



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

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA COMO MECANISMO  
INMUNOSUPRESOR EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER DE CUELLO  
UTERINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS ROBERTO AVILA IBARRA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
FES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA COMO MECANISMO  
INMUNOSUPRESOR EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER DE CUELLO**

**UTERINO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**LUIS ROBERTO AVILA IBARRA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
FES ZARAGOZA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014**



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **AVILA IBARRA LUIS ROBERTO** con número de cuenta **304321225**, con la tesis titulada **“ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA (CD39/CD73/ADENOSINA) COMO MECANISMO INMUNOSUPRESOR EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**:

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER  
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
Suplente: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTÍZ NAVARRETE  
Suplente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de septiembre de 2014

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por enriquecer mi formación personal y académica, así como la realización de esta tesis.

**El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave del proyecto IN217013 “Análisis in vivo del efecto inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de tumores malignos de cuello uterino a través de la vía CD73”.**

**Y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS, con el apoyo financiero de los proyectos: FIS/IMSS/PROT/957.**

Durante los estudios de maestría recibí los siguientes apoyos: Beca Conacyt con número de registro 280526 durante el periodo comprendido entre de Agosto del 2012 y Julio del 2014; apoyo financiero como becario de investigación con numero de matricula 99096723 proporcionado por el Instituto Mexicano del Seguro Social en el periodo de Marzo 2013 a Septiembre 2014; Beca de Estudios Continuos de Posgrado con el numero de folio 12BCM0159-II por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) del periodo comprendido entre Agosto del 2012 y Julio del 2014.

A los miembros del Comité Tutor.

El trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la tutoría principal del Dr. Alberto Monroy García y la dirección tutorial del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y la Dra. María de Lourdes Mora García, por la guía y consejos en la realización y culminación de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Dios por permitirme realizar cada una de mis metas y objetivos. Por guiarme siempre por el camino correcto.

A la Dra. María de Lourdes Mora García por haberme abierto las puertas de su laboratorio, la atención y apoyo brindados.

Al Dr. Alberto Monroy García por el gran apoyo brindado durante estos años, por permitirme desenvolverme en su grupo de investigación y por la formación recibida que me han permitido ser una mejor persona tanto humana y profesional. Mil gracias.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por ser el tutor que no aparece en mi comité, enriqueciendo este trabajo con cada una de sus sugerencias y consejos, por su amplia experiencia y conocimiento los cuales fueron un apoyo muy valioso. Gracias Profe.

Al Dr. Benny Weiss Steider, Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete y Dra. Leticia Rocha Zavaleta por la atinada revisión de éste trabajo, así como las observaciones y sugerencias realizadas que permitieron enriquecer al mismo.

A mis donadores y cada una de las personas involucradas en la realización del trabajo experimental. El apoyo técnico fue proporcionado por el Señor Ernesto Rivera.

A mis padres Saúl y Yola por apoyarme en cada una de mis decisiones y depositar en mi toda su confianza.

A Yohaly y Gabriel que me motivan a darles el buen ejemplo. A Dieguito por ser cada día la fuerza y el motor para lograr cada una de mis metas y objetivos.

A Gaby por toda su paciencia, sus consejos y por tener la disponibilidad de estar conmigo siempre, por hacer que cada paso que doy en mi vida sea aún mas feliz. Te amo.

A la familia Ibarra-Velázquez por ser un grupo tan alegre y su apoyo tan importante.

A mis carnales Rodrigo y Carlos por aquellas experiencias vividas y aún por vivir. A Adri por aquellas aventuras compartidas.

A mis compañeros de laboratorio Vianey, Azucena, Itzel, Victor, Fanny, Eva, Gaby, Cesar y Estrella por el apoyo brindado y hacer del ambiente de trabajo mas agradable y ameno. Gracias mis cuates.

## DEDICATORIA

*Para aquellas personas que padecen o han  
fallecido a causa de esta terrible enfermedad llamada cáncer.*



# ÍNDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>Abreviaturas</b>	3
<b>Marco Teórico</b>	4
Cáncer	4
Cáncer Cérvico Uterino (CaCu)	6
CaCu y Virus del Papiloma Humano	7
Sistema Inmune	10
Inmunidad Innata	10
Inmunidad Adaptativa	11
Inmunidad Humoral	11
Inmunidad Celular	11
Linfocitos T	12
Inmunidad Antitumoral e Inmunoedición	13
Evasión de la Inmunidad Antitumoral	15
Vía Adenosinérgica	19
Producción de Adenosina por CD39/CD73	20
CD39 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1 – Entpd1)	21
CD73 (ecto-5-nucleotidasa-Nt5e)	21
Expresión y Función de CD39/CD73 en Cáncer	22
Efecto Supresor de Adenosina	24
Bloqueo del Mecanismo Inmunosupresor (CD39/CD73/Adenosina)	27
<b>Planteamiento del problema y justificación</b>	28
<b>Hipótesis</b>	29
<b>Objetivos</b>	30
<b>Materiales y métodos</b>	31
Líneas celulares	31
Expresión de CD39/CD73 por citometría de flujo	31
Ensayo de actividad funcional de CD39/CD73	31
Cromatografía en capa fina (TLC)	32

Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)	32
Extracción de células mononucleares de sangre periférica	32
Ensayo de proliferación celular colorimétrico (MTS)	33
Ensayo de proliferación celular por marcaje con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE)	33
Determinación de la producción de IFN- $\gamma$ intracelular en T CD8+	34
Determinación de la expresión de CD69 en TCD8+	34
Tipificación de HLA-A2	34
Generación de linfocitos T citotóxicos específicos	34
Enriquecimiento de TCD8+	35
Identificación de linfocitos T CD8+ específicos al péptido YMDLQPETT	35
Células T2 cargadas con péptido	35
Ensayo de citotoxicidad por marcaje con 7AAD/CFSE	36
<b>Resultados</b>	37
Células tumorales derivadas de cáncer de cuello uterino (CaCu) co-expresan las ectoenzimas de la vía adenosinérgica CD39/CD73	37
Las células tumorales HeLa generan adenosina mediante la actividad funcional de las ectoenzimas CD39/CD73	38
Células de CaCu inhiben la proliferación de linfocitos T mediante la generación de adenosina	42
Células tumorales de CaCu disminuyen la activación de linfocitos T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP	47
La adenosina generada por células tumorales de CaCu no afecta la función efectora de linfocitos T citotóxicos específicos	51
<b>Discusión y análisis de resultados</b>	55
<b>Conclusiones</b>	60
<b>Perspectivas</b>	61
<b>Figuras complementarias</b>	62
<b>Literatura citada</b>	64

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	<b>Pàgina</b>
<b>Figura 1.</b> Cascada de mutaciones durante la progresión del tumor	4
<b>Figura 2.</b> Línea de tiempo de progresión de cáncer y etapas premalignas en las que genes específicos contribuyen a la carcinogénesis	5
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de infección del virus de papiloma humano en el cérvix	9
<b>Figura 4.</b> Inmunidad innata y adaptativa	12
<b>Figura 5.</b> Destrucción de células tumorales por parte de linfocitos T citotóxicos	13
<b>Figura 6.</b> Las tres fases de la inmunoedición del cáncer	15
<b>Figura 7.</b> Los tumores desarrollan mecanismos para inhibir la inmunidad por medios intrínsecos y extrínsecos	18
<b>Figura 8.</b> Estructuras químicas de adenosina	19
<b>Figura 9.</b> Representación de generación de adenosina extracelular a través de hidrólisis enzimática	20
<b>Figura 10.</b> . El complejo CD39/CD73 en el desarrollo y progresión tumoral	24
<b>Figura 11.</b> Vías de segundos mensajeros acopladas a los subtipos de receptores de adenosina	25
<b>Figura 12.</b> Mecanismo inmunosupresor de células tumorales mediante la vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina)	26
<b>Figura 13.</b> Expresión de CD39 y CD73 en las líneas celulares HeLa, de CaCu, y Jurkat, de leucemia linfoide aguda	37
<b>Figura 14.</b> Las células tumorales HeLa generan adenosina mediante la actividad funcional de CD39/CD73	39
<b>Figura 15.</b> Curva tipo de adenosina	40
<b>Figura 16.</b> Análisis cuantitativo de la generación de adenosina por las células HeLa a partir de ADP y AMP	41

<b>Figura 17.</b> Efecto inhibitorio de la adenosina pura sobre la proliferación de linfocitos T	43
<b>18.</b> Células tumorales HeLa de CaCu inhiben la proliferación de células T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP	45
<b>Figura 19.</b> Células tumorales HeLa de CaCu inhiben la activación de células T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP	48
<b>Figura 20.</b> Células tumorales HeLa de CaCu inhiben la generación de IFN- $\gamma$ en células T CD8+, mediante la generación de adenosina a partir de AMP y ADP	49
<b>Figura 21.</b> Donador normal positivo a la expresión de moléculas HLA-A2 de MHC I	51
<b>Figura 22.</b> Generación <i>in vitro</i> de linfocitos TCD8+ específicos al péptido YMDLQPETT	51
<b>Figura 23.</b> La función efectora de los linfocitos T CD8+ no se ve afectada por las células tumorales de CaCu mediante la generación de adenosina a partir de AMP.	52
<b>Figura comp. 1</b> Efecto inhibitorio de la adenosina pura sobre la proliferación de linfocitos T (Método colorimétrico MTS)	62
<b>Figura comp. 2</b> Células HeLa inhiben la proliferación de células T inducida por anticuerpos CD2/CD3/CD28 mediante la generación de adenosina (Método colorimétrico MTS)	62
<b>Figura comp.3</b> Células HeLa inhiben la proliferación de células T inducida por anticuerpos CD2/CD3/CD28 mediante la generación de adenosina (Método de marcaje con CFSE)	63
<b>Cuadro 1.</b> Etapas del cáncer cérvico-uterino	7
<b>Cuadro 2.</b> Expresión de CD39 y CD73 en cánceres humanos	22
<b>Cuadro 3.</b> CD39 y CD73 en tumores líquidos y sólidos	23
<b>Cuadro 4.</b> Efectos celulares acumulativos de la cafeína en relación a sus concentraciones	27

## RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa una de las principales causas de muerte por tumores en las mujeres mexicanas. Cada año se diagnostican alrededor de 12,000 casos nuevos de cáncer invasor y mueren cerca de 6,000 mujeres por este padecimiento. Se ha descrito que la infección persistente por virus de papiloma humano (HPV) de alto riesgo y la deficiente respuesta inmune para eliminar a las células infectadas en sus etapas iniciales juega un papel muy importante en la progresión de la enfermedad. En este contexto, varios factores inmunosupresores pueden intervenir para evitar que la respuesta inmune participe de manera eficiente, debido a que las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento inmune y suprimir la función efectora de linfocitos T citotóxicos. Un mecanismo inmunosupresor recientemente propuesto es la vía adenosinérgica, en la cual se genera adenosina extracelular por la fosfohidrólisis de los nucleótidos ATP, ADP y AMP, mediante la actividad funcional de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 expresadas en las células tumorales.

Se sabe que la adenosina inhibe la activación y la función efectora de los linfocitos T a través de su interacción con receptores específicos. Tomando en consideración que en estudios previos hemos detectado que células tumorales de CaCu expresan CD73 y éstas son capaces de generar adenosina, el presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de analizar si células tumorales de CaCu expresan la vía CD39-CD73-adenosina, y si a través de este mecanismo son capaces de inhibir la proliferación, activación y actividad citotóxica de linfocitos T.

Mediante análisis de citometría de flujo se encontró que la línea celular de CaCu, HeLa (HPV-18+), expresó ambas ectoenzimas en membrana celular. Cuando estas células fueron incubadas en presencia de ADP y AMP de manera independiente, en los sobrenadantes se generó adenosina, la cual fue identificada mediante cromatografía en capa fina (TLC). Por otro lado, empleando un análisis por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), se observó que en los cultivos de HeLa en presencia de polioxometalato (POM-1), un inhibidor específico para CD39; así como de adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP), un inhibidor específico para CD73, la cantidad de adenosina fue reducida en aproximadamente 50% cuando se adicionaron de manera simultánea a ADP (ADP+P) y a AMP (AMP+A) respectivamente.

Por otro lado, al analizar el efecto de los sobrenadantes de las células HeLa cultivadas con ADP y AMP, se observó una disminución de 20-40% de la proliferación, 15% en la disminución de la expresión del marcador de activación CD69 y de más del 50% en la producción de IFN-gamma, de linfocitos T estimulados con los anticuerpos CD2/CD3/CD28. Este efecto inhibitorio fue menor al evaluar los sobrenadantes de las células HeLa en presencia de ADP+P y AMP+A. Finalmente los sobrenadantes de las células HeLa cultivadas con ADP y AMP no tuvieron efecto inhibitorio sobre la capacidad de linfocitos T citotóxicos, previamente activados con el péptido YMLDMQPETT de la proteína E7 de HPV-16.

Estos resultados nos permiten concluir que la expresión y actividad funcional de las ectoenzimas CD39 y CD73 en células tumorales de CaCu, constituye un mecanismo potencial para inhibir la respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T.

## ABSTRACT

Cervical Cancer (CC) is one of the leading causes of cancer death in Mexican women. Each year about 12,000 of new cases of invasive cancer are diagnosed, and about 6,000 women die for this disease. It has been reported that persistent infection with high risk HPVs, and the poor response of the immune system to eliminate infected cells in early stages of the disease, plays an important role in the disease progression. In this context, several immunosuppressive factors can act to prevent the efficient immune response, because tumor cells have developed multiple mechanisms to evade immune recognition, as well as, to eliminate the effector function of CTLs. Recently it has been proposed that adenosine produced by hydrolysis of ATP, ADP and AMP by the CD39/CD73 enzymes in tumor cells, is an important mechanism to inhibit T cell function.

It is known, that adenosine inhibits activation and effector function of T cells through its interaction with specific receptors. Considering that in previous studies we detected that CC tumor cells express CD73 and are capable to generate adenosine, in this work we analyzed if CC tumor cells express CD39-CD73-adenosine mechanism, and if through this via, are capable of inhibiting proliferation, activation and effector activity of T lymphocytes.

Using flow cytometry analysis, we found that the HeLa (HPV-18 +) cell line, strongly expressed both ectoenzymes on its cell membrane. When these cells were incubated in the presence of either ADP or AMP, we could detect adenosine in those supernatants, by using thin layer chromatography (TLC). Analysis by liquid chromatography ultra resolution (UPLC) revealed that when polyoxometalate (POM-1), an CD39-specific inhibitor, or adenosine diphosphate  $\alpha\beta$ -methylene (APCP), an CD73-specific inhibitor, were added in the presence of ADP (ADP+P) or AMP (AMP+A) respectively, the amount of adenosine generated in HeLa cell cultures, was reduced by approximately 50% in relation to those cell cultures in the absence of the specific inhibitors.

Furthermore, we observed that supernatants derived from HeLa cells cultured with ADP and AMP, inhibited their proliferation from 20 to 40%; as well as, over 15% of the expression of CD69, an activation marker; and the production of IFN-gamma by over 50% in T lymphocytes stimulated with CD2/CD3/CD28 antibodies. This inhibitory effect was lower when ADP+P and AMP+A supernatants of HeLa cells were added. Finally we detected that supernatants derived from HeLa cells cultured with ADP and AMP, had no inhibitory effect on the cytotoxic activity of T cells previously activated with the antigenic peptide YMLDMQPETT, derived from the HPV-16 E7 protein.

These results demonstrate that the expression and functional activity of the CD39/CD73/adenosine pathway in cervical cancer cells, is a potential mechanism to inhibit the immune response mediated by T lymphocytes.

## ABREVIATURAS

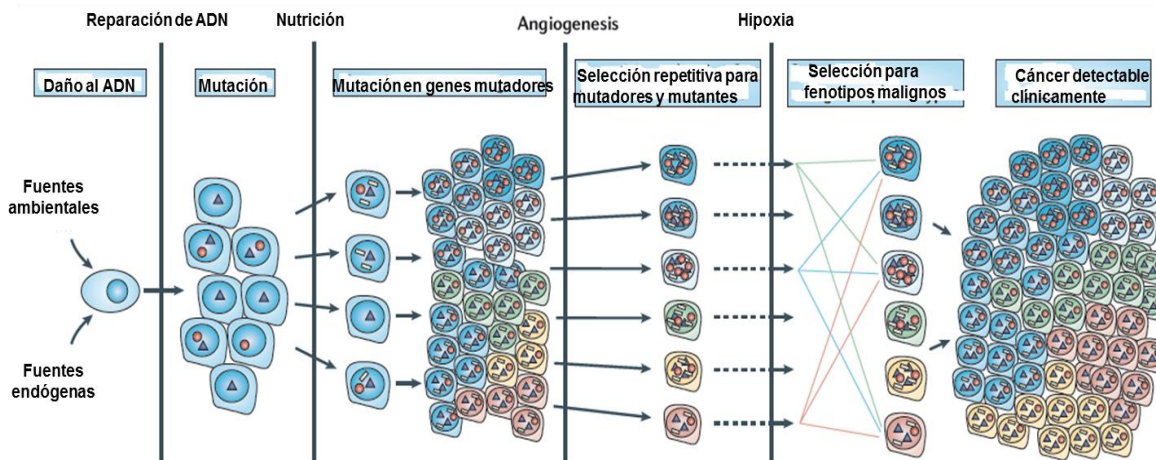
<b>ADA</b>	Adenosina desaminasa
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AMPC</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>AR´S</b>	Receptores de adenosina
<b>A2AR</b>	Receptor de adenosina A2A
<b>APCP</b>	Adenosina 5´ $\alpha$ , $\beta$ metileno monofosfato
<b>CaCu</b>	Cáncer cérvico uterino
<b>CD</b>	Célula dendrítica
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>CTL</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inductor de hipoxia 1 alfa
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>NK</b>	Célula asesina natural
<b>POM-1</b>	Polioxotugstato
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>Th</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores
<b>HPV</b>	Virus del papiloma humano

## MARCO TEÓRICO

### Cáncer

Una definición que aún prevalece de cáncer es la llamada "proliferación celular descontrolada". Esta definición fue satisfactoria a través de la década de 1970, sin embargo hoy está obsoleta, en vista de los prodigiosos avances realizados en los últimos 20 años en relación con las bases genéticas del cáncer. Ahora se sabe que la exposición a agentes nocivos como la radiación, químicos, virus o mutágenos durante toda la vida, puede conducir a alteraciones en las secuencias de ADN. El cáncer se desarrolla cuando en la secuencia de ADN se inducen mutaciones de genes que promueven el crecimiento y confieren una ventaja de supervivencia de la célula afectada y sus descendientes, llamados en conjunto un "clon" maligno. Mutaciones adicionales en cualquiera de estas células malignas clonales es necesaria para convertirse en un tumor local o distalmente invasivo (Faguet, 2008).

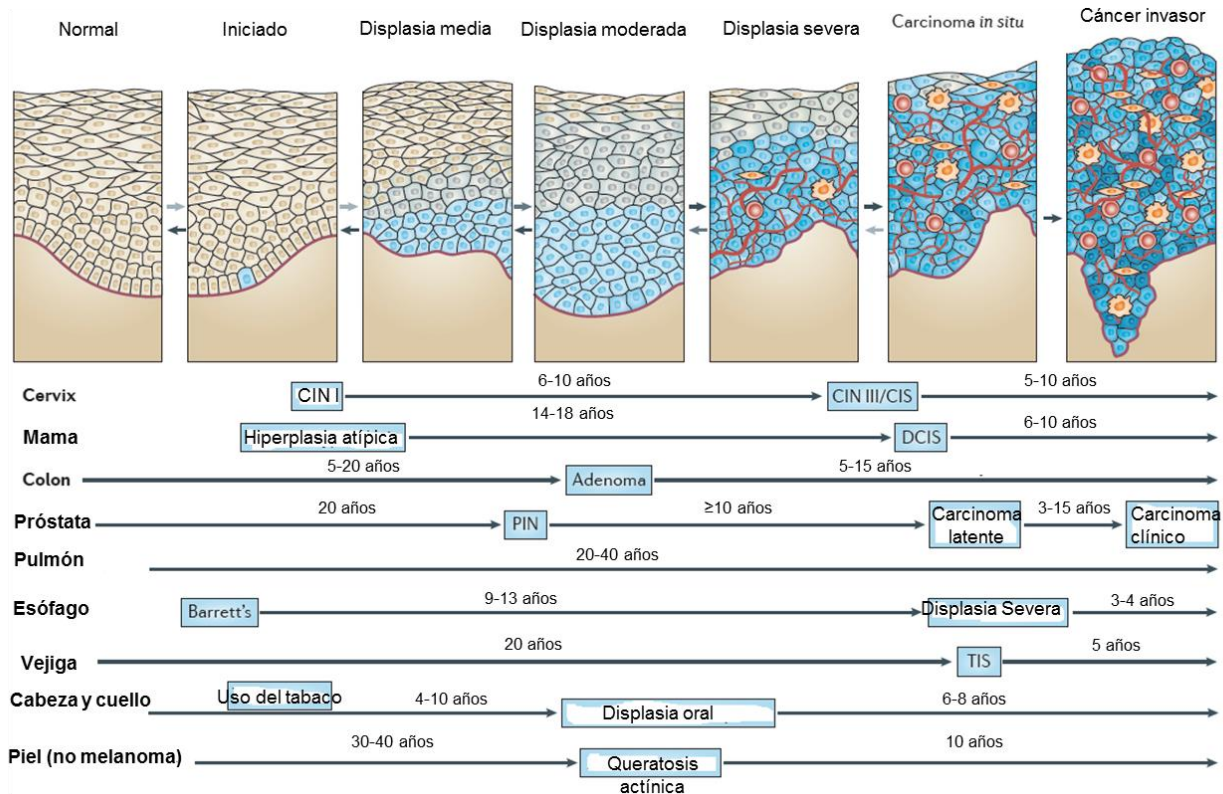
Hay dos grupos principales de genes celulares normales asociados con el cáncer: proto-oncogenes (100 son conocidos actualmente) que promueven, y genes supresores de tumores (más de 30 son conocidos) que inhiben el crecimiento celular (McLaughlin *et al* 2003; Alberts *et al* 2008). En contraste con el efecto promotor del crecimiento de los oncogenes, genes supresores de tumores mutados se eliminan o pierden su función inhibitoria privando así a las células de los frenos cruciales que normalmente previenen el crecimiento celular excesivo. La inactivación de un subconjunto de genes supresores de tumores, llamados genes de reparación del ADN, puede conducir a un proceso de reparación del ADN defectuoso y a la inestabilidad genómica (**Fig. 1**) (Umar *et al* 2012; Faguet, 2008). Independientemente de su mecanismo de acción, las células cancerosas se diferencian de su contraparte normal en su regulación aberrante por genomas mutados. El grado de desregulación determina la biología de las células malignas, que a su vez determina el curso clínico de la enfermedad (Faguet, 2008).



