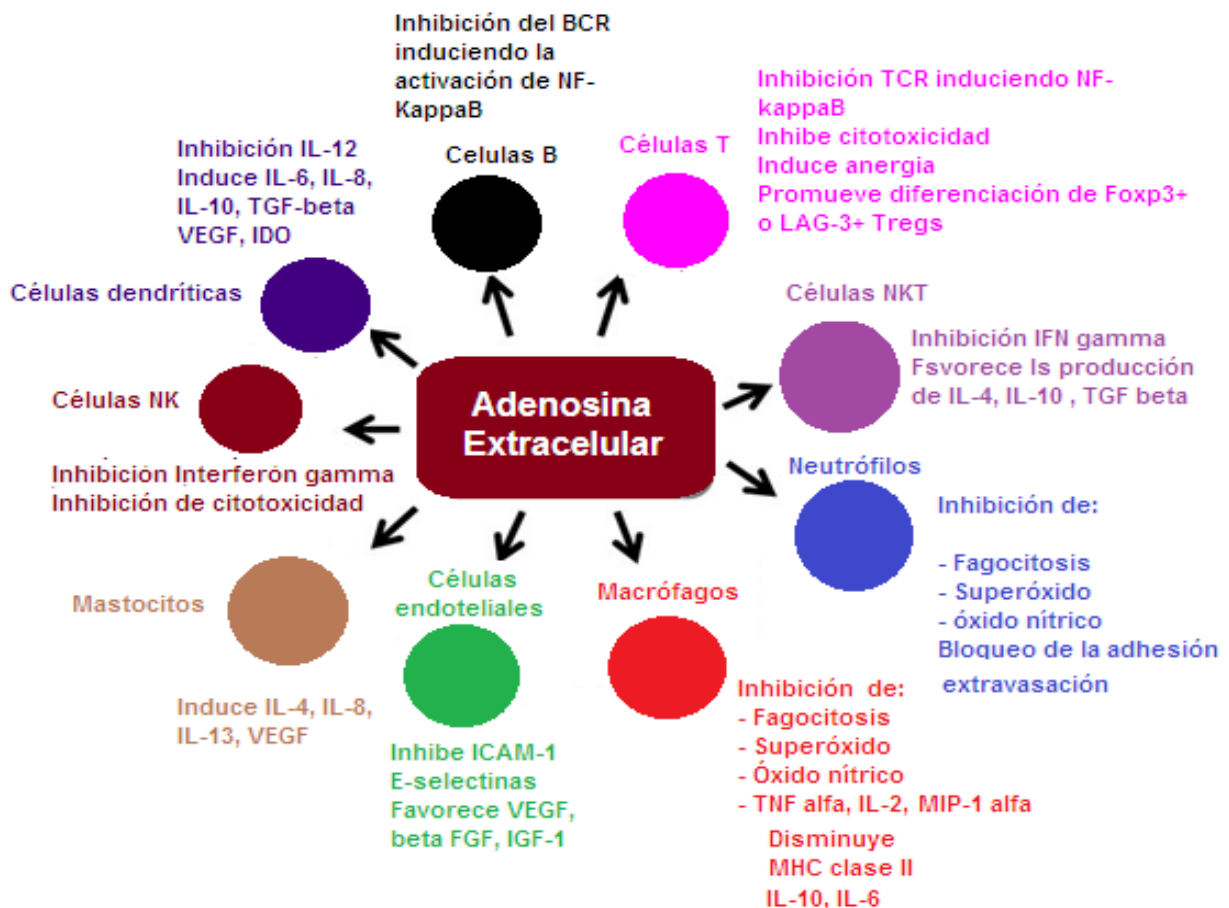
La ecto-5'-nucleotidasa, CD73 es una molécula de 70 kD formada por un dímero de 2 subunidades unidas por un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) a la cara externa de la membrana plasmática (Thompson *et al.*, 2004) con actividad ectoenzimática. Originalmente fue definida como un antígeno de diferenciación de linfocitos, con función de una molécula de co- señalización en los linfocitos T y una molécula de adhesión para la unión del linfocito al endotelio. CD73 se encuentra en la superficie celular de la mayoría de tejidos expresándose abundantemente en el endotelio vascular y con bajo nivel en ciertos tipos celulares (Dachuan *et al.*, 2010), incluidos los subconjuntos de linfocitos, células endoteliales y las células epiteliales (Colgan *et al.*, 2006).

Estudios recientes han implicado a CD73 en el control de una variedad de respuestas fisiológicas incluyendo la iónico epitelial, el transporte de fluidos, el accidente isquémico, pre-acondicionamiento, las lesiones de tejidos, la función plaquetaria, la hipoxia y el daño vascular (Linden, 2001; Colgan *et al.*, 2006). La expresión de CD73 es fundamental para la regulación de la hipoxia inducida por permeabilidad vascular y para el control de respuestas inflamatorias hacia las enfermedades (Thompson *et al.*, 2004). La expresión de CD73 en el endotelio regula negativamente la migración de células T y B de la sangre a los ganglios linfáticos (Takedachi *et al.*, 2008). En contraste promueve extravasación de células T en el tejido periférico. (Mills *et al.*, 2008).



## ADENOSINA

La adenosina, un nucleósido cíclico formado de adenina y un azúcar ribosa, es una molécula endógena biológicamente activa de alta importancia (Eltzschig *et al.*, 2003), que se encuentra en el espacio intracelular en una concentración considerada entre 10-50 nM (Cunha, 2001), o extracelular, generalmente en el rango 25-250 nM (Dunwiddie y Masino, 2001), en donde ejerce una amplia gama de acciones fisiológicas (Kirchhof *et al.*, 2003). Muchos estudios han indicado en general las propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias de la adenosina (Spychala *et al.*, 2004), que resaltan su papel en la regulación del sistema inmunológico, la estimulación de la angiogénesis y la inhibición de la inflamación en el sitio de la lesión (Spychala, 2000) (**Fig.10**). La adenosina se encuentra en todas las células de nuestro organismo incluyendo las neuronas, en donde juega un papel importante en la regulación de la transmisión sináptica y excitabilidad neuronal del sistema nervioso central (Boison, 2008), actuando como un modulador inhibitorio endógeno cuyas concentraciones extracelulares en el SNC oscilan en el rango de 30 a 300 nM (Fisone *et al.*, 2004).



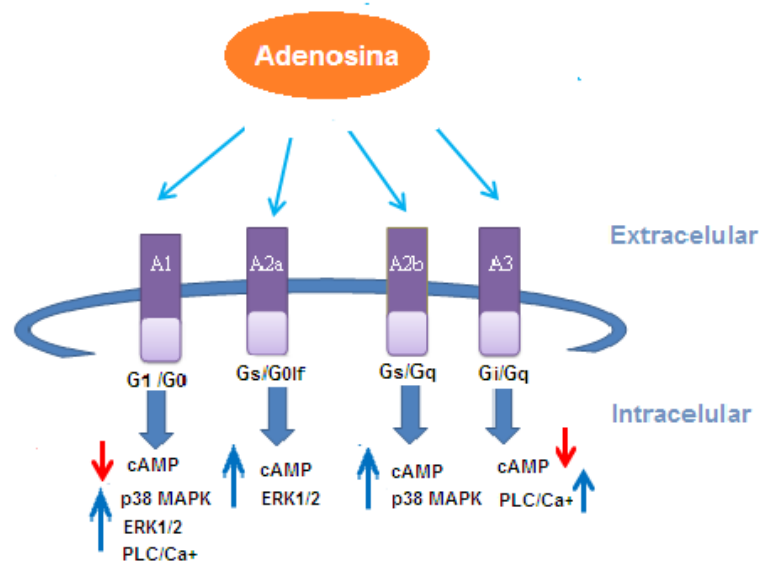
**Fig. 10 Efectos inmunosupresores de la adenosina extracelular.** La adenosina producida por la fosfohidrólisis del ATP extracelular por efecto de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, actúa como un potente mecanismo de retroalimentación negativa para suprimir las funciones de las células de la inmunidad innata y adaptativa. Modificado de: Stagg and Smyth, 2010.

Varios estudios han descrito la producción y el aumento de los niveles de adenosina en las células y tejidos en condiciones tales como la anoxia (Foster *et al.*, 2009), hipoxia (Eltzschig *et al.*, 2005) e isquemia (Grenz *et al.*, 2008), en donde se sugiere que la adenosina juega un papel fundamental en la adaptación celular a niveles de oxígeno limitado (Eltzschig, 2009), crucial para el mantenimiento de las funciones celulares durante la hipoxia (Eltzschig *et al.*, 2005) y para amortiguar la inflamación generada por ésta (Soop *et al.*, 2009); Rosenberger *et al.*, 2009; Hart *et al.*, 2009).

La adenosina también es producida por la desfosforilación extracelular de ATP y ADP, que son liberados de los nervios, plaquetas, mastocitos y otros tipos de células. La adenosina puede reingresar a las células endoteliales, músculo liso o eritrocitos donde es fosforilada por la adenosina cinasa a AMP, o inactivada por desaminación por la adenosina desaminasa (ADA), o bien incorporada a otras moléculas. (Wilson *et al.*, 1990). Debido a que el endotelio es una barrera para la adenosina, la adenosina formada dentro del lumen de los vasos sanguíneos puede derivarse en gran parte a partir de nucleótidos liberados de las plaquetas o células endoteliales. Por el contrario, la adenosina intersticial puede producir vasodilatación principalmente actuando sobre los receptores A<sub>2A</sub> en células musculares lisas vasculares que son especialmente accesibles para los nucleósidos intersticiales. La fuente de esta adenosina es probable que sean las células del parénquima isquémico, o nucleótidos derivados de los nervios, o mastocitos intersticiales (Decking *et al.*, 1997).

### ● RECEPTORES PARA ADENOSINA.

Los diversos efectos de la adenosina extracelular están mediados por la activación de cuatro distintos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) denominados A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Mirza *et al.*, 2005) (Fig. 11).



**Fig. 11** Los 4 receptores para adenosina anclados en la membrana celular. Se muestran algunos de los efectos que produce a nivel intracelular. La flecha roja indica disminución y la flecha azul incremento. Modificado: de Hoskin *et al.*, 2007.

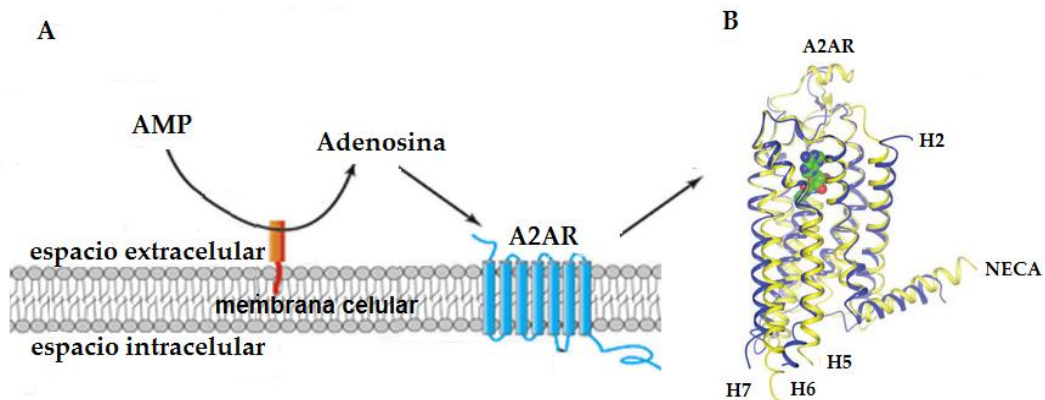


## RECEPTORES A1 Y A3.

Los receptores de adenosina A1 y A3 de 35kDa, inhiben la actividad de la adenilciclase y la proteína quinasa, disminuyendo así los niveles de cAMP intracelular, que tienen una importante función en la cardio protección (Reichelt *et al.*, 2005; Hochhauser *et al.*, 2007), angiogénesis (Clark *et al.*, 2007) y la protección contra el choque séptico (Gallos *et al.*, 2005). La activación de los receptores para adenosina A1 disminuye la expresión de p27, con lo que desregula la actividad de CDK4 (Mirza *et al.*, 2005).

## RECEPTOR A2A.

El receptor A2A de 45kDa, tiene una estructura que consta de siete hélices trans membrana que contienen bien conservados motivos de secuencia, lo que indica que probablemente es activado por un mecanismo común. (Lebon *et al.*, 2011) (**Fig 12**) Se expresa en monocitos/macrófagos, mastocitos, granulocitos, linfocitos, CDs, NKC, NKT, células epiteliales y endoteliales (Fredholm *et al.*, 2007).



**Fig. 12 Receptor de adenosina A2A.** A) La imagen muestra las 7 hélices trans dominio y la larga cola del A2AR. B) Estructura cristalina transmembrana del receptor unida al agonista de la adenosina endógena, la NECA (color amarillo). Modificado de: Lebon *et al.*, 2011.

Es importante destacar que la regulación de la expresión del receptor A2A está mediada por lo menos de cuatro promotores independientes, que en su mayoría explicarían probablemente sus funciones específicas (Yu *et al.*, 2004). La expresión del receptor A2A es inducida por la hipoxia, así como por TNF- $\alpha$  e IL-1, así como por el factor nuclear- $\kappa$ B (Khoa *et al.*, 2001). Se ha identificado el receptor A2A como un importante antiinflamatorio asociado con las células T. (Minguet *et al.*, 2005; Ohta *et al.*, 2006). Debido a su alta afinidad para la adenosina, tiene un papel inmunosupresor no redundante (El-Tayeb *et al.*, 2009). La activación de los receptores A2A en las células endoteliales favorece significativamente la angiogénesis tumoral, esto es consistente con el hecho de que las células endoteliales asociadas con tumores expresan niveles más altos de receptores de adenosina A2A (Ahmad *et al.*, 2009) y promueven directamente la supervivencia de las células tumorales (Etique *et al.*, 2009). Además de sus efectos pro-angiogénicos y proliferativos, el receptor A2A es un potente supresor de la inmunovigilancia en tumores endógenos (Ohta *et al.*, 2006).

## ● RECEPTOR A2B.

Difiere de los otros receptores por su afinidad relativamente baja a la adenosina (Yang *et al.*, 2006). Es inducido transcripcionalmente por el factor de inducción de hipoxia - alfa (HIF-1 $\alpha$ ) (Feoktistov *et al.*, 2004; Morote *et al.*, 2008), El TNF- $\alpha$ , IL-1b y el IFN- $\gamma$  (Kolachala *et al.*, 2005; St Hilaire *et al.*, 2008). Los receptores de adenosina A2B también tienen un papel importante en la angiogénesis (Feoktistov *et al.*, 2004). El efecto pro-angiogénico de los receptores A2B es debido a se expresa tanto en células endoteliales como en hematopoyéticas (Ryzhov *et al.*, 2008). La expresión de receptores de adenosina A2B sobre los mastocitos también puede mejorar significativamente la angiogénesis tumoral (Ryzhov *et al.*, 2004).

## ● EFECTO DE LA ADENOSINA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

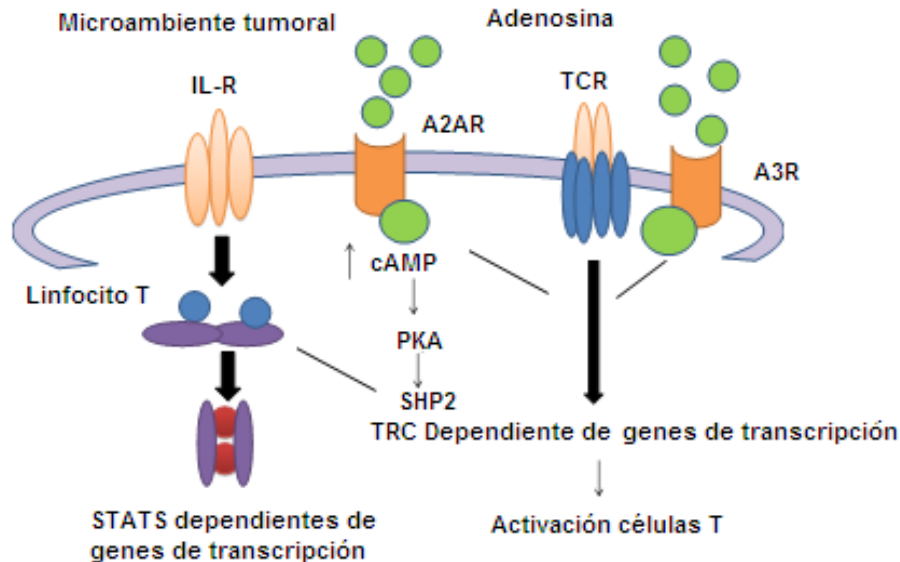
El microambiente tumoral está constituido por el flujo sanguíneo, la micro circulación, el aporte de oxígeno y nutrientes, el pH residual, el estado bio-energético y metabólico de un tumor. Este microambiente influye en las características biológicas de los tumores, como la tasa de proliferación celular, la capacidad de reparación de la lesión sub-letal o potencialmente letal, la inducción de la apoptosis o el potencial de invasión metastásico y angiogénico, así como de la expresión de genes responsables de la resistencia a drogas. (Kumar, 2000).

Hay estudios que han demostrado que cerca de un 60% de los tumores de cérvix localmente avanzados tienen áreas de tejido con hipoxia, las cuales están heterogéneamente distribuidas dentro de la masa tumoral (Vaupel *et al.*, 2001; Witz, 2006; Laconi, 2008). Pacientes con niveles elevados de hipoxia intratumoral presentan un peor control de la enfermedad y supervivencia que pacientes con tumores mejor oxigenados, ante un mismo estadio y tamaño tumoral (Lartigau, 2007). La resistencia de muchos tumores sólidos para organizar la respuesta inmune ha sido en gran parte atribuida a un amplio espectro de tumores asociados a mecanismos inmuno-supresores que han sido bien documentados tanto en ratones portadores de tumores como en pacientes con cáncer (Zou, 2005; Rabinovich, 2007).

CD73, se encuentra en muchos tipos de cáncer humano y de ratón (Spychala, 2000; Stagg *et al.*, 2010; Zhang, 2010). Recientemente se ha demostrado que los tumores que expresan CD73 en conjunto con CD39 tienen una alta efectividad para inhibir a las células T antitumorales de la inmunidad celular y promueven el crecimiento del tumor a través de su actividad enzimática, mediante adenosina extracelular (Zhang, 2010; Jin, 2010). Teniendo en cuenta que CD73 se expresa en muchos tipos de células, incluyendo los subgrupos de linfocitos (Yamashita *et al.*, 1998), mieloides células, en células de médula ósea del estroma, en células epiteliales del timo, en células B (Resta, 1998), células endoteliales (Airas *et al.*, 1998) y del epitelio (Strohmeier *et al.*, 1997), se piensa que CD73 protege a los tumores de las células T efectoras (Kobie *et al.*, 2006).

La adenosina se encuentra dentro de los tumores sólidos en concentraciones elevadas (Ohta, 2006), de tal forma que puede promover el crecimiento del tumor por estimular la angiogénesis tumoral y la inhibición de respuestas inmunes antitumorales (Spychala, 2000; Stagg *et al.*, 2010) (**Fig. 13**).

Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la adenosina se acumula en los tumores sólidos y los posibles efectos derivados de esta acumulación no se conocen exactamente (Spychala, 2000; Zhang, 2010).

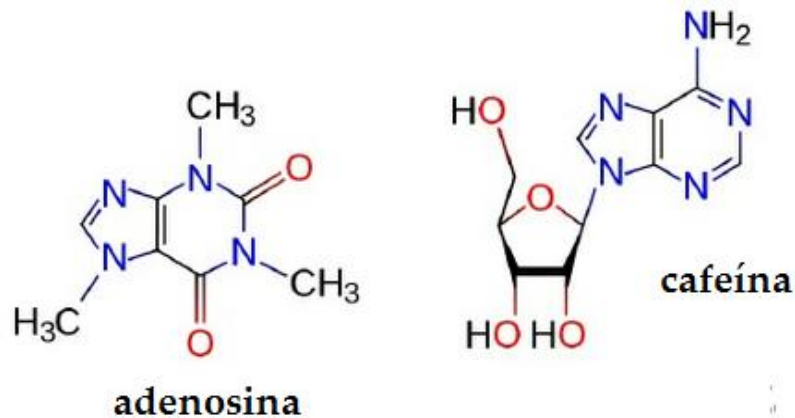


**Fig. 13 El efecto inhibitorio de la adenosina en vías de señalización células T en el microambiente tumoral.** La expansión clonal de células T y la expresión de moléculas efectoras asociadas al receptor de IL-2 (IL-2R) de señalización. La subsiguiente fosforilación de tirosina y la activación del TCR-dependen de la transcripción del gen, se suprimen por la acción de la adenosina a través de sus receptores A2a y A3. Modificado de: Hoskin *et al.*, 2007.

### ● CAFEÍNA.

La cafeína (1, 3, 7 - Trimetilxantina), es una sustancia que atraviesa sin dificultad las barreras membranosas, por lo que después de su ingestión llega con facilidad al SNC (Fredholm *et al.*, 1999), donde modifica procesos que estimulan la actividad intelectual, inhibe el sueño y reduce la fatiga (Fisone *et al.*, 2004) (Snel *et al.*, 2004). La cafeína actúa sobre otras sustancias en el organismo siendo capaz de modificar diversos procesos celulares que podrían explicar sus efectos biológicos (Daly and Fredholm, 2004) (**Fig.14**). Sin embargo, su efecto más consistente es el bloqueo de las acciones de la adenosina, un autacoide liberado por prácticamente todos los tipos celulares en condiciones de gran actividad metabólica (Daly and Fredholm, 2004).

La cafeína es un antagonista competitivo, no selectivo, que se une a los receptores de adenosina con el siguiente orden de potencias  $A2A > A1 > A2B > A3$  (Fredholm *et al.*, 1999). Por ser una molécula estructuralmente similar a la adenosina (Basheer *et al.*, 2004) su absorción en el tracto gastrointestinal es rápida y virtualmente completa en 45 minutos presentándose en su concentración máxima en un rango de entre 15 y 120 minutos con una vida media de 2.5 a 4.5 horas. (Fisone *et al.*, 2004).