**Figura 1. Cascada de mutaciones durante la progresión del tumor.** La evidencia epidemiológica indica que por lo menos 20 años pasan entre el tiempo que un individuo se expone a un carcinógeno a la aparición clínica de un tumor. Existen varias barreras a la progresión del tumor, incluyendo los procesos de reparación del ADN, la disponibilidad de la nutrición, el requisito de la angiogenesis para permitir al tumor aumentar en tamaño y las respuestas a la hipoxia. Los círculos representan mutaciones en los genes que dan como resultado una mayor mutagénesis, triángulos mutaciones del conductor que se seleccionan sobre la base de los cambios en el microambiente del tumor; y rectángulos representan mutaciones pasajeras. **Tomado de Loeb 2011.**



Los cánceres de tipo epitelial representan el paso final en una progresión de varios años a partir de tejido normal, desde lesiones premalignas hacia la invasión de la membrana basal, que constituye el cáncer invasor. Una vez que un límite histológico ha sido penetrado, el cáncer invasivo tiene el potencial de metástasis y la metástasis generalmente conduce a la mortalidad relacionada con el cáncer (Umar *et al* 2012) (Fig. 2).



**Figura 2. Línea de tiempo de progresión de cáncer y etapas premalignas en las que genes específicos contribuyen a la carcinogénesis.** La progresión desde tejido normal a cáncer invasivo se caracteriza por los cambios genéticos que se producen en diferentes puntos. Debido al largo tiempo entre la iniciación y presencia manifiesta (es decir, invasivo) del cáncer en la mayoría de tipos de cáncer, la intervención temprana y estrategias de prevención pueden potencialmente interrumpir el proceso de la progresión del cáncer. Mutaciones de genes que contribuyen a esta progresión desde tejido normal a cáncer invasivo varían entre los tipos de cáncer. Células naranjas representan cambios en el microambiente del tumor, incluyendo el reclutamiento de células inmunes, la inducción de la angiogénesis y alteraciones en las células circundantes, tales como los fibroblastos. CIN, adenocarcinoma in situ; CIS, carcinoma in situ; DCIS carcinoma ductal in situ; TIS, carcinoma de transición in situ. Tomado de Umar *et al* 2012.

A nivel mundial, el cáncer es la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, donde la carga del cáncer está aumentando. La Organización Mundial de la Salud predice que para 2020 habrá 20 millones de pacientes nuevos de cáncer cada año (McLaughlin *et al* 2003). A pesar de las mejoras en el tratamiento de varios cánceres comunes, sigue siendo una importante carga, proporcionando un incentivo creciente para hacer frente a este problema mediante un enfoque preventivo. A pesar de la eliminación de la exposición a agentes cancerígenos, es un enfoque bien establecido para la prevención, la intervención activa con los agentes que se espera para reducir el riesgo de cáncer es cada vez más aceptada (Umar *et al* 2012).

## Cancer cérvico-uterino (CaCu)

El cáncer cervical o carcinoma de cuello uterino (CaCu), es la segunda causa más frecuente de muerte por neoplasias en mujeres en todo el mundo, después del cáncer de mama (Clifford *et al* 2002; Monie *et al* 2009), siendo un problema importante de salud pública, con medio millón de nuevos casos y cerca de 300.000 muertes cada año (Insinga *et al* 2009). En los países en desarrollo, CaCu a menudo es el cáncer más común en las mujeres y puede constituir hasta un 25% de todos los tipos de cáncer en la mujer (Harro *et al* 2001); en México, esta enfermedad representa la segunda causa de muerte con aproximadamente 6,000 decesos anuales (INEGI, 2012).

El CaCu es una alteración celular que se origina en el epitelio cerca de la unión escamosa del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a cáncer in situ, en grado variable cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal (Duarte-Franco and Franco, 2004). Inicialmente este proceso pre-invasivo está limitado al epitelio cervical y se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Este tipo de lesiones cervicales, se clasifican en NIC I, II y III (Richart, 1990) de acuerdo a la cantidad de epitelio que haya sido invadido por una población celular proliferativa e inmadura anormal. Con el tiempo puede extenderse a todo el espesor del epitelio cervical, una condición que se conoce como carcinoma cervical in situ (CIS) por sus siglas en inglés. Posteriormente, la enfermedad puede llegar a ser invasora (Duarte-Franco and Franco, 2004). Este proceso puede tardar una década o más. NIC 1 corresponde a la displasia leve, NIC 2 a la displasia moderada y NIC 3 a la displasia grave y al CIS según el sistema de clasificación Reagan. En años recientes el sistema de Bethesda 2001 clasifica las lesiones según las anomalías de las células escamosas en 4 categorías diferentes: células escamosas atípicas (ASC), lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) y carcinoma de células escamosas (SCC), por sus siglas en inglés respectivamente. La lesión precursora del cáncer cervical se le denomina neoplasia intraepitelial cervical que equivale a LSIL, mientras que HSIL equivale a NIC II y III.

Hay dos principales tipos histológicos de cáncer invasor: los carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. La lesión invasora puede metastatizar a partes cercanas de la pelvis y ganglios linfáticos distantes y otros sitios del cuerpo (**Cuadro 1**). Los síntomas y signos en la mayoría de las mujeres con cáncer invasivo del cuello uterino incluyen sangrado post-coito, infecciones recurrentes de la vejiga y úlceras en el cuello uterino. Las presiones sobre los nervios y el plexo nervioso producen dolor persistente. Tan pronto se produce metástasis de ganglios linfáticos la enfermedad empeora considerablemente (Duarte-Franco, 2004).

Etapa	Características
<b>0</b>	Se encuentra en la primera capa de células que recubren el cuello del útero; y no ha invadido tejidos profundos denomina Carcinoma in situ
<b>I</b>	Se encuentra en el cuello uterino
<b>IA</b>	Se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer; no teniendo más de 5mm de profundidad y 7 mm de ancho.
<b>IB</b>	El cáncer se encuentra dentro del cuello uterino aproximadamente más de 4 cm.
<b>II</b>	El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino sin alcanzar la pared pélvica
<b>IIA</b>	Cáncer se ha diseminado a dos tercios superiores de la vagina.
<b>IIB</b>	El cáncer se ha diseminado ha dos tercios superiores de la vagina y a los tejidos en torno al útero
<b>III</b>	Cáncer diseminado al tercio inferior de la vagina y tal vez haya alcanzado la pared pélvica y los ganglios linfáticos circundantes.
<b>IIIA</b>	Se ha diseminado al tercio inferior de la vagina
<b>IIIB</b>	Se ha diseminado a la pared pélvica y es lo suficientemente grande para bloquear los uréteres. Y puede haber alcanzado a los ganglios linfáticos.
<b>IV</b>	El cáncer se ha diseminado a la vejiga , recto y otras partes del cuerpo
<b>IVA</b>	Cáncer diseminado a la vejiga o a la pared del recto y puede que también él los ganglios linfáticos en la pelvis
<b>IVB</b>	El cáncer se ha diseminado más allá de la pelvis y ganglios linfáticos y otros lugares en el cuerpo como abdomen, hígado, tubo intestinal o pulmones

**Cuadro1. Etapas del cáncer cérvico-uterino** Tomado de (www.NCI/PDQ/pacientes)

## **CaCu y virus de papiloma humano (HPV)**

Se estima que el 15 por ciento de todos los cánceres humanos en todo el mundo puede atribuirse a los virus, lo que representa una porción significativa de la carga global. Tanto virus de ADN y ácido ribonucleico (ARN) han demostrado ser capaces de causar cáncer en seres humanos (Liao, 2006). Estudios realizados en 22 países, coordinados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), identificaron al ADN del virus del papiloma humano (HPV) por sus siglas en inglés, en casi todos (99,7% de 1000) los casos de CaCu (Walboomers *et al* 1999).

Actualmente, es reconocido por la Organización Mundial de la Salud que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por HPV, demostrado por primera vez en la década de 1980 por Harold Zur Hausen, virólogo alemán, y que la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más propagada, aunque se estima que sólo un 5 a 8% de mujeres que la padecen desarrolla CaCu (Bosch *et al* 2002; Franco, 1995). Se ha demostrado que los genomas de los HPV usualmente se integran al genoma de la célula hospedera. Esta integración se realiza en diversos sitios, algunos de ellos cercanos a oncogenes específicos o sitios frágiles, sugiriendo que este evento puede tener un papel importante en el desarrollo de los tumores cervicales (Vázquez-Ortiz *et al* 2005).

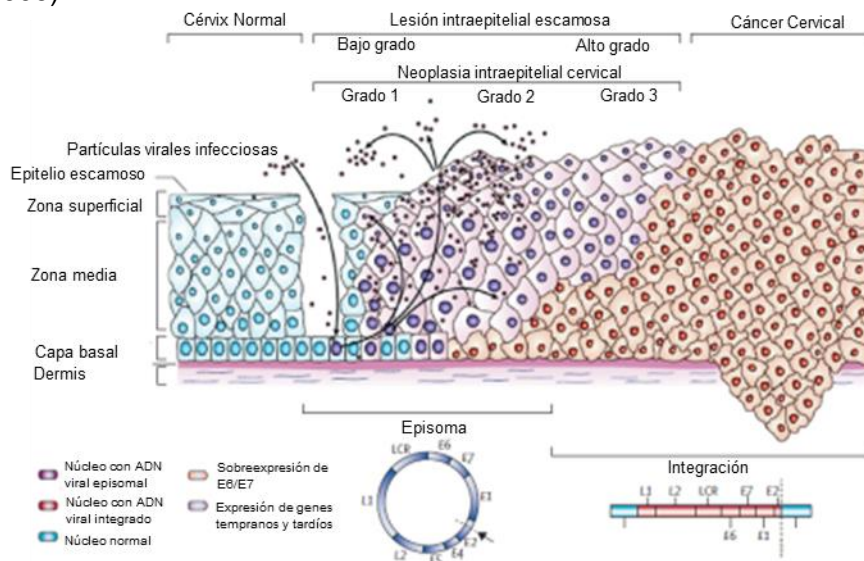
Los HPVs son virus de ADN de doble cadena, de la familia *Papillomaviridae*. El genoma viral puede variar ligeramente entre los diferentes tipos de HPV, contienen cerca de 8.000 pb y codifica en 8 o 9 marcos abiertos de lectura, los cuales son transcritos como ARNm policistrónicos. La cápside viral está formada por 2 proteínas: La proteína L1 (elemento estructural primario), con 360 copias organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes. La proteína L2 es un componente menor del virión y está presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión; interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad. Ambas proteínas juegan un papel importante en la eficiencia de la infectividad del virus. La infección por HPV requiere que las partículas virales accedan a la capa basal epitelial y penetren a las células basales en división. Es bien conocido que previo a que los HPVs establezcan una infección, tienen que experimentar un complicado proceso para unirse y entrar a la célula huésped. Hay controversia sobre la naturaleza del receptor viral, pero se cree que son los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) los receptores iniciales. Se ha observado que L2 de todos los virus HPVs secuenciados, contienen en su extremo amino terminal una secuencia consenso que es escindido por furina, una pro-proteína convertasa, y la escisión por furina se supone es necesaria para la unión y entrada del virus a la célula, ya que esto provoca un cambio conformacional de la cápside viral, seguido de la liberación de los HSPGs para la posterior asociación con un receptor putativo secundario, que se cree es una integrina. Otros estudios evidencian que el rompimiento de furina puede llevarse a cabo en la superficie celular o dentro de un compartimento endosomal temprano y las cápsides se liberan en un compartimento endosomal tardío, llevando a liberar el genoma asociado del endosoma hacia el citoplasma por un mecanismo que involucra el extremo C-terminal de L2.

La reproducción del HPV está íntimamente ligada al proceso de diferenciación de las células huésped. Las células escamosas del epitelio normal crecen como epitelio estratificado el cual presenta dos tipos de queratinocitos, las células madre y células de amplificación en tránsito. Las células madre se adjuntan a la de la membrana basal y mantienen una alta capacidad de autorrenovación. Después de la división de las células basales, las células hijas que se convertirán en células de amplificación en tránsito migran hacia arriba y se someten a la diferenciación terminal. Poco después de salir de la membrana basal, esas células normales salen del ciclo celular y comienzan a sintetizar queratinas de alto peso molecular que se acumulan en el estrato granuloso y en los estratos más altos del epitelio. Estas células eventualmente forman sacos llenos de queratina en la epidermis. La infección por HPV se considera que requiere de una ruptura en el epitelio estratificado, que puede ocurrir a través de microlesiones que exponen a la capa basal de la entrada del virus (Sterlinko *et al* 2009; Abdul *et al* 2009).

El ciclo de vida del virus del papiloma, comienza con la infección de las células basales epiteliales que incluye la entrada a la célula huésped, manteniendo su genoma a un bajo

número de copias por célula infectada y requiriendo la expresión de E1 y E2. La segunda fase, incluye ya el primer paso hacia la transformación celular, es decir, la integración del genoma del HPV a la célula. E1 y E2 se unen al origen de replicación viral y enganchan a las ADN polimerasas celulares y otras proteínas necesarias para la replicación del ADN. El genoma viral se cree que se mantiene en 10 a 200 copias por célula en la capa basal de toda la infección. Sin embargo, este número de copias aumenta dramáticamente cuando se mueven las células infectadas a las capas superiores del epitelio. Durante esta fase de amplificación, los genomas son empaquetados en viriones infecciosos antes de su liberación. Las células infectadas son morfológicamente diferentes y se denominan coilocitos en esta etapa, con un núcleo ampliado y a menudo múltiples núcleos por célula (**Fig. 3**). La activación del promotor dependiente de diferenciación conduce a una mayor expresión de las proteínas E1, E4 y E5, mientras que L1 y L2 se expresan en la capa superior del epitelio para facilitar su ensamblaje y la formación de viriones. Las cápsides se someten a un proceso de maduración provocada por el procesamiento proteolítico de los componentes del virión antes de la liberación de la célula. El virión que se libera puede infectar el epitelio basal o extenderse a nuevos huéspedes (Stanley, 2005).

Las oncoproteínas E6 y E7 del HPV actúan para aumentar la proliferación de las células infectadas en el epitelio. La actividad de estas proteínas subvierte el proceso normal de diferenciación terminal, provocando un aumento en el número de células infectadas que a la larga producen viriones infecciosos. E6 y E7 estimulan la progresión del ciclo celular y ambas proteínas están asociadas con reguladores del ciclo celular. La principal función de la proteína E6 es la de unirse a la proteína supresora de tumores p53 en conjunción con la ligasa de ubiquitina celular E6AP y marcar a p53 para la degradación. Por otra parte, la asociación de E7 con los miembros de la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular también ha sido bien caracterizada. Se sabe que pRb es un regulador negativo del ciclo celular que controla la entrada en la fase S al asociarse con los miembros de la familia E2F de factores de transcripción de ADN; en este sentido, E7 interrumpe esta función mediante la unión a pRb y desplazando las proteínas E2F. Por lo tanto las células entran en la fase S y activan los factores de la replicación celular, necesarios para la replicación viral. E7 también marca pRb para la degradación proteolítica por la vía de proteosomas de ubiquitina a través del proteosoma 26S (Abdul *et al* 2009).



**Figura 3. Mecanismo de infección del virus de papiloma humano en el cérvix.** En la imagen se muestra la entrada del virus a la capa basal del epitelio, así como la integración aleatoria en el genoma del hospedero y la posterior transformación celular. Tomado de Crosbie *et al* 2013.

En algunos casos, la infección viral es claramente seguida de la activación del sistema inmune y la eliminación de la infección del hospedero, sin embargo, las lesiones ocasionalmente persisten y progresan malignamente causando tumores; la falla en la eliminación del virus es atribuida a una pobre respuesta inmunológica, la cual es vital en la protección contra el HPV, y la subsecuente progresión neoplásica (Gariglio *et al* 1992; Hilders *et al* 1994; Guzmán-Rojas *et al* 1994; Vázquez-Ortiz *et al* 2005).

## Sistema Inmune

En un sentido histórico, inmunidad significa protección contra la enfermedad y, más en concreto, contra una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas responsables de su ejecución constituyen el sistema inmunitario y su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas se denomina respuesta inmune. La función fisiológica del sistema inmune es la defensa contra los organismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmune (Abbas *et al* 2009). Este sistema debe enfrentar todo tipo de agentes patógenos y ha desarrollado por evolución múltiples estrategias para combatir la invasión de estos agentes que han rebasado las primeras barreras. Algunas de estas estrategias están encaminadas a reaccionar en el instante mismo en que un patógeno supera las barreras; otras defensas están diseñadas para actuar una vez que se ha establecido la infección (Kindt *et al* 2007).

La protección conferida por el sistema inmune puede dividirse en: reconocimiento y respuesta; puede reconocer patrones moleculares que caracterizan a grupos de patógenos comunes y atacarlos de manera rápida, discriminando entre moléculas extrañas, células y proteínas del cuerpo. Además, reconoce células propias alteradas que pueden desembocar en cáncer. El reconocimiento de un agente patógeno por el sistema inmune activa una reacción efectora, que suprime o neutraliza al invasor; sus múltiples componentes son capaces de convertir el suceso de reconocimiento inicial en una variedad de respuestas efectoras, cada una adaptada de manera única para anular un tipo específico de patógeno. Determinadas exposiciones inducen una reacción de memoria, caracterizada por una respuesta inmune más rápida e intensa en caso de ataque ulterior. Esta propiedad impide contraer por segunda vez algunas enfermedades, y es la base de la vacunación, la cual constituye un medio para “instruir” al sistema inmune y prepararlo para ataques posteriores (Kindt *et al* 2007). Aunque se hace referencia al sistema inmune, debe señalarse que existen dos, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa mediadas por una variedad de diferentes células y moléculas que colaboran para proteger al organismo (**Fig. 4**) (Kindt, 2007; Parham, 2003).

## Inmunidad Innata

Casi todos los componentes de la inmunidad innata se encuentran antes del inicio de la infección y constituyen un grupo de mecanismos de resistencia contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno particular, sino que incluyen componentes celulares y moleculares, que reconocen clases de moléculas peculiares a los patógenos que se encuentran con frecuencia. El primer obstáculo son las barreras que protegen al hospedador, como la piel y las membranas mucosas. La acidez del contenido estomacal y del sudor son otra barrera contra los microorganismos incapaces de prosperar en condiciones ácidas. Enzimas como la lisozima, presente en las lágrimas, atacan las paredes celulares de determinadas bacterias cuando entran en contacto con ellas. Después de las barreras mecánicas, diversas células, fagocíticas como monocitos, neutrófilos y macrófagos tisulares, así como compuestos antimicrobianos sintetizados por el hospedador son capaces de reconocer y neutralizar a los invasores con base en marcadores moleculares de superficie comunes. Esta inmunidad proporciona la primera

línea de defensa durante el período crítico, inmediatamente después de la exposición del hospedador a un patógeno.

En general, la mayoría de los microorganismos que encuentra un individuo sano son eliminados con facilidad en el transcurso de unos cuantos días por los mecanismos de defensa del sistema inmune innato antes de activar el adaptativo.

## **Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa es capaz de reconocer y eliminar de manera selectiva microorganismos y moléculas extrañas específicas. A diferencia de las reacciones inmunes innatas, las adaptativas no son iguales en todos los miembros de una especie, sino que son respuestas a retos antigénicos específicos y posee cuatro atributos característicos: especificidad antigénica, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio y lo extraño.

La especificidad antigénica del sistema inmune adaptativo permite reconocer diferencias sutiles entre los antígenos, siendo capaz de generar una gran diversidad de moléculas de reconocimiento, lo cual permite identificar infinidad de estructuras únicas en antígenos extraños. Además puede reconocer tipos individuales de microorganismos y distinguir entre individuos de esta especie con variaciones genéticas mínimas. Una vez que el sistema inmune adaptativo reconoce y responde a un antígeno muestra memoria inmunitaria; es decir, un segundo encuentro con el mismo antígeno induce un estado mucho mayor de inmunorreactividad. Debido a este atributo, el sistema inmune puede conferir inmunidad durante toda la vida contra muchos agentes infecciosos después de un contacto inicial (Kindt et al 2007). Hay dos tipos de respuesta inmune adaptativa, la inmunidad humoral y la celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos o de sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica llamadas antígenos (Ag) (Abbas *et al* 2012).

## **Inmunidad Humoral**

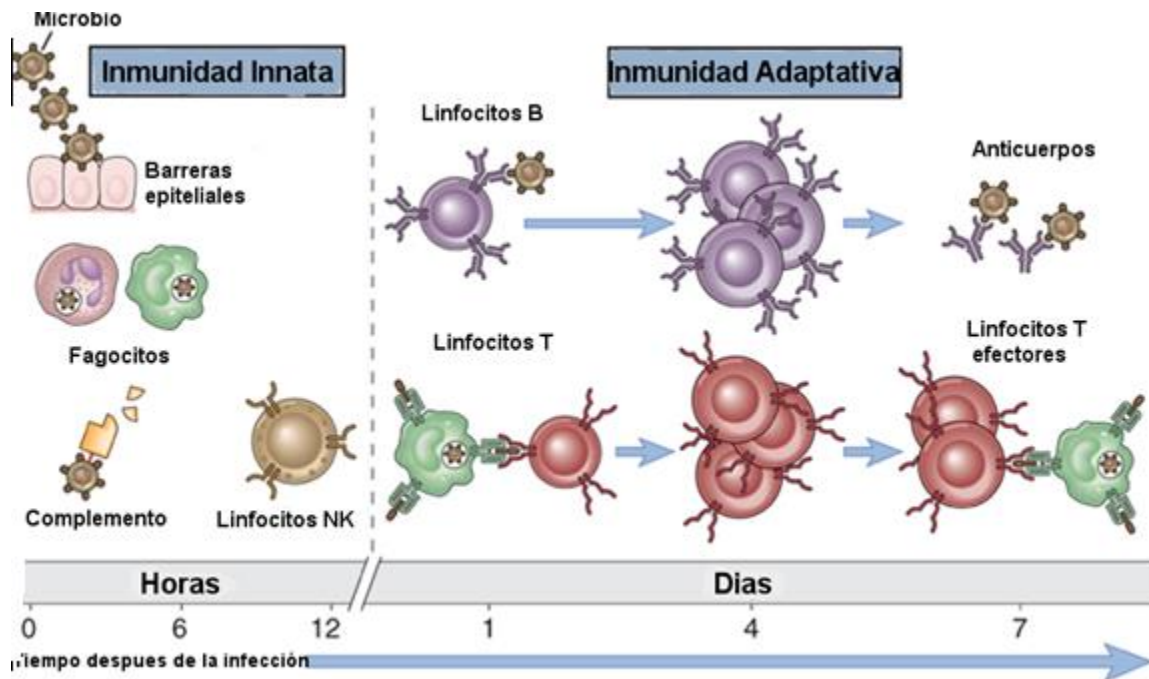
La rama humoral del sistema inmune funciona cuando sucede la interacción de las células B con antígeno y su proliferación y diferenciación en células plasmáticas que secretan anticuerpo (**Fig. 4**). El anticuerpo actúa como efector de la respuesta humoral, se une a antígeno y neutraliza o facilita su eliminación. Un antígeno cubierto de anticuerpo puede eliminarse de varias maneras. Por ejemplo, el anticuerpo puede enlazar en forma cruzada varios antígenos y formar agregados que las células fagocíticas ingieren con mayor facilidad. La unión de anticuerpo a antígeno en un microorganismo también puede activar el sistema de complemento, que tiene como resultado la lisis del microorganismo. El anticuerpo también puede neutralizar toxinas o partículas víricas y recubrirlas, lo que impide que se unan a células del hospedador.

## **Inmunidad Celular**

Las células T efectoras generadas en respuesta a antígeno tienen a su cargo la inmunidad mediada por células (**Fig. 4**). Cuando una célula T virgen reconoce un complejo de antígeno y MHC en una célula presentadora de antígeno (CPA) o una célula blanco apropiada, se activa y precipita una respuesta primaria. La célula T crece hasta convertirse en un blastocito y experimenta ciclos repetidos de división celular. La activación depende de una señal inducida por la inclusión del complejo TCR y una señal coestimuladora inducida por la interacción CD28-B7. Estas señales estimulan la entrada de la célula T en la fase G1 del ciclo celular y provocan la transcripción del gen IL-2 y la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25). La secreción de IL-2 y su



unión subsecuente a su receptor inducen a la célula T activada a proliferar y diferenciarse; de este modo se dividen dos a tres veces por día durante cuatro a cinco días, lo que crea una amplia clona de células progenitoras, que se diferencian en poblaciones de células T de memoria o efectoras.



**Figura 4. 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 los mecanismos 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. Tomado de Abbas *et al* 2006.

## Linfocitos T

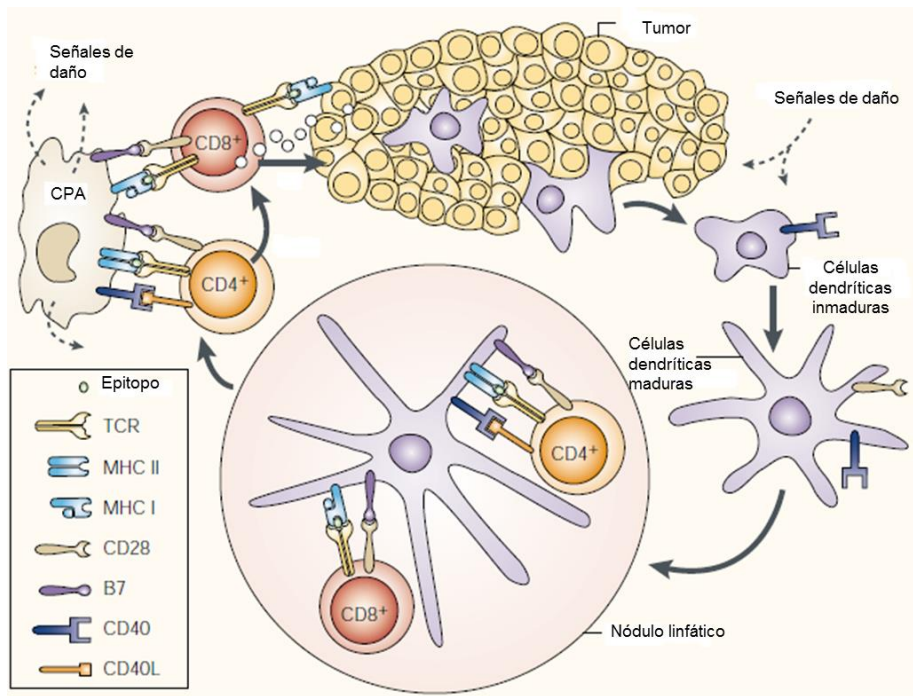
Existen dos subpoblaciones bien definidas de células T: colaboradoras (TH del inglés: T helper) y citotóxicas (CTL del inglés cytotoxic T lymphocytes); recientemente se caracterizó una tercera subpoblación de células T, las células T reguladoras (Treg). Las células TH y CTL pueden distinguirse entre sí por la presencia de glucoproteínas de membrana CD4 o CD8 en sus superficies. Las células T que exhiben CD4 generalmente funcionan como linfocitos TH, mientras que las que exhiben CD8 por lo general funcionan como citotóxicos. Las diversas células T efectoras llevan a cabo funciones especializadas, como secreción de citocinas (células TH CD4 activadas) y actividad citotóxica destructora (CTL CD8). Las células T CD4 forman dos subpoblaciones que se distinguen por los grupos distintos de citocinas que secretan. Una población, llamada subconjunto TH1, secreta IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El subconjunto TH1 tiene a su cargo las funciones habituales mediadas por células, como la hipersensibilidad de tipo tardío y la activación de CTL. El otro subconjunto, denominado subconjunto TH2, secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Este subconjunto funciona con mayor eficacia como colaborador para la activación de células B (Kindt, 2007).

Por otro lado los CTL tienen la capacidad de destruir células extrañas y sólo reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I. Diferentes estudios han demostrado que las células tumorales y células infectadas por virus pueden ser destruidas por estas células efectoras (**Fig. 5**) (Canaday *et al* 2001). Por medio de este reconocimiento del antígeno de



superficie la célula citotóxica entra en contacto íntimo con su célula blanco y administra el “beso de la muerte por apoptosis” (Murphy *et al* 2008).

El CTL activado tiene un receptor en la membrana (CD69) transitoriamente expresado, no detectado en linfocitos en reposo (Sancho *et al* 2005). La rápida y transitoria inducción de CD69 sugiere que puede incrementar la activación y/o diferenciación, como ocurre con CD40L (CD154) o CD25 (Testi *et al* 1994). Los CTL contienen altas concentraciones de gránulos citolíticos preformados en su citoplasma que contienen proteínas citosólicas como perforinas y granzimas designadas a inducir muerte en células blanco tras su liberación (Cooper *et al* 2001; Burkhardt *et al* 1989; Tschopp & Nabholz, 1990). Forrando la membrana de estos gránulos está la proteína 1 asociada a membrana de lisosoma (LAMP-1 o CD107 del inglés lysosomal-associated membrane protein-1) (Winchester, 2001; Peters *et al* 1991), cuya expresión sobre la superficie celular ha sido descrita como un marcador de degranulación de estas células citotóxicas y se ha demostrado que actúa como un fuerte sobrerregulador en la superficie celular siguiendo la estimulación en concordancia con la pérdida de las perforinas (Betts *et al* 2003).



**Figura 5 Destrucción de células tumorales por parte de linfocitos T citotóxicos.** Péptidos presentados por Células Dendríticas (DC's) a Th o CTL. CTL CD8 + destruyen, y las células CD4 + 'de ayuda' proporcionan citocinas como la interleucina 2 (IL-2). Las células presentadoras de antígeno locales (CPA) son probablemente reclutadas y secretan mediadores que mejoran el medio inflamatorio, y promueven aún más la respuesta. Algunas células T se convierten en células de memoria, que pueden reactivar el posterior encuentro con el antígeno. **Tomado y modificado de Tindle, 2002.**

## Inmunidad antitumoral e inmunoección

Las células T que median las respuestas antitumorales eficaces pueden mediar directamente las respuestas citotóxicas contra las células tumorales, ya sea a través de su expresión de moléculas que inducen la apoptosis, o a través de la liberación de gránulos citotóxicos. Células T CD8 + incrementan interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), mejorando la respuesta inmune mediante el incremento en la expresión de moléculas MHC de clase I y de clase II sobre las células tumorales y CPA presentes en el tumor (Restifo *et al* 2012). Peptidos

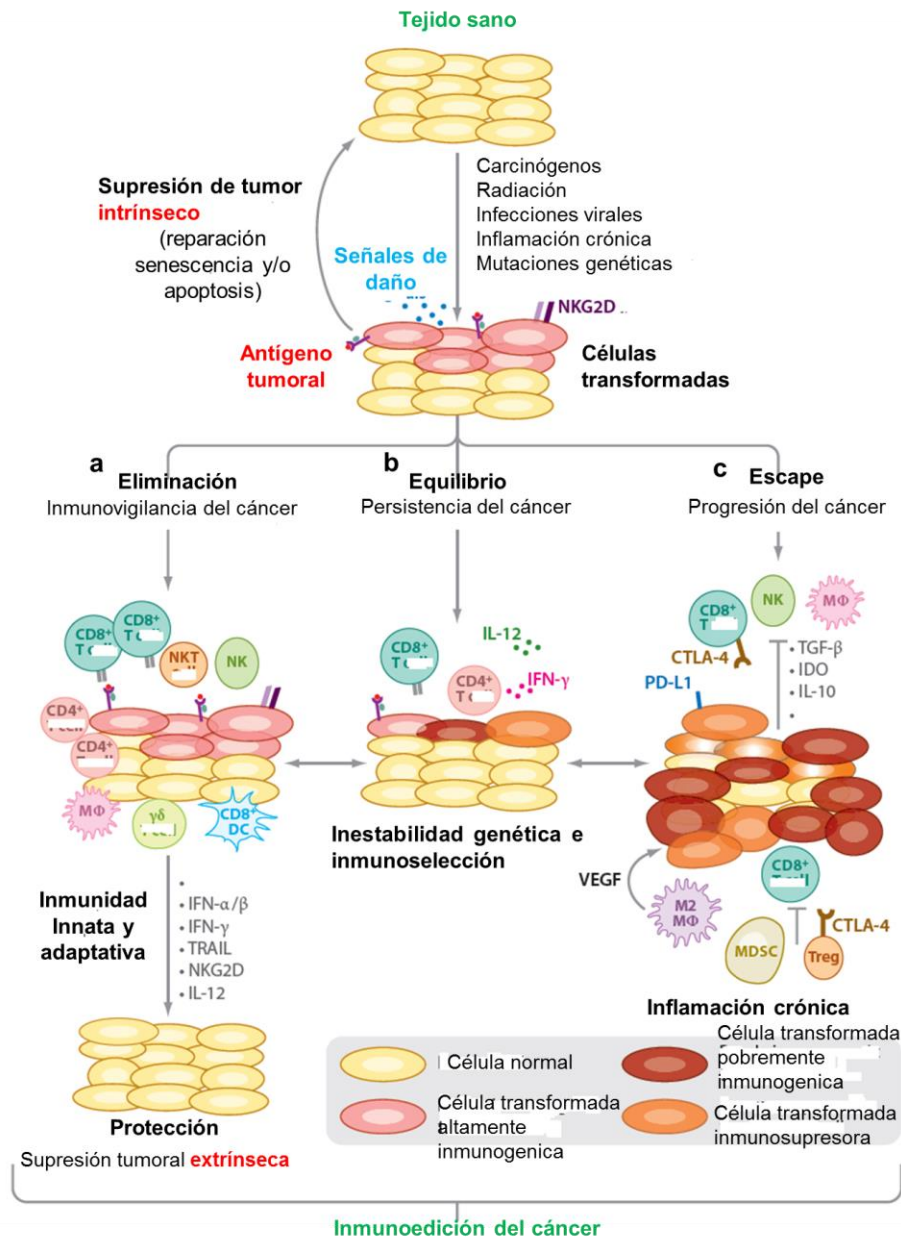
unidos a moléculas de MHC I de células tumorales han sido secuenciados en una búsqueda de antígenos específicos de tumores. La capacidad de propagar células dendríticas ha hecho posible reconstituir una respuesta inmune *in vitro*. Las células dendríticas se pueden cargar con varios péptidos, proteínas derivadas de tumor, o incluso células tumorales enteras y cultivarse con células T, imitando lo que ocurre *in vivo* (Finn, 2008). Es por ello que los CTLs han sido usados por muchos años como las mejores células efectoras contra el crecimiento de tumores y se ha sugerido el uso de epítopes antigénicos para inducir una respuesta efectiva, específica en la respuesta inmune celular (Castellanos, 2001).

El sistema inmune tiene tres funciones principales en la prevención de tumores. Puede proteger al huésped de los tumores inducidos por virus mediante la eliminación o la supresión de infecciones virales. En segundo lugar, la eliminación oportuna de los patógenos y la pronta resolución de la inflamación puede impedir el establecimiento de un ambiente inflamatorio que conduce a la tumorigénesis. Por último, el sistema inmune puede identificar y eliminar específicamente las células tumorales en ciertos tejidos sobre la base de su expresión de antígenos específicos de tumores (TSA, del inglés tumor specific antigens). Este tercer proceso, denominado inmunovigilancia del cáncer, se produce cuando el sistema inmune identifica las células transformadas que han escapado a los mecanismos supresores de tumores de células intrínsecas y los elimina antes de que puedan establecer malignidad (Vesely *et al* 2011).

La hipótesis de la inmunovigilancia postula que el sistema inmune reconoce las células malignas como agentes extraños y los elimina. Los modelos de ratón en el que los mecanismos efectoras inmunes, tales como los interferones de tipo I fueron eliminados por delección de su gen mostraron una clara reducción en la incidencia de tumores por el sistema inmune (Finn, 2008). En modelos animales, el encuentro entre el sistema inmune y un tumor incipiente inicia un proceso denominado "inmunoedición"; un proceso de tres resultados: la **eliminación** del cáncer, **equilibrio**, en donde el sistema inmune puede ejercer una selección o promover variantes que sobrevivan al control inmunológico y el **escape** tumoral, el crecimiento de variantes tumorales que se resisten a la destrucción inmune (**Fig. 6**) (Finn, 2008; Dun, 2002).

La eliminación es una vista modernizada de inmunovigilancia del cáncer en el que las moléculas y las células de la inmunidad innata y adaptativa trabajan juntas para detectar la presencia de un tumor en desarrollo, y destruirlo antes de que se vuelva clínicamente evidente. En casos en los que la destrucción de células tumorales llega a su terminación, la fase de eliminación representa un extremo de inmunoedición del cáncer. Sin embargo, las variantes de células tumorales a veces no pueden ser completamente eliminadas, sino que entran en una fase de equilibrio en el que el sistema inmunológico controla el crecimiento externo de células tumorales. En esta fase de equilibrio, las células tumorales pueden ser funcionalmente inactivas y permanecer clínicamente no aparentes para la vida del huésped. Por último, ya sea como resultado de cambios que se producen en la población de células tumorales debido a un proceso de inmunoedición activo o en el sistema inmune del huésped, como resultado de incrementos en la inmunosupresión inducida por el cáncer o avería del sistema inmune debido al proceso natural de envejecimiento, la latencia funcional de la población de células tumorales se puede romper, lo que lleva a la progresión de estas células en la fase de escape, en el que comienzan a crecer de una manera inmunológicamente sin restricciones y emerger como una enfermedad clínicamente evidente (Vesely *et al* 2010).

El concepto de inmunoedición del cáncer es por lo tanto una interpretación exhaustiva de los datos clínicos y experimentales anteriores y actuales, que integra la capacidad del sistema inmune tanto para proteger al huésped de cáncer y promover la excrecencia de cáncer a través de una multitud de mecanismos (Vesely *et al* 2010).



**Figura 6. Las tres fases de la inmunoección del cáncer.** (a) En la primera fase, **la eliminación**, células y moléculas inmuneinnatas y adaptativas reconocen células transformadas y las destruyen, lo que resulta en un tejido fisiológico normal. (b) Sin embargo, si la inmunidad antitumoral no es capaz de eliminar totalmente las células transformadas, sobreviviendo variantes tumorales, pueden entrar en la fase de **equilibrio**, donde las células y las moléculas de la inmunidad adaptativa previenen el crecimiento del tumor. (c) Estas variantes pueden llegar a adquirir nuevas mutaciones que dan lugar a la evasión del reconocimiento tumoral, progresando a enfermedades malignas en la fase de **escape**. Tomado de Vesely *et al* 2010.

## Evasión de la inmunidad antitumoral

Aunque es claro que el sistema inmune puede reaccionar hacia las células tumorales, el hecho de que mueran tantas personas cada año por cáncer indica que la respuesta inmunitaria hacia las células tumorales a menudo es ineficaz. Las células cancerosas se someten a cambios genéticos y epigenéticos estocásticos que generan los cambios críticos necesarios para eludir las defensas inmunológicas innatas y adaptativas. Por otra parte, el sistema inmunológico

contribuye a la progresión del tumor mediante la selección de variantes tumorales más agresivas, la supresión de la respuesta inmune antitumoral, o la promoción de la proliferación de células tumorales. La interacción entre una población heterogénea de células con cáncer sometidas a modificaciones genéticas rápidas y la presión inmunológica constante ejercida por las células inmunitarias permite la selección darwiniana de las variantes tumorales más aptas para sobrevivir y formar cáncer en huéspedes inmunocompetentes.