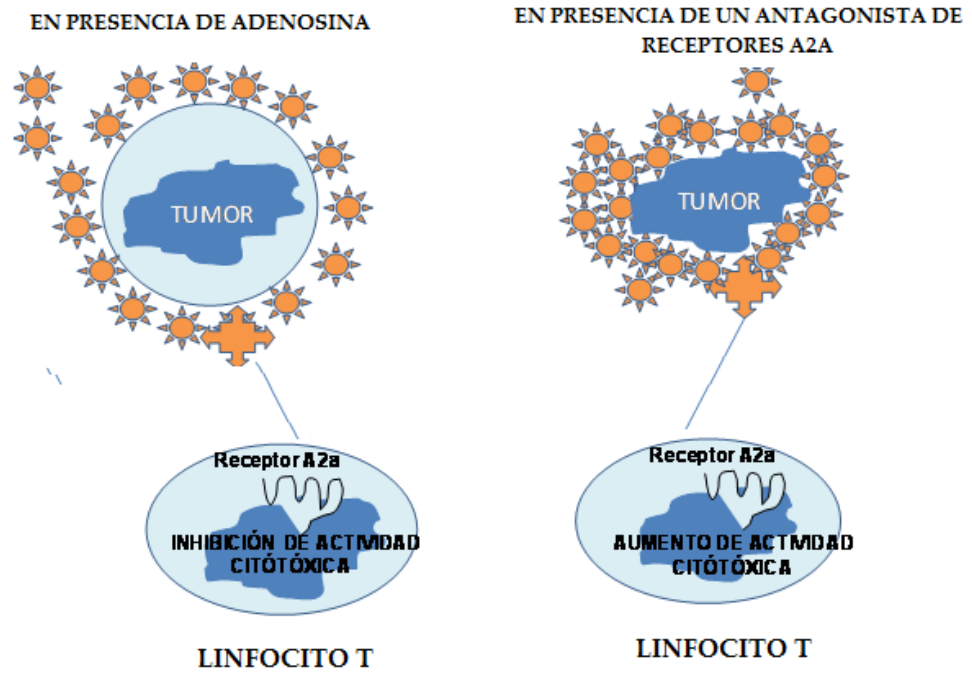
**Fig. 14 La cafeína actúa como un inhibidor competitivo.** La molécula de la cafeína es estructuralmente similar a la adenosina y se une a receptores de adenosina en la superficie de las células sin la activación de ellos (un "antagonista" mecanismo de acción): Basheer *et al.*, 2004.

La cafeína se metaboliza en el hígado por el sistema enzimático citocromo P450 oxidasa (concretamente, la isoenzima 1A2) en tres dimetilxantinas metabólicas: Paraxantina (84%), teobromina (12 %) y teofilina (4%) Cada uno de éstas, se metaboliza y luego es excretada en la orina. (Fisione *et al.*, 2004). La cafeína puede por tanto bloquear de forma dependiente de la dosis (**Tabla 1**), los efectos de la adenosina, incluidos los que se producen en las células cancerosas que también tienen receptores de adenosina (Franco, 2008).

CONCENTRACIÓN DE CAFEÍNA	EFEECTO CELULAR
1-30µM	<b>Bloqueo de los receptores de Adenosina A1,A2B.</b>
20-300 µM	<b>Bloqueo de los receptores A3 e inhibición de la fosfodiesterasa de AMPc.</b>
40 a 700 µM	<b>Bloqueo de los receptores GABAA</b>
100-3000 µM	<b>Liberación de calcio del retículo endoplásmico.</b>

**Tabla 1. Efectos celulares acumulativos de la cafeína en relación a sus concentraciones.** La cafeína es un antagonista competitivo de la adenosina que es capaz de bloquear todos los receptores para adenosina. Modificado de: Fredholm, 1999.

Hasta el momento los receptores de adenosina de las células cancerosas no han sido considerados una "diana" para el desarrollo de fármacos anticancerosos. Sin embargo, hay evidencias de que los receptores de adenosina de las células del sistema inmunitario pueden ser una buena "diana" terapéutica al menos en ciertos tipos de cáncer (Franco, 2008) (**Fig. 15**).



**Fig.15** La cafeína bloquea los receptores para adenosina impidiendo su efecto inmunosupresor sobre las células T. A la izquierda se observa que la adenosina inhibe la actividad citotóxica de los linfocitos T favoreciendo el desarrollo tumoral. A la derecha, el empleo de un antagonista de los receptores A2A bloquea su acción produciendo un aumento de la actividad citotóxica del linfocito T, atacando las células tumorales. Modificado de: Franco, 2008.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en México, siendo más frecuente en mujeres entre los 20 y 50 años de edad, pasando por carcinoma *in situ*, entre los 25 y 35 años, a carcinoma invasivo en mujeres mayores de 40 años (Hunter *et al.*, 2008). Esto es un problema importante de salud pública, ya que constituye una de las principales causas de mortalidad entre las mujeres Mexicanas con cáncer (INEGI, 2008). Numerosas evidencias demuestran la etiología de los virus del Papiloma humano (HPV) en el desarrollo del cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras (Bosch *et al.*, 2002).

La falla en la respuesta inmune mediada por linfocitos T auxiliares tipo Th1 y por linfocitos T citotóxicos, se asocia a la presencia de linfocitos T reguladores antígeno-específicos y su influjo en el tumor y nódulos linfáticos de pacientes con CaCu avanzado (Visser *et al.*, 2007). La resistencia de muchos cánceres humanos, a inmunoterapias, incluyendo inmunoterapia adaptiva y la administración de las vacunas terapéuticas contra el cáncer, ha sido atribuido a la supresión inmune asociada al tumor, debida a las moléculas inmunosupresoras situadas dentro del microambiente tumoral (Malmberg, 2004); (Tabi and Man, 2006); (Whiteside, 2006).

La adenosina es un nucleósido de las purinas encontrado dentro del líquido intersticial de tumores sólidos en las concentraciones a las cuales puede inhibir inmuno respuestas transmitidas por células del tumor. Se ha establecido que la adenosina extracelular inhibe la activación del linfocito de T y su función efectora sobre las células del tumor, actuando sobre todo a través de receptores específicos de alta afinidad A2a y A3 en la superficie de las células T (Beldi *et al.*, 2008). Mucha atención se ha centrado recientemente en el papel de las células T reguladoras y de las células mieloides como mediadores de la supresión inmune asociada al tumor (Wang and Wang, 2007). Sin embargo, las células mismas del tumor pueden suprimir la respuesta inmune mediante la producción de citocinas inmunosupresoras que incluyen el TGF- $\beta$ , la interleucina IL - 10 (Gastl. *et al.*, 1996), los ligandos de la familia TNF-  $\alpha$  tales como Fas ligando (Lapas *et al.*, 2005) y pequeñas moléculas inhibitorias como la prostaglandina E2 (Castellone *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta que nuestro grupo de investigación ha encontrado evidencias de la actividad enzimática de la ectoenzima CD73 en células tumorales de cáncer cérvico uterino, el presente trabajo tiene como finalidad analizar los efectos de esta enzima sobre la proliferación de células tumorales de cáncer cérvico uterino mediante la generación de adenosina a partir de AMP. La identificación de la vía adenosinérgica y su actividad funcional en células tumorales de CaCu resulta de gran importancia en este tipo de tumor, puesto que constituye un mecanismo de supresión inmunológica contra células efectoras del sistema inmune. Por lo que esta información será importante para enfocar nuevas estrategias de inmunoterapia hacia este tipo de cáncer.



## HIPÓTESIS

Se sabe que la ectoenzima CD73 se expresa en células T reguladoras, células dendríticas foliculares y células epiteliales entre otras. Además, la generación de adenosina extracelular mediante CD73 a partir de AMP tiene efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos T al interactuar con receptores de alta afinidad como A2a. Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha detectado actividad enzimática de esta ectonucleotidasa y la presencia de receptores A2a en células tumorales de cáncer cérvico uterino. En consecuencia, se espera que al adicionar AMP a células tumorales de CaCu se genere adenosina extracelular e inhiba su proliferación.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de la ecto enzima CD73 y el efecto de adenosina sobre la proliferación en células tumorales de cáncer cérvico uterino.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la expresión de CD73 en células tumorales de cáncer cérvico uterino.
2. Analizar la expresión de receptores para Adenosina en células tumorales de cáncer cérvico uterino
3. Analizar el efecto de la Adenosina sobre la proliferación de células de cáncer cérvico uterino.

## ● MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA ECTOENZIMA CD73 EN LAS CÉLULAS TUMORALES DE CaCu..

**Líneas celulares:** Para llevar a cabo el presente estudio se contó con las siguientes líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino humanas: CaSki y SiHa (VPH tipo 16), HeLa e INBL (VPH tipo 18), ViBo y C33A (Negativo para VPH). Como control, se utilizó la línea celular de queratinocitos de prepucio denominada HaCaT (negativa para VPH). La determinación de CD73 se realizó en membrana y de manera intracelular. Las líneas celulares de CaCu fueron cultivadas con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, y la línea HaCaT fue cultivada con DMEMF-12 suplementado con 15% de SFB.

**Determinación de CD73 en membrana:** las líneas celulares fueron cultivadas y antes de llegar a confluencia (80%) de llenado de la superficie de las cajas de cultivo, fueron despegadas con una solución de EDTA (Verseno), se lavaron con PBS suplementado con 1% de seroalbúmina bovina (PBS-BSA 1%). Posteriormente se contaron empleando azul de tripano y se distribuyeron 500 000 células viables en 200  $\mu$ L en tubos para citometría de 5mL de volumen, de acuerdo a la siguiente distribución por cada línea celular:

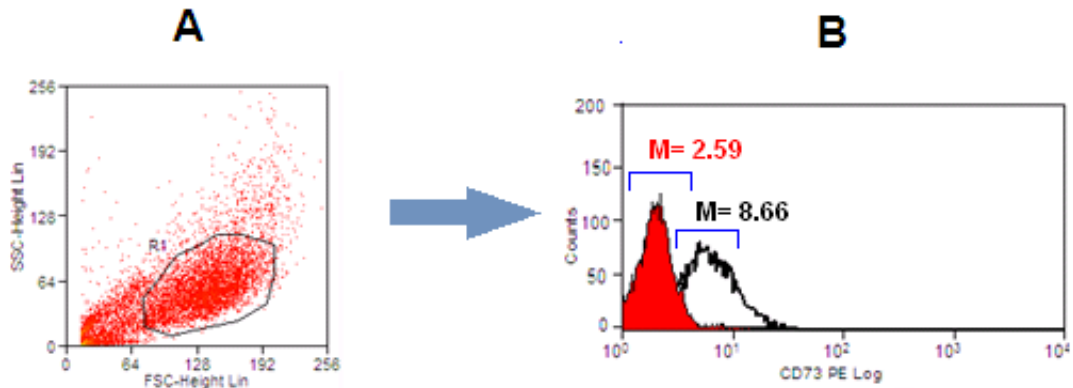
1. Autofluorescencia
2. Control de Isotipo (IgG2a)
3. Tubo problema

A cada uno de los tubos problema se les adicionó 20  $\mu$ L del anticuerpo anti-CD73 marcado con ficoeritrina (PE, Becton Dickinson, USA) a 4°C por 20 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con 0.5 mL de PBS-BSA 1% mediante centrifugación y se resuspendieron en 0.5mL de PBS-BSA 1% para llevar a cabo la lectura de 10000 eventos en un citómetro de flujo (FACS-Calibur (BD Biosciences, USA).

**Determinación intracelular de CD73:** Las células se fijaron previamente con una solución fijadora (0.5mL) conteniendo paraformaldehído al 1% (Cytofix, BD USA) durante 20 min a 4°C. Posteriormente se incubaron en 0.5 mL de una solución de permeado/lavado (Permwash, BD USA) durante 15min a 4°C. En seguida, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD73 marcado con ficoeritrina (PE, Becton Dickinson, USA) a 4°C por 20 minutos y se lavó 2 veces con la solución Permwash. Finalmente se llevó a cabo la lectura de 10000 eventos en un citómetro de flujo, teniendo como control células teñidas con un anticuerpo isotipo marcado con PE.

**Adquisición y análisis de los datos.** La adquisición de los datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Summit V4.3 (Dako Colorado, Inc., USA). Previo a ello, se realizó una selección (R1) para incluir células epiteliales en una gráfica dot plot de tamaño: Forward scatter-FSC (FSC), contra granularidad side scatter (SSC) (**Fig. 16 A**).

Finalmente, se crearon gráficas de Histogramas FL2-H y sobreposición, para medir cuantitativamente la expresión de la ectoenzima CD73 a través de la obtención de intensidad media de fluorescencia (IMF) captada por el equipo como se muestra en la Fig. 16B.



**Fig. 16 Método utilizado para obtener la IMF de CD73 en las células tumorales de CaCu. A)** Selección de la región correspondiente a las células viables en una gráfica de Dot plot de FSC vs SSC mediante la autofluorescencia. **B)** Histograma FL2-H de sobreposición que muestra la IMF del Isotipo control (rojo) y de CD73 (negro).

## 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A2A PARA ADENOSINA EN LAS CÉLULAS TUMORALES.

**La detección de CD73 y del receptor A2A en las líneas celulares.** Se realizó con ultraView Universal DAB Detection kit del sistema Ventana™ el cual consistió en:

1. Recuperación antigénica por 8 minutos en amortiguador básico basado en TRIS (CCI).
2. Inhibición de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. Incubación con el anticuerpo primario (Mouse anti CD73 E5NT, NT Invitrogen™) para CD73 y Anti-Adenosina Receptor A2a clon monoclonal antibody (Millipore®) para el Receptor A2A, por 30 minutos a 37° C.
4. Anticuerpo secundario basado en el sistema multímero marcado con peroxidasa de rábano.
5. Revelado con diaminobenzidina.
6. Contraste con hematoxilina.

Posterior al tratamiento realizado por el equipo, se lavaron las laminillas, se deshidrataron en alcoholes ascendentes y se aclararon con Xilol, para finalmente ser montadas en resina. Se dejaron secar perfectamente para posteriormente analizar la expresión de A2A en membrana y de manera intracelular a través de un microscopio óptico tomándose fotografías de las tinciones realizadas. Se emplearon dos parámetros de medición consistentes en determinar: el porcentaje de la Intensidad de expresión (PIE) y la Intensidad media de expresión (IME).

**Determinación del porcentaje de intensidad de expresión (PIE).**

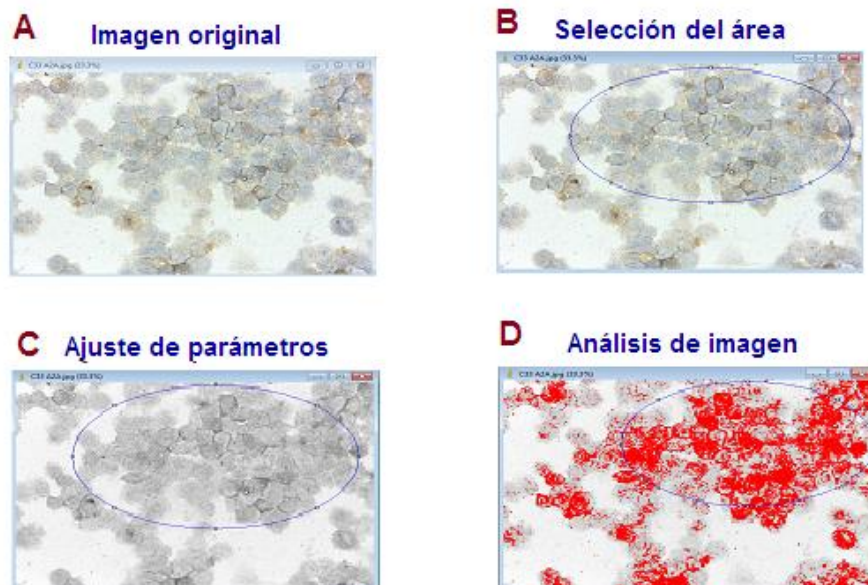
El PIE de CD73 y del A2AR fue evaluado semi-cuantitativamente con base al sistema propuesto por Ruiter *et al.*, 1998, el cual evalúa la intensidad de expresión en células positivas a través de los siguientes valores: 0 (0% de células teñidas); 1 (1-25% de células teñidas) expresión débil; 2 (25-50% de células teñidas) expresión moderada; 3 (50-75% de células teñidas) expresión fuerte; y 4 (75-100% de células teñidas) expresión intensa. (**Tabla 2**).

VALOR	PORCENTAJE	INTENSIDAD DE EXPRESIÓN
1	1-25%	débil
2	25-50%	moderada
3	50-75%	fuerte
4	75-100%	intensa

**Tabla 2. Parámetros para evaluar el porcentaje de la intensidad de expresión en células positivas.** Asigna un valor del 1 al 4 equivalente a un porcentaje definido por la intensidad de la expresión, según el sistema propuesto por Ruiter *et al.*, 1998.

**Intensidad media de expresión (EMI).**

La EMI se evaluó mediante el programa ImageJ®. (Image processing and analysis) Microsoft Java 1.1.4., siguiendo el protocolo del programa para mediciones de intensidad, de la siguiente manera (**Fig. 17**): **A**) Abrir la imagen analizar, **B**) seleccionar una región tomando como base una escala de grises de 8 bits (256 colores) en Split channels, **C**) Ajustar el umbral de la intensidad de los objetos a 225 (thresholded objects) en Upper threshold level empleando 200 pixeles de definición, **D**) Delimitar el área seleccionada (Limit to threshold) para realizar una evaluación de 100 eventos por imagen para cada línea celular.



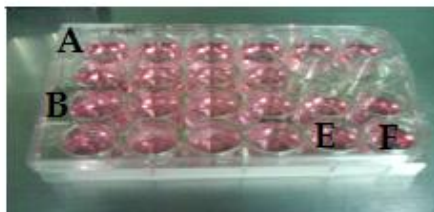
**Fig. 17 Análisis de imagen mediante el protocolo para mediciones de intensidad.** Según el programa ImageJ®. (Image processing and analysis) Microsoft Java 1.1.4

### 3. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES DE CaCu.

Cada una de las líneas celulares fueron marcadas con 2.5  $\mu$ l de CFSE 200 $\mu$ M (por sus siglas en inglés *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) por cada millón de células/ml de PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Una porción de células no fue marcada con la finalidad de ser utilizada para analizar su autofluorescencia. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS para eliminar el exceso de CFSE y se sembraron en placas de 24 pozos, colocando 100,000 células por pozo en presencia de las siguientes condiciones: (**Fig. 18**).

- A) Células tumorales con diferentes concentraciones de adenosina (1mM a 1pM).
- B) Células tumorales con diferentes concentraciones de adenosina (1mM a 1pM) y del bloqueador de receptores A2A, cafeína (300  $\mu$ M).
- C) Células tumorales con diferentes concentraciones de AMP (1mM a 1pM).
- D) Células tumorales con diferentes concentraciones de AMP (1mM a 1pM) y del bloqueador de los receptores A2A, cafeína (300  $\mu$ M).

PLACA 1



- A) Pozos 1-10 Adenosina
- B) Pozos 13-22 Adenosina + Cafeína

PLACA 2

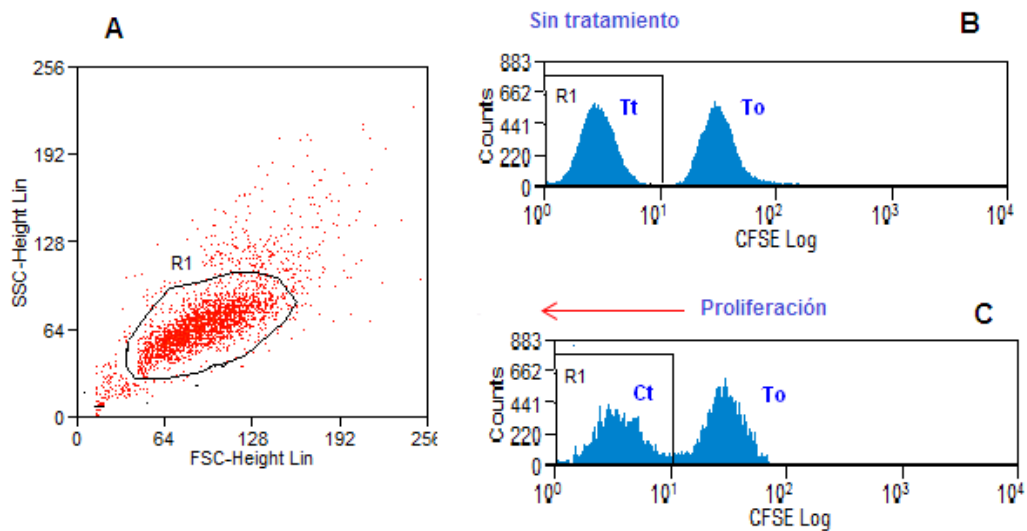


- C) Pozos 1-10 AMP
- D) Pozos 13-22 AMP + cafeína

- E) Pozo 23 sin tratamiento
- F) Pozo 24 cafeína

**Fig. 18 Placas de 24 pozos con las condiciones de cultivo.** Para cada ensayo se utilizaron 2 placas de 24 pozos, por línea celular. La siembra y el cultivo se realizaron simultáneamente, con una incubación de 72 horas.

**Adquisición y análisis de los datos.** La adquisición de datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Summit V4.3 (Dako Colorado, Inc., USA) (**Fig. 19**). Previo a ello, se realizó una selección (R1) para incluir células epiteliales en una gráfica dot plot de tamaño: Forward scatter-FSC (FSC), contra granularidad side scatter (SSC) (**A**), finalmente, se crearon gráficas de histogramas, para medir cuantitativamente la expresión de CFSE, para lo cual la proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100% (**B**), mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero (**C**).



**Fig. 19 Histogramas empleados para determinar la respuesta proliferativa total de las células en cultivo. A)** Selección de la región correspondiente a las células viables en un histograma de FSC vs SSC mediante la autofluorescencia. **B)** El tiempo inicial (To) de marcaje con CFSE se reservó en el momento de la siembra, conservando en refrigeración hasta el momento de la lectura en el citómetro. **C)** La respuesta proliferativa total (Tt) de células tumorales (Ct) se determinó sobre las células marcadas y cultivadas en ausencia de cualquier tratamiento.