El escape tumoral puede ser resultado de los cambios que se producen a nivel del tumor, inhibiendo directamente el reconocimiento de células cancerosas o la citólisis por las células efectoras inmunes. En algunos casos, la evasión inmune por tumores es absoluta y el sistema inmune tiene poco impacto en la progresión del tumor, mientras que en otros casos el crecimiento del tumor se retrasa antes de que el sistema inmune este abrumado, que conduce a la progresión del tumor. En su forma más simple de escape, las células tumorales pueden evadir la detección, ya sea debido a la falta de reconocimiento inmunológico o para la inducción de tolerancia central o periférica. La tolerancia central es un proceso por el cual las células T auto-reactivas se eliminan o se convierten en un fenotipo regulador en el timo. En este caso, y en ausencia de expresión de neoantígenos, los tumores pueden permanecer invisibles para el sistema inmune adaptativo y son libres de crecer sin impedimentos. La tolerancia periférica es un proceso importante en las células T reactivas con antígenos propios que no se expresan en el timo se eliminan. En este caso, un cierto nivel de respuesta inmune antitumoral puede ser iniciada de forma transitoria antes de que se induzca la tolerancia, lo que lleva a la progresión del tumor.

Además de la inducción de la tolerancia, las células tumorales pueden adquirir defectos en el procesamiento de antígenos y las vías de presentación que facilitan la evasión del reconocimiento inmune adaptativo. Las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectoras de células T anti-tumorales (**Fig. 7**). Estos mecanismos pueden cooperar en etapas avanzadas del cáncer para limitar la capacidad del sistema inmune para frenar el tumor y la eficacia de las estrategias de inmunoterapia para erradicar con éxito las células malignas (Rabinovich *et al* 2007). Dichos mecanismos incluyen:

### **I Pérdida y baja regulación del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I).**

Específicamente, la ausencia total de la expresión de MHC-I causada por mutaciones del gen  $\beta$ 2-microglobulina; disminución de la expresión de MHC-I debido a la pérdida selectiva de los distintos alelos HLA; presentación deficiente de los antígenos tumorales también debida a defectos en la maquinaria de procesamiento de antígenos, incluyendo las mutaciones del transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) y los componentes del inmunoproteasoma (LMP2 y LMP7) (Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010).

**II Baja regulación, mutación o pérdida de antígenos tumorales.** La inestabilidad genómica dentro de las células tumorales puede resultar en la pérdida de antígenos específicos de tumor (TSA), la pérdida de variantes antigénicas que ya no son detectables por las células T CD8 + específicas de antígeno (Stewart, 2011; Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010)

**III Bloqueo de puntos de control inmunológicos.** Modulación eficaz de las respuestas antitumorales requieren el bloqueo de los reguladores negativos de puntos de control que pueden interrumpir las respuestas de células T efectoras. Sin lugar a dudas, una de las señales reguladoras mejor estudiados es la proteína 4 asociada a CTL (CTLA-4). Otro punto de control inmunológico que contribuye a la evasión inmune del tumor implica las interacciones entre el

receptor de la muerte programada-1 (PD-1) y el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (Stewart, 2011; Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010).

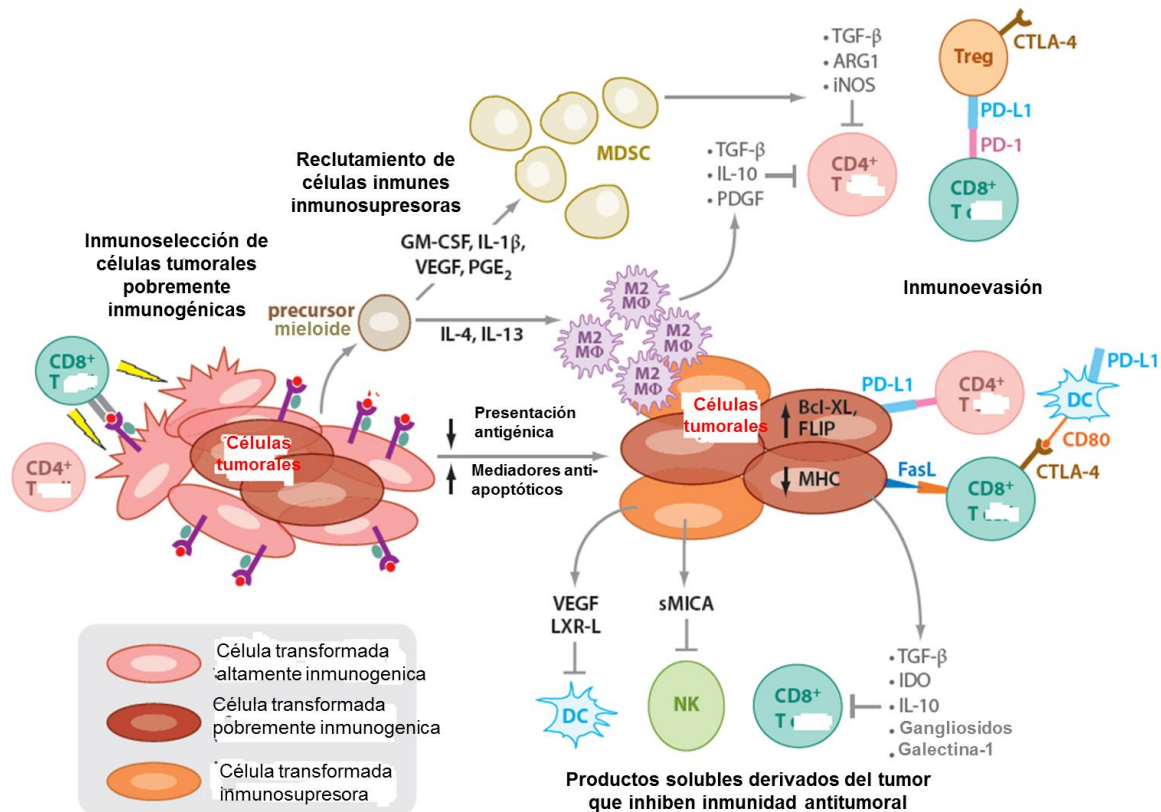
**IV Factores epigenéticos.** Cáncer y muchas otras enfermedades humanas muestran regulación epigenética aberrante. En particular, el epigenoma del cáncer se caracteriza por los cambios globales en la metilación del ADN y los patrones de modificación de las histonas alteradas. Debido a las características típicas, tales como hipometilación del ADN global y la hipermetilación del promotor específico pueden ser observados comúnmente en las neoplasias benignas y tumores en etapa temprana. Se hace evidente que la desregulación epigenética puede preceder a los eventos clásicos preliminares de transformación: mutaciones en supresores tumorales, protooncogenes, o ambos y la inestabilidad genómica (Stewart, 2011; Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010).

**V Alteraciones en la señalización de receptores de muerte celular.** Uno de los mecanismos más controvertidos de escape inmune tumoral implica la expresión de ligandos de los receptores de muerte (por ejemplo, FasL, TRAIL) por las células cancerosas. FasL, una proteína transmembrana de tipo II de la familia de TNF, puede interactuar con su receptor, Fas, y desencadenar una cascada de eventos intracelulares que conducen a la inducción de la muerte celular por apoptosis. FasL se expresa en los linfocitos T activados y desempeña un papel fisiológico en el mantenimiento de la homeostasis de células T y desencadenar respuestas de células T citotóxicas. Además, las células tumorales que son incapaces de evitar la detección de células inmunes pueden desarrollar mecanismos para evadir la muerte. Incluso cuando los antígenos continúan siendo expresados, los tumores pueden evadir los linfocitos efectores por sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas tales como FLIP y Bcl-XL (Stewart, 2011; Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010).

**VI Citocinas inmunosupresoras.** La inhibición simultánea de múltiples etapas en el desarrollo de la inmunidad antitumoral se puede lograr a través de la liberación de citocinas inmunosupresoras por las células tumorales. Por ejemplo, la secreción de TGF- $\beta$  por las células tumorales conduce a la inhibición de la activación de células dendríticas (DC), así como la inhibición directa de células T y la función de las células Natural Killer (NK). Del mismo modo, la IL-10 presente dentro de los tumores puede suprimir la función de DC y respuestas de células T, además de sesgar hacia una respuesta inmune de tipo 2 que es menos eficaz contra las células malignas. Sin embargo, el papel de la IL-10 en la inmunidad tumoral sigue siendo poco clara (Stewart, 2011; Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010).

**VII Inducción de células inmunosupresoras.** Una variedad de leucocitos reguladores inmunosupresores puede suprimir la función inmune, dando lugar al escape tumoral. Células T reguladoras (Treg), en gran medida que expresan CD4, CD25 y Foxp3, inhiben las funciones de CTL, incluyendo la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , y la expresión de PD-L1 y CTLA-4, así como producción de IL-2. Además de células T reguladoras, otras poblaciones de linfocitos reguladores se pueden encontrar en subconjuntos de células NKT y las células B que inhiben las respuestas efectoras contra células transformadas. MDSCs son un grupo heterogéneo de células progenitoras mieloides y células mieloides inmaduras que pueden inhibir la función de los linfocitos por varios mecanismos, incluyendo la producción de citocinas inmunosupresoras (TGF- $\beta$ ). Además de MDSCs, células plasmacitoides en desarrollo (PDC) son reclutadas a la masa tumoral y se convierten en actores clave en la red inmunosupresora. Muchos tumores atraen a los macrófagos asociados al tumor (TAM) por la IL-4 e IL-13. Por otro lado macrófagos M2 pueden inhibir la inmunidad antitumoral a través de la producción de TGF- $\beta$  e IL-10 y pueden promover la angiogénesis a través de la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Stewart, 2011; Rabinovich *et al* 2007; Vesely *et al* 2010).

**VIII Producción de otros factores inmunosupresores.** Otros factores derivados del tumor pueden ser más selectivos en la inhibición de los componentes particulares de la respuesta inmune, pero todavía puede suprimir de forma eficaz la inmunidad. Por ejemplo, la producción del proteoglicano galectina que puede impedir la actividad de las células T y la supervivencia, así como el bloqueo de este factor puede ayudar al rechazo de tumores en ratones. Además de utilizar las citocinas y las lectinas a regular a la baja las respuestas inmunes, los tumores pueden secretar enzimas que metabolizan los aminoácidos dentro del microambiente del tumor. Específicamente, la expresión de IDO por las células tumorales metaboliza triptófano para generar cinureninas e inhibe la proliferación de células T CD8 + y promueve la apoptosis de células T CD4 +. Además, las células tumorales secretan factores que inhiben funciones de las células inmunes efectoras (TGF- $\beta$ , IL-10, el VEGF, LXR-L, gangliósidos, o secuencia de polipéptidos relacionados con MHC de clase I A (MICA soluble))(Finn, 2008; Vesely *et al* 2011; Rabinovich *et al* 2007).



**Figura 7. Los tumores desarrollan mecanismos para inhibir la inmunidad por medios intrínsecos y extrínsecos.** Alteraciones dentro de las células tumorales evaden la inmunidad por la regulación negativa de la presentación de antígenos, sobrerregulación de inhibidores de la apoptosis ( Bcl - XL , FLIP ), o expresando moléculas inhibitorias que eliminan las células T citotóxicas ( PD - L1 , FasL). Además, secretan factores que inhiben las funciones de células efectoras (TGF -  $\beta$ , IL - 10, el VEGF , LXR -L, IDO, gangliósidos, o MICA soluble) o bien reclutar células reguladoras para generar un microambiente inmunosupresor (IL - 4, IL - 13, GM-CSF, IL - 1 $\beta$ , el VEGF, o la PGE2). Las células reguladoras atenúan la inmunidad antitumoral a través de la liberación de citocinas como IL - 4 e IL - 13 que conducen al reclutamiento de los macrófagos M2 desde precursores mieloides , que expresan TGF -  $\beta$ , IL - 10, y PDGF que inhiben las células T . La liberación de GM-CSF , IL - 1 $\beta$ , VEGF , o PGE2 por células tumorales resulta en la acumulación de MDSCs que pueden bloquear la función de las células T mediante la expresión de TGF -  $\beta$ , ARG1, y la iNOS . Tomado de Vesely *et al* 2010.



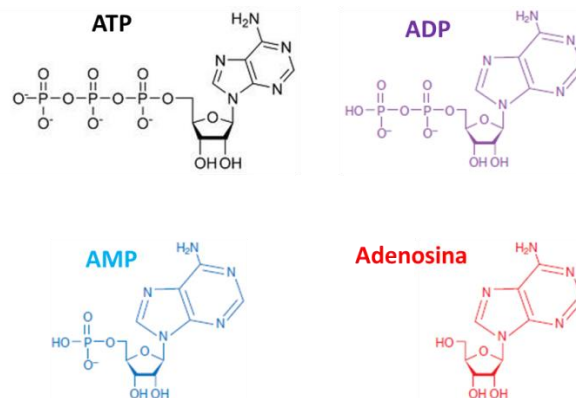
Otro mecanismo inmunosupresor, recientemente propuesto, es la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular la cual está presente en concentraciones inmunosupresoras dentro del microambiente tumoral y puede ser un factor importante en la evasión inmune por las células tumorales (Blay *et al* 1997).

## Vía Adenosinérgica

La adenosina está implicada en una amplia variedad de funciones biológicas básicas, incluyendo la biosíntesis de nucleótidos o el metabolismo de la energía celular (Eltzschig Holger K, 2010). En el exterior de la célula, la adenosina sirve principalmente como una molécula de señalización y sus funciones biológicas ocurren a través de la activación de los receptores de adenosina (ARS) localizados en la superficie extracelular de las membranas celulares.

La adenosina se forma por el metabolismo del ATP y se acumula en el microambiente tumoral mediante una combinación de procesos. Por ejemplo, la adenosina es exportada de la célula por diversas proteínas de transporte de nucleósidos. La adenosina puede atravesar la membrana celular a través de los transportadores de nucleósidos de concentración o de equilibrio. Transportadores de nucleósidos de equilibrio (ENT) por sus siglas en inglés 1 y 2 son funcionalmente los transportadores de adenosina más relevantes (Eltzschig *et al*, 2005; Loffler *et al*, 2007). ENT representan canales que permiten que la adenosina cruce libremente la membrana celular después de un gradiente de concentración. En condiciones fisiológicas, las diferencias entre las concentraciones de adenosina intra o extracelular son muy pequeñas (Loffler *et al* 2007). El flujo de salida de adenosina se observa en lesión tisular, necrosis e isquemia y por tanto, puede ser una fuente importante de este nucleósido extracelular en tumores sólidos (Zhang, 2010; Sitkovsky *et al* 2008).

Sin embargo, durante condiciones de estrés celular (inflamación, hipoxia, lesión aguda), la adenosina extracelular se deriva de la hidrólisis de sus moléculas precursoras, 5'-trifosfato de adenosina (ATP), 5'-difosfato de adenosina (ADP) o 5'-monofosfato de adenosina (AMP). Estas moléculas (llamadas nucleótidos) consisten en el nucleósido adenosina, unido a un número variable de fosfoésteres ligados al átomo 5' de su anillo de azúcar ribosa (**Fig. 8**) (Eltzschig Holger K, 2010).



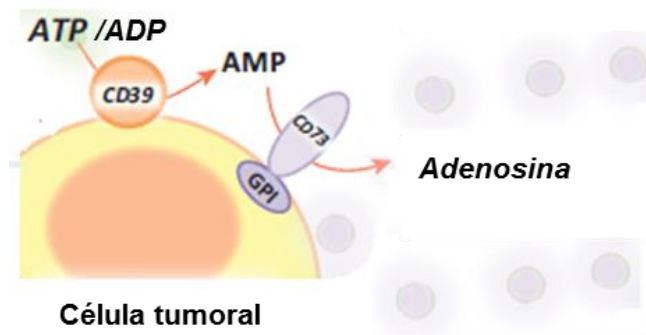
**Figura 8. Estructuras químicas de adenosina , 5'-monofosfato de adenosina (AMP), 5'-difosfato de adenosina (ADP) y 5'-trifosfato de adenosina (ATP).** Tomado y modificado de Bauerle *et al* 2011.

## Producción de adenosina por CD39/CD73.

En ausencia de enzimas catalíticas capaces de hidrolizar los nucleótidos extracelulares ATP, ADP y AMP, estos serían relativamente estables. Sin embargo, la mayoría de los tipos celulares expresan enzimas en su superficie celular que catalizan la fosfohidrólisis de nucleótidos (Eltzschig Holger K, 2010). Este evento es controlado por la acción de ectonucleotidasas, incluidos los miembros de las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas, ecto-ATPasas, ectoapirrasas, EC 3.6.1.5), ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasas (E-NPP, EC 3.1.4.1), ectoalcalina fosfatasa (ALP, EC 3.1.3.1), y la ecto-5-nucleotidasa/CD73 (ecto-5-NT/CD73, EC 3.1.3.5), que de manera eficiente hidrolizan ATP, ADP y AMP en adenosina (Scussel *et al* 2012).

La vía dominante que conduce a la producción de adenosina extracelular es por la defosforilación de ATP (o ADP) por las enzimas ectonucleotidasas llamadas: CD39 (*ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1* – Entpd1) y CD73 (*ecto-5-nucleotidasa-Nt5e*). CD39 hidroliza ATP y ADP hacia AMP, el cual es hidrolizado hacia adenosina por CD73 (**Fig. 9**). La conversión de ATP hacia AMP por CD39 es reversible por la acción de cinasas extracelulares como la adenilato cinasa. En contraste, la conversión de AMP hacia adenosina por CD73 es reversible solamente después del transporte de adenosina hacia células donde ésta puede ser convertida hacia AMP por adenosina cinasa (Ghiringhelli *et al* 2012; Beavis *et al* 2012; Allard *et al* 2012). Este proceso se produce en una reacción de tres pasos:

Como primer paso, varios tipos de células liberan nucleótidos intracelulares almacenados, particularmente en forma de ATP y ADP (Eltzschig, 2009). Es importante señalar que los niveles intracelulares de ATP son muy altos (5-8 mmolar) y la liberación de nucleótidos desde fuentes intracelulares puede ocurrir durante el daño celular o la muerte (lisis, necrosis, apoptosis, etc.) (Chen Y *et al* 2006). Plaquetas activadas las cuales liberan ADP desde vesículas intracelulares almacenadas a través de la liberación granular proporcionan una fuente adicional de nucleótidos extracelulares (Weissmuller *et al* 2008). Como segundo paso CD39 hidroliza ATP y ADP a sus respectivos nucleótidos (Robson *et al* 2005). Como tercer y último paso de generación de adenosina extracelular, la CD73 hidroliza nucleótidos de monofosfato extracelulares hacia nucleósidos intermedios bioactivos, metabolizando AMP hacia adenosina (Colgan *et al* 2006; Resta y Thompson, 1997). Los niveles de adenosina son controlados por la enzima Adenosina Deaminasa (ADA) la cual convierte adenosina hacia inosina. ADA se puede unir a CD26, la cual reduce la concentración local de adenosina sobre la superficie celular y evita la unión entre adenosina y sus receptores (Saldanha-Araujo *et al* 2011).



**Figura 9. Representación de generación de adenosina extracelular a través de hidrólisis enzimática.** En la imagen se representa la actividad de CD39 y CD73 para dar lugar a la adenosina mediante la degradación de nucleótidos extracelulares. **Tomado y modificado de Dwyer, 2007.**



### **CD39 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1 – Entpd1).**

CD39 es una proteína integral de membrana, la cual fosfohidroliza ATP y ADP eficientemente, en una manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para producir AMP. CD39 humana es una proteína de 510 aminoácidos con siete sitios de glicosilación ligados a N, 11 residuos de cisteína, y dos regiones transmembrana. Estructuralmente, es caracterizada por dos dominios transmembrana, un pequeño dominio citoplasmático que comprende los segmentos NH<sub>2</sub> y COOH terminal y un largo dominio hidrofóbico extracelular, el cual incluye 5 dominios altamente conservados, conocidos como regiones apirasa los cuales son el pivote para la actividad catabólica de la enzima. CD39 llega a ser catalíticamente activa sobre la membrana celular y su glucosilación es crucial para el plegamiento correcto de la proteína, enfoque hacia la membrana y actividad enzimática (Antonioli *et al* 2013).

CD39 degrada ATP y ADP producida por plaquetas activadas y por lo tanto inhibe la generación de trombos y puede actuar sobre angiogenesis tumoral por esta vía. CD39 junto con CD73 regulan negativamente los efectos proinflamatorios del ATP extracelular, ya que el ATP liberado por células dañadas, estresadas o muertas y bacterias, promueve el reclutamiento de fagocitos activando al receptor P2X7, un coactivador del inflammasoma NLRP3, lo cual dispara la producción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1 $\beta$  y IL 18 (Allard *et al* 2012; Stagg and Smyth, 2010). La ectoenzima CD39 está expresada sobre células endoteliales y sobre muchos tipos de células hematopoyéticas activadas como células B, células NK y subtipos de células T activadas, así como monocitos/macrófagos y células dendríticas, además de T reguladoras y células estromales mesenquimales (Saldña-Araujo *et al* 2011). La expresión de CD39 sobre leucocitos es indispensable para la generación de adenosina y consecuentemente dictar sus funciones inmunosupresoras (Ghiringhelli *et al* 2012; Scussel *et al* 2012; Deaglio *et al* 2007).