El porcentaje de proliferación de células tumorales bajo condiciones de cultivo, se determinó al comparar los valores obtenidos de la Intensidad media de fluorescencia en cada una de las determinaciones, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células proliferantes} = \frac{[\text{Células tumorales (To)} - \text{Cel. Tumorales cultivo}]}{\text{células tumorales (To)} - \text{células tumorales (Tt)}} \times 100$$



## ● RESULTADOS

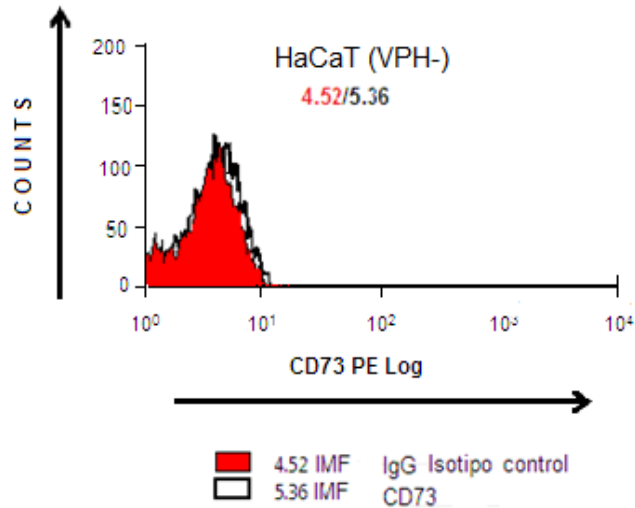
### ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD73 EN LÍNEAS CELULARES DE CaCu POR CITOMETRÍA DE FLUJO. (OBJETIVO 1).

La aparición de un tumor implica que las células neoplásicas son capaces de crecer y proliferar al utilizar diferentes mecanismos para evitar su reconocimiento y eliminación por el sistema inmune. La vía adenosinérgica es uno de esos mecanismos que ejerce su efecto inmunosupresor por medio de adenosina, un potente inhibidor de una amplia gama de las respuestas del linfocito T al estímulo antigénico, incluyendo la proliferación celular, además de modular el crecimiento de las células del tumor (Hoskin *et al.*, 2008).

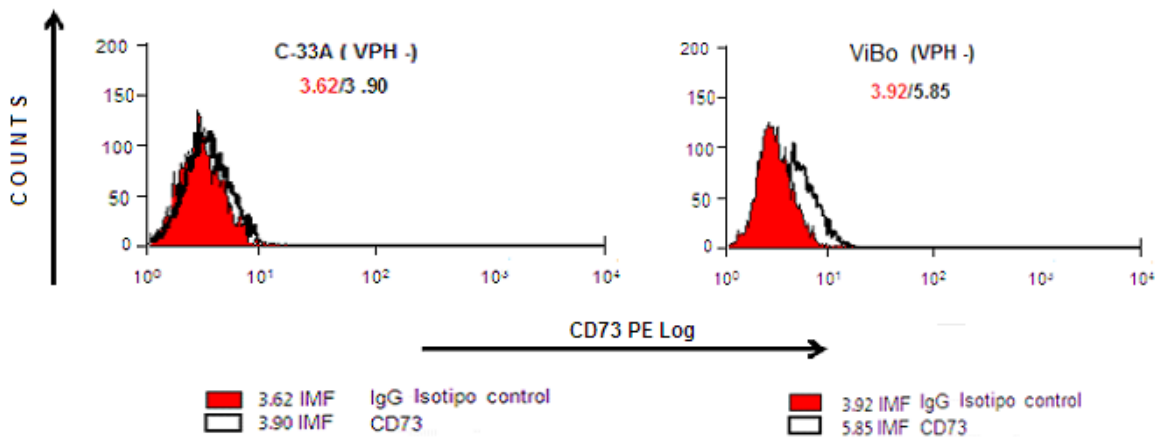
La adenosina es generada por la ectoenzima CD73 que se expresa en diversos tipos cáncer entre los que se encuentran: el cáncer de mama (Spychala *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008), esófago (Fukuda *et al.*, 2004), próstata (Hastie *et al.*, 2005), leucemia (Mikhailov *et al.*, 2008), glioma (Bavaresco *et al.*, 2008), tiroides (Kondo *et al.*, 2006), vejiga (Stella *et al.*, 2009), melanoma (Sadej *et al.*, 2006), ovario, y colon (Jin *et al.*, 2010). Además se ha reportado que esta ectoenzima se expresa abundantemente en el endotelio vascular y con bajo nivel en ciertos tipos celulares como leucocitos, subconjuntos de linfocitos, células T reguladoras (Eltzschig *et al.*, 2004; Deaglio *et al.*, 2007), células endoteliales y epiteliales (Colgan *et al.*, 2006), así como en muchas líneas celulares tumorales, encontrándose aumentada en los tejidos cancerosos (Jin *et al.*, 2010).

A este respecto, nuestro grupo de investigación ha detectado la expresión de CD73 en tejidos tumorales de CaCu en diferentes estadios clínicos de la enfermedad, así como el de la expresión de receptores para adenosina A2A en las células tumorales. Por lo que el presente trabajo se realizó con el objetivo de analizar la expresión de CD73 y del receptor A2A en líneas celulares de CaCu, así como evaluar el efecto de adenosina sobre la proliferación de las células tumorales. Mediante la técnica de citometría de flujo, inicialmente se determinó la expresión de la ectoenzima CD73 en la membrana de las líneas celulares de CaCu: C-33 A (VPH-), ViBo (VPH-), CaSki (VPH 16+), SiHa (VPH 16+), HeLa (VPH 18+) e INBL (VPH 18 +), empleando como control la línea de queratinocitos de prepucio HaCaT negativa para la infección por VPH.

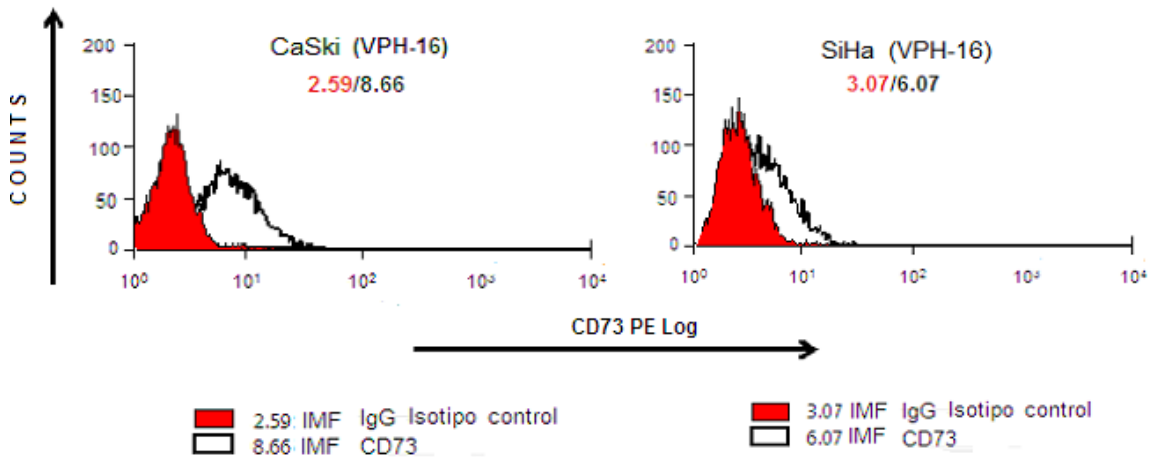
Nuestros resultados muestran que todas las líneas celulares expresaron la ectoenzima CD73 en la membrana celular. En el caso de la línea celular HaCaT empleada como control, el valor de IMF fue de 5.36 (**Gráfica 1**); para las líneas celulares de CaCu negativas a VPH, los valores fueron de 3.90 para C-33 A y 5.85 para ViBo (**Gráfica 2**); en el caso de las líneas positivas a VPH-16 los valores fueron de 8.66 para CaSki y 6.7 para SiHa (**Gráfica 3**); finalmente para las líneas celulares positivas a VPH-18, los valores fueron de 7.47 para HeLa y de 4.27 para INBL (**Gráfica 4**).



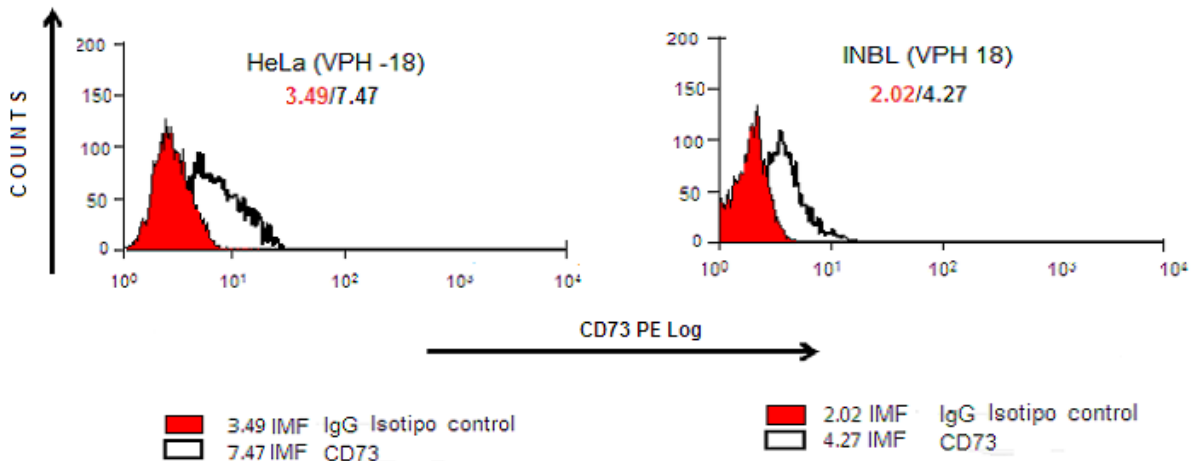
**Gráfica 1. Expresión de CD73 en las células HaCaT (VPH-).** El histograma muestra la Intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células HaCaT de queratinocitos de prepucio, empleando un anticuerpo irrelevante IgG2a como Isotipo control y un anticuerpo anti-CD73. La diferencia en expresión neta de CD73 fue de 0.84.



**Gráfica 2. Expresión de CD73 en las células C-33 A y ViBo (VPH -).** El histograma muestra la Intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células C33A y ViBo, empleando un anticuerpo irrelevante IgG2a como Isotipo control y un anticuerpo anti-CD73. La diferencia en expresión neta de CD73 fue de 0.28 para C33A y de 1.93 para ViBo.



**Gráfica 3. Expresión de CD73 en las células CaSki y SiHa (VPH-16).** El histograma muestra la Intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células CaSki y SiHa, empleando un anticuerpo irrelevante IgG2a como Isotipo control y un anticuerpo anti-CD73. La diferencia en expresión neta de CD73 fue de 6.07 para CaSki y de 2.99 para SiHa.

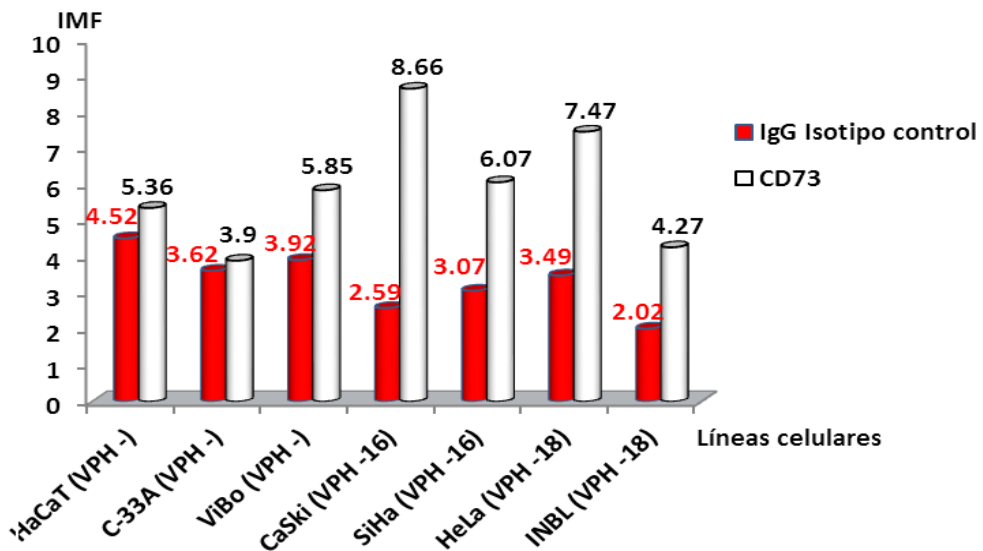


**Gráfica 4. Expresión de CD73 en las células HeLa e INBL (VPH-18).** El histograma muestra la Intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células HeLa e INBL, empleando un anticuerpo irrelevante IgG2a como Isotipo control y un anticuerpo anti-CD73. La diferencia en expresión neta de CD73 fue de 3.98 para HeLa y de 2.25 para INBL.

Al evaluar la expresión diferencial de CD73 en la membrana de las diferentes líneas celulares, se encontró que las líneas celulares positivas a infección por VPH mostraron mayor expresión diferencial de CD73 respecto a las líneas celulares negativas a VPH, incluyendo a las células HaCaT empleadas como control negativo (Tabla 3, Gráfica 5).

Líneas celulares de CaCu	IMF Isotipo Control	IMF CD73	Expresión diferencial de CD73
<b>CaSki (VPH -16)</b>	<b>2.59</b>	<b>8.66</b>	<b>6.07</b>
HeLa (VPH -18)	3.49	7.47	3.98
SiHa (VPH -16)	3.07	6.07	3.00
INBL (VPH -18)	2.02	4.27	2.25
ViBo (VPH -)	3.92	5.85	1.93
HaCaT (VPH -)	4.52	5.36	0.84
<b>C-33A (VPH -)</b>	<b>3.62</b>	<b>3.90</b>	<b>0.28</b>

**Tabla 3. Expresión diferencial de CD73 en líneas celulares de CaCu.** Se muestra la expresión diferencial de CD73 encontrada en las líneas celulares de CaCu al restar el valor de IMF del isotipo control al valor obtenido de IMF empleando el anticuerpo anti-CD73. Los datos se muestran en orden decreciente tomando en cuenta el valor más alto de IMF para CD73 (en rojo) al más bajo (en azul).



**Gráfica 5. Expresión de CD73 en las líneas celulares de CaCu y de las células HaCaT en relación con el Isotipo control.** Se muestra la expresión de CD73 y del isotipo control IgG2a en las diferentes líneas celulares utilizadas en el estudio.

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A2A PARA ADENOSINA (A2AR) POR INMUNOCITOQUÍMICA (OBJETIVO 2).

Tomando en consideración que nuestro grupo de investigación ha detectado la expresión del receptor para adenosina A2AR, así como la de CD73 en citoplasma y núcleo de células tumorales contenidas en preparaciones de tejido cervical tumoral, se procedió a analizar la expresión intracelular de ambas moléculas en las siete líneas celulares previamente cultivadas y adheridas a laminillas. Se incluyó un control negativo para cada línea celular, al cual no se le adicionó anticuerpo (células sin tratamiento).

Al analizar la expresión de CD73 empleando estos parámetros, se encontró que las líneas celulares negativas a la expresión de VPH, incluyendo a las células HaCaT empleadas como control negativo, mostraron bajo Porcentaje de Intensidad de Expresión (PIE), de 1-25% y valores de Intensidad Media de Expresión (IME) entre 51 y 74, con tinción débil en membrana y citoplasma (Figuras 20-22).

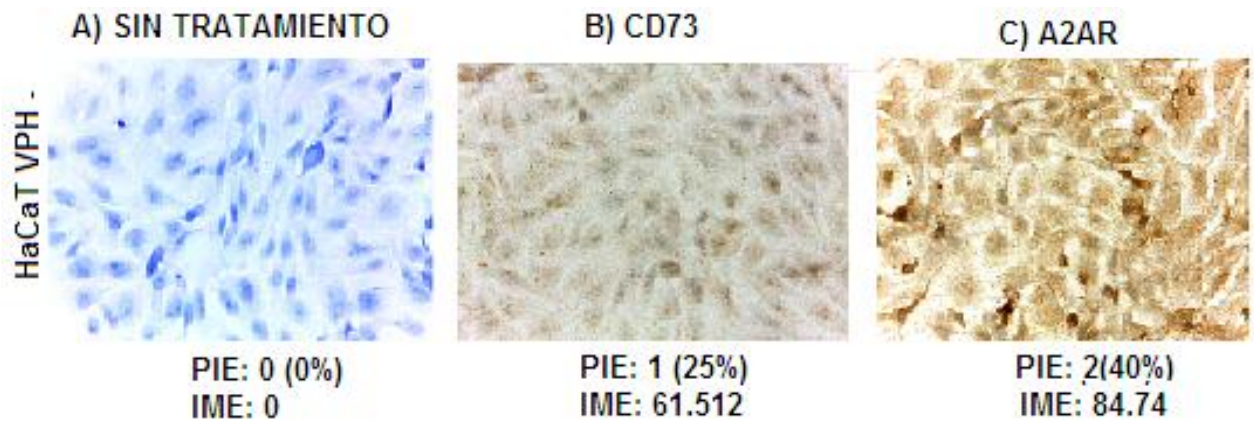
De manera contrastante, las líneas celulares positivas a la infección por VPH mostraron valores más altos en la expresión de CD73, encontrándose valores de PIE (60-75%) y valores de IME entre (106-154) (Figuras 23-26). Cabe mencionar que a diferencia de las líneas celulares negativas a la I-VPH, las líneas celulares positivas a VPH mostraron mayor intensidad de expresión en citoplasma y núcleo (Figuras 23-26), lo cual se vio reflejado en una mayor IME promedio (Gráfica 6).

Por otro lado, al evaluar la expresión del receptor de alta afinidad para adenosina A2A se encontró que en las líneas celulares negativas a la infección por VPH los valores del PIE fueron más heterogéneos, encontrándose valores entre 15% y 40%; mientras que la IME fue de 65-85 (Figuras 20-22).

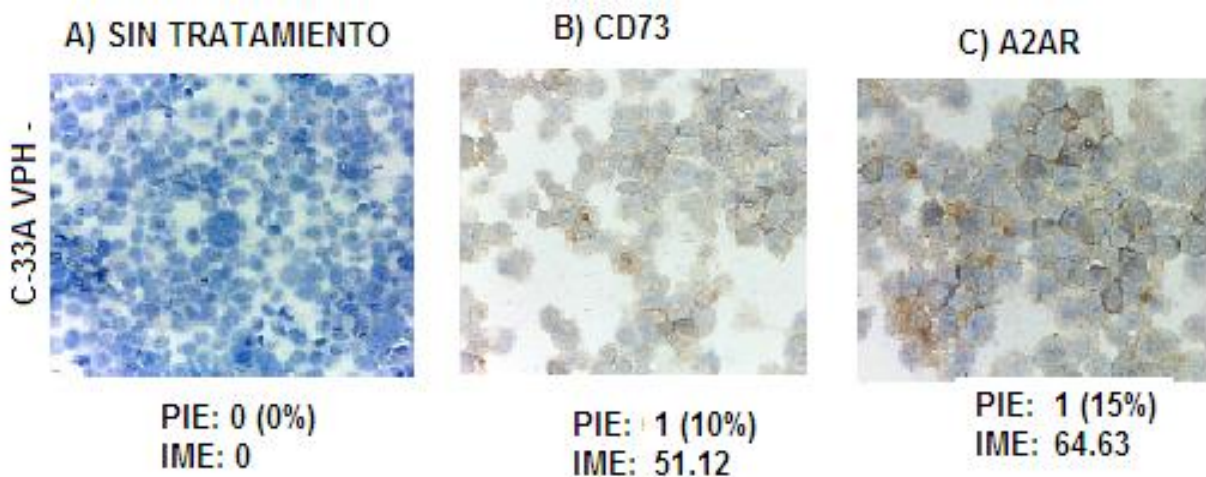
Por su parte la expresión de A2A en las líneas celulares positivas a la infección por VPH fue significativamente mayor, encontrándose valores de PIE de 45-65% y de IME de 84-141 (Figuras 23-26). Al analizar de manera global la expresión de A2A en las líneas celulares estudiadas, se encontró que el patrón de expresión de A2A fue mayor en las líneas celulares positivas a la infección por VPH (Gráfica 7).

La expresión combinada de CD73 y del receptor de adenosina A2A también mostró diferencias importantes entre las líneas celulares negativas y positivas a la infección por VPH, encontrándose una mayor expresión de ambos marcadores en las líneas celulares positivas a la infección por VPH, empleando los parámetros de IME (Gráfica 8) y del PIE (Gráfica 9).

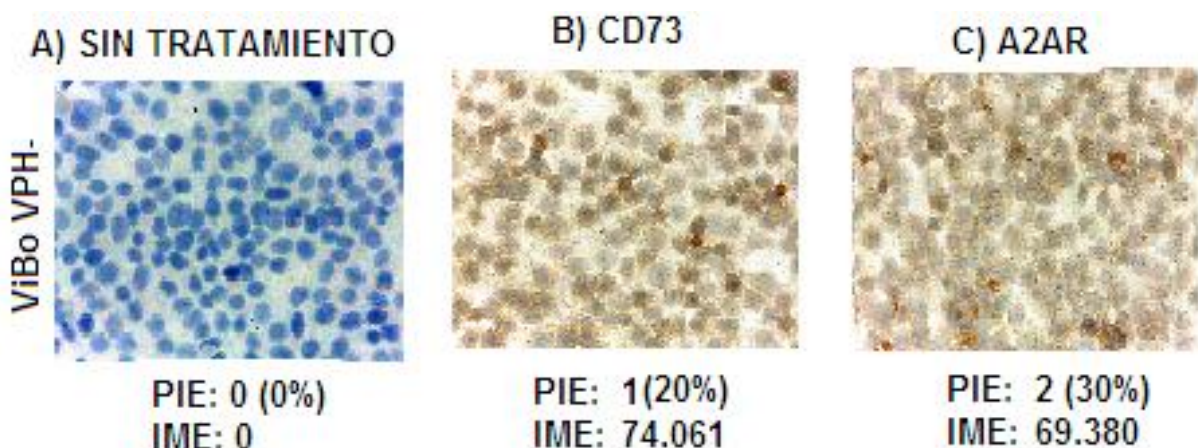




**Fig. 20** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A de la línea celular HaCaT VPH- . **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad de expresión. **IME**, Intensidad media de expresión.

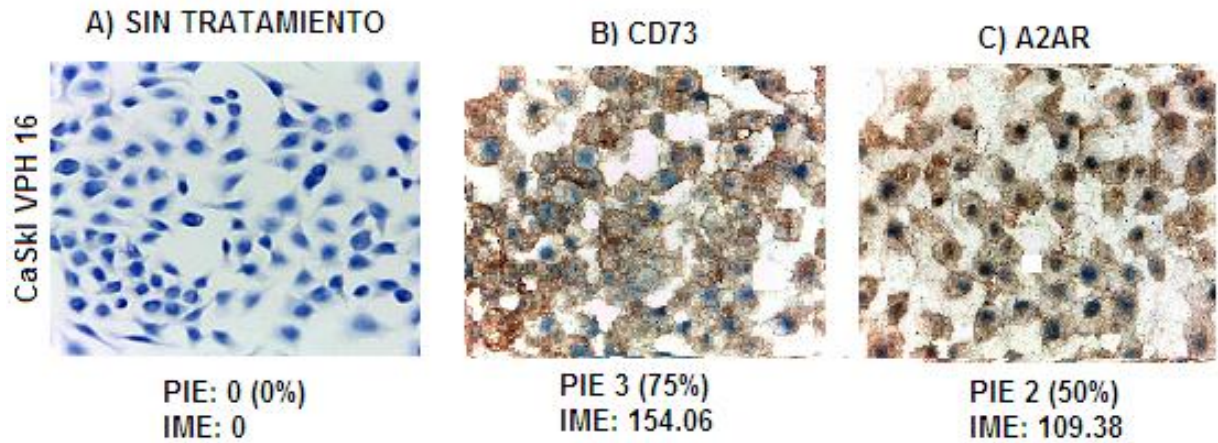


**Fig. 21** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular C-33 A (VPH -). **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad de expresión. **IME**, Intensidad media de expresión.

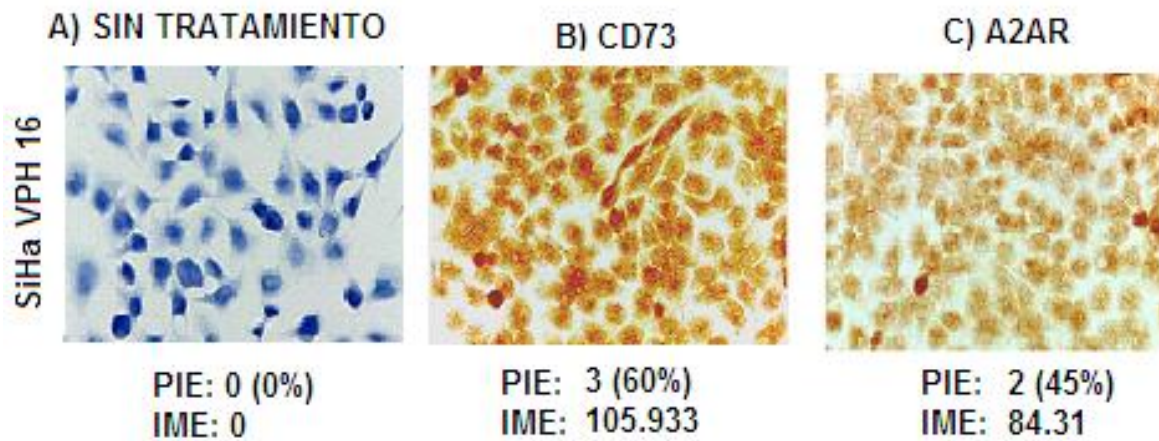


**Fig. 22** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular ViBo (VPH -). **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad de expresión. **IME**, Intensidad media de expresión.

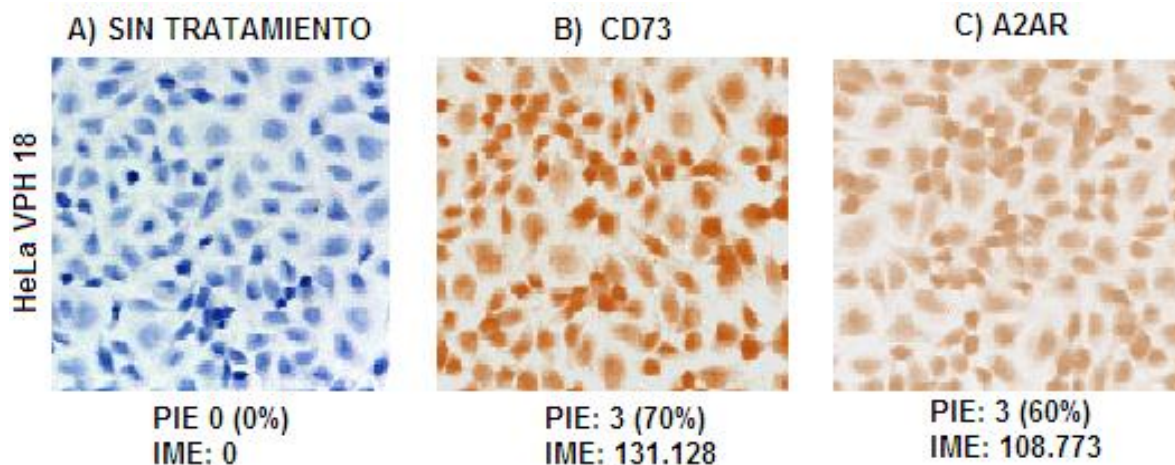




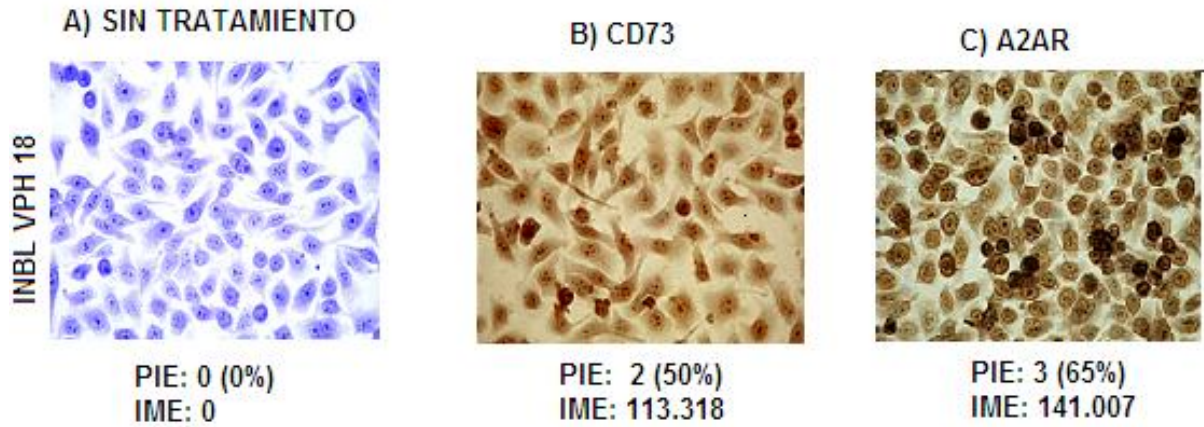
**Fig. 23** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular CaSki (VPH -16). **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad de expresión. **IME**, Intensidad media de expresión.



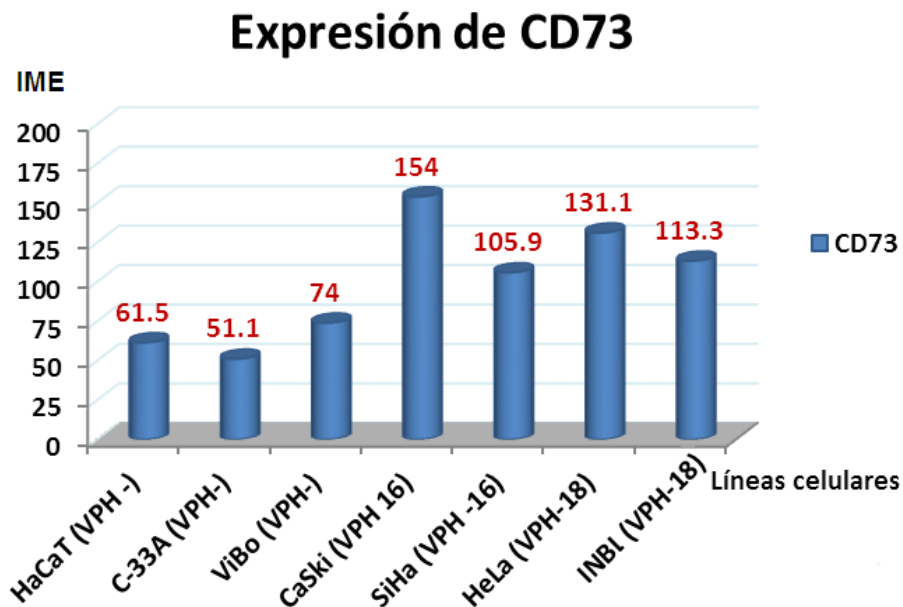
**Fig. 24** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular SiHa (VPH -16). **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad de expresión. **IME**, Intensidad media de expresión.



**Fig. 25** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular HeLa (VPH -18). **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad. **IME**, Intensidad media de Expresión.

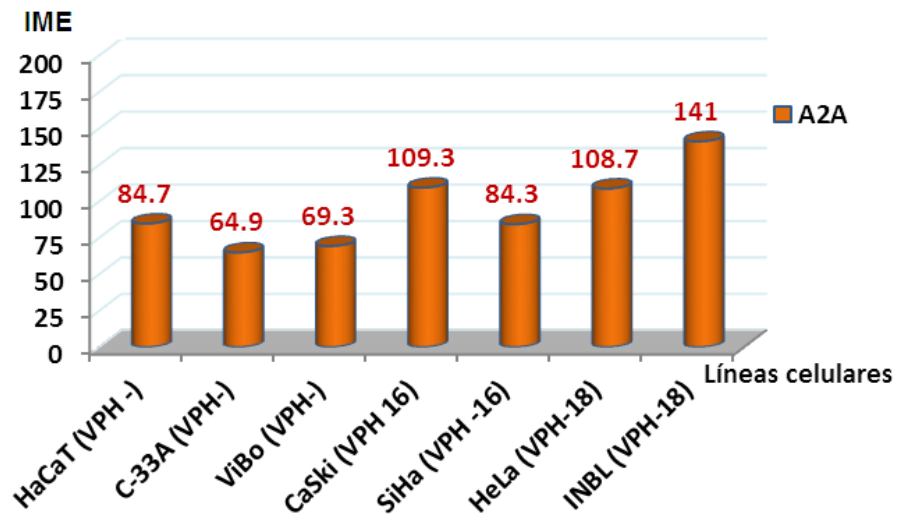


**Fig. 26** Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular INBL (VPH -18). **A)** Células sin tratamiento; **B)** Expresión de CD73; **C)** Expresión de A2AR. **PIE**, Porcentaje de intensidad. **IME**, Intensidad media de Expresión.



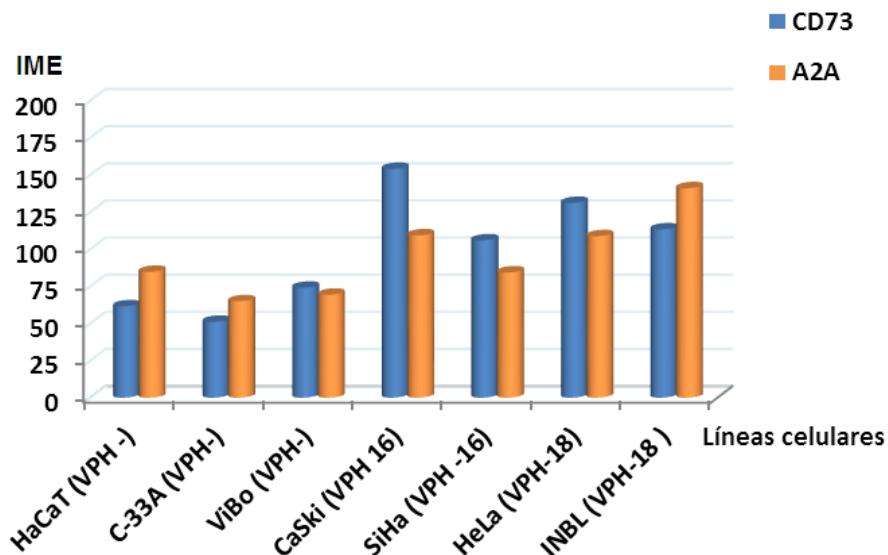
**Gráfica 6. Expresión de CD73.** Se muestra la IME de CD73 en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino negativas y positivas a la infección por VPH y de la línea de queratinocitos humanos HaCaT, las líneas positivas a la I-VPH muestran mayor IME en comparación con las VPH negativas.

## Expresión del receptor A2A

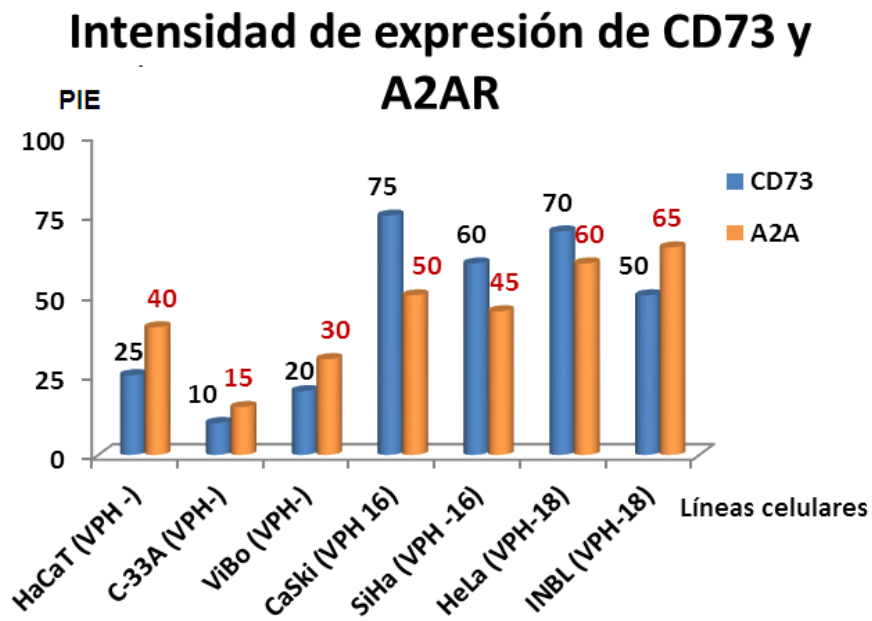


**Gráfica 7. Expresión del Receptor A2A.** Se muestra la IME de la expresión del receptor A2A en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino negativas y positivas a la infección por VPH y de la línea de queratinocitos humanos HaCaT, las líneas positivas a la I-VPH muestran mayor IME en comparación con las VPH negativas.

## Expresión de CD73 y A2AR



**Gráfica 8. Expresión diferencial entre CD73 y el receptor A2A.** Se muestra la IME en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino negativas y positivas a la infección por VPH y de la línea de queratinocitos humanos HaCaT.



**Gráfica 9. Porcentaje de Intensidad de expresión de CD73 y A2AR.** Se muestra el PIE de CD73 y el receptor A2A en las líneas celulares de CaCu negativas y positivas a la infección por VPH, y de la línea de queratinocitos humanos HaCaT.



## EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CaCu POR CITOMETRÍA DE FLUJO (Objetivo 3).

La adenosina participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos dentro y fuera de las células, su concentración en ambos compartimentos se debe al equilibrio existente en la actividad de varias enzimas que controlan su síntesis y degradación, así como a los transportadores de membrana que permiten el intercambio extra e intracelular para su función biológica (Cunha, 2001). La adenosina generada de manera extracelular depende inicialmente de la actividad enzimática de la ectoenzima CD39 al convertir ATP en AMP y posteriormente de la ecto-5-nucleotidasa CD73 que convierte AMP a adenosina (Lennon *et al.*, 1998; Eltzschig *et al.*, 2004; Deaglio *et al.*, 2007).

Tomando en consideración que la interacción de la adenosina con receptores específicos de alta afinidad como A2A induce inhibición de la proliferación en linfocitos T (Beavis *et al.*, 2012), en el presente estudio evaluamos el efecto de adenosina en la proliferación de las células tumorales de cáncer cérvico uterino al adicionar de manera extracelular varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM), o de la potencialmente generada por las mismas células tumorales al adicionar varias concentraciones de AMP (1mM a 1pM) como sustrato de CD73. De manera simultánea, también se evaluó el efecto de Cafeína, un antagonista competitivo, no selectivo, que se une a los 4 receptores de adenosina (Fredholm *et al.*, 2001).

Al cultivar las diferentes líneas celulares con Adenosina o AMP se observó que la mayor inhibición de la proliferación se obtuvo empleando la concentración de 1mM de estas moléculas: 35-45% con adenosina y de 30-35 con AM en las líneas celulares negativas a VPH; mientras que los valores de inhibición de la proliferación en las líneas celulares positivas a la infección por VPH fueron de 50-60% con adenosina y de 45-60% con AMP.

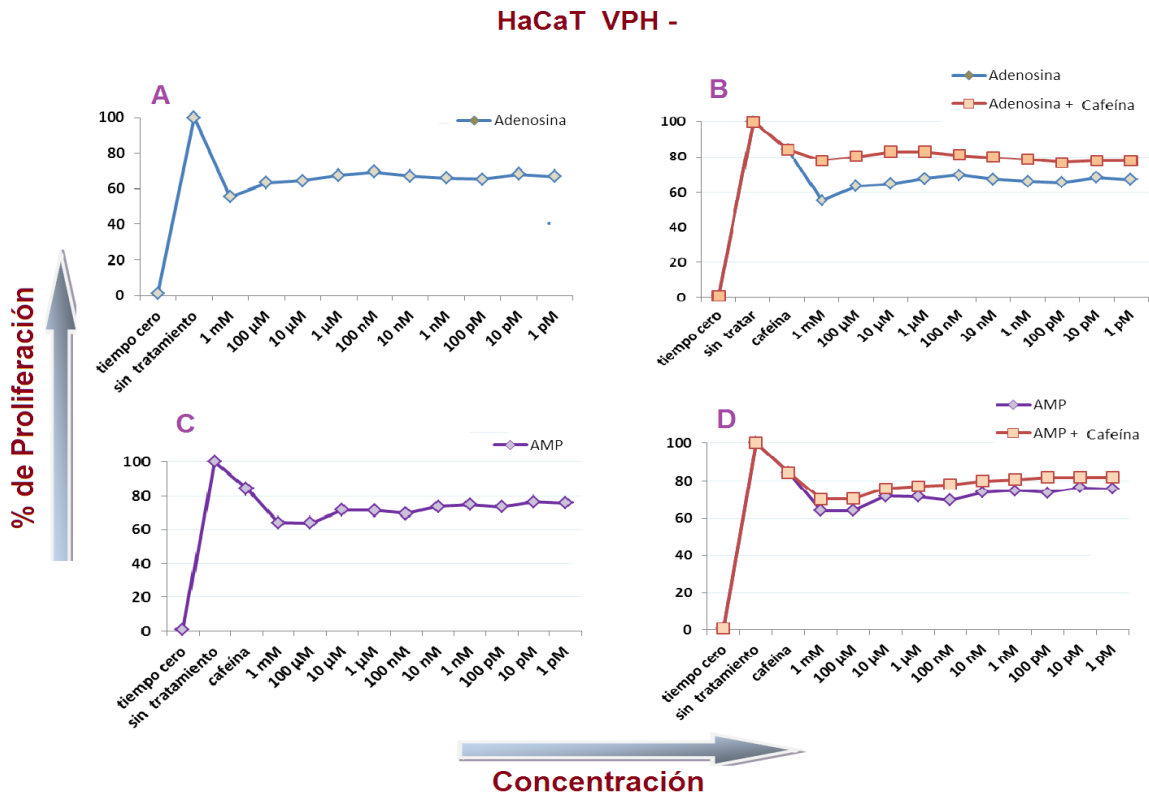
De manera interesante, es importante destacar que al utilizar concentraciones menores (100µM a 1pM) de estas moléculas, en todos los casos se encontró inhibición de la proliferación de las líneas celulares. Aunque en algunos casos al disminuir gradualmente la concentración de adenosina y AMP en las concentraciones de 100nM a 1pM se obtuvo una ligera disminución en la inhibición de la proliferación de las células, sin embargo en ninguno de los casos se logró restablecer la proliferación basal; células sin tratamiento (Gráficas **10-16**, Tablas **4-10**).

Otro aspecto importante fue que aún en concentraciones de 100µM a 1pM, el patrón de inhibición de la proliferación de las líneas celulares negativas a la I-VPH fue menor respecto a las líneas celulares positivas a la infección por VPH. De manera general, la inhibición de la proliferación en las líneas celulares negativas a VPH, usando este intervalo de concentraciones, fue de 22-34% con adenosina y de 11-23% con AMP; mientras que en las líneas celulares positivas a la IVPH fue de 40-55% con Adenosina y de 22-46% con AMP (Gráficas **10-18**, Tablas **4-10**). Por otro lado, se ha reportado que la cafeína es capaz de bloquear los receptores para adenosina de manera dosis dependiente y que a una concentración de 300 µM

bloquea los 4 receptores (Fredholm *et al.*, 1999; Fredholm *et al.*, 2001 and Franco, 2008). En consecuencia, se procedió a adicionar cafeína (300 $\mu$ M) a los cultivos celulares con adenosina o AMP (1mM-1pM). Al cultivar las diferentes líneas celulares en presencia de cafeína 300 $\mu$ M, se encontró una disminución en la proliferación entre 11-20%, a excepción de la línea celular CaSki en donde se observó un 27% de inhibición.