### **CD73 (ecto-5-nucleotidasa-Nt5e).**

CD73 es una nucleotidasa vinculada a proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) presente en los rafts de lípidos de membrana de las células, estando activa como un homodímero unido por disulfuro, de 70 Kilodaltones (kDa). Una forma soluble de CD73 puede ser desprendida desde la membrana a través de escisión proteolítica o hidrólisis de GPI por fosfolipasas específicas. La forma madura de CD73 consiste de 548 aminoácidos. El dominio N-terminal coordina la unión de dos iones metálicos divalentes catalíticos, mientras que el dominio C-terminal proporciona el bolsillo de unión de AMP (Antonioli *et al* 2013). CD73 se considera la enzima limitante en la generación de adenosina extracelular, catalizando la desfosforilación de monofosfatos ribo y desoxirribonucleósidos de purina y pirimidina a los nucleósidos correspondientes. Esta molécula particular impulsa la conversión de AMP en adenosina (Allard *et al* 2012; Colgan *et al* 2006).

Este antígeno fue definido inicialmente como de diferenciación de linfocitos, se ha reportado que actúa como una molécula de señalización de cooperación en los linfocitos T (Resta and Thompson, 1997; Dianzani *et al* 1993; Massaia *et al* 1990) y como una molécula de adhesión que se requiere para la unión de linfocitos al endotelio. Está vinculada con el control de una variedad de respuestas fisiológicas, incluyendo transporte de fluidos e iones epiteliales, el preconditionamiento isquémico, lesión de los tejidos, la función plaquetaria, fuga vascular, función de barrera vascular, restricción de la migración de linfocitos a los ganglios linfáticos y estimulación de la hidratación de la mucosa (Colgan *et al* 2006). También se ha demostrado que participa en interacciones célula-célula y célula-matriz; está implicada en la resistencia a las drogas, la promoción de tumores (Airas *et al* 1995) y suprime las respuestas pro-inflamatorias en células endoteliales humanas (Grünewald and Ridley, 2010). Se expresa en algunas células

del sistema inmune, tales como células B activadas, células T CD4+, CD8+, T reguladoras, pero no en células T vírgenes, células NK, células dendríticas foliculares, macrófagos, monocitos, células endoteliales, células epiteliales, y fibroblastos (Ghiringhelli *et al* 2012; Allard *et al* 2012; Scussel *et al*, 2012; Deaglio *et al* 2007; Colgan *et al* 2006).

### Expresión y función de CD39/CD73 en cáncer.

Distintas evidencias sugieren que las interacciones entre células tumorales y su microambiente son esenciales para la generación del tumor. Dentro del medio neoplásico, células cancerosas e inmunes interactúan para generar un ambiente inmunosupresor por incremento de factores inmunomodulatorios los cuales contribuyen al crecimiento tumoral.

Muchos estudios se han realizado en animales deficientes de CD39 o CD73 en las células cancerosas y en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, y su expresión se ha observado en muchos tipos histológicos de cáncer humano, tales como el cáncer de melanoma, mama, cáncer de colon, glioma, leucemia, gástrico, cáncer de cabeza y cuello, entre otros (**Cuadro 2**), además de exosomas de células cancerosas. El papel de la expresión de estas enzimas en células de cáncer sigue siendo en gran parte poco clara (Beavis *et al* 2012).

TIPO DE CÁNCER	N°de líneas o pacientes		EXPRESIÓN	AUTOR
	CD39	CD73		
Cáncer de mama (2 estudios)		5/9 y	Líneas celulares ER-	Spychala <i>et al</i> , 2004
		13/30.	Muestras de pacientes	Leth-Larsen <i>et al</i> , 2009
Leucemia (2 estudios)	299/299	97/299 y	Células neoplásicas CD19+	Serra <i>et al</i> , 2011
		1/1.	Células tumorales	Mikhailov <i>et al</i> , 2008
Glioma		1/1.	Línea celular U138MG	Babaresco <i>et al</i> , 2011
Glioblastoma		158/165	Muestras de tejidos	Ludwig <i>et al</i> , 1999
Melanoma		7/7.	Líneas celulares	Sadej <i>et al</i> , 2006
Cáncer de ovario (2 estudios)	34/36	33/36	Líneas celulares	Hausler <i>et al</i> , 2011
			Células tumorales	Cho <i>et al</i> , 2006
Cáncer de tiroides		3/3.	Muestras de pacientes	Kondo <i>et al</i> , 2006
Cáncer de esófago		4/4.	Líneas celulares	Fukuda <i>et al</i> , 2004
Cáncer gástrico		15 <sup>a</sup>	Muestras de tejidos	Durak <i>et al</i> , 1994
Cáncer de colon		38 <sup>a</sup>	Muestras de tejidos	Eroglu <i>et al</i> , 2000
Cáncer de próstata		1/2.	Líneas celulares	Hastie <i>et al</i> , 2005
Cáncer de cabeza y cuello		33 <sup>a</sup>	Muestras de pacientes	Mandapathil <i>et al</i> , 2009
Exosomas de cáncer	3/3.	3/3.	Líneas celulares (próstata, vejiga y colon)	Clayton <i>et al</i> , 2011.
Cáncer de vejiga		2/2.	Líneas celulares	Stella <i>et al</i> , 2009.
Cáncer cervical		9/10.	Líneas celulares HPV (+) y (-)	Avila Ibarra, 2011 y Titla Vilchis, 2012

**Cuadro 2.** Expresión de CD39 y CD73 en cánceres humanos.

Sin embargo, varios estudios han señalado la tarea crítica llevada a cabo por CD39 y CD73 en la generación de este entorno inmunosupresor, caracterizado por el aumento de los niveles de adenosina, que promueve el desarrollo y progresión del cáncer (**Fig. 10**). Observaciones de la alta expresión y actividad de estas enzimas en varios tumores sólidos y líquidos (**Cuadro 3**) sugieren papeles para la promoción de crecimiento tumoral e infiltración.

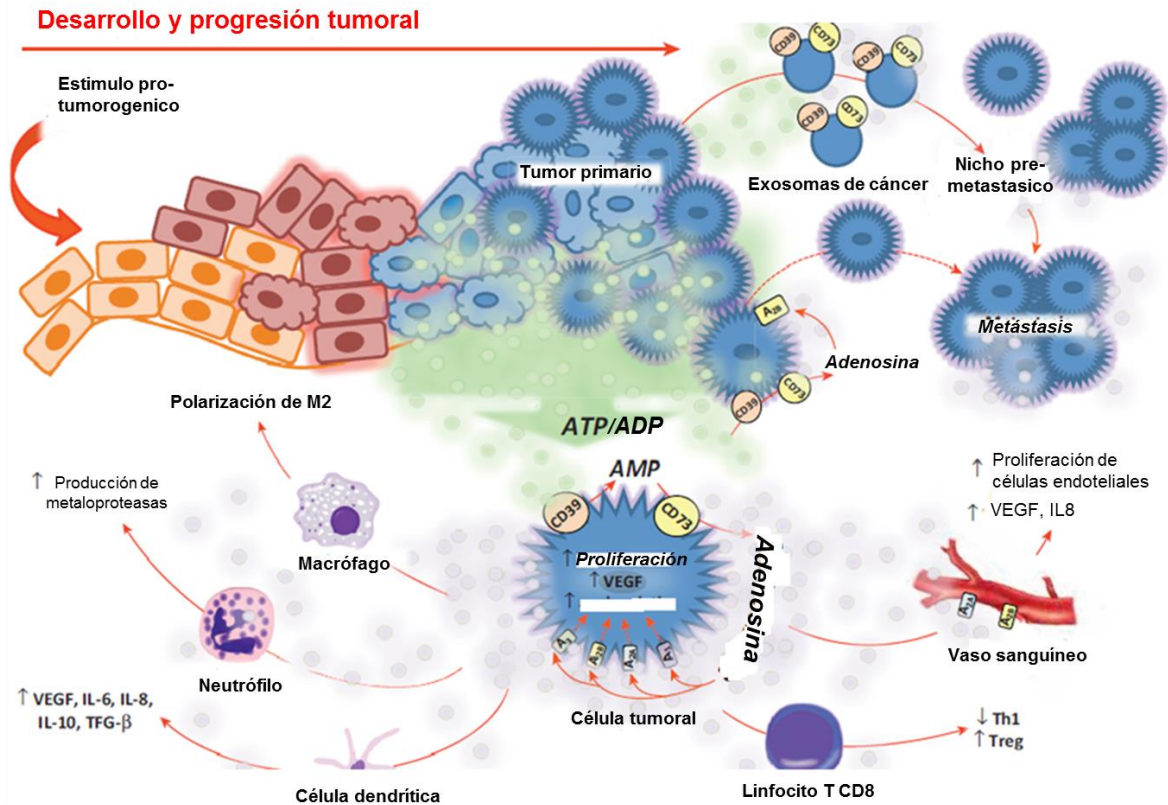
Tipo de Cáncer	Expresión y actividad de CD39/CD73
<b>Tumor sólido</b>	
Glioma	Incremento de RNAm en CD73
Cabeza y cuello	Incremento en la expresión y actividad de CD39 y CD73 en Tregs
Melanoma	Incremento en la expresión de CD73 esta asociado con un alto fenotipo invasivo Incremento en la expresión de CD39 esta relacionado con la diferenciación de melanocitos a células malignas
Tiroides	Incremento en la expresión de CD73
Mama	Incremento de RNAm , niveles de proteínas y actividad enzimática en CD73 Participación e CD73 en crecimiento y progresión tumoral
Páncreas	Incremento de RNAm en CD39
Hígado	Expresión de CD39 sobre Tregs facilita crecimiento hepático de melanoma metastásico
Colon	Incremento en la expresión de CD73
Vejiga	Incremento en la expresión de CD73
Ovario	Incremento en la expresión de CD39 y CD73
Próstata	Actividad de CD73 promueve crecimiento tumoral y metastasis
<b>Tumor líquido</b>	
Leucemia	Incremento en la expresión y actividad de CD39
Linfoma	Incremento en la expresión y actividad de CD39 en Linfocitos TCD4+ y CD8+

**Cuadro 3. CD39 y CD73 en tumores líquidos y sólidos. Tomado y modificado de Antonioli *et al* 2013.**

El complejo CD39/CD73 participa en el proceso de inmunoescape tumoral, por inhibición de la activación, expansión clonal y migración de células T específicas a tumor (en particular T citotóxicas), alterando la eliminación de células tumorales por CTL, dictando la generación de adenosina, un componente sustancial de las capacidades supresoras de Treg y TH17, mejorando la conversión de macrófagos tipo 1 hacia macrófagos tipo 2 promoviendo el tumor. Células supresoras de origen mieloide (MDSCs), también promueven el crecimiento tumoral por un mecanismo mediado por CD39. Además la expresión de CD39/CD73 en exosomas de cáncer también puede elevar los niveles de adenosina en el microambiente tumoral, inhibiendo de este modo respuestas de células T (**Fig. 10**) (Antonioli *et al* 2013).

La expresión de la molécula CD73 sobre tumores puede ser regulada por la presión selectiva ejercida por el sistema inmune, debido a que los tumores positivos a CD73 están mejor equipados para suprimir las respuestas inmunes antitumorales. Sin embargo el microambiente tumoral contiene factores que regulan la expresión de CD73. El más altamente definido de estos es la hipoxia, debido al factor inducible a hipoxia (HIF), además, algunos factores solubles encontrados en el microambiente tumoral han sido implicados en la sobrerregulación de CD73, incluyendo los IFN tipo I (Niemela *et al* 2004), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , la prostaglandina E2 (PGE2), el TGF- $\beta$ , la IL-6 y agonistas de la vía de señalización de wnt también podrían regular positivamente la expresión ectonucleotidasa, mientras que IFN- $\gamma$  e IL-4 se ha demostrado que regulan a la baja la expresión de CD73 (Ghiringhelli *et al* 2012; Beavis *et al* 2012). De manera interesante, en linfocitos, la expresión de CD73 mediada por TGF- $\beta$  es antagonizada por citocinas TH1 y TH2, sugiriendo una relación recíproca entre la respuesta antitumoral y citocinas proinflamatorias inhibiendo la expresión de CD73 (Regateiro *et al* 2011). Por otro lado también se ha demostrado que en líneas celulares de cáncer de mama la pérdida del receptor de estrógeno (ER) induce la expresión de CD73 (Spsychala *et al* 2004).

La expresión de CD39 es regulada por importantes citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo y la hipoxia a través de los factores de transcripción SP1, Stat 3 y factor de transcripción 1 independiente del factor de crecimiento de zinc (Antonioli *et al* 2013).



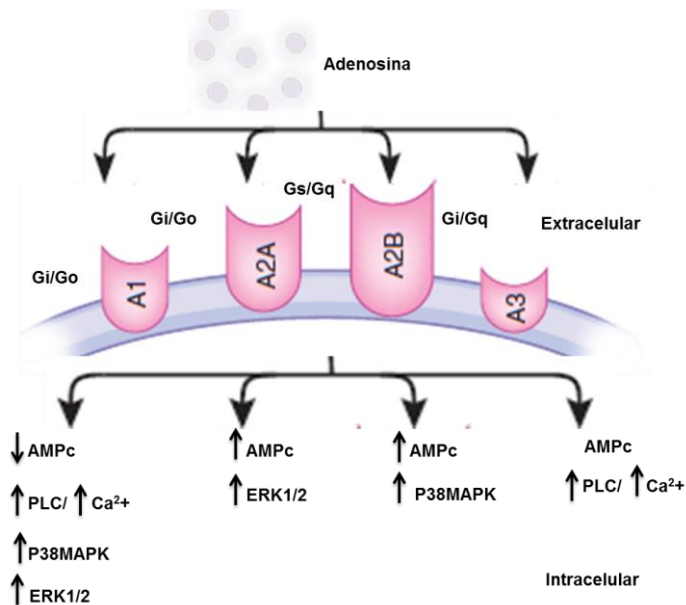
**Figura 10. El complejo CD39/CD73 en el desarrollo y progresión tumoral.** Dentro del ambiente tumoral, ATP es incrementado y convertido hacia adenosina por CD39 y CD73. La adenosina promueve crecimiento tumoral por estas ectonucleotidasas expresadas en células tumorales o exosomas de cáncer generando un ambiente inmunosupresor inhibiendo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células T. **Tomado de Antonioli et al 2013.**

## Efecto supresor de adenosina

La adenosina está constitutivamente presente en los medios extracelulares en una concentración muy baja, pero su concentración aumenta en muchas condiciones metabólicamente estresantes, en particular en el microambiente tumoral (Ghiringhelli *et al* 2012). La adenosina inhibe de forma potente una amplia gama de respuestas de los linfocitos T a la estimulación antigénica, incluyendo proliferación celular (Hoskin *et al* 2002; Huang *et al*, 1997), síntesis de IL-2 y citocinas proinflamatorias como el interferón- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Lappas *et al* 2005; Butler *et al* 2003; Raskovalova *et al* 2005), la sobreexpresión de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2) (Huang *et al* 1997; Butler *et al* 2003), la expresión de moléculas efectoras citotóxicas como perforinas y Fas ligando (Hoskin *et al* 2002; Koshiba *et al* 1997), la adhesión de LTC a las células diana del tumor (MacKenzie *et al* 1994, 2002) y la exocitosis de gránulos por LTC (Koshiba *et al* 1997). También inhibe algunos de los primeros pasos en la activación de las células T asociada con señales de transducción mediante los receptores de las células T y de moléculas coestimuladoras como CD28 (Ohta *et al* 2006). Las bajas concentraciones micromolares de adenosina, inhiben la fosforilación inducida por el receptor de las células T CD3 y CD28 de los residuos de tirosina en proteínas intracelulares de las células T de ratón, proteínas tirosina cinasas p56lck y ZAP-70, que son componentes esenciales de la vía de transducción de señales del receptor de las células T (Mustelin and Taskén, 2003).

La adenosina extracelular induce sus potentes efectos inmunosupresores vía cuatro receptores (ARs, por sus siglas en inglés), específicos bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3 (Fredholm *et al* 2001; Linden *et al* 2001). Los ARs tienen siete dominios transmembrana que abarcan y se acoplan a proteínas de unión GTP intracelulares (Proteínas G), utilizando AMP cíclico intracelular (AMPc) como segundo mensajero (Haskó *et al* 2008). El receptor A1 de alta afinidad y el receptor A3 de baja afinidad están acoplados a proteínas Gi. Los receptores A2 se subdividen en A2A de alta afinidad y A2B de baja afinidad, los cuales están acoplados a proteínas Gs (**Fig. 11**) (Linden, 2001; Thiel *et al* 2003; Sitkovsky, 2003, 2008).

Receptores A1 y A3 inducen una disminución de AMPc intracelular, mientras que los receptores A2A y A2B inducen la activación de la adenilato ciclasa que resulta en aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Receptores A1 y A3 también inducen la activación de fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) y la proteína cinasa C (PKC) (Ghiringhelli *et al* 2012). Los cuatro receptores de adenosina se han asociado con la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y las vías de la proteína cinasa C (PKC) (Allard *et al* 2012). A bajas concentraciones de adenosina, A1, A2A y A3 están involucrados en la señalización, mientras que a concentraciones altas, como los observados en el microambiente tumoral, el receptor A2B está implicado en la señalización. Debido a que los receptores de adenosina se expresan ampliamente, la adenosina puede influir en células del sistema inmune, cáncerosas y células endoteliales (Ghiringhelli *et al* 2012).

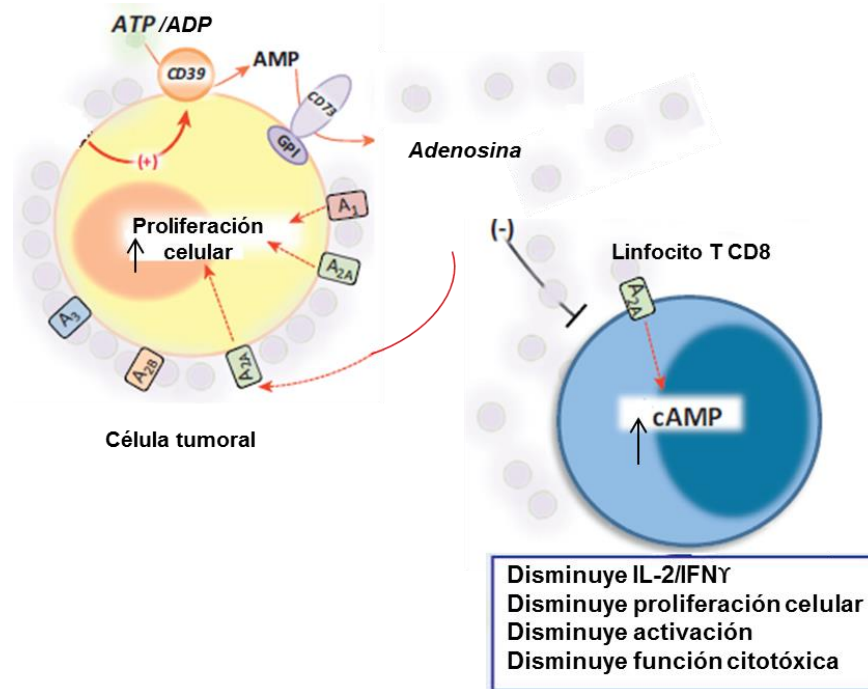


**Figura 11. Vías de segundos mensajeros acopladas a los subtipos de receptores de adenosina.** La adenosina extracelular se puede unir a cuatro diferentes receptores acoplados a proteínas G, estructuras que estimulan (A2AR y A2BR) o inhiben (A1R y A3R) la actividad de la adenilato ciclasa. La estimulación de A1R y A3R puede también activar la fosfolipasa C (PLC) con el lanzamiento consecutivo de Ca<sup>2+</sup> desde depósitos intracelulares. Además, todos los receptores de adenosina se acoplan a las vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo señales de vías extracelulares reguladas por cinasa (ERK) 1/2 y p38 MAPK). **Tomado de Hoskin *et al* 2008.**

Tomando en cuenta las diferentes afinidades entre la adenosina y sus ARs, y el hecho de que estos se expresan diferencialmente en función del tipo de célula, la adenosina tiene la capacidad de actuar de forma variable en las células inmunes. La adenosina tiene un gran impacto directamente en subconjuntos de células T. La señalización a través del TCR (receptor de células T) provoca un rápido aumento en los niveles de mRNA del receptor A2A, que se



correlaciona con un aumento significativo en la acumulación de cAMP en estas células. *In vitro*, el reconocimiento de antígenos en el contexto de la activación del receptor A2A por agonistas específicos induce anergia de células T, incluso en la presencia de la coestimulación como la activación de CD28. Células T estimuladas inicialmente en presencia de un agonista del receptor A2A también fallan para proliferar y para producir IL-2 e IFN- $\gamma$  después de la reestimulación (**Fig. 12**). El acoplamiento de un receptor A2A *in vivo* inhibe la expresión de IL-6, mientras que mejora de la producción de TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  en la ausencia de IL-6 promueve la diferenciación de células T vírgenes en células Treg. Por consiguiente, el tratamiento de ratones con agonistas de adenosina no sólo inhibe la generación de células Th1 efectoras sino que también promueve la generación de células T reguladoras. La exposición a la adenosina durante la activación de células T promueve anergia de células T y la inducción de células T reguladoras, que conducen a una respuesta inmune antitumoral deteriorada drástica (Ghiringhelli *et al* 2012).