No obstante, se pudo observar que la adición simultánea de cafeína a los cultivos con adenosina o AMP, fue capaz de restablecer de manera parcial la inhibición de la proliferación inducida por estas moléculas, aún en las concentraciones más bajas (100nM-1pM) utilizadas de adenosina o AMP. Asimismo, la adición de cafeína en los cultivos celulares en presencia de adenosina o AMP, no modificó el patrón de inhibición de la proliferación de las líneas celulares, ya que las líneas celulares positivas a la infección por HPV mostraron mayor inhibición de la proliferación respecto a las líneas celulares negativas a la infección por VPH.

De manera general, la inhibición de la proliferación observada en las líneas celulares negativas a VPH fue de 11-23% con adenosina+cafeína y de 12-30% con AMP+cafeína; mientras que en las líneas celulares positivas a la infección por VPH fue de 22-46% con adenosina+cafeína y de 22-45% con AMP+cafeína (**Gráficas 10-18, Tablas 4-10**). Tomando en consideración que las líneas celulares positivas a la infección por VPH mostraron mayor expresión de CD73 y del receptor A2A en membrana y de manera intracelular (**Gráficas 1-9; Figuras 20-26**), lo anterior nos permite sugerir que la infección por VPH puede tener un papel importante en la inducción de la expresión de estas moléculas participantes en la vía adenosinérgica.

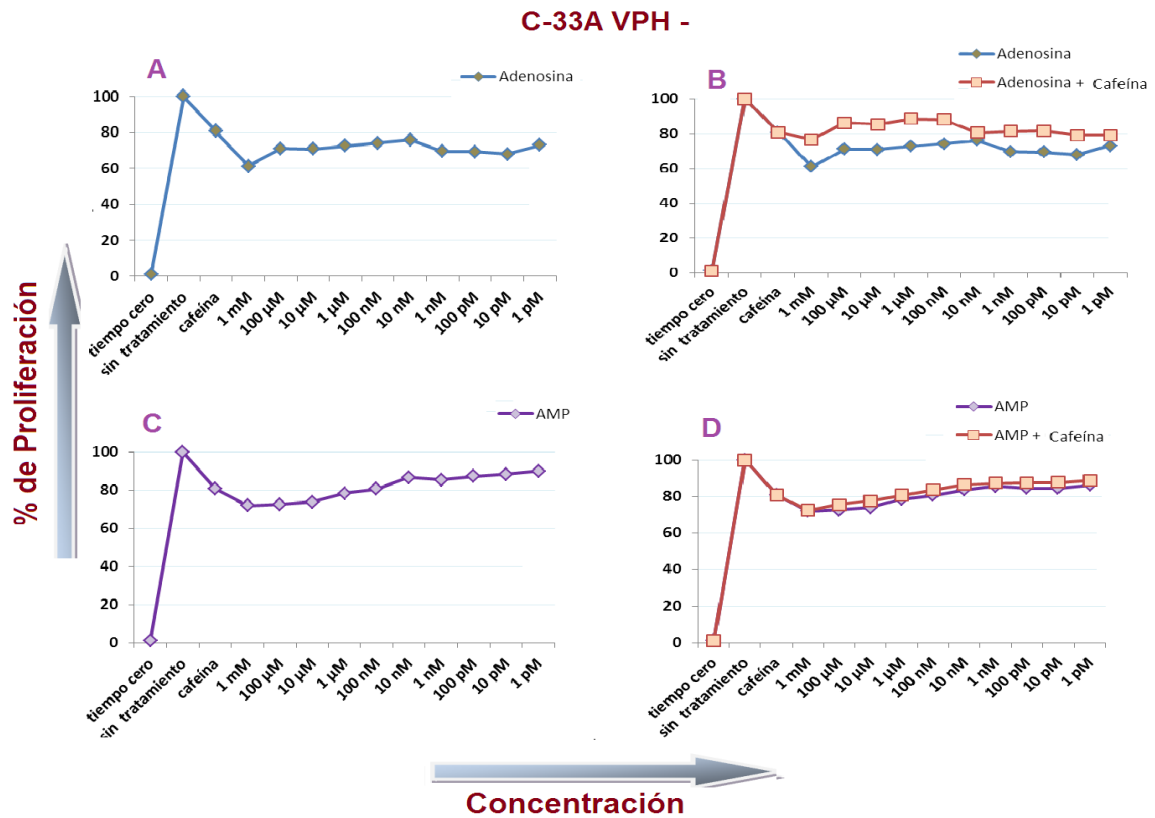


**Gráfica 10. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células HaCaT.** Las células HaCaT fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300μM) más adenosina (B) o de cafeína más AMP (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero.

**TRATAMIENTOS**

Condiciones	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	84.3	15.7	84.3	15.7	84.3	15.7	84.3	15.7
1 Mm	<b>55.44</b>	<b>44.56</b>	<b>68.1</b>	<b>31.9</b>	<b>63.03</b>	<b>36.7</b>	<b>70.1</b>	<b>29.9</b>
100 μM	63.36	36.64	80.25	19.75	63.93	36.07	70.25	29.75
10 μM	64.48	35.52	82.84	17.16	71.51	28.29	75.84	24.16
1 μM	67.55	32.45	<b>82.93</b>	<b>17.07</b>	71.36	28.64	76.93	23.07
100 nM	<b>69.44</b>	<b>30.56</b>	81	19	69.51	30.49	78	22
10 nM	67.14	32.86	79.89	20.11	73.65	26.35	79.89	20.11
1 nM	65.99	34.01	78.64	21.36	74.78	25.22	80.64	19.36
100 pM	65.27	34.73	76.85	23.15	73.53	26.47	81.85	18.15
10 pM	68.08	31.92	77.87	22.13	<b>76.51</b>	<b>23.49</b>	81.87	18.13
1 pM	66.87	33.13	77.89	22.11	75.66	24.34	<b>81.89</b>	<b>18.11</b>

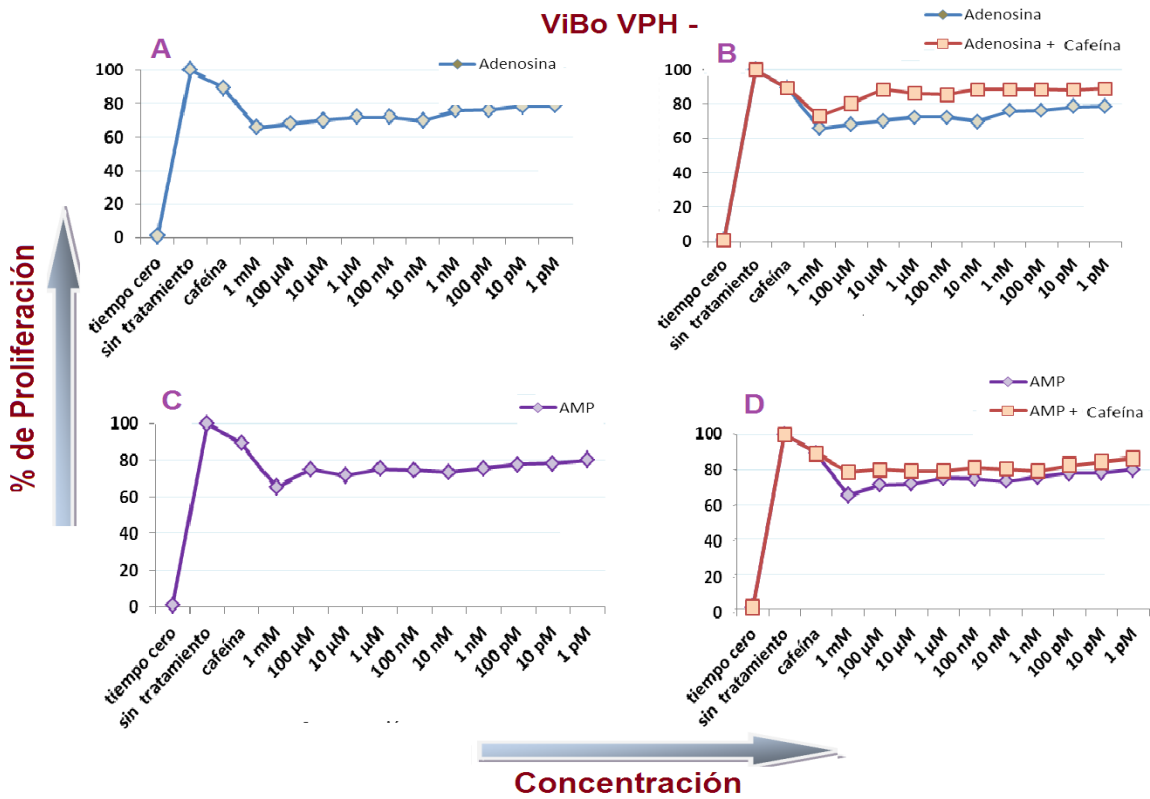
**Tabla 4. Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células HaCaT.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células HaCaT cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300μM). El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición.



**Gráfica 11. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células C-33A.** Las células C-33A fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300µM) más adenosina (B) o de cafeína más AMP (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero.

TRATAMIENTOS								
Condiciones	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	80.76	19.24	80.76	19.24	80.76	19.24	80.76	19.24
1 mM	<b>60.99</b>	<b>39.01</b>	<b>76.64</b>	<b>23.36</b>	<b>71.72</b>	<b>28.28</b>	<b>72.22</b>	<b>27.78</b>
100 µM	70.91	29.09	86.22	13.78	72.36	27.64	75.31	24.69
10 µM	70.83	29.17	85.32	14.68	73.73	26.27	77.54	22.46
1 µM	72.64	27.36	<b>88.53</b>	<b>11.47</b>	78.34	21.66	80.66	19.34
100 nM	74.09	25.91	88.03	11.97	80.66	19.34	83.59	16.41
10 nM	<b>76</b>	<b>24</b>	80.48	19.52	83.56	16.44	86.33	13.67
1 nM	69.5	30.5	81.43	18.57	85.32	14.68	87.25	12.75
100 pM	69.25	30.75	81.58	18.42	84.3	15.7	87.45	12.55
10 pM	67.94	35.06	79.14	20.86	<b>84.3</b>	15.7	87.74	12.26
1 pM	72.92	27.08	79.14	20.86	<b>85.89</b>	<b>14.11</b>	<b>88.75</b>	<b>11.25</b>

**Tabla 5. Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células C-33A.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células C-33A cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300µM). El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición.

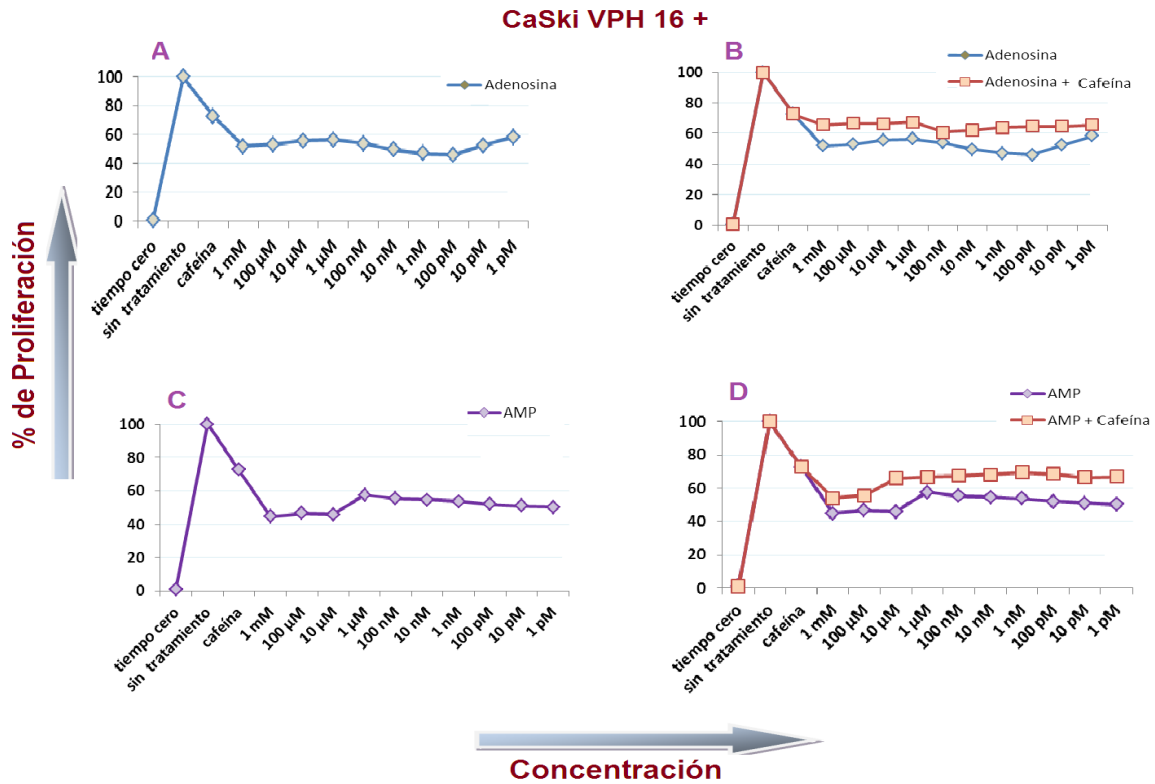


**Gráfica 12. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células ViBo.** Las células ViBo fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300µM) más adenosina (B) o de cafeína más AMP (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero

Condiciones	TRATAMIENTOS							
	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	89.12	10.88	89.12	10.88	89.12	10.88	89.12	10.88
1 mM	65.88	34.12	72.96	27.04	65.12	34.88	78.73	21.27
100 µM	68.13	31.87	80.21	19.79	74.91	25.09	79.91	20.09
10 µM	70.15	29.85	88.51	11.49	71.47	28.53	79.29	20.71
1 µM	72.15	27.85	86.3	13.7	75.1	24.9	79.26	20.74
100 nM	72.12	27.88	85.44	14.56	74.53	25.47	80.96	19.04
10 nM	69.65	30.35	88.47	11.53	73.33	26.67	80.3	19.7
1 nM	75.89	24.01	88.44	11.56	75.61	24.39	79.17	20.83
100 pM	76.33	23.67	88.54	11.46	77.71	22.29	82.45	17.55
10 pM	78.61	21.39	88.26	11.74	78.18	21.82	84.36	15.64
1 pM	78.8	21.2	88.91	11.09	79.99	20.01	86.56	13.44

**Tabla 6. Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células ViBo.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células ViBo cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300µM. El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición.



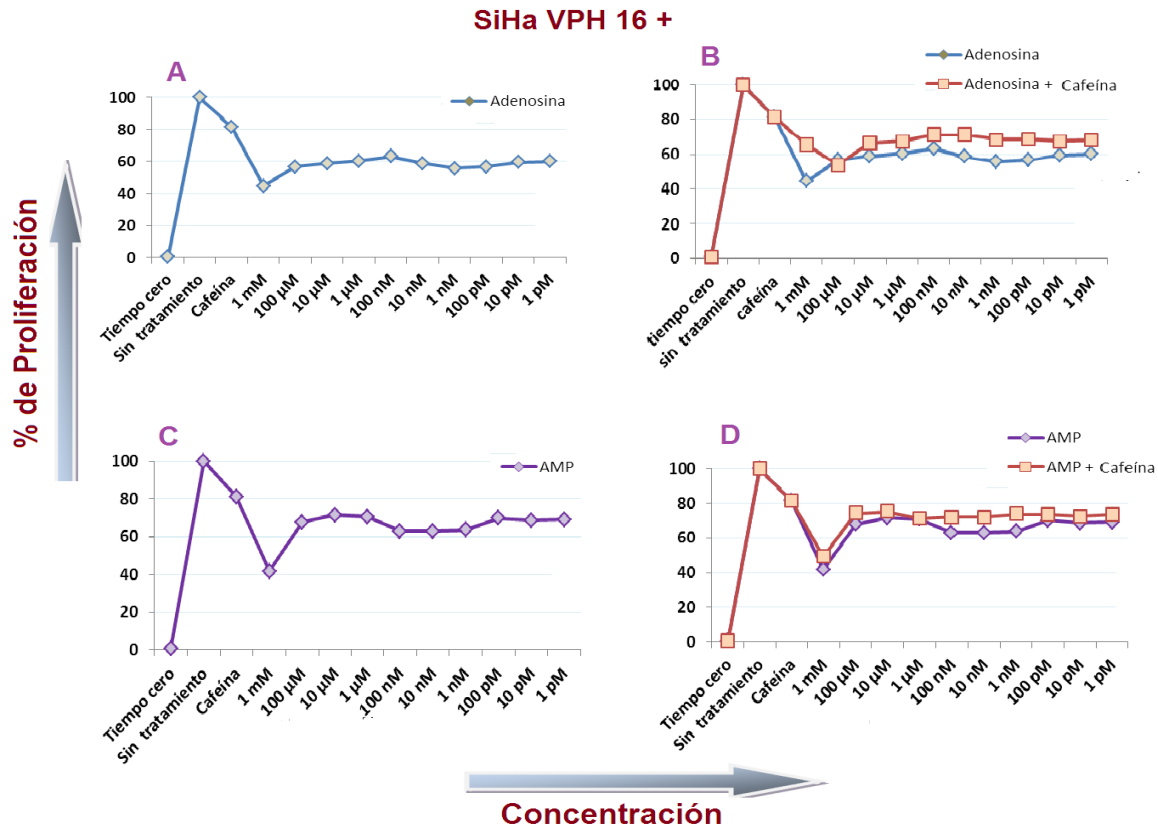


**Gráfica 13. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células CaSki.** Las células CaSki fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300µM) más adenosina (B) o de cafeína más AMP (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero.

TRATAMIENTOS

Condiciones	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	72.76	27.74	72.76	27.74	72.76	27.74	72.76	27.74
1 mM	51.84	48.16	65.53	34.47	44.78	55.22	54.15	45.85
100 µM	53.02	46.98	66.61	33.39	46.63	53.37	55.52	44.48
10 µM	55.82	44.48	66.41	33.59	45.98	54.02	66.12	33.88
1 µM	56.39	43.61	67.48	32.52	57.57	42.43	66.73	33.27
100 nM	53.96	46.04	60.69	39.31	55.33	44.67	67.54	32.36
10 nM	49.66	50.34	62.01	37.99	54.59	45.41	68.29	31.71
1 nM	47.09	52.91	63.93	36.07	53.73	46.27	69.56	30.44
100 pM	45.93	54.07	64.63	35.37	51.94	48.06	68.64	31.46
10 pM	52.37	47.63	64.53	35.47	50.91	49.09	66.55	33.45
1 pM	58.37	41.63	65.53	34.47	50.32	49.68	67.05	32.95

**Tabla 7. Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células CaSki.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células CaSki cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300µM). El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición.

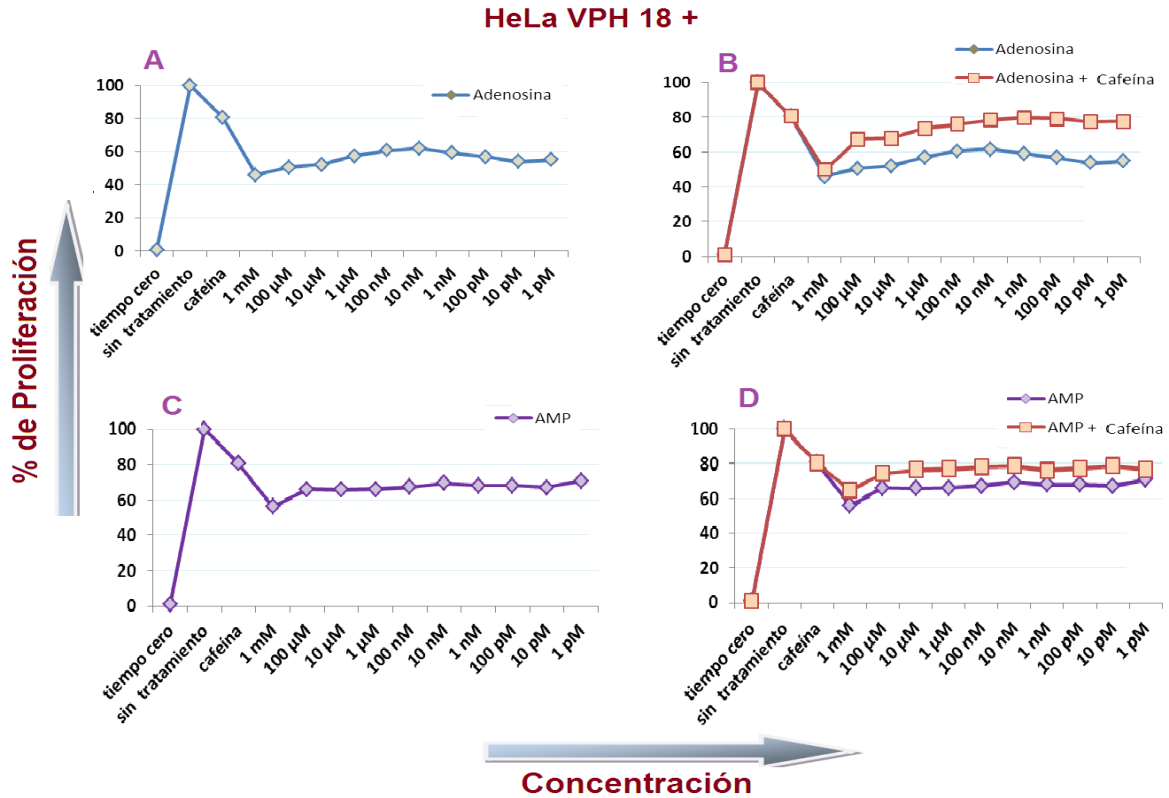


**Gráfica 14. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células SiHa.** Las células SiHa fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300µM) más adenosina (B) o de cafeína más AMP (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero.