**Figura 12. Mecanismo inmunosupresor de células tumorales mediante la vía adenosinergica (CD39/CD73/Adenosina).** Representación de la inhibición de un linfocito T CD8 efector mediante el incremento del AMPc por la señalización del receptor A2A de la adenosina la cual es generada a partir de la hidrólisis enzimática de CD39 y CD73 ancladas en la superficie de una célula tumoral. **Tomado y modificado de Sitkovsky *et al* 2008; Zhang, 2010; Antonioli *et al* 2013.**

La adenosina también puede afectar el crecimiento de las células cancerosas a través de la unión directa de sus receptores específicos expresados en la superficie celular de las células tumorales, ya que algunos informes mencionan que la adenosina también podría inducir la muerte de células cancerosas o inhibir su proliferación celular (Gessi *et al* 2004). (**Fig. 11**). Particularmente, AR1 está involucrado principalmente en la proliferación celular tumoral e induce la activación del ciclo celular, ya que podría inhibir p27, una molécula que promueve la senescencia y la proliferación. AR3 se expresa en muchos tipos de cáncer y parece que se sobreexpresa en células tumorales en comparación con las células normales. El principal efecto de la activación del receptor A3 es promover la angiogénesis. La adenosina, de una manera dependiente de A3, aumenta (HIF-1 $\alpha$ ) en respuesta a la hipoxia en el melanoma humano, glioblastoma, y las células de cáncer de colon. La adenosina también media la producción de

VEGF y angiopoyetina por las células tumorales de una manera dependiente de A3. Algunos trabajos también han demostrado que en leucemia linfocítica crónica humana (CLL), mieloma y las células de melanoma expresan AR2A. La activación de estos receptores podría modular la respuesta a la quimioterapia. El receptor A2A también aumenta la producción de eritropoyetina (EPO) en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

### Bloqueo del mecanismo inmunosupresor CD39/CD73/Adenosina

En el supuesto de que la producción de adenosina promueva la proliferación tumoral, la neoangiogénesis y directamente inhibe células T efectoras antitumorales, y que las ectonucleotidasas son altamente expresadas en las células tumorales y células inmunosupresoras, debe ser de gran interés inhibir los ARS en linfocitos T, o la producción de adenosina por las ectonucleotidasas CD39/CD73 en células tumorales para promover la respuesta antitumoral.

Recientemente se han ideado algunos sistemas para contrarrestar el efecto inmunosupresor de la vía adenosinérgica en tumores, por ejemplo la inhibición de la actividad de CD39 por polyoxometalato1 (POM-1), un inhibidor farmacológico de la actividad nucleósido trifosfato difosfohidrolasa, disminuyó el crecimiento del tumor de melanoma en ratones normales, pero no en los animales deficientes del gen CD39 (Wang *et al* 2009), lo que indica un efecto específico de POM-1 sobre CD39. Por otro lado, la inhibición de CD73 se ha estudiado más a fondo. Un anticuerpo de bloqueo específico suprimió el crecimiento de tumores de próstata e inhibió el desarrollo de metástasis de pulmón (Stagg *et al* 2012). Además, el inhibidor adenosina 5'-  $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) también afectó el crecimiento tumoral de ovario y la formación de metástasis de pulmón. Por otro lado se ha empleado el uso de antagonistas del receptor A2A como la cafeína, lo que ha permitido la reactivación de la actividad funcional de linfocitos T efectores y la disminución del tamaño tumoral (Ohta *et al* 2006). Los antagonistas de los receptores de adenosina, incluida la cafeína, mejoran la inhibición del crecimiento tumoral por los linfocitos T, permitiendo una reducción de la metástasis y previenen la angiogenia tumoral. La cafeína puede bloquear de forma dependiente de la dosis los efectos del autoceide adenosina, incluidos los que se producen en las células cancerosas que también tienen receptores de adenosina (**Cuadro 4**). Por el momento los receptores de adenosina de las células cancerosas no se han considerado una diana para el desarrollo de fármacos anticancerosos. Sin embargo, hay evidencias de que los receptores de adenosina de las células del sistema inmune pueden ser una buena diana terapéutica al menos en ciertos tipos de cáncer (Franco *et al* 2008), lo cual sugiere que el uso de antagonistas del receptor A2A y/o el bloqueo de la generación de adenosina a través de la inhibición de las ectoenzimas CD39 y CD73, puede ser de gran relevancia para revertir el efecto inmunosupresor en el microambiente tumoral.

Concentración de Cafeina	Efecto Celular
1-30 $\mu$ M	Bloqueo de los receptores de Adenosina A1, A2A y A2B
20-300 $\mu$ M	Bloqueo del receptor de Adenosina A3 e inhibición de la fosfodiesterasa de AMPc
40-700 $\mu$ M	Bloqueo de los receptores GABA <sub>A</sub>
100-3000 $\mu$ M	Liberación de calcio del reticulo endoplasmico

**Cuadro 4. 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. (Tomado y modificado de Fredholm *et al* 1999).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la tercera causa de muerte por tumores malignos entre las mujeres de todo el mundo con medio millón de nuevos casos y cerca de 300.000 muertes cada año y en México es una de las principales causas de muerte y cada año se diagnostican alrededor de 12,000 casos nuevos de CaCu invasor (INEGI, 2010; Muñoz *et al* 2002). Actualmente, es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es cercano al 100% atribuible a la infección por el virus de papiloma humano (HPV) (Bosch *et al* 2002), siendo la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo (Herman and Baylin, 2003). La persistencia de la infección por HPV de alto riesgo y la deficiente respuesta inmune para eliminar a las células infectadas en sus etapas iniciales juega un papel muy importante (Bellone *et al* 2009).

Se ha reportado que durante el desarrollo de la neoplasia cervical, varios factores inmunosupresores pueden intervenir para evitar la respuesta inmune celular de manera eficiente, ya que las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T antitumorales (Tindle, 2002). Un mecanismo inmunosupresor recientemente propuesto es la vía adenosinérgica, el cual a través de la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina mediada por las ectonucleotidasas ectoapirasa (CD39) y 5'-ectonucleotidasa (CD73), produce adenosina extracelular cuya función es la de inhibir varios mecanismos que conducen a la activación y a la función efectora de linfocitos T citotóxicos (Blay *et al* 1997; Thompson *et al* 2004; Ohta *et al* 2006).

La expresión de CD39 y/o CD73 en células tumorales, ha sido reportada en varios tipos de cáncer, incluyendo: cáncer de vejiga (Stella *et al* 2009), leucemia (Mikhailov *et al* 2008), glioma (Bavaresco *et al* 2008), glioblastoma (Ludwing *et al* 1999), melanoma (Sadej *et al* 2006), cáncer de ovario (Cho *et al* 2006), tiroides (Kondo *et al* 2006), esófago (Fukuda *et al* 2004), próstata (Hastie *et al* 2005) y mama (Spychala *et al* 2004; Wang *et al* 2008). Asimismo, la expresión de CD39 actúa sobre la angiogenesis tumoral; mientras que CD73 ha sido asociada fuertemente con un fenotipo prometastásico en melanoma y cáncer de mama, y recientemente se ha reportado que la terapia con anti-CD73 inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis en cáncer de mama, sugiriendo entonces que la expresión de estas moléculas en tumores tiene un papel relevante en la progresión e invasión tumoral (Stagg *et al* 2010; Jin *et al* 2010).

Nuestro grupo de trabajo ha detectado en diferentes líneas celulares de CaCu positivas y negativas a la infección por HPV, la presencia de la ectoenzima CD73. Asimismo hemos determinado la capacidad de estas células para generar adenosina a partir de AMP y el efecto inhibitorio de la adenosina generada sobre la proliferación de linfocitos T (Titla-Vilchis, 2012; Avila-Ibarra, 2011), sugiriendo que la vía adenosinérgica puede tener un papel muy importante en las células de CaCu para ejercer un efecto inmunosupresor sobre la respuesta inmune. En el presente trabajo se realizó con la finalidad de analizar la expresión y actividad funcional de las ectoenzimas CD39 y CD73 para generar adenosina a partir de nucleótidos ADP y AMP; así como el de analizar la actividad inmunosupresora de la adenosina generada, sobre la proliferación, activación y función efectora de linfocitos T. Los resultados de este trabajo de investigación, resaltan la importancia de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina) en las células tumorales de CaCu para inhibir la respuesta inmune mediada por linfocitos T.



## **HIPÓTESIS**

Recientemente se ha reportado que la vía adenosinérgica, constituida por la expresión conjunta de las ectoenzimas CD39/CD73 y la producción de adenosina, es uno de los mecanismos importantes de inmunosupresión ejercido por células tumorales de diferentes tipos histológicos sobre la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos (CTL). En estudios previos hemos encontrado que células tumorales de cáncer cérvico-uterino (CaCu) son capaces de generar adenosina cuando son incubadas en presencia de nucleótidos como AMP. En consecuencia, se espera que si las células de CaCu expresan ambas ectoenzimas (CD39/CD73) en membrana, sean capaces de generar adenosina a partir de los nucleótidos ADP y AMP, y que ésta sea capaz de suprimir la proliferación, activación y función efectora de linfocitos T CD8+.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General.**

Analizar la actividad inmunosupresora de células tumorales de cáncer cérvico-uterino a través de la vía adenosinérgica mediada por CD39-CD73-adenosina.

### **Objetivos Particulares.**

- 1.- Analizar la expresión de las ectoenzimas CD39/CD73 en células tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino.
- 2.- Analizar la actividad funcional de las ectoenzimas CD39/CD73 en células tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino.
- 3.- Determinar la actividad inmunosupresora de células tumorales de cáncer cérvico-uterino sobre la proliferación y activación de linfocitos T a través de la vía adenosinérgica.
- 4.- Determinar la actividad inmunosupresora de células tumorales de cáncer cérvico-uterino sobre la función efectora de linfocitos T citotóxicos específicos a través de la vía adenosinérgica.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Líneas celulares.**

Las línea celular tumoral derivada de cáncer de cuello uterino HeLa derivada de un carcinoma epiteloides (adenocarcinoma, HPV-18) fue utilizada en este trabajo para determinar la expresión de las moléculas CD39 y CD73 en membrana celular, así como su actividad funcional mediante la generación de adenosina. Como control negativo para la expresión de CD73, se utilizó una línea celular de linfocitos T de leucemia, Jurkat (Resta, 1997). Como células blanco en el ensayo de citotoxicidad, se utilizó la línea celular linfoblástica denominada T2 (Hosken y Bevan, 1990), la cual expresa moléculas vacías HLA-A\*0201 en su membrana celular. Las líneas celulares fueron mantenidas bajo condiciones de cultivo, empleando medio de cultivo RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies, USA) al 10%, 100U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomina y mantenidas en condiciones de esterilidad en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente de humedad saturante.

### **Expresión de CD39/CD73 por citometría de flujo.**

Puesto que el mecanismo adenosinérgico para generar adenosina, (importante agente inmunosupresor de linfocitos T), es debido a la presencia de las ectoenzimas de superficie CD39 y CD73, la expresión de estas moléculas en células de CaCu, fue analizada mediante la técnica de citometría de flujo. Para ello un total de  $2 \times 10^5$  células por determinación, contadas con ayuda de un hemocitómetro y azul de tripano se incubaron en PBS/SFB 2% durante 30 min a 4°C y en obscuridad con los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD73/PE (BD Pharmingen, USA) y anti-CD39 (Bioscience, USA) de acuerdo a las cantidades sugeridas por el proveedor. Por otra parte, se incluyeron controles, incubando a las células con el correspondiente isotipo control de acuerdo al anticuerpo primario IgG1k PE (BD Pharmingen, USA) y anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con FITC (Caltag Laboratories, USA). Para eliminar los anticuerpos, las células se lavaron dos veces con PBS-SFB 2%. Finalmente las células marcadas se analizaron contando un mínimo de 10,000 eventos en el citómetro de flujo FACSAriaII (BD Biosciences, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Summit V4.3 (Dako Colorado, Inc, USA).

### **Ensayo de actividad funcional de CD39/CD73.**

Tomando en consideración que CD39 hidroliza ATP y ADP a sus respectivos nucleósidos (Robson *et al* 2005) y que la CD73 degrada el monofosfato de adenosina (AMP) a adenosina como producto final (Resta *et al* 1998), se estableció un ensayo *in vitro* para determinar la actividad funcional de ambas ectoenzimas en células Jurkat y células tumorales de CaCu HeLa. Brevemente se colocaron  $1 \times 10^7$  de células viables por cuadruplicado en placas de 96 pozos de fondo U estériles (Corning costar, USA) en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de sustituto de suero (Invitrogen, USA). En uno de los pozos se colocó Adenosina Difosfato (ADP) 2.5mg/mL; en otro pozo Adenosina Monofosfato (AMP) a 2.5mg/mL, mientras que en los pozos restantes además de ADP y AMP, las células fueron preincubadas durante 30 minutos con los inhibidores selectivos: polioxometalato (POM-1) (Santacruz, Biotech, USA) para CD39 y adenosina 5'-  $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) (Sigma-Aldrich, USA) para CD73, a una concentración final de 2.5mg/mL, en un volumen final de 200 $\mu$ L. Después de la adición de los diferentes sustratos e inhibidores, las células fueron resuspendidas inmediatamente y se tomaron alícuotas de 1 $\mu$ L de cada uno de los pozos (Tiempo cero), y las células fueron incubadas a 37°C, humedad saturante y 5% de CO<sub>2</sub>. A partir de ese momento y en cada hora

de incubación (1-5 hrs), fueron tomadas muestras de 1  $\mu$ L de la suspensión celular. Todos los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados y almacenados en tubos cónicos de plástico (Corning costar, USA) a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser utilizados posteriormente en los siguientes experimentos.

### **Cromatografía en capa fina (TLC).**

La adenosina producida bajo las diferentes condiciones de cultivo en las células HeLa con los sustratos ADP, AMP en ausencia y presencia de los inhibidores específicos de CD73 y CD39, fue monitoreada a través de la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) del inglés Thin Layer Chromatography, utilizando laminillas fluorescentes de poliéster conteniendo sílica gel (Whatman, Germany). A cada una de las laminillas se colocó 1  $\mu$ L de las alícuotas de los cultivos celulares tomadas en los diferentes tiempos (0-5hrs). Después de 30 minutos, las laminillas fueron colocadas verticalmente en una cámara de elución conteniendo 2mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil para adenosina) compuesta por: isobutanol: alcohol isoamílico:etoxietanol:amoníaco:agua (9:6:18:9:15) (Niemela et al, 2004; Stagg *et al* 2010 y Grünwald and Ridley, 2010). La fase móvil se dejó correr durante 1 hr y posteriormente las laminillas fueron retiradas de la cámara de elución para su secado a temperatura ambiente. Como estándares se utilizaron: ATP, ADP, AMP, Adenosina e Inosina (Sigma Life science, USA) a una concentración de 2.5mg/mL. Finalmente los compuestos fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador en una cámara con luz UV (UVP Bioso-H System, USA).

### **Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC).**

Para determinar la cantidad de adenosina generada en los cultivos de células HeLa y Jurkat se utilizó un equipo de UPLC aquity (Waters, USA) y el análisis se realizó empleando el software Empower 3 (Waters, USA). Previo a la lectura de las muestras, se prepararon estándares de adenosina a una concentración de 1mg/mL disueltas en fase móvil (0.5% acetonitrilo: 5% metanol: 94.5% acetato de sodio 0.25 M, pH 6.3) y se realizaron diluciones seriadas apropiadas (1:100) para establecer los límites de detección. Se realizó una curva estándar de 10 puntos empleando adenosina pura. Por otro lado los sobrenadantes de las células de CaCu cultivadas con los diferentes sustratos fueron adicionados a tubos con 200  $\mu$ L de fase móvil, se agitaron en vortex durante 1 minuto y se centrifugaron 3 minutos a 12000 rpm para extraer las proteínas y estabilizar la adenosina; posteriormente las muestras fueron introducidas al equipo para su determinación. Las condiciones de corrida de cada muestra fueron las siguientes: velocidad de flujo 1.0mL/min; detector UV 254-260 nm; tiempo de retención 2.0 minutos; T ambiente; columna de fase reversa LiChrosferRP de 18e 5  $\mu$ m, 100 RP-18 (tamaño 125mm x 4mm, 5mm de tamaño de partícula). La adenosina se cuantificó comparando el tiempo de retención de la muestra con el de la adenosina pura empleada como control.

### **Extracción de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP).**

Para evaluar el efecto inmunosupresor de las células tumorales de CaCu sobre la proliferación, activación y función efectora de linfocitos T a través de la vía adenosinérgica se requirió de sangre periférica de donadores normales. Para ello, se tomaron 15-20 mL de sangre periférica mediante punción en la vena de un brazo empleando tubos vacutainer de 6 mL con anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa) (Becton Dickinson, USA). En condiciones de esterilidad la muestra de sangre fue procesada y centrifugada a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos para separar el plasma sanguíneo (fase

superior) del paquete celular (fase inferior). Con ayuda de una pipeta serológica fue retirado el plasma y colocado en otro tubo para eliminar las proteínas de complemento mediante inactivación a temperatura de 56°C durante 30 minutos. La fase inferior conteniendo el paquete celular, fue resuspendido con solución buffer salina de fosfatos (PBS). Después de dos lavados, el paquete celular se llevó a un volumen 1:1. La mezcla de sangre y PBS fue depositada sobre 10 mL de Ficoll (Histopaque, Sigma-Aldrich, USA) y centrifugada durante 30 minutos a 1000 rpm. A continuación, las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP), colectadas en la interfase fueron resuspendidas con medio IMDM-12440 (Life Technologies, USA) suplementado con 2mM de L-glutamina, 1 mM de Piruvato de Sodio, 50  $\mu$ M de  $\beta$ -Mercaptoetanol y 100  $\mu$ M de una mezcla de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, USA), además de antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomycin 100  $\mu$ g/mL).

### **Ensayo de proliferación celular colorimétrico (MTS).**

Para evaluar si la adenosina generada por CD39/CD73 en las células tumorales de CaCu suprime la proliferación de células T, CMNSP obtenidas por gradiente de densidad fueron cultivadas por triplicado en 100  $\mu$ l de medio IMDM sin rojo fenol (Life Technologies, USA) + suero autólogo humano (SAH) a una densidad final de  $1 \times 10^5$ /pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano estéril (Corning costar, USA), con medios condicionados de los cultivos de células HeLa (proporción 1:50) en presencia de perlas coestimuladoras recubiertas de anticuerpos CD2/CD3/CD28 (Miltenyi Biotec, USA) en una proporción 2:1 linfocitos T:perlas, e incubados a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 72 hrs. Por otro lado, de manera simultánea, para evaluar el bloqueo del efecto inmunosupresor de adenosina sobre la proliferación de linfocitos, se adicionó cafeína a una concentración de 30  $\mu$ M (J.K Baker, USA). Linfocitos con medio solo, con adenosina pura (100  $\mu$ M), con cafeína (30  $\mu$ M) y adenosina-cafeína (100  $\mu$ M-30 $\mu$ M), AMP e Inosina (100  $\mu$ M) fueron sembrados de manera independiente para establecer los controles correspondientes. Después de este período las células fueron cosechadas con 20  $\mu$ l/pozo del reactivo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega, USA) a una concentración final de 317  $\mu$ g/ml y fueron incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 4 hrs. Posteriormente la placa fue leída en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices, USA) a una longitud de onda de 490 nm como describe Soman *et al* 2009.

**% de Proliferación = (media DO de CMNSP cultivados con medios condicionados/media DO de CMNSP cultivadas con perlas anti-CD2/CD3/CD28) X100.**

### **Ensayo de proliferación celular por marcaje con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE).**

Para corroborar el efecto inhibitorio de la adenosina pura y adenosina generada por CD39/CD73 en células de CaCu sobre la proliferación de linfocitos T, CMNSP fueron marcadas previamente con 2  $\mu$ M de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Sigma, USA) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron cultivadas en 200  $\mu$ l de medio IMDM + SAH a una densidad final de  $2.5 \times 10^5$ /pozo en una placa de 96 pozos de fondo U (Corning costar, USA), en presencia de anticuerpos CD2/CD3/CD28 en una proporción 2:1, en presencia de adenosina pura a diferentes concentraciones (10-5000  $\mu$ M) y medios condicionados de los cultivos de células HeLa (proporción 1:25) e incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 72 hrs. Al finalizar el tiempo de cultivo se analizaron los niveles de CFSE en CMNSP a través de un citómetro de flujo FACS ARIA II contando un mínimo de 25,000 eventos. El tiempo inicial (To) de marcaje con CFSE se determinó en el momento de la cosecha al marcar las células y determinar los niveles iniciales de la incorporación de CFSE. La respuesta de

proliferación total ( $T_1$ ) de CMNSP se determinó sobre las células marcadas y cultivadas en ausencia de adenosina.