TRATAMIENTOS

Condiciones	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	81.26	18.74	81.26	18.74	81.26	18.74	81.26	18.74
1 mM	44.64	55.36	65.5	34.5	41.69	58.31	49.3	50.7
100 µM	56.7	43.3	53.94	46.06	67.68	32.32	74.3	25.7
10 µM	58.81	41.19	66.49	33.51	71.53	28.47	75.2	24.8
1 µM	60.35	39.65	67.47	32.42	70.7	29.3	71.4	28.6
100 nM	63.27	36.73	71.12	28.88	63.01	36.99	72.1	27.9
10 nM	58.75	41.25	71.18	28.82	62.92	37.08	72.13	27.87
1 nM	55.59	44.41	68.43	31.57	63.74	36.26	73.87	26.13
100 pM	56.63	43.37	68.65	31.35	69.96	30.04	73.44	26.56
10 pM	59.51	40.49	67.44	32.56	68.58	31.42	72.62	27.38
1 pM	60.2	39.8	68.29	31.71	69.14	30.86	73.64	26.36

**Tabla 8. Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células SiHa.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células SiHa cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300µM). El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición

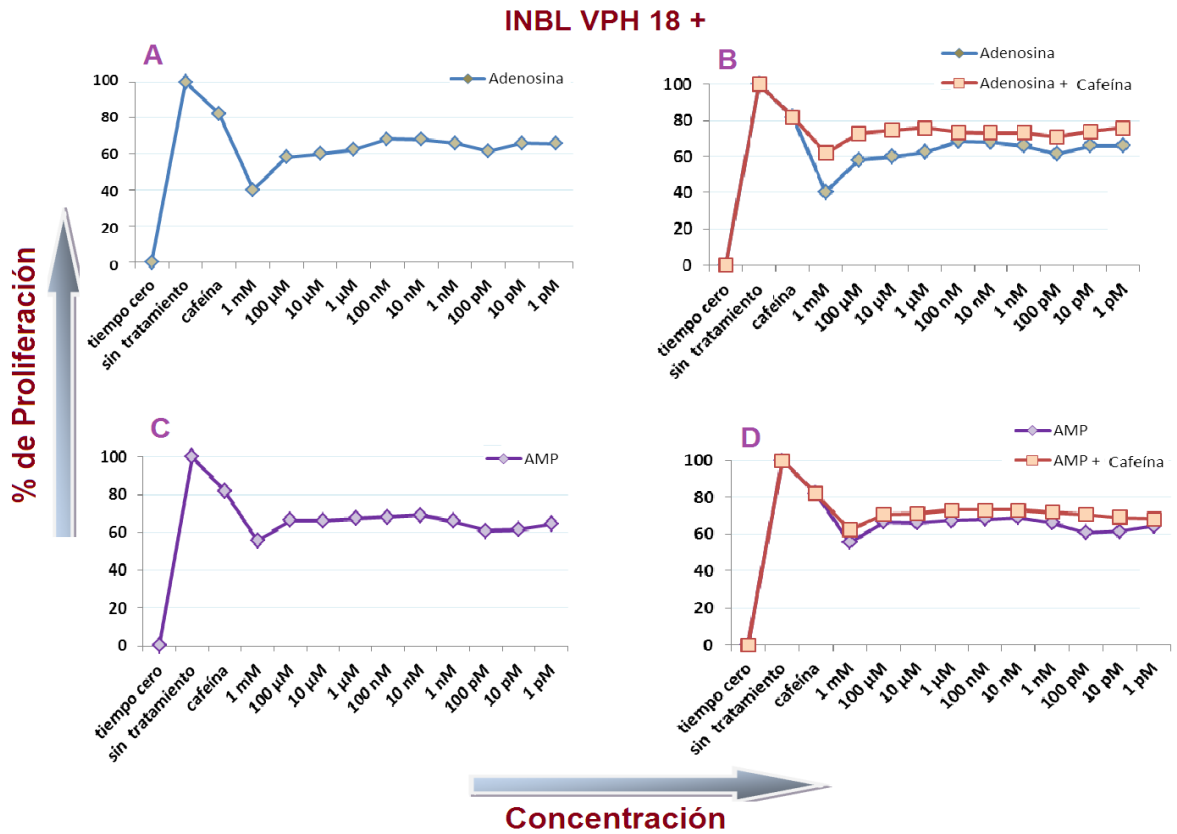


**Gráfica 15. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células HeLa.** Las células HeLa fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300µM) más adenosina (B) o de cafeína más AMP (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero.

TRATAMIENTOS

Condiciones	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	80.48	19.52	80.48	19.52	80.48	19.52	80.48	19.52
1 mM	45.78	54.22	49.76	50.24	56.14	43.86	64.67	35.33
100 µM	50.51	49.49	67.5	32.5	65.91	34.09	74.66	25.34
10 µM	52.08	47.92	68	32	65.71	34.29	76.46	23.54
1 µM	57.19	42.81	73.64	26.36	65.85	34.15	77.19	22.81
100 nM	60.76	39.24	75.94	24.06	67.23	32.77	78.36	21.64
10 nM	61.9	38.1	78.57	21.43	69.37	30.63	78.92	21.08
1 nM	59.19	40.81	79.83	20.17	67.97	32.03	76.22	23.78
100 pM	56.88	43.12	79.15	20.85	67.99	32.01	77.36	22.64
10 pM	53.86	46.14	77.41	22.59	67	33	78.73	21.27
1 pM	54.93	45.07	77.73	22.27	70.71	29.29	76.71	23.29

**Tabla 9. Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células HeLa.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células HeLa cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300µM). El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición.



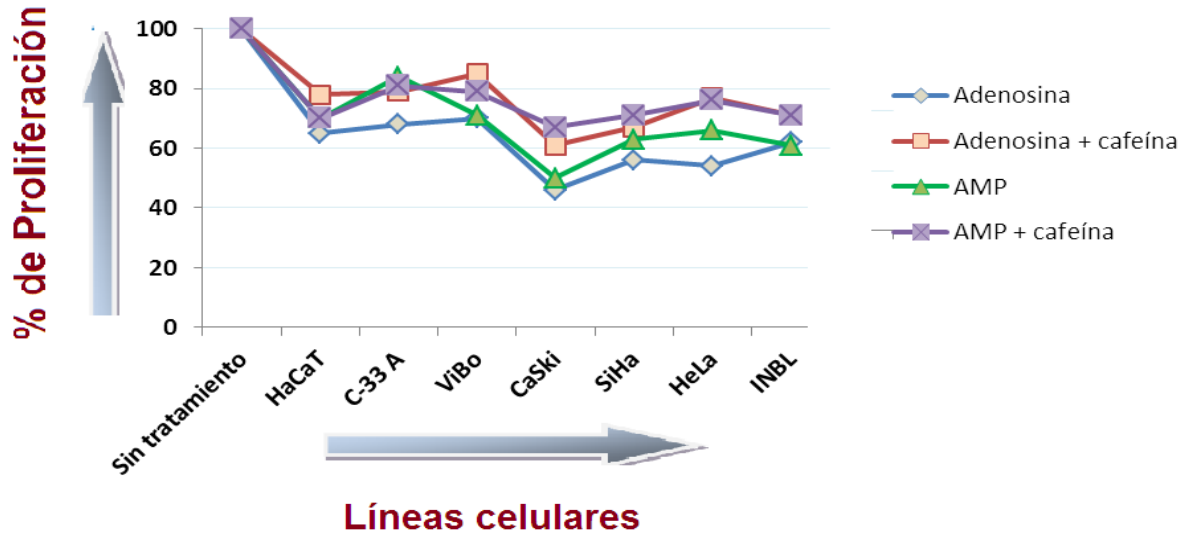
**Gráfica 16. Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células INBL.** Las células INBL fueron cultivadas con varias concentraciones de adenosina sintética (1mM a 1pM) (A) o de AMP (1mM a 1pM) (C), o en presencia de cafeína (300µM) más adenosina (B) o de cafeína más AM (D). Las células fueron marcadas con CFSE y después de tres días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de la proliferación celular como indicado en materiales y métodos. La proliferación de las células sin ningún tratamiento al final del cultivo fue considerada como 100%, mientras que la del inicio del cultivo se consideró como el tiempo cero.

TRATAMIENTOS

Condiciones	A) Adenosina		B) Adenosina + cafeína		C) AMP		D) AMP + cafeína	
	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición	% Proliferación	% Inhibición
Tiempo cero	—	—	—	—	—	—	—	—
Sin tratamiento	100	0	100	0	100	0	100	0
Cafeína	82	18	82	18	82	18	82	18
1 mM	<b>40.28</b>	<b>59.72</b>	<b>61.8</b>	<b>38.2</b>	<b>55.52</b>	<b>44.48</b>	<b>62.25</b>	<b>37.75</b>
100 µM	58.11	41.89	72.7	27.3	66.42	33.58	70.63	29.37
10 µM	59.96	40.04	74.58	25.42	66.01	33.99	70.97	29.03
1 µM	62.36	37.64	<b>75.96</b>	<b>24.04</b>	67.25	32.75	<b>73.03</b>	<b>26.97</b>
100 nM	<b>68.41</b>	<b>31.59</b>	73.37	26.63	68.05	31.95	73.02	26.98
10 nM	68.07	31.93	73.03	26.97	<b>69</b>	<b>31</b>	72.98	27.02
1 nM	65.94	34.06	73.13	26.87	65.9	34.1	71.88	28.12
100 pM	61.5	38.5	70.8	29.2	60.72	39.28	70.7	29.3
10 pM	65.93	34.07	73.9	26.1	61.42	38.58	68.98	31.02
1 pM	65.84	34.16	<b>75.96</b>	<b>24.04</b>	64.35	35.65	68.29	31.71

**Tabla 10. Efecto de adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células INBL.** Se muestran los porcentajes de proliferación e inhibición de las células INBL cultivadas durante 72 horas en presencia de Adenosina o AMP, o de manera simultánea con Cafeína (300µM). El mayor porcentaje de proliferación se muestra en azul y el menor en rojo considerándose lo contrario para el porcentaje de inhibición.

## Proliferación celular



Gráfica 17. Porcentaje de proliferación de las Líneas celulares a los diferentes tratamientos de adenosina, adenosina mas cafeína, AMP y AMP mas cafeína. El menor porcentaje de proliferación fue expresado por las células CaSki en todos los tratamientos, mientras que las células con mayor porcentaje de proliferación fueron ViBo con Adenosina y Adenosina mas cafeína y C-33A con AMP y AMP mas cafeína.

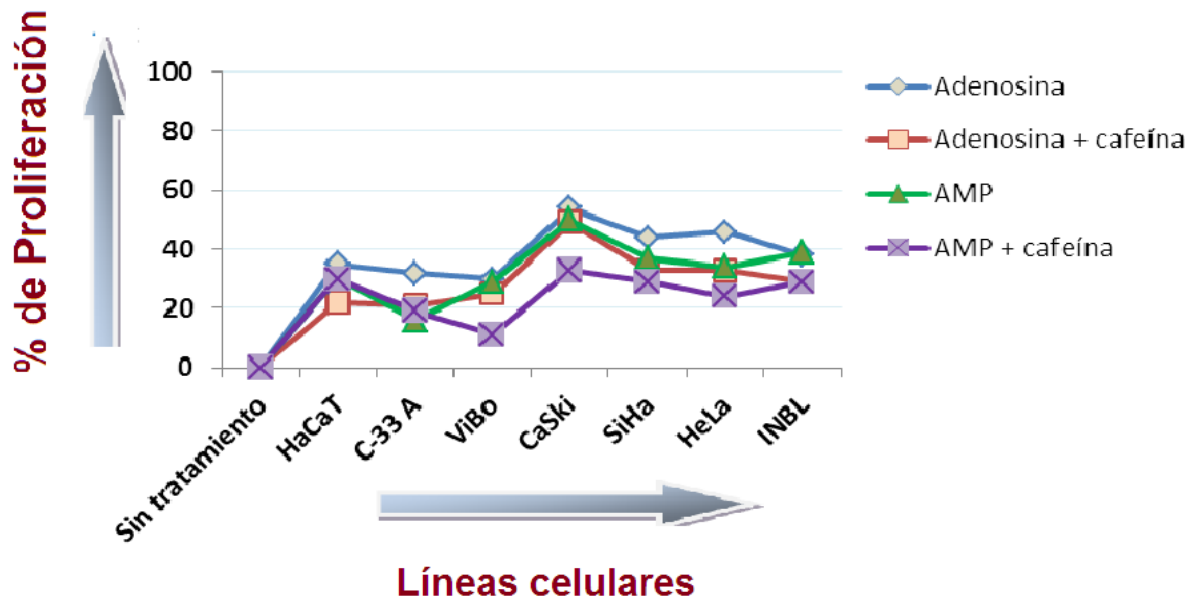
### PROLIFERACIÓN CELULAR

Línea celular	A) adenosina	B) adenosina + cafeína	C) AMP	D) AMP + cafeína
	Porcentaje de proliferación	porcentaje de proliferación	porcentaje de proliferación	porcentaje de proliferación
HaCaT	65	77	70	70
C-33 A	68	79	84	81
ViBo	70	85	71	79
CaSki	46	61	50	67
SiHa	56	67	63	71
HeLa	54	77	66	76
INBL	61	71	61	71

Tabla 11. Porcentajes de proliferación de las líneas celulares de CaCu y HaCaT a diferentes concentraciones de adenosina, adenosina con Cafeína, AMP y AMP con cafeína. En color rojo se muestran los menores porcentajes de proliferación y en azul los mayores para cada una de las líneas celulares.



### Inhibición de la proliferación celular



Gráfica 18. Porcentaje de inhibición sobre la proliferación de las líneas celulares a los diferentes tratamientos de Adenosina, Adenosina mas cafeína, AMP y AMP mas cafeína. El menor porcentaje de inhibición fue expresado por las células ViBo con Adenosina, Adenosina mas cafeína y AMP mas cafeína, así como C-33 A con AMP, El mayor porcentaje fue expresado por las células CaSki en todos los tratamientos.

#### INHIBICIÓN SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Línea celular	1) Adenosina	2) Adenosina + cafeína	3) AMP	4) AMP + cafeína
	Mayor porcentaje de proliferación	Mayor porcentaje de proliferación	Mayor porcentaje de proliferación	Mayor porcentaje de proliferación
HaCaT	35	22	30	30
C-33 A	32	21	16	19
ViBo	30	25	29	11
CaSki	54	49	50	33
SiHa	44	33	37	29
HeLa	46	33	34	24
INBL	38	29	39	29

Tabla 12. Porcentajes de Inhibición sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu a diferentes concentraciones de Adenosina, Adenosina con Cafeína, AMP y AMP con cafeína. En color rojo se muestra el mayor porcentaje de inhibición y en azul el mayor para cada una de las líneas celulares.

## ● DISCUSIÓN.

Diversos factores inmersos en el microambiente tumoral proveen de elementos necesarios para la sobrevivencia y proliferación de las células tumorales, además de darles las condiciones para favorecer la evasión de la respuesta inmune adaptativa del huésped (Rincon *et al.*, 2007). Entre estos factores destacan: citocinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- $\beta$ ), quimiocinas, factores pro angiogénicos y moléculas que inhiben la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos (Teraben *et al.*, 2000; Akasaki *et al.*, 2004; Rabinovich *et al.*, 2007; Feng and Chen, 2009). Recientemente se ha demostrado que la adenosina acumulada en los tejidos tumorales, ejerce un efecto inmunosupresor además de la promoción del crecimiento y metástasis tumoral (Haskó *et al.*, 2008). Esta molécula es generada por la presencia de las ectoenzimas CD39 (ENTPD1 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1), EC 3.6.1.5) que hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP a sus respectivos nucleósidos (Robson *et al.*, 2005); y la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5) que degrada el fosfato de adenosina (AMP) a adenosina (Hoskin *et al.*, 2008).

La molécula CD73 se encuentra expresada en prácticamente la mayoría de los tejidos (Colgan *et al.*, 2006) en donde ejerce el control de una gran variedad de respuestas fisiológicas, incluyendo la adhesión de linfocitos T al endotelio, el transporte de líquidos, pre-acondicionamiento isquémico, anti-inflamatorio en la lesión de los tejidos, la función plaquetaria, hipoxia, y fuga vascular entre otros (Linden, 2001). Estudios recientes sugieren que la función de CD73 en tumores está implicada en la resistencia a las drogas, la promoción, control, crecimiento y progresión tumoral, metástasis y alteración de la respuesta inmune anti-tumoral (Airas *et al.*, 1995; Stagg *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Por tanto, el análisis de la expresión de CD73 y su regulación en la proliferación de las células tumorales resulta relevante para el establecimiento de nuevas estrategias de terapia antitumoral.

En el presente estudio se analizó la expresión de la ecto enzima CD73 y el efecto de adenosina sobre la proliferación de 6 líneas celulares derivadas de tumores de cáncer cérvico uterino: C33A y ViBo (VPH-); CaSki y SiHa (VPH-16+); e INBL y Hela (VPH-18+); así como de la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (VPH-). De acuerdo a los resultados obtenidos en este modelo experimental *in vitro*, se encontró que: a) las líneas celulares positivas a la infección por VPH (VPH-18+ y VPH-16+) mostraron una mayor expresión de CD73 en membrana que aquellas negativas a la I-VPH; b) las líneas celulares positivas a la infección por VPH mostraron una mayor expresión del receptor A2A de alta afinidad para adenosina; c) la adenosina inhibió parcialmente la proliferación de todas las líneas celulares en un amplio intervalo de concentraciones y el efecto inhibitorio fue mayor en aquellas positivas a la infección por VPH; d) finalmente el bloqueo de los receptores para adenosina (con cafeína) en las células tumorales disminuyó

parcialmente la actividad inhibitoria de la proliferación ejercido por la adenosina aún a bajas concentraciones.

La expresión y actividad funcional de CD73 ha sido evaluada en diferentes tipos tumorales incluyendo: cáncer de mama (Spychala *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008), de esófago (Fukuda *et al.*, 2004), de próstata (Hastie *et al.*, 2005), de ovario (Cho *et al.*, 2006), de tiroides (Kondo *et al.*, 2006), de vejiga (Stella *et al.*, 2009), melanoma (Sadej *et al.*, 2006), leucemia (Mikhailov *et al.*, 2008) y glioma (Bavaresco *et al.*, 2008) y los resultados han sido diversos. Por ejemplo en un análisis específico de Western blot y Northern blot en 9 líneas celulares de cáncer de mama humano se reveló una alta expresión de CD73 en los niveles de ARN mensajero (ARNm) y proteínas en cinco de seis líneas celulares negativas al receptor de estrógeno (ER-), mientras que en tres líneas positivas al receptor de estrógeno (ER+) mostraron una expresión muy baja o no detectable de la molécula (Spychala *et al.*, 2004).

Más recientemente, se demostró mediante citometría de flujo la presencia de CD73 en la superficie de una gran variedad de células tumorales. Mikhailov y colaboradores (2008) revelaron una alta expresión de CD73 (3672 de intensidad media de fluorescencia (IMF) en células leucémicas multi resistentes a drogas. En otro reporte, las células de cáncer de mama de ratón 4T1.2 y E0771, en contraste con una variante no metastásica de 4T1.2 (67NR), expresaron altos niveles de CD73 (Stagg *et al.*, 2010). Otro estudio adicional ha mostrado que CD73 está regulada en los tejidos cancerosos y se expresa ampliamente en muchas líneas celulares de una gran variedad de tumores (Jin *et al.*, 2010). En el caso particular de cáncer cérvico-uterino, aún no hay reportes en la literatura sobre la expresión y actividad funcional de CD73. Sin embargo en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se logró detectar la expresión de esta ectoenzima en la membrana celular de varias líneas celulares de CaCu, así como su actividad biológica para convertir AMP a adenosina (Ávila-Ibarra LR 2011).

En el presente estudio además de corroborar la expresión de CD73 en la membrana celular, también se logró detectar la expresión de esta ectoenzima en citoplasma y núcleo. De manera interesante, las líneas celulares positivas a la infección por VPH mostraron una mayor expresión de ese marcador, respecto a las líneas celulares negativas a VPH (**Gráficas 1-9; Tabla 3; Figuras 20-26**), sugiriendo que I-VPH en las células tumorales pueda tener un papel importante en la inducción de CD73. De hecho la inducción de moléculas con función inmunosupresora, tal como IL-10 y TGF $\beta$  entre otras, ha sido asociada con alteraciones en la estabilidad genómica de las células infectadas por VPH de alto riesgo (Zur Hausen, 2009). Asimismo, el incremento en la expresión de CD73 también han sido reportado en células epiteliales infectadas por virus como el Virus Sincitial Respiratorio (Haeberle *et al.*, 2008) o por citomegalovirus humano (Kas *et al.*, 2001).

La expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales implica una mayor producción de adenosina extracelular (Zhang, 2010), lo cual ha sido relacionada directamente con la inhibición de la proliferación y activación de linfocitos T (Blay *et al.*, 1997; Kobie *et al.*, 2006; Hoskin *et al.*, 2008) y en la protección de los tejidos cancerosos ante el reconocimiento y ataque de las células T citotóxicas (Stagg, 2010; Hoskin, 2002). Por otro lado, la expresión de receptores para adenosina en las células tumorales, además de estar asociado con su potencial metastásico (Haskó *et al.*, 2008), también se relaciona con la reutilización de purinas para la síntesis de ácidos nucleicos y por tanto para la división celular (Spychala, 2000).

En nuestro estudio encontramos que las líneas VPH positivas mostraron mayor expresión de receptores A2A en membrana, citoplasma y núcleo respecto a las líneas celulares negativas a VPH (**Figuras 20-26, Gráficas 7-9**). Dado que las líneas celulares de CaCu analizadas muestran en membrana, en mayor o menor medida la expresión tanto de CD73 como de receptores de alta afinidad para adenosina, se procedió a analizar el efecto de adenosina y el de AMP (sustrato de CD73) en la proliferación de estas células tumorales. En primera instancia se procedió a analizar el efecto de adenosina sobre la proliferación de las diferentes líneas celulares.

Los resultados obtenidos mostraron que la adenosina tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación de todas las líneas celulares de CaCu en un amplio intervalo de concentraciones (1mM a 1pM), esta inhibición en la proliferación se mantuvo de manera sostenida incluso en concentraciones menores a las encontradas de manera fisiológica en líquido intersticial (30-300nM), o la encontrada de manera extracelular (25-250 nM) (Palmer and Stiles, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001). Es interesante mencionar que las líneas celulares positivas a VPH, las cuales mostraron mayor expresión de receptores A2A, fueron quienes mostraron los mayores porcentajes de inhibición de la proliferación celular en presencia de las diferentes concentraciones de adenosina utilizadas (**Gráficas 10-17, Tablas 4-12**).