### **Determinación de la producción de IFN- $\gamma$ intracelular en T CD8+.**

Para analizar la influencia de la vía adenosinergica en células tumorales de CaCu sobre la activación de los linfocitos T,  $2.5 \times 10^5$  CMNSP fueron sembradas en una placa de 24 pozos (Corning costar, USA) con 1ml de medio de cultivo IMDM + 10% de SAH con medios condicionados de los cultivos de células HeLa y se estimularon con anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 en proporción 2:1, éstos fueron incubados a 37°C, en humedad saturante y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 hrs. De manera simultánea, se adicionó cafeína a una concentración de 300  $\mu$ M. Linfocitos con medio solo, con AMP, con adenosina pura, inosina (1mM), cafeína (300  $\mu$ M) y adenosina-cafeína fueron sembrados de manera independiente para establecer los controles correspondientes. Para la determinación de IFN- $\gamma$  intracelular después de el tiempo de cultivo fue adicionada Brefeldin-A (Sigma, USA) a una concentración final de 10  $\mu$ M por 4 horas. Posteriormente las células fueron colectadas, fijadas y permeabilizadas de acuerdo con las instrucciones del proveedor de los reactivos Cytotfix/Cytoperm y Perm/Wash (Beckton Dickinson, USA), y fueron marcadas con 1 $\mu$ l/50  $\mu$ l PBS de anticuerpos anti-IFN $\gamma$ /FITC y 1 $\mu$ l /50  $\mu$ l PBS anti-CD8/APC (R&D, Systems, USA) por incubación a 4°C por 30 minutos. Las células tratadas fueron evaluadas en un citómetro de flujo FACS ARIA II. Un total de 50,000 eventos fueron adquiridos y analizados para obtener los porcentajes de células CD8+ productoras de IFN- $\gamma$ , bajo las diferentes condiciones empleando el software Summit V4.3

### **Determinación de la expresión de CD69 en T CD8+.**

Para evaluar la expresión de CD69 como un marcador de activación de células T CD8+,  $2.5 \times 10^5$  CMNSP fueron cultivadas en placas de 24 pozos con medio IMDM en las mismas condiciones que el apartado anterior y transcurrido el tiempo de cultivo las células fueron marcadas con 1 $\mu$ l de anti-CD69/FITC, y anti-CD8/APC (R&D, Systems, USA) en 50  $\mu$ l de PBS/SFB 2% por incubación a 4°C por 30 minutos, para finalmente ser evaluados los porcentajes de células CD8+CD69+ bajo los diferentes tratamientos mediante un citómetro de flujo FACS ARIA II. Un total de 50,000 eventos fueron adquiridos y analizados para obtener los porcentajes de células CD8+ con C69+, bajo las diferentes condiciones.

### **Tipificación de HLA-A2.**

El fenotipo de HLA-A2 de CMNSP de donadores normales se confirmó por tinción indirecta con 1 $\mu$ l del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-HLA-A28, BB7.2 (dilución 1:100 en PBS+2% SFB) (ATCC,USA) a 4°C durante 30 minutos, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con FITC (Caltag Laboratories, USA) por 30 minutos, para finalmente analizarse por citometría de flujo.

### **Generación de linfocitos T citotóxicos específicos.**

Para generar linfocitos T citotóxicos específicos, se llevó a cabo el método de “vacunación in vitro” empleando células dendríticas (CD) (Romani N *et al* 1996; Faush *et al* 2002). Para generar las células dendríticas, CMNSP de donadores normales que presentaron el alelo HLA-A2 en su haplotipo de moléculas del complejo de histocompatibilidad clase-I, fueron incubados en platos de petri de plástico por 2 hrs. Los linfocitos no adherentes fueron retirados y los platos fueron lavados con medio de cultivo completo (MCC) consistente de RPMI-1640, suplementado

con 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 100 UI/mL de penicilina, 100mg/mL de estreptomina, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 10mM de Hepes (pH 7.2), 50µM de β-mercaptoetanol y 10% de SAH. La fracción adherente fue cultivada durante 5 días en presencia de 30ng/mL de GM-CSF recombinante humano (BD-Pharmingen, Palo Alto, CA, USA) y 20 ng/mL de IL-4 recombinante humana (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA), con reemplazo del 50% de medio y adición de citocinas cada 3 días con la finalidad de inducir la diferenciación de CD inmaduras. Dos días después se realizó un cocultivo de CD con células flotantes que fueron colectadas, lavadas con MCC e incubadas durante 1 hr con 10µg/mL del péptido YMLDLQPETT (Invitrogen, USA) derivado de la proteína E7 de HPV-16 (Mora García *et al* 2006). La maduración de las CD se llevó a cabo con la adición de 20µg/mL del adyuvante Poli I:C (ácido poliriboinosínico) (Amersham Biosciences, USA), un ARN sintético de doble cadena, durante incubación por 48 hrs. CMNSP fueron co-cultivadas con las CD maduras y pulsadas con el péptido en presencia de IL-2 (20 ng/mL) e IL-7 (15 ng/mL) (R&D Systems, MN) durante 7 días para expandir la población de T específicas al péptido.

### **Enriquecimiento de T CD8+.**

Después de dos re-estímulos, la población de linfocitos T CD8+ fue enriquecida mediante selección negativa empleando un kit de enriquecimiento para linfocitos T CD8+ humanos y perlas magnéticas (EasySep Enrichment Cocktail, Stem Cell Technologies, USA) para la detección y determinación de las frecuencias de linfocitos T CD8+ específicos hacia el péptido antigénico YMDLQPETT presentado por moléculas HLA-A2. Para ello, se preparó una suspensión celular en un tubo estéril de poliestireno de 5 mL y se incubaron con 50 µl/mL del coctel de anticuerpos por cada  $5 \times 10^7$  células durante 10 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se incubó con 50 µl de partículas magnéticas por 10 minutos, enseguida se colocó el tubo de la suspensión celular en un magneto durante 5 minutos, se colectaron las células no adheridas a la pared del tubo, se centrifugaron y posteriormente se contaron para llevar a cabo los ensayos correspondientes.

### **Identificación de linfocitos T CD8+ específicos al péptido YMDLQPETT.**

La población de linfocitos T CD8+ específicos hacia el péptido YMLDLQPETT derivado de la proteína E7 de HPV-16, fue verificada mediante el uso de moléculas pentaméricas constituidas por 5 moléculas HLA-A2 unidas al péptido YMLDLQPETT (Prolimmune Ltd, UK). Brevemente,  $1 \times 10^6$  linfocitos T fueron incubados con las moléculas pentaméricas marcadas con PE durante 10 minutos a temperatura de cuarto (22°C) protegidas de la luz. Después de lavar las células con PBS/SFB 2%, se incubaron con 1 µl de anti-CD8/APC (R&D, Systems, USA) durante 20 minutos a 4°C y después de 2 lavados se evaluó su expresión mediante citometría de flujo.

### **Células T2 cargadas con péptido**

Como célula blanco presentadora de antígeno, se utilizó la línea T2, la cual expresa moléculas vacías HLA-A\*0201 en membrana celular. Dichas moléculas fueron cargadas con el péptido antigénico YMDLQPETT. Brevemente, por cada millón de células T2, se adicionó una concentración de 20 µg/ml del péptidos en un volumen de 100 µl de RPMI-1640 suplementado con 2mM de glutamina, 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato de sodio, 20 MM de Hepes, 5 M de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, USA) y 15% de SAH, se incubó durante dos horas a 37°C bajo estas condiciones, previo a la realización de los ensayos de citotoxicidad.

## **Ensayo de citotoxicidad por marcaje con CFSE/7AAD.**

Células T CD8+ se cultivaron en medio IMDM +10% SAH en placas de 6 pozos (Corning costar, USA). Posteriormente los linfocitos T citotóxicos, fueron colectados y utilizados como células efectoras y su actividad citotóxica fue evaluada contra células blanco consistentes de células T2 (HLA-A\*0201+) pulsadas con péptido. La citotoxicidad fue evaluada en cocultivos de células efectoras: células blanco en las proporciones de 20:1 en una placa de 96 pozos con 200µl de medio IMDM + 10% de SAH. Para evaluar el efecto de adenosina generada por las células HeLa cultivadas con ADP, AMP, ADP+P y AMP+A, se adicionaron dichos sobrenadantes en dilución 1:25. Para determinar el número de células blanco muertas en el ensayo de citotoxicidad, las células blanco fueron marcadas con 2 µM de CFSE durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a lavar las células con PBS para eliminar el exceso de CFSE y se procedió a contarlas para realizar los co-cultivos con linfocitos T CD8+ pre-estimulados, y después de 4 horas de co-cultivo, blanco-efectoras, las células del co-cultivo se lavaron con PBS, y se adicionaron 15 µl de 7-Amino-actinomycin D (7AAD). El porcentaje de células blanco muertas, marcadas como CFSE+, 7AAD+, se determinó mediante citometría de flujo. Se incluyeron como controles del experimento a células T2 permeadas con peróxido de hidrógeno (lisis total), y células sin permear (lisis basal), la positividad a 7AAD y CFSE fue analizada en el programa Dako Summit 4.3. y el porcentaje de lisis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

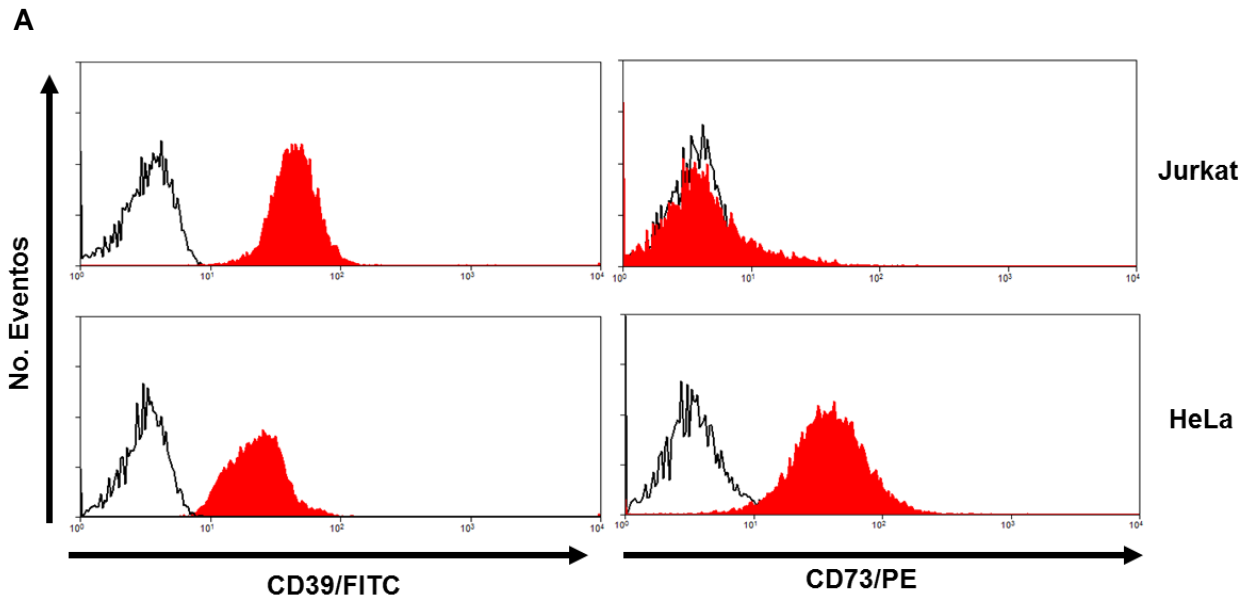
**% de citotoxicidad= 100 x [(lisis experimental (CFSE+, 7AAD+) – lisis basal (CFSE+, 7AAD+) / (lisis total con H2O2 (CFSE+, 7AAD+) – lisis basal (CFSE+, 7AAD+)].**

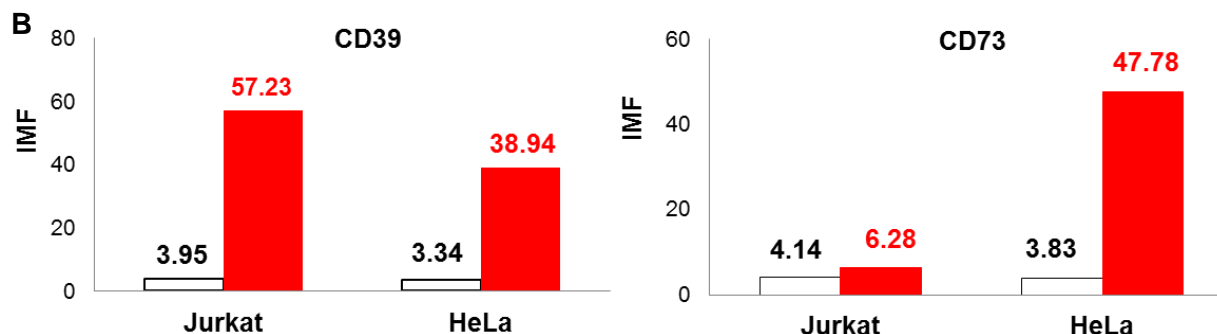


## RESULTADOS

### Células tumorales derivadas de cáncer de cuello uterino (CaCu) co-expresan las ectoenzimas de la vía adenosinérgica CD39/CD73.

Recientemente se ha propuesto que uno de los mecanismos de protección de tumores ante el reconocimiento de las células T citotóxicas es la producción de adenosina extracelular a través de la vía adenosinérgica, por acción de la actividad enzimática de las nucleotidasas CD39 y CD73 unidas a membrana (Sitkovsky *et al* 2008; Pellegatti *et al* 2008). Esta vía ha sido reportada en muchos tipos histológicos de cáncer humano, tales como el cáncer de melanoma, mama, cáncer de colon, glioma, leucemia, gástrico, cáncer de cabeza y cuello, entre otros. Sin embargo no hay reportes en la literatura de la vía adenosinérgica en CaCu, por ello en el presente trabajo se analizó la expresión de las moléculas CD39/CD73 en la membrana de las células tumorales HeLa (HPV-18+), derivada de CaCu. Mediante análisis de citometría de flujo, y empleando los anticuerpos monoclonales anti-CD39-FITC y anti-CD73-PE, se pudo detectar la expresión de ambas ectoenzimas en las células HeLa (histogramas marcados con color rojo). En este estudio también se utilizó a la línea celular Jurkat, de leucemia linfocítica aguda (negativa para CD73), para poder comparar la capacidad de generar adenosina a través de la vía adenosinérgica. Esta línea celular sólo expresó CD39 en la membrana celular (**Fig. 13A**). La expresión de CD39 en las células HeLa mostró un valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) de 38.94, mientras que para CD73 fue de 47.78; mientras que en la línea celular Jurkat, el valor de CD39 fue de 57.23 y prácticamente negativa a CD73, cuyo valor de IMF fue de 6.28, similar al valor del control de isotipo, el cual fue de 4.14 (**Fig. 13B**).

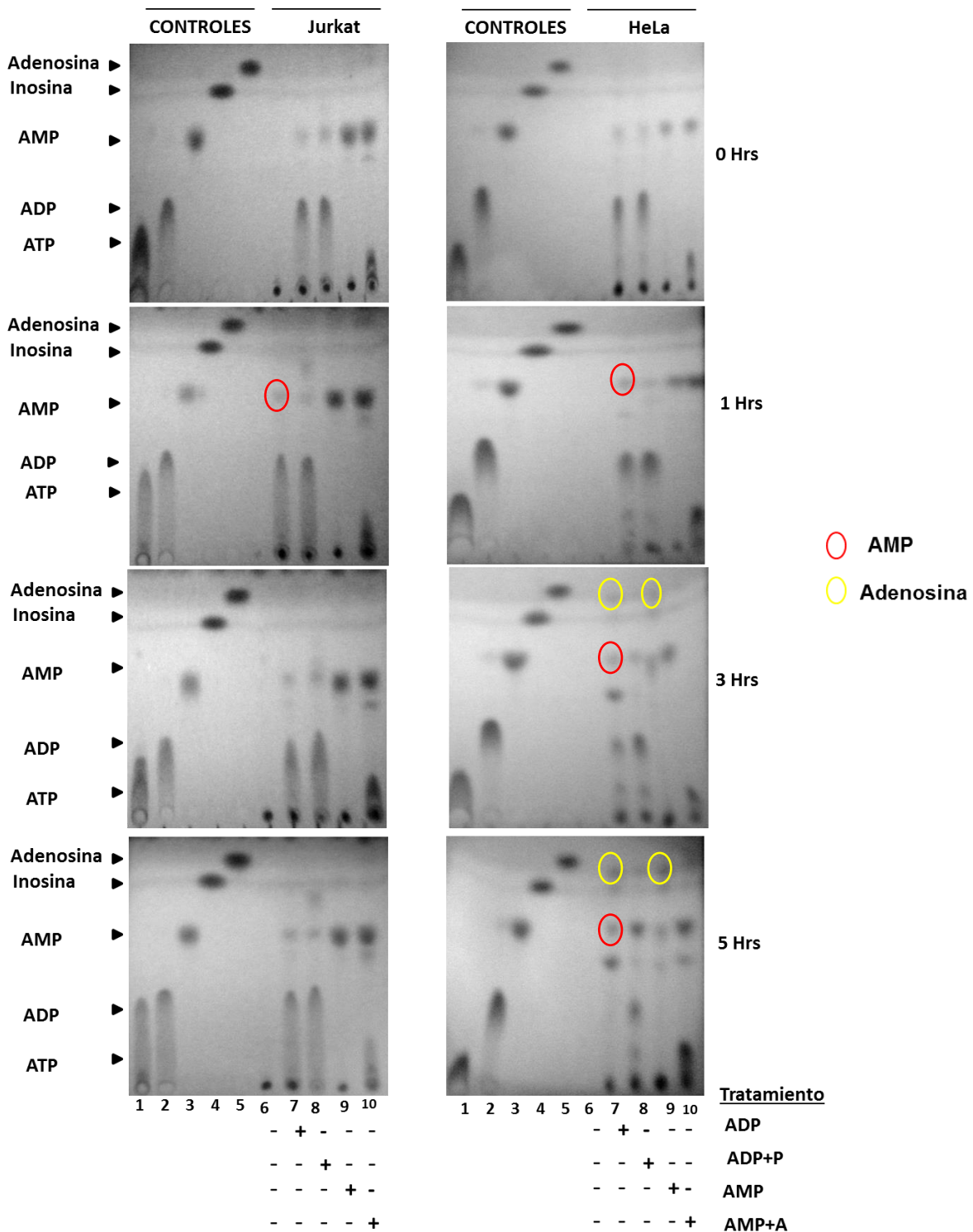




**Figura 13. Expresión de CD39 y CD73 en las líneas celulares HeLa, de CaCu, y Jurkat, de leucemia linfocítica aguda.** La expresión de CD39 y CD73 en las líneas celulares HeLa y Jurkat fue determinada mediante citometría de flujo empleando los anticuerpos específicos anti-CD39-FITC y anti-CD73-PE. A). Los histogramas en rojo muestran la expresión de CD39 y CD73, como se indica y los histogramas en línea negra indican la expresión dada por un anticuerpo Isotipo control para cada caso. B). Se muestran los valores de la Intensidad media de fluorescencia (IMF), de la determinación de CD39 y CD73 (en rojo). Para la determinación se consideraron 10 000 eventos, ensayo representativo de tres realizados.

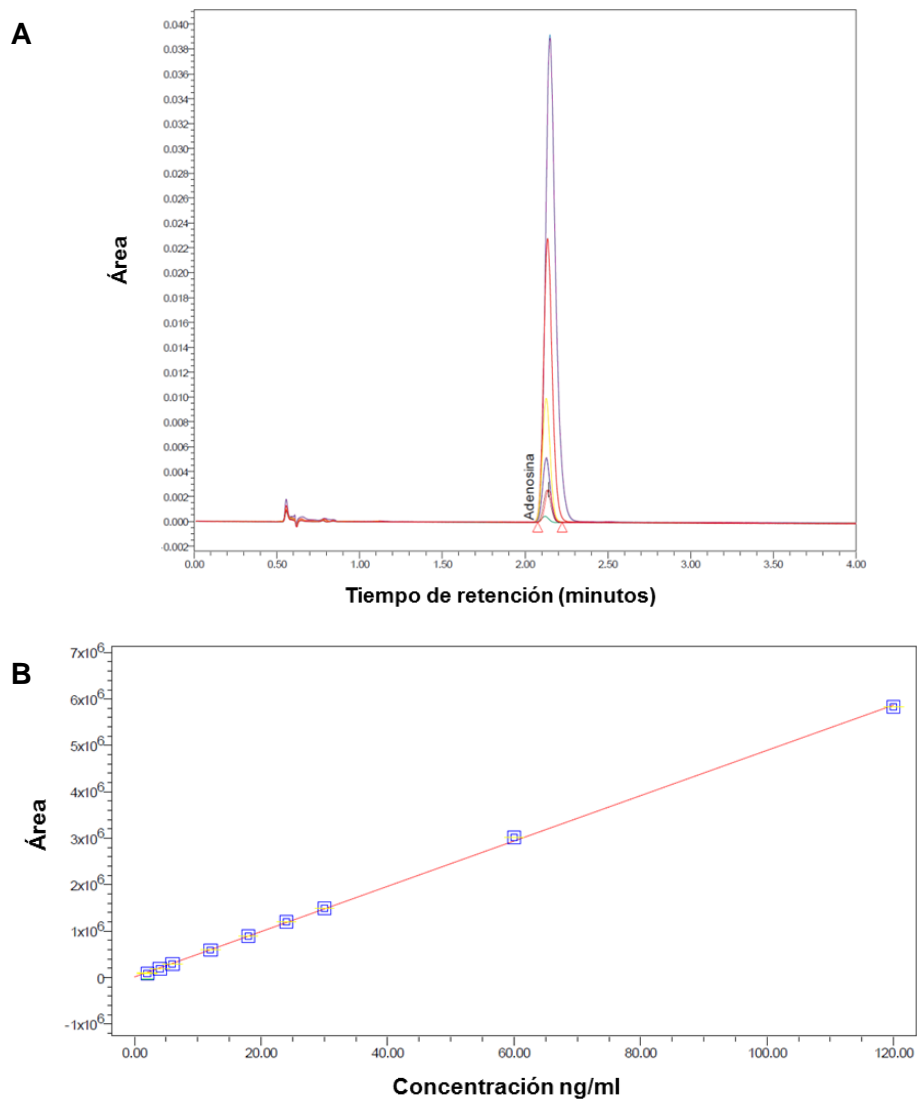
### Las células tumorales HeLa generan adenosina mediante la actividad funcional de las ectoenzimas CD39/CD73.

Una vía importante para generar adenosina de manera extracelular, es a través de la fosfohidrólisis secuencial de los nucleótidos ATP y ADP, por medio de la actividad CD39 para generar AMP, y finalmente la fosfohidrólisis de AMP para generar adenosina mediante la ectonucleotidasa CD73 (Zhang, 2010; Spychala, 2000). Con la finalidad de analizar la actividad funcional de CD39 y CD73 en las células tumorales HeLa, se cultivaron  $10^7$  células tumorales en presencia de 2.5mg/mL de cada uno de los sustratos ADP y AMP de manera independiente, en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con sustituto de suero, y durante 5hrs fue monitoreada la generación de adenosina mediante cromatografía en capa fina (TLC). De manera simultánea, se llevaron a cabo cultivos de las células tumorales en presencia de ADP y del inhibidor POM-I, selectivo para CD39, (ADP+P) y de AMP, y el inhibidor APCP, selectivo para CD73, (AMP+A). Como se puede observar en la **Fig. 14**, desde el inicio del cultivo (0 hrs) las células tumorales HeLa y Jurkat empezaron a generar AMP a partir de ADP. Sin embargo, sólo la línea celular HeLa generó adenosina a partir de ambos sustratos, ADP y AMP, y la mayor producción de adenosina se observó después de 5 hrs de cultivo. De manera notable, la línea celular Jurkat, debido a la ausencia de CD73, no fue capaz de generar adenosina a partir de ambos sustratos, no obstante, solo se pudo apreciar la generación de AMP a partir de ADP. Es importante mencionar que la adición de los inhibidores selectivos POM-1 o APCP, produjo una marcada disminución en la fosfohidrólisis de ADP y AMP para la producción de adenosina en los cultivos de las células HeLa, y de manera similar POM-1 inhibió la generación de AMP a partir de ADP en el cultivo de las células Jurkat. Es importante mencionar que además de la generación de adenosina en los cultivos de HeLa con ADP y AMP, también se generó un componente de peso menor similar al de inosina, el cual fue evidenciado por la presencia de bandas situadas debajo de las de adenosina (**Fig 14**). Estos resultados nos indican que las células tumorales HeLa presentan actividad funcional de CD39 y CD73 para generar adenosina a partir de los nucleótidos ADP y AMP.



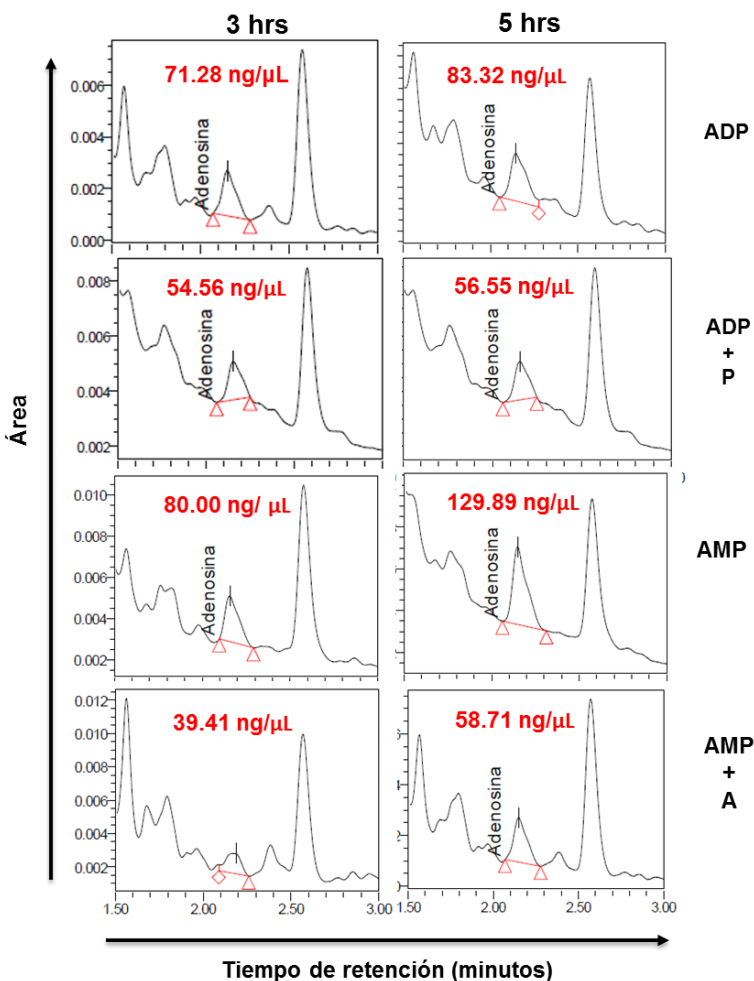
**Figura 14. Las células tumorales HeLa generan adenosina mediante la actividad funcional de CD39/CD73.**  $10^7$  células tumorales HeLa y Jurkat (control positivo de CD39), fueron incubadas durante 5 hrs en presencia de 2.5mg/mL de ADP o AMP; y en presencia de ADP más el inhibidor para CD39, polioxotungstato (POM-1), (ADP+P); así como de AMP más el inhibidor para CD73, adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP), (AMP+A). La generación de adenosina fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina (TLC) a partir de la toma de 1 $\mu$ L de medio condicionado de cada uno de los cultivos. Los carriles 1-5 muestran el corrimiento de las moléculas utilizadas como controles, y corresponden a ATP, ADP, AMP, adenosina e inosina, respectivamente. La hidrólisis extracelular de ADP hacia AMP en los cultivos de células Jurkat y HeLa, es mostrada en los carriles 7-10.

Por otro lado, con la finalidad de cuantificar la adenosina producida por las células tumorales HeLa durante el tiempo de incubación en presencia de los sustratos ADP y AMP, se tomaron muestras de los sobrenadantes y fueron analizadas por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC). Para ello, inicialmente se determinó una curva de calibración de adenosina, partiendo de una concentración de 1 mg/mL y realizando diluciones dobles seriadas 1:100 hasta obtener 10 concentraciones diferentes (**Fig. 15A**). Los parámetros de regresión incluyeron la ordenada al origen de - 2.24, la pendiente de 3.27 y un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0.999 para adenosina. El estándar se analizó por triplicado, el porcentaje de RSD (Desviación estándar de correlación) fue de 101.63 indicando una precisión satisfactoria en el análisis (**Fig. 15B**).



**Figura 15. Curva tipo adenosina.** A) muestra los picos obtenidos a través del corrimiento de varias concentraciones (1mg/mL- 1pg/mL) de adenosina, teniendo un tiempo de retención de aproximadamente 2.15 min. B). Representa la curva de regresión lineal a partir de los valores del área bajo la curva de cada uno de los picos mostrados en A.

Los datos analíticos obtenidos en la cuantificación de adenosina se registraron en un tiempo de retención de 2.15 minutos y la concentración fue expresada en ng/μL. La generación del nucleósido adenosina fue registrado por UPLC a partir de los sobrenadantes de células HeLa en presencia de ADP y AMP durante las 3-5 hrs de cultivo (**Fig. 16**). Cuando se adicionó ADP como sustrato, el sobrenadante del cultivo de células HeLa presentó una concentración de adenosina de 71.28 ng/μL en 3 hrs y de 83.32 ng/μL a las 5 hrs. Mientras que al añadir AMP, se detectó una concentración de 80 ng/μL en 3 hrs y de 129.89 ng/μL en 5 hrs. Cabe mencionar que las células HeLa a las cuales no se les adicionó sustrato, no mostraron niveles detectables de adenosina en sobrenadantes colectados en estos intervalos de tiempo. De manera interesante, la actividad funcional de CD39 y CD73, fue inhibida de manera parcial con la adición de los inhibidores POM-1 y APCP. POM-1 redujo la producción de adenosina en los cultivos de las células HeLa en presencia de ADP, obteniéndose una concentración de 54.56 ng/μL a las 3 hrs y de 56.55 ng/μL a las 5 hrs de cultivo. Mientras que la adición de APCP redujo fuertemente la generación de adenosina a partir de AMP, produciéndose una concentración de adenosina de 39.41 ng/μL a las 3 hrs, y de 58.71 ng/μL a las 5 hrs de cultivo (**Tabla 5**). Estos resultados nos dan evidencia importante de la actividad funcional de CD39 y de CD73 en las células tumorales de CaCu, y actúan de manera consecutiva para generar adenosina como producto final de la fosfohidrólisis de ADP y AMP respectivamente. Por otro lado, en el caso de las células Jurkat los valores de detección de adenosina fueron nulos, tanto en presencia o ausencia de ADP o AMP.



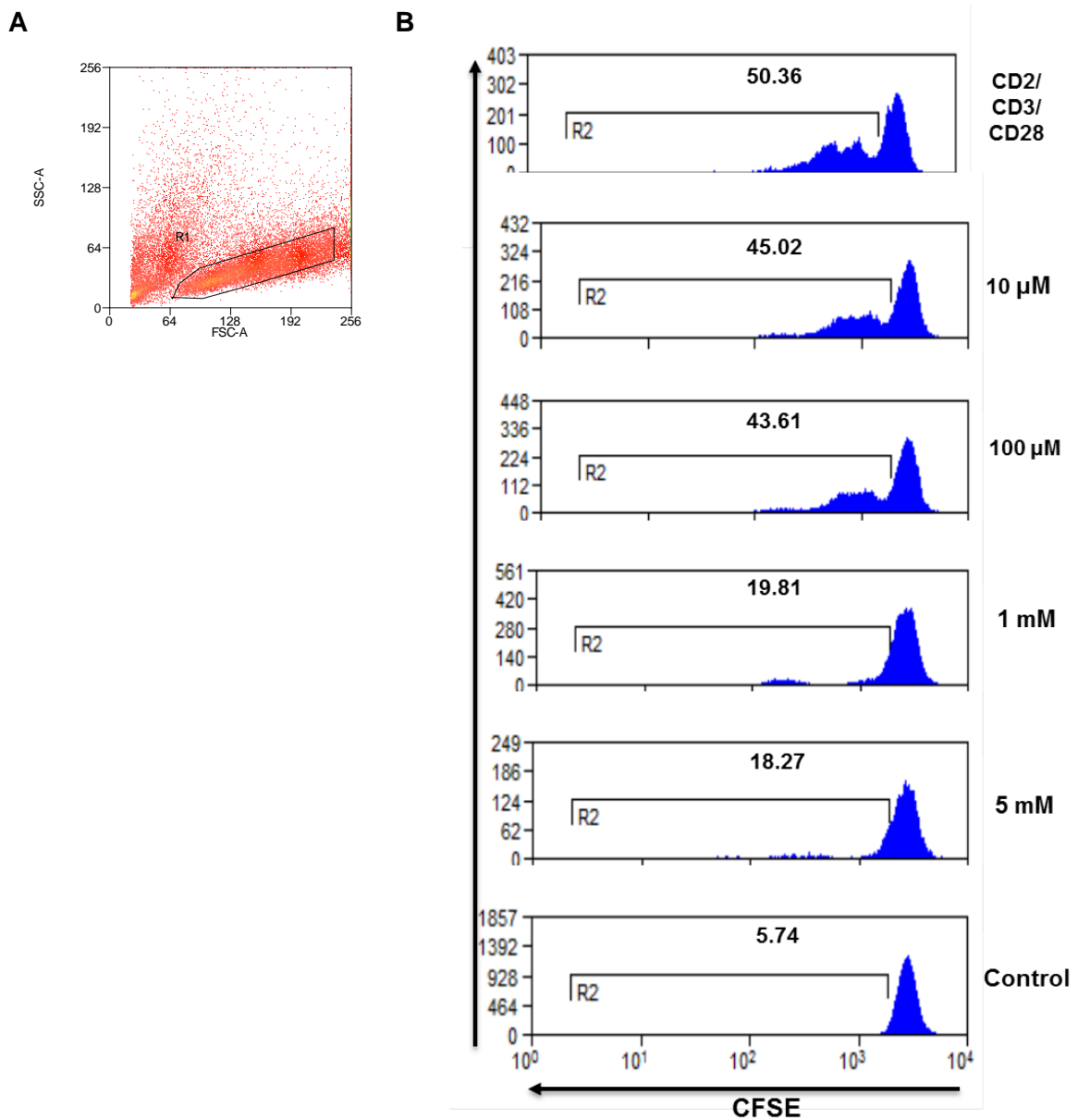
**Figura 16. Análisis cuantitativo de la generación de adenosina por las células HeLa a partir de ADP y AMP.** Se muestran los cromatogramas representativos de la cuantificación de adenosina, mediante UPLC, a partir de medios condicionados de  $10^7$  células HeLa cultivadas en presencia de 2.5mg/mL de: ADP o AMP; o ADP + POM-1 (ADP+P) y de AMP + APCP (AMP+A). La adenosina cuantificada derivó de 1μL de sobrenadante tomado a las 3 y 5 hrs del cultivo.

Linea celular	Generación de adenosina ng/μl							
	3 hrs				5 hrs			
	ADP	ADP + POM-1	AMP	AMP + APCP	ADP	ADP + POM-1	AMP	AMP + APCP
HeLa	71.28	54.56	80.00	39.41	83.32	56.55	128.90	58.71
Jurkat	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 5. Adenosina producida por las células HeLa en presencia de ADP y AMP.**  $10^7$  células tumorales HeLa o Jurkat (control negativo de CD73), fueron incubadas durante 5 hrs en presencia de 2.5mg/mL de ADP o AMP; de ADP+POM-1, o de AMP+APCP a un volumen total de 200μL. La cuantificación de adenosina fue obtenida mediante análisis en UPLC (Waters, USA) a una longitud de onda de 260 nm UV y a un tiempo de retención de 2.15 min, es expresada en ng/μl de sobrenadante.

### **Células de CaCu inhiben la proliferación de linfocitos T mediante la generación de adenosina.**

Es conocido que la adenosina al interactuar con receptores específicos de alta afinidad en linfocitos T inhibe su proliferación (Takayama y Sitkovsky 1988). Con la finalidad de analizar el efecto de adenosina sobre la proliferación de linfocitos T, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donadores normales fueron estimuladas *in vitro* con anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 acoplados a esferas, e incubados con adenosina pura a diferentes concentraciones (10 μM a 5 mM) durante 72 hrs. La proliferación se determinó por el método colorimétrico MTS y por marcaje con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE). Mediante el método colorimétrico, se pudo detectar que a 100μM, la adenosina inhibe en más de 30% la proliferación de los linfocitos T; observándose un efecto inhibitorio en más del 50% en las concentraciones de 1 y 5 mM (**Fig. complementaria 1**). Resultados similares fueron obtenidos mediante el marcaje de las CMSP con CFSE, en este caso se observó una inhibición de aproximadamente 18% a una concentración de 100μM de adenosina y mayor a 50% a concentraciones mayores a 1mM de adenosina (**Fig. 17**).

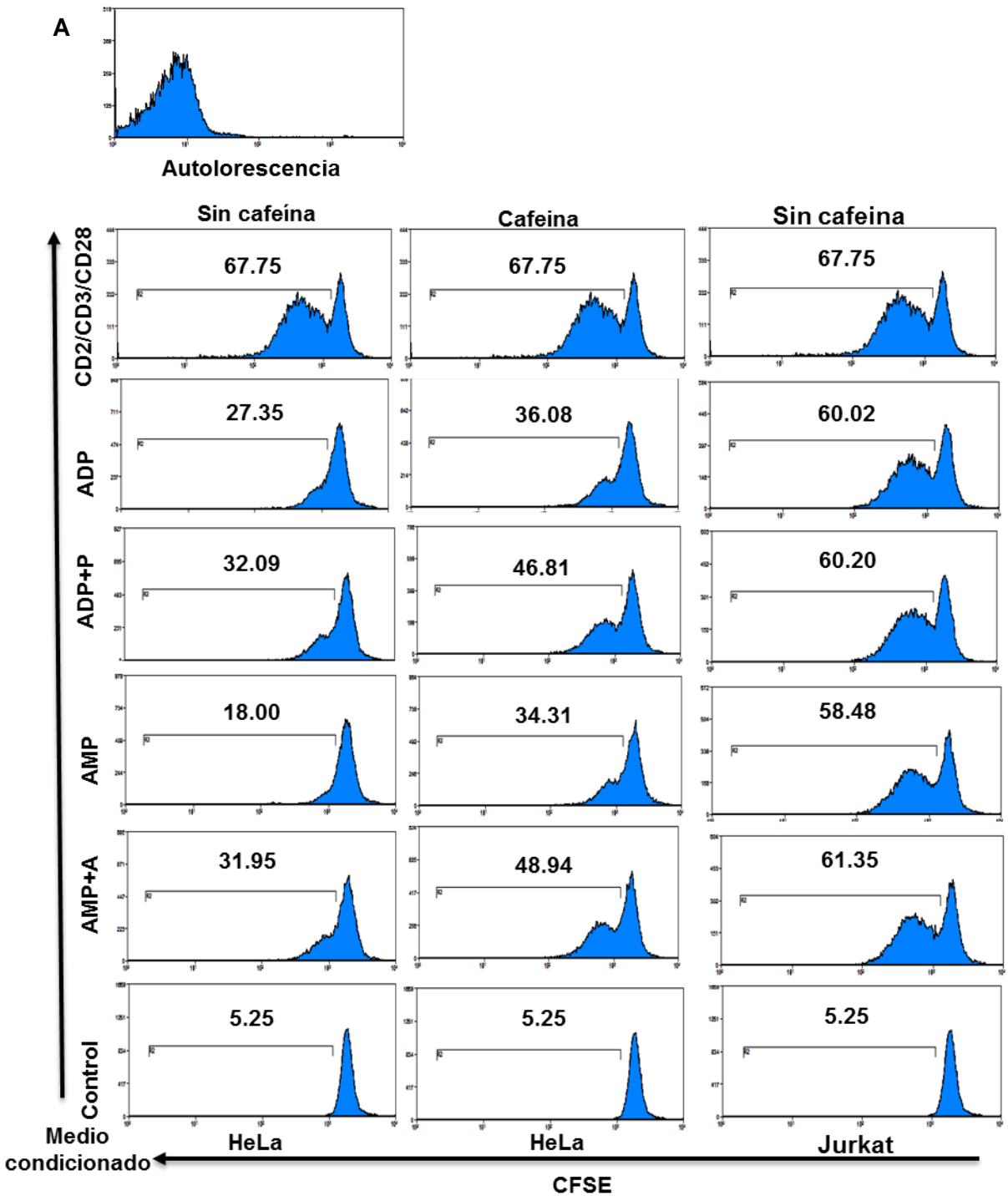