De igual manera, al evaluar el efecto de la adición de AMP sobre la proliferación de las células tumorales, se encontró que las líneas celulares positivas a VPH mostraron una mayor inhibición en la proliferación celular en el intervalo de concentraciones utilizadas de AMP (1mM-1pM) (**Gráficas 10-17, Tablas 4-12**), sin embargo el efecto inhibitorio de la proliferación celular en presencia de AMP fue menor al observado en presencia de adenosina pura, lo cual puede deberse a que en la conversión de AMP a adenosina también se genera Inosina, un compuesto desaminado de la adenosina, el cual es catalizado por la enzima adenosina desaminasa (ADA). Aunque la conversión de adenosina a inosina ocurre de manera constitutiva en bajos niveles en el espacio extracelular, metabólicamente en condiciones de estrés, tales como los que ocurren durante la lesión, la isquemia y la inflamación, se incrementan enormemente sus concentraciones extracelulares.

Es evidente que la adenosina, al interactuar con sus receptores, sea una importante molécula que participa en la regulación de muchos los procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Ralevic *et al.*, 1998). A diferencia de la adenosina, pocos papeles fisiológicos han sido atribuidos a inosina, que se consideraba anteriormente como un producto de la degradación de la adenosina inactiva y que carecía de acciones fisiológicas. Sólo recientemente se reconoció que la inosina también puede unirse a los receptores de adenosina e iniciar los eventos de señalización intracelular (Jin *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2003).

Además, la inosina puede afectar la función celular a través de vías independientes del receptor. Se ha reportado que Inosina no tiene efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos T, por ejemplo se ha reportado que linfocitos T reguladores, quienes al expresar las ecto enzimas CD39/CD73 y generar altas concentraciones de adenosina extracelular, convierten adenosina a inosina para favorecer su sobrevivencia al evitar la activación del proceso de apoptosis inducido por adenosina (Beavis *et al.*, 2012).

El mecanismo por el cual se evita la apoptosis a través de inosina aún no ha sido completamente dilucidado, sin embargo en un estudio reciente se demostró que los receptores A2A para adenosina pueden tener efectos inmunomoduladores ante la presencia de Inosina, ya que la aplicación sistemática de Inosina en un modelo de ratón, mostró un efecto protector ante la inhibición de la proliferación y apoptosis de linfocitos T mediado por adenosina (Gomez and Sitkovsky, 2003). Por otro lado, también se ha demostrado que la Inosina desencadena la fosforilación de la proteína quinasa B (también conocida como Akt) que es una proteína esencial para la proliferación y apoptosis (muerte celular programada) de las células tanto normales como cancerosas a través de un mecanismo mediado por el receptor A3 para adenosina (Gao *et al.*, 2001).

Asimismo, en ensayos con ratones knock out se ha demostrado que el efecto protector de la Inosina ante la respuesta inflamatoria sistémica requiere de su interacción con los receptores A2A y A3 (Gómez *et al.*, 2003), demostrado que la activación de los receptores A2A por la propia adenosina promueve la supervivencia de las células del tumor al inducirlas a un estado de senescencia (Etique *et al.*, 2009). En el caso particular de las líneas celulares de CaCu, nuestro grupo de investigación ha detectado mediante cromatografía de capa fina la presencia de un componente con peso similar a Inosina al analizar los productos obtenidos luego de adicionar AMP a las células tumorales en cultivo, lo que sugiere que las líneas celulares de CaCu tienen este mecanismo regulador de adenosina-inosina, lo cual les ayudaría a evitar ser dañadas ante la presencia de adenosina extracelular. Además sería interesante corroborar la presencia de ADA en la membrana de las células tumorales de CaCu.



Cabe mencionar que aunque en el presente trabajo no se analizó la expresión del receptor A3 para adenosina, tenemos evidencias de que este receptor tiene una expresión prácticamente nula en las líneas celulares negativas a VPH (C-33, ViBo y HaCaT) y una expresión importante en las líneas positivas a VPH (INBL, CaSki y SiHa), por tanto, será interesante analizar si en estas células tumorales la interacción de adenosina y de inosina con alguno de los receptores para adenosina inhibe el proceso de apoptosis y las lleva a un estado de senescencia.

Por otra parte, en nuestro modelo experimental evaluamos el efecto de cafeína, un antagonista de los receptores adenosinérgicos. Nuestros resultados mostraron un incremento parcial en la proliferación celular de las células tratadas simultáneamente con adenosina o AMP. Este efecto puede estar relacionado con el hecho de que la cafeína se acopla a los 4 receptores de adenosina bloqueando la unión para adenosina y evitando así el efecto de esta molécula para inhibir la proliferación celular. En nuestro estudio empleamos una concentración de 300µM, la cual se ha reportado que bloquea a los 4 receptores de adenosina (Nomura *et al.*, 2005), aunque también se observó que tuvo un efecto parcialmente inhibitorio en la proliferación de las líneas celulares estudiadas, sería conveniente evaluar si a concentraciones menores se pudiera favorecer un mayor rescate en la proliferación celular de las células tratadas con adenosina o AMP, ya que se tiene reportado que a una concentración de 30µM es suficiente para bloquear los receptores A2A de alta afinidad para adenosina (Franco, 2008).

Por otro lado, la identificación específica de los receptores de adenosina como "frenos naturales" en la inflamación proporciona un marco útil para la comprensión de cómo los tejidos regulan el proceso inflamatorio y cómo la orientación endógena anti-inflamatoria de esta vía podría modular la inflamación (Sitkovsky *et al.*, 2008; Haskó *et al.*, 2002). No obstante, hasta el momento los receptores para adenosina presentes en las células cancerosas no han sido considerados una "diana" para el desarrollo de fármacos anticancerosos.

Tomando en consideración que en nuestro modelo experimental encontramos inhibición en la proliferación de las células tumorales al adicionar adenosina o AMP en un amplio intervalo de concentraciones, este fenómeno podría representar un mecanismo protector o de adaptación de las células tumorales ante las condiciones de daño o estrés fisiológico proporcionado por la propia adenosina contenida en el medio de cultivo, tal como ocurre de manera natural en la hipoxia que se presenta en los tejidos tumorales. En este estado, la disminución en la proliferación celular o su entrada a senescencia le permite a la célula tumoral el poder sobrevivir. En consecuencia, el bloqueo de receptores de adenosina que conducen a la vía de inhibición de la apoptosis podría ser conveniente para que las células tumorales puedan ser sensibilizadas y por tanto ser blanco de terapia antitumoral.

● **CONCLUSIONES.**

- Se encontró expresión diferencial de CD73 en las líneas celulares de CaCu; Las líneas celulares positivas a la infección por VPH -16 + y VPH -18 + mostraron una mayor expresión de esta molécula en membrana, citoplasma, y núcleo, en relación a las líneas VPH negativas.
- Se encontró expresión diferencial del receptor A2A en las líneas celulares de CaCu; Las líneas celulares positivas a la I- VPH -16 + y VPH -18 + mostraron una mayor expresión de este receptor en membrana, citoplasma, y núcleo, en relación a las líneas VPH negativas.
- La adición de adenosina y AMP en un amplio intervalo de concentraciones indujo inhibición en la proliferación de las líneas celulares de CaCu. La mayor inhibición se observó en las líneas celulares VPH -16 + y VPH -18 +.
- El tratamiento con Cafeína, un antagonista no específico de los receptores de adenosina, disminuyó la inhibición de la proliferación celular inducida por Adenosina y AMP en las líneas celulares de CaCu.

● **PERSPECTIVAS:**

En nuestro modelo experimental encontramos inhibición en la proliferación de las células tumorales al adicionar adenosina o AMP en un amplio intervalo de concentraciones, sugiriendo un posible mecanismo protector o de adaptación de las células tumorales ante condiciones de daño o estrés fisiológico proporcionado por la propia adenosina extracelular. En consecuencia:

- Sería interesante determinar si las células tumorales entran en un estado de senescencia, por lo que sería necesario analizar el ciclo celular bajo esas condiciones de cultivo.
- Evaluar el efecto de Adenosina y AMP a largo plazo.
- Determinar la expresión de otras moléculas implicadas en la regulación de adenosina como son: la adenosina deaminasa (ADA) e Inosina en las células tumorales de CaCu.
- A un intervalo amplio de concentraciones de Adenosina y AMP se observó inhibición de la proliferación celular, por lo que sería interesante determinar si se activan mecanismos de inhibición de apoptosis en estas células.
- En nuestro estudio encontramos que la adición de cafeína, restableció parcialmente la proliferación en las células tumorales tratadas con adenosina y AMP simultáneamente, por lo que sería importante indagar si la cafeína promueve la proliferación de las células tumorales en estado de senescencia.

● *Ivonne Jackeline Titla Vilchis*  
*México, 2012*

## BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas KA and Lichtman A. (2009) "Basic Immunology; Functions and Disorders of the Immune System". 3rd ed, Saunders Elsevier. 3-27.
- Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, Franklin WA, Bridges JP, Schaack JB, Colgan SP and White CW, (2009) "Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 alpha in pulmonary endothelial cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 10684–10689.
- Airas L, Salmi M, Jalkanen S. (1993) "Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kDa molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium". *Immunol* 151: 4228–4238.
- Akasaki Y, Liu G, Chung N, Ehtesham M, Black K and Yu J. (2004) "Induction of a CD4+T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma". *Immunol* 173: 4352–4359.
- American Cancer Society, (2009) "Cancer Facts & Figures for Hispanics/Latinos 2009-2011". American Cancer Society, Inc.1002: 320-333.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE and Young JD. (2004) "The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29". *Pflugers Arch* 447: 735-743.
- Baseman JG and Koutsky LA. (2005) "The epidemiology of human Papillomavirus infections". *Virology* 32: S16-S24.
- Basheer R, Strecker R, Thakkar M and McCarley R. (2004) "Adenosine and sleep, wake regulation". *Neurobiology* 3: 379.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Cañedo DA and Battastini AM. (2008) "The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation". *Biochem*. 319: 61–68.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, and Smyth MJ. (2012) "CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses". *Immunology* 33: 231-237.
- Beldi G, Wu Y, Banz Y, Nowak M, Miller L, Enjoji K, Haschemi A, Yegutkin GG, Candinas D, Exley M, and Robson SC. (2008) "Natural killer T cell dysfunction in CD39-null mice protects against concanavalin A-induced hepatitis". *Hepatology* 48: 841-852.
- Billich A. (2003) "HPV vaccine MedImmune/GlaxoSmithKline". *Invest Drugs* 4: 210-213.
- Blay J, White TD and Hoskin DW. (1997) "The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine". *Cancer* 57: 2602–2605.
- Boison D. (2008) "Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases" *Pharmacol* 8: 2-7.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz NC, Meijer JLM and Shah KV. (2002) "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer". *Clin Pathol* 55: 244- 265.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S and Bruni L. (2008) "Epidemiology and natural history of human papillomavirus infection and type-specific implications in cervical neoplasia". *Vaccine* 26S: k1-k16.

- Bosch FX, Castellsagué X and de Sanjosé, S. (2008) "HVP and cervical cancer: screening or vaccination ". *Cancer* 98: 15-21.
- Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F and Stern PL. (2000) "Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer". *Tissue Antigens* 55: 401–411.
- Burchell AN, Winer RL, De Sanjosé S and Franco E. (2006) "Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection". *Vaccine* 3: 52-61.
- Carretero R, Romero JM, Cabello FR, Maleno I, Rodriguez F and Camacho FM. (2008) "Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy". *Immunogenetics* 60: 439-447.
- Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM and Gutkind JS. (2005) "Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis". *Science* 310: 1504-1510.
- Castellsagué X and Munoz N. (2003) "Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis, Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking". *Cancer* 3:20-28.
- Castellsagué X, Díaz M, Vaccarella S, Sanjosé DS, Muñoz N, Herero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJF, Chris JL, Meijer F and Bosch X. (2011) "Intrauterine device use, cervical infection with human papillomavirus, and risk of cervical cancer: a pooled analysis of 26 epidemiological studies". *Oncology* 12: 1023-1031.
- Chen S and Fukuda M. (2006) "Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis". *Methods Enzymol* 416: 71-80.
- Cho KR and Shih MI. (2009) "Ovarian cancer". *Pathol* 4: 287–313.
- Clark AN, Youkey R, Liu X, Jia L, Blatt R, Day YJ, Gail W, Sullivan GW, Joel Linden J and Amy L. Tucker AL. (2007) "A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes". *Circ Res* 101: 1130–1138.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PTH, Ferreccio C, Hieu NT, Mato E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, MDI, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJLM and Franceschi S. (2005) "Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis". *Lancet* 366: 991-998.
- Colgan SP, Eltzhig HK, Eckle T and Thompson LF. (2006) "Physiological roles for ecto-50-nucleotidase (CD73)". *Purinergic Signal* 2:351–360.
- Coussens LM and Werb Z. (2002) "Inflammation and cancer". *Nature* 420: 860-867.
- Cunha RA, Almeida T and Ribeiro JA. (2001) "Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats". *Neurochem* 76: 372-382.



- Dachuan J, Jie F, Wang L, Thompson FL, Liu A, Benjamin JD, Shin T, Curiel TJ and Zhang B. (2010) "CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression". *Cancer* 70: 6407-6411.
- Daly JW and Fredholm BB. (2004) "Mechanisms of action of caffeine on the nervous system". *Nutrition, Brain, and Behavior* 2: 1-11.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB and Robson SC. (2007) "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediate immune suppression". *Exp Med* 204: 1257–1265.
- Decking UKM, Schlieper G, Kroll K and Schrader J. (1997) "Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release". *Circ. Res* 81: 154–164.
- Delves PJ and Roitt IM. (2000) "The immune system". *Med* 343: 37-49.
- De Jong A, O'Neill T, Khan AY, Kwappenberg KM, Chisholm SE, Whittle NR, Dobson JA, Jack LC, St Clair Roberts JA, Offringa RH, Van der Burg SH and Hickling JK. (2002) "Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 E2 E6 E7 fusion protein". *Vaccine* 20: 3456-3464.
- De Villiers EM, Fauquet C and Broker TR. (2004) "Classification of papillomaviruses". *Virology* 324: 17–27.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F and Flies DB. (2002) "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion". *Med* 8: 793-800.
- Doorbar J. (2006) "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer". *Clin. Sci* 110: 525–541.
- D' Souza G, Kreimer A, Viscidi, MD, Pawlita M, Fakhry C, Wayne M. Koch MD, William H. Westra WH, and Gillison, ML. (2007) "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer" *Medicine* 356:1944–1956
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD. (2002) "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape". *Immunol* 3: 991-998.
- Dunwiddie TV and Masino SA. (2001) "The role and regulation of adenosine in the central nervous system". *Neurosci* 24: 31-55.
- Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, Eltzschig HK. (2007) "Identification of Ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury". *Immunol* 178: 8127–8137.
- El-Tayeb A, Iqbal J, Behrenswerth A, Romio M, Schneider M, Zimmermann H, Schrader J, and Muller CE. (2009) "Nucleoside-5'- monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase". *Med Chem* 52: 7669-7677.
- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA and Enjyoji K. (2003) "Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors". *Exp Med* 198: 783–796.

- Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC and Colgan SP. (2004) "Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism". *Blood* 104: 3986–3992.
- Eltzschig HK, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton KE, Daniels D, Schonfeld C, Loffler M, Reyes G, Duszenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman KA, Coe IR and Colgan SP. (2005) "HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia". *Med* 202: 1493–1505.
- Eltzschig, HK. (2009) "Adenosine: An old drug newly discovered". *Anesthesiology* 111: 904–915.
- Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J and Flament S. (2009) "Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER alpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells". *Oncol* 21: 977–981.
- Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, Rowe M, Jones M, Gileadi U, Cerundolo V and Man S. (2001) "Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6." *Immunol* 167: 5420–5428.
- FDA. (2010) "Licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2) for use in female and updated HPV vaccination recommendation from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)". *MMWR* 59: 626-629.
- Feng B and Chen L. (2009) "Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells", *CANCER Biother Radiopharm* 24: 717-721.
- Feoktistov I, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D and Biaggioni I. (2004) "Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype". *Hypertension* 44: 649–654.
- Fisone G, Borgkvist A and Usiello A. (2004) "Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action". *Life Sci.* 61: 857-872.
- Foster GE, Brugniaux JV, Pialoux V, Duggan CT and Hanly PJ. (2009) "Cardiovascular and cerebrovascular responses to acute hypoxia following exposure to intermittent hypoxia in healthy humans. *Physiol.* 587: 149-159.
- Franco EL, Viela LL and Sobrino JB. (1999) "Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer". *Infect Dis* 180:1415-1423.
- Franco R. (2008) "Café y cancer". *Med Clin* 131: 633-635.
- Fredholm BB, Battig K, Holmén J, Nehlig A and Zvartau EE. (1999) "Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its idespread use". *Pharmacol* 51: 83-133.
- Fredholm BB, Ap IJ, Jacobson KA, Klotz KN and Linden J (2001) "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors". *Pharmacol* 53: 527–552.
- Fredholm BB, Chern Y, Franco R and Sitkovsky M. (2007) "Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling". *Prog Neurobiol* 83: 263–276.

- Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, Nakase Y, Hagiwara A, Mitsufuji S, Okazaki Y, Hayashizaki Y and Yamagishi (2004) "Differential gene expression profiles of radio resistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation". *Cancer* 91:1543–1550.
- Gallos G, Ruyle TD, Emala CW and Lee HT. (2005) "A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased mortality, renal dysfunction, and hepatic injury in murine septic peritonitis". *Renal Physiol* 289: F369–F376.
- Gao Z, Sheng B, Yuan L, Day Ji and Linden J. (2001) "A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis". *Mol. Pharmacol* 59: 76–82.
- Garcia C, Castellsague R, Bosch X and Gonzalez CA. (2005) "The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence". *Cancer* 117: 629-637.
- García RR, Ramírez AP and Acosta VN. (2009) "Alteration of Regulation of Fas/FasL Mediated Apoptosis in Gastric Cancer". *Salud* 7: 103-117.
- Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, Chen M, Albino AP and Bander NH. (1996) "Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression". *Cancer* 55:96-101.
- Gomez G and Sitkovsky MV. (2003) "Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo". *Blood* 102: 4472–4478.
- Grenz A, Osswald H, Eckle T, Yang D, Zhang H, Tran ZV, Klingel K, Ravid K, and Eltzschig HK:. (2006). "The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia", *Med* 5: e137-e143.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C and Amigorena S. (2002) "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells". *Immunol* 20: 621-666.
- Haeberle HA, Dürrstein C, Rosenberger P, Hosakote YM, Kuhlicke J, Kempf VAJ, Garofalo RP, Eltzschig HK. (2008) "Oxygen-Independent Stabilization of Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 during RSV Infection". *Anesthesia* 3: e335- e346.
- Hart ML, Jacobi B, Schittenhelm J, Henn M, and Eltzschig HK: (2009) "A2B Adenosine receptor signaling provides potent protection during intestinal ischemia/reperfusion injury. *Immunol* 182: 3965–3968.
- Haskó G, Linden J, Cronstein B and Pacher P. (2008) "Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases". *Drug Discov* 7: 759-770.
- Hastie C, Saxton M, Akpan A, Cramer R, Masters RJ and Naaby SH. (2005) "Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells". *Oncogene* 24: 5905–5913.
- Hernández HD, Apresa GT, Alvarado CI, García CA, Guido JM, González SJ, Cruz TF and Martínez EO. (2002) "Virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en mujeres de dos hospitales de la Ciudad de México". *Invest Clin* 54: 299-306.

- Herrero R, Castle P, Schiffman M, Bratti M, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman M, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC and Burk RD. (2005) "Epidemiology profile of typespecific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica" *Infectious Diseases* 191: 1796-1807.
- Hockel M and Vaupel P. (2001) "Tumour hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects". *Cancer* 93: 266–276.
- Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS and Ramaekers FC. (2005) "HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV". *Cancer* 20: 115-123.
- Hoskin DW, Butler JJ, Drapeau D, Haeryfar SM and Blay J. (2002) "Adenosine acts through an A3 receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells". *Cancer* 99: 386-395.
- Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM and Blay J. (2008) "Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells" *Oncol* 25: 267–276.
- Hunter MI, Monk BJ and Tewari KS. (2008) "Cervical neoplasia in pregnancy. Part 1: screening and management of preinvasive disease". *Obstet Gynecol* 199: 3-9.
- INEGI (2008) "Mujeres y hombres en México" 12: 98-102.
- Janeway CA. (2010) "Immunobiology: The immune system in health and disease". Garland Publishing 71-76.
- Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M and Krishna S. (2009) "Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis". *Med Res* 13: 286-295.
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson L, Liu A, Daniel B, Shin T, Curiel T, and Zhang B. (2010) "CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression". *American Association for Cancer Research* 6: 2245–2255.
- Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E and Paavonen J. (2007) "Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials." *Lancet* 369: 1693-1702.
- Kas-Delena AM, Bakkerb WW, Olinga P, Visserd J, Maarc EF, Van Sonc WJ, Thea TH, and Harmsena MC. (2001) "Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73) on endothelial cells" *Medical Biology* 491: 21–25.
- Kirchhof P, Fabritz L, Matherne P, Lankford A, Baba H Wilhelm Schmitz W, Breithardt1 G, Neumann J and Boknik P. (2003) "Altered sinus nodol and atrioventricular and freely moving mice overexpressing the A1 adonosine receptor". *Physiol Heart* 285: 145-153.
- Knipe D, Lamb R, Howley P, Griffin D and Martin M. (2006) "Papillomaviruses, Section II: Specific Virus Families". *Virology*: 3091.



- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ and Mosmann TR. (2006) "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppr D4 T cells by converting 50-adenosinemonophosphate to adenosine". *Immunol* 177: 6780–6786.
- Kolachala V, Asamoah V, Wang L, Obertone TS, Ziegler TR and Merlin D. (2005) "TNF-alpha upregulates adenosine 2b (A2b) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A2bR overexpression in colitis". *Cell Mol* 62, 2647–2657.
- Kondo T, Nakazawa T, Murata S and Katoh R. (2006) "Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas". *Histopathology* 48: 612–614.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM and Jansen KU (2002) "A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine". *Med* 347: 1645-1651.
- Kumar P. (2000) "Tumor Hypoxia and Anemia: Impact on the Efficacy of Radiation Therapy". *Hematol* 3: 4-8.
- Kumar S, Shah JP, Bryant CS, Imudia AN, Morris TR and Malone JM. (2009) "A comparison of youngsters older women with vulvar cancer in the United States". *Obstet Gynecol* 200: e52-e55.
- Laconi E and Sonnenschein C. (2008) "Cancer development at tissue level". *Cancer Biol* 18: 303-304.
- Lappas CM, Rieger JM, and Linden J. (2005) "A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells". *Immunol* 174: 1073-1080.
- Lartigau E. (2007) "Angiogenesis and radiotherapy (vessels, anemia, oxygen and radiosensitivity)" *Bull Cancer* 94: S197-S202.
- Lebon G, Warne T, Edwards P, Bennett K, Langmead C, Leslie A and Tate C. (2011) "Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation". *Nature* 474: 521–525.
- Linden J. (2001) "Molecular approach to adenosine receptors: receptor mediated mechanisms of tissue protection". *Pharmacol Toxicol* 41: 775–787.
- Longworth M and Laimins A. (2004) "Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia *Microbiol*". *Mol Biol* 68: 362–372.
- López MA, Chávez MCI and Granados AJ. (2005) "Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad". *Invest Clin* 57 : 132-141.
- Lowy DR and Schiller JT. (2006) "Prophylactic human papillolavirus vaccines". *Clinical Invest.* 116: 1167-1173.
- Lupiani Castellanos L and Fraga HM. (2008) "Vacunas del Papiloma Humano: Se amplía el calendario vacunal ". *Canar Ped* 22: 1-32.
- Malmberg KJ. (2004) "Effective immunotherapy against cancer. Aquestion of overcoming immune suppression and immune escape". *Cancer Immunol* 53: 879-892.
- Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H and Unger ER. (2007) "Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)" *MMWR* 56: 1-23.



- Medeiros LR, Dornelles D, da Rosa MI, Bozzetti MC and Ruviaro R, (2009) "Efficacy of Human Papillomavirus Vaccines: A Systematic Quantitative Review". *Gynecol Cancer* 19: 1166-1176.
- Mikhailov A, Sokolovskaya A, Gennady G, Amdahl Y, Anne H, West A, Yagita H, Lahesmaa R, Linda F. Thompson N, Jalkanen S, Blokhin D, and Eriksso JE (2008) "CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis". *Immunol* 181: 464-475.
- Mills JH, Thompson LF, Mueller C, Waickman AT, Jalkanen S and Niemela J. (2008) "CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis". *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9325-9330.
- Minguet S, Hube M, Rosenkranz L, Schamel WL, Reth M, and Brummer T. (2005) "Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors". *Immunol* 35: 31-41.
- Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz E, Wang Y and Liu S. (2005) "RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis". *Cancer Biol* 4: 1355-1360.
- Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H, Enjoji K and Takashima A. (2002) "CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase.". *Med* 8: 336-358.
- Moodley M. (2005) "Update on pathophysiologic mechanisms of human papillomavirus". *Obstet Gynecol* 17: 61-64.
- Morote GJC, Rosenberger P, Kuhlicke J and Eltzhig HK. (2008) "HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak". *Blood* 111: 5571-5580.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S and Villa L. (2006) "Updating the natural history of HPV and anogenital cancer". *Vaccine* 24S3: S3/42-S3/51.
- Moscow JA and Cowan KH. (2007) "Biology of cancer". In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier: chap 187.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF and Meijer CJLM. (2003) "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer" *Med* 348: 518-527.
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Diaz M, Sanjose S, Hammouda D, Shah KV and Meijer CJLM. (2004) "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective". *Cancer* 111: 278-285.
- Muñoz N, Castellsagué X, Barrington de González A and Gissmann L. (2006) "HPV in the etiology of human cancer". *Vaccine* 24: S1-S10.
- Muñoz IL, Santana RZ, Fulda GS, Pérez BR, Urdiales OA, Fernández NG, Martínez A, Ahumada S, García SF, Camacho CA, Mayorga GE, Garza SG, Osornio SV, Cantellano OM, Morales MG and Pacheco GC. (2012) "Detección del virus de papiloma humano mediante reacción en cadena de la polimerasa en pacientes con cáncer de pene: Experiencia en la división de urología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" *Urol* 72: 8-12.

- Nizar S, Copier J, Meyer B, Bodman SM, Galustian C, Kumar D and Dalglish A. (2009) "T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy". *Cancer*. 100: 1697–1703.
- Nomura M, Ichimatsu D, Moritani S, Koyama I, Dong Z, Yokogawa K, Miyamoto K. (2005) "Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine". *Mol. Carcinog* 44: 67-76.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, and Shanahan F. (1996) "The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand". *Exp Med* 184: 1075-1082.
- Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MKK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S and Sitkovsky M. (2006) "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13132-13137.
- Pagliusi SR and Aguado MT. (2004) "Vaccine" 23: 569–578.
- Palmer TM and Stiles GL. (2000) "Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A (3) adenosine receptor". *Mol Pharmacol* 5: 539–545.
- Parkin M and Brays F. (2006) "The burden of HPV-related cancers". *Vaccine* 24: S11–S25.
- Parra AL, Cruz LL, Ferrer GJ, Martínez MW Rojas PL and Fernández VY. (2011) "Factores de riesgo en la infección vaginal". *Correo Científico Médico de Holguín* 21:90-93.
- Patel S and Chiplunkar S. (2009) "Host immune responses to cervical cancer". *Obstet Gynecol* 21 54-59.
- Perez G, Lazcano-Ponce E, Hernandez-Avila M, García PJ, Muñoz N, Villa LL, Bryan J, Taddeo FJ, Lu S, Esser MT, Vuocolo S, Sattler C, Barr E. (2008) "Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like-particle vaccine in Latin American women". *Cancer* 122: 1311-1318.
- Pinto LA, Edwards J, Castle PE, Harro CD, Lowy DR, Schiller JT, Wallace D, Kopp W, Adelsberger JW, Baseler MW, Berzofsky JA and Hildesheim A. (2005) "Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles". *Infect* 188: 327-338.
- Rabinovich A, Gabrilovich D and Sotomayor EM. (2007) "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells". *Immunol* 25: 267–296.
- Ralevic V and Burnstock G. (1998) "Receptors for purines and pyrimidines". *Pharmacol* 50: 413–492.
- Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE and Castle PE. (2009) "Etiologic Heterogeneity for Cervical Carcinoma by Histopathologic Type, using comparative age period-cohort models". *Cancer Epidemiol Biomarkers* 18: 792-799.
- Resta R, Yamashita Y and Thompson LF. (1998) "Ecto-enzyme and signaling" functions of lymphocyte CD73. *Immunol* 161: 95–109.

- Rincon OL, Pareja EL, Jaramillo S and Aristizabal FL. (2007) "Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja" *Obstet Ginecol* 58: 202-212.
- Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R and Larraín A. (2006) "Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical". *Obstet Ginecol* 71:135-140.
- Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S and Parmia G. (2002) "Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction". *Immunol* 188: 97-113.
- Robson SC, Sévigny J and Zimmermann H. (2006) "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance" *Purinergic signaling* 2: 409-430.
- Roitt IM Delves P, Martin SJ and Burton DR. (2008) "Inmunología Fundamentos". 11ª ed. Editorial Médica Panamericana: 13- 26.
- Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V, Masekowsky E, Mager A and Morote-Garcia JC. (2009) "Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-dampens inflammation caused by hypoxia". *Immunol* 10: 195–202.
- Rudolf MP, Man S, Melief CJM, Sette A and Kast M. (2001) "Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7". *Cancer* 7: 7885-7955.
- Ryzhov S, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I and Feoktistov I. (2004) "Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A2B-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma". *Immunol* 172: 7726–7773.
- Ryzhov S, Novitskiy SV, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Carbone DP and Biaggioni I. (2008) "Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth". *Neoplasia* 10: 987–995.
- Sadej R, Sychala J and Skladanowski A. (2006) "Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells.Nucleosides" *Nucleotides Nucleic Acids* 25: 1119–1123.
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C and y Lacopetta B. (2009) "Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer". *Oncol* 27: 186-192.
- Salit RB, Kast WM and Velders MP. (2002) "Ins and outs of clinical trials with peptide-based vaccines". *Frontiers in Bioscience* 7: e204-e213.
- Santin DA, Bellone S, Roman JJ, Burnett A, Cannon JM and Pecorelli S. (2005) "Therapeutic Vaccines for Cervical Cancer: Dendritic Cell-Based Immunotherapy". *Pharmaceutical Design* 11: 3485-3500.
- Sato E, Olson SH, Ahn J, Olson HS, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritte G, Lele S, Chen TY, Ohtan H, Old LJ, and Odunsi K. (2005) ". Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer ". *Acad Sci*: 02: 18538-18543.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC and Wacholder S. (2007) "Human papillomavirus and cervical cancer". *Lancet* 370: 890–907.

- Sheets EE, Urban RG, Crum CP, Hedeley ML, Politch JA, Gold MA, Muderspach LI, Cole GA and Crowley-Nowick PA. (2003) "Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA". *Obstet Gynecol* 188: 916-926.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D and Ohta A. (2008) "Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia". *Clin Cancer* 14: 5947-5952.
- Snel J, Tiegues Z and Lorist MM. (2004) Effects of caffeine on sleep and wakefulness: an update. En: Nehlig A, editor. *Coffee, Tea, Chocolate and the Brain*. Boca Raton: CRC Press: 13-33.
- Soop A, Cullberg SJ, Albert J, Hållström L, Treutiger CJ and Sollevi A. (2009) "Adenosine infusion attenuates soluble RAGE in endotoxin-induced inflammation in human volunteers" *Physiology* 197: 45-53.
- Sosa LSG, Walker D and Serván E. (2009) "Práctica de mastografías y pruebas de Papanicolaou entre mujeres de áreas rurales de México". *Salud Pública Mex* 2: S236-S245.
- Szychala J. (2000) "Tumour-promoting function of adenosine". *Pharmacol Therapy* 87: 161-173.
- Szychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue L, Jin A and Mitchell B. (2004). "Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer". *Clin Cancer* 10:708-717.
- Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer KM and Smith MJ. (2010) "CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis" *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 1547-1552.
- Stanley M. (2010) "Pathology and epidemiology of HPV infection in females". *Gynecologic Oncology* 117: S5-S10.
- Starcevic LS, Elferink C and Novak FR. (2001) "Progressive Resistance to Apoptosis in a Cell Lineage Model of Human Proliferative Breast Disease". *Cancer* 93: 776-782.
- Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Fernandes P, Wink M, Azambuja A, Barrios C, Bueno F and Oliveira A. (2009) "Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines". *Urol Oncol* 1016: 021-035.
- Stern PL. (2005) "Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination". *Clinical Virology* 32S: S72-S81.
- Stites A, Terr A and Parslow T. (2000) "Inmunología básica y clínica" 9a ed. Ed. El manual moderno: 200-250.
- St Hilaire C, Koupenova M, Carroll SH, Smith BD and Ravid K. (2008) "TNF-alpha upregulates the A2B adenosine receptor gene: the role of NAD (P) H oxidase 4". *Biochem Biophys* 375: 292-296.
- Strohmeier GR, Lencer WI, Patapoff TW, Thompson LF, Carlson SL, Moe SJ, Carnes DK, Mrsny RJ, and Madara JL (1997) "Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia". *Invest* 99: 2588-2601.



- Tabi Z and Man S. (2006) "Challenges for cancer vaccine development" *Drug Deliv* 58: 902-915.
- Takedachi M, Colgan SP, and Thompson LP. (2007) "The Role of CD73 in the Generation of Extracellular Adenosine for Adenosine Signaling. In *Adenosine receptors-Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Disease*". CRC Press 4RN: 39-48.
- Teraben M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H and Watson C. (2000) "NK T cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway". *Immunol* 1: 515–520.
- Tirado GL, Mohar BA, López CM, García CA, Franco MF and Borges G. (2005) "Factores de riesgo de cáncer cérvico-uterino invasor en mujeres mexicanas". *Salud Pública Mex* 47: 342-350.
- Tomasi TB, Magner WJ and Khan AN. (2006) "Epigenetic regulation of immune escape genes in cancer." *Cancer Immunol* 10: 1159–1184.
- Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC and Colgan SP. (2004) "Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia". *Med* 200: 1395–1405.
- Thun MJ. (2007) "Epidemiology of cancer". In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23a. ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. Chap 185.
- Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K and Bonehill A. (2007). "Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy". *Cancer Immunol* 56: 1513-1537.
- Unertl K and Eltzschig HK. (2009) "Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-dampens inflammation caused by hypoxia" *Immunol* 10: 195–202.
- Vaupel P, Kelleher DK and Höckel M. (2001) "Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy". *Oncol* 28: 29-35.
- Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, Van der Zee AG and Daemen T. (2007) "Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia". *Immunol* 150: 199–209.
- Von Knebel and Doeberitz M. (2000) "New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections". *Cancer* 38: 22.
- Wang HY and Wang RF. (2007) "Regulatory T cells and cancer" *Immunol* 19: 217-223.
- Wang L, Zhou X and Zhou T. (2008) "Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells". *Clin Oncol* 134: 365–372.
- Weiner HL. (2001) "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells". *Immunol* 182: 207-214.
- Whiteside TL. (2002) "Tumor-induced death of immune cells: Its mechanisms and consequences". *Cancer Biol* 12: 43-50.



- Williamson AL, Passmore JA and Rybicki EP. (2005) "Strategies for the prevention of cervical cancer by human papillomavirus vaccination". *Clinical Gynecol* 4: 531 – 544.
- Witz IP and Nissenbaum LO (2006) "The tumor microenvironment in the post-PAGET era". *Cancer Lett* 242:1-10.
- Wu D and Meydani SN, (2008) "Age-associated changes in immune and inflammatory responses. Impact of vitamin E intervention". *Leukoc Biol* 84: 900-914.
- Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD and Ravid K: (2006) "The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion". *Clin Invest* 116: 1913–1923.
- Yamashita Y, Hooker SW, Jiang H, Laurent AB, Resta R, Khare K, Coe A, Kincade PW and Thompson LF. (1998) "CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes". *Immunol* 28: 2981–2990.
- Yap SC. And Thomas LH. (2012) "Adenosine and protection from acute kidney injury" *Nephrology & Hypertension* 21: 24-32.
- Yu T, Junger WG, Yuan C, Jin A, Zhao Y, Zheng X, Zeng Y, and Liu J. (2009) "Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation". *Cell Physiol* 298: 457-464.
- Zhang LF, Zhou J, Chen S, Cai LL, Bao QY, Zheng FY, Lu JQ, Padmanabha J, Hengdst K, Malcolm K and Frazer IH. (2000). "HPV6b virus like particles is potent immunogens without adjuvant in man". *Vaccine*18: 1051-1058.
- Zhang B. (2010) "CD73: A novel target for cancer immunotherapy" *Cancer* 70: 6407–6411.
- Zou W. (2005) "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance". *Cancer* 5: 263–274.
- Zou W. (2006) "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy". *Immunol* 6: 295-307.
- Zur Hausen H. (2009) "Papillomaviruses in the causation of human cancers, a brief historical account". *Virology* 384: 260–265.

## ● BIBLIOTECA DIGITAL

- <http://www.inegi.gob.mx>. 2008
- <http://www.Globedia.com> noticias de salud, 2012.
- <http://www.National Cancer Institute> images visualsonline 2008
- [http://www.policlinicagipuzkoa.com/genetica\\_molecular](http://www.policlinicagipuzkoa.com/genetica_molecular). 2009.
- <http://www.Nature Review Cancer/> index.2012

## ÍNDICE

● APOYOS	2
● ABREVIATURAS	3
● RESUMEN.	4
● INTRODUCCIÓN.	5
● CÁNCER.	5
● CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.	5
● EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.	7
● GENOMA VIRAL.	7
● CICLO DE VIDA DEL VPH.	8
● EL SISTEMA INMUNE.	10
● INMUNIDAD INNATA	11
● INMUNIDAD ADAPTATIVA.	12
● RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.	13
● MECANISMOS DE EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE.	15
● VÍA ADENOSINÉRGICA	16
● ECTO-5'-NT, CE 3.1.3.5. (CD73).	17
● ADENOSINA.	18
● RECEPTORES PARA ADENOSINA.	19
● RECEPTORES A1 Y A3.	20
● RECEPTOR A2A.	20
● RECEPTOR A2B.	21
● EFECTO DE LA ADENOSINA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.	21
● CAFÉINA.	22
● JUSTIFICACIÓN.	25
● HIPÓTESIS.	26
● OBJETIVO GENERAL.	26
● OBJETIVOS PARTICULARES.	26
● MATERIALES Y MÉTODOS.	27
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA ECTOENZIMA CD73 EN LAS CÉLULAS TUMORALES.	27
➤ Líneas celulares.	27
➤ Determinación de CD73 en membrana.	27
➤ Determinación intracelular de CD73.	27
➤ Adquisición y análisis de los datos.	27
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A2A PARA ADENOSINA EN LAS CÉLULAS TUMORALES.	28
➤ Determinación de CD73 y A2AR por inmunocitoquímica	29
➤ Determinación del Porcentaje de Intensidad de expresión (PIE).	29
➤ Intensidad media de Expresión (EMI).	29
➤ Adquisición y análisis de datos	29

<b>3. EFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES DE CaCu.</b>	<b>30</b>
➤ Determinación del efecto de adenosina sobre la proliferación celular	31
➤ Adquisición y análisis de datos	31
● <b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
➤ Análisis de la expresión de CD73 en líneas celulares de CaCu por citometría de flujo (objetivo 1).	32
➤ Análisis de la expresión del receptor A2A para adenosina por inmunocitoquímica (objetivo 2).	36
➤ Evaluación del efecto de la Adenosina sobre la proliferación en líneas celulares de CaCu por citometría de flujo (objetivo 3).	42
● <b>DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
● <b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
● <b>PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
● <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>

<b>● ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
1 Riesgo oncogénico asociado a los diferentes genotipos virales causantes del CaCu	6
2 Estructura de una partícula de VPH.	7
3 Organización del genoma del VPH.	8
4 Ciclo de vida del papillomavirus.	9
5 Ensamblaje de partículas virales y liberación del VPH.	10
6 Principales componentes del sistema inmune.	11
7 Principales células de la inmunidad Innata y adaptativa.	12
8 Esquema del metabolismo de la adenosina extracelular inducida por el tumor en la supresión inmune.	16
9 ATP es convertido a AMP y AMP a adenosina.	17
10 Efectos inmunosupresores de la adenosina extracelular.	18
11 Los 4 receptores para adenosina anclados en la membrana celular.	19
12 Receptor de adenosina A2A.	20
13 El efecto inhibitor de la adenosina en vías de señalización células T en el microambiente tumoral.	22
14 La cafeína actúa como un inhibidor competitivo.	23
15 La cafeína bloquea los receptores para adenosina impidiendo su efecto inmunosupresor sobre las células T.	24
16 Método utilizado para obtener la IMF de CD73 en las células tumorales de CaCu.	28
17 Análisis de imagen mediante el protocolo para mediciones de intensidad.	29
18 Placas de 24 pozos con las condiciones de cultivo.	30
19 Histogramas empleados para determina la respuesta proliferativa total de las células en cultivo.	31
20 Expresión intracelular de CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular HaCaT (VPH-)	37
21 Expresión intracelular de CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular C-33 A (VPH -)	37
22 Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular ViBo (VPH -).	37
23 Expresión intracelular de la CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular CaSki (VPH-16)	38
24 Expresión intracelular de la CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular SiHa (VPH -16)	38
25 Expresión intracelular de la CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular HeLa (VPH -18)	38
26 Expresión intracelular de la ecto enzima CD73 y del receptor de alta afinidad para adenosina A2A en la línea celular INBL (VPH -18)	38

**INDICE DE TABLAS****Pág.**

1	Efectos celulares acumulativos de la cafeína en relación a su concentración	23
2	Parámetros para evaluar la intensidad de expresión en células positivas.	29
3	Expresión diferencial de CD73 en líneas celulares de CaCu.	35
4	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células HaCaT.	44
5	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células C-33 A.	45
6	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células ViBo.	46
7	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células CaSki.	47
8	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células SiHa.	48
9	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células HeLa.	49
10	Efecto de Adenosina y AMP en la proliferación e inhibición de las células INBL.	50
11	Porcentajes de proliferación de las líneas celulares de CaCu y HaCaT a diferentes concentraciones de Adenosina, Adenosina con Cafeína, AMP y AMP con cafeína.	51
12	Porcentajes de Inhibición sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu y HaCaT a diferentes concentraciones de Adenosina, Adenosina con Cafeína, AMP y AMP con cafeína.	52

**INDICE DE GRÁFICOS****Pág.**

1	Expresión de CD73 en las células HaCaT (VPH).	33
2	Expresión de CD73 en las células C-33 A y ViBo (VPH -).	33
3	Expresión de CD73 en las células CaSki y SiHa (VPH-16).	34
4	Expresión de CD73 en las células Hela e INBL (VPH-18).	34
5	Expresión de CD73 en las líneas celulares de CaCu y de las células HaCaT en relación con el Isotipo control.	35
6	Expresión de CD73 en líneas celulares.	39
7	Expresión del Receptor A2A en líneas celulares.	40
8	Expresión diferencial entre CD73 y el receptor A2A en líneas celulares.	40
9	Porcentaje de Intensidad de expresión de CD73 y A2AR.	41
10	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células HaCaT.	44
11	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células C-33A.	45
12	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células ViBo.	46
13	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células CaSki.	47
14	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células SiHa.	48
15	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células HeLa.	49
16	Efecto de adenosina y AMP sobre la proliferación de las células INBL.	50
17	Porcentaje de proliferación de las líneas celulares.	51
18	Porcentaje de Inhibición sobre la proliferación de las Líneas celulares.	52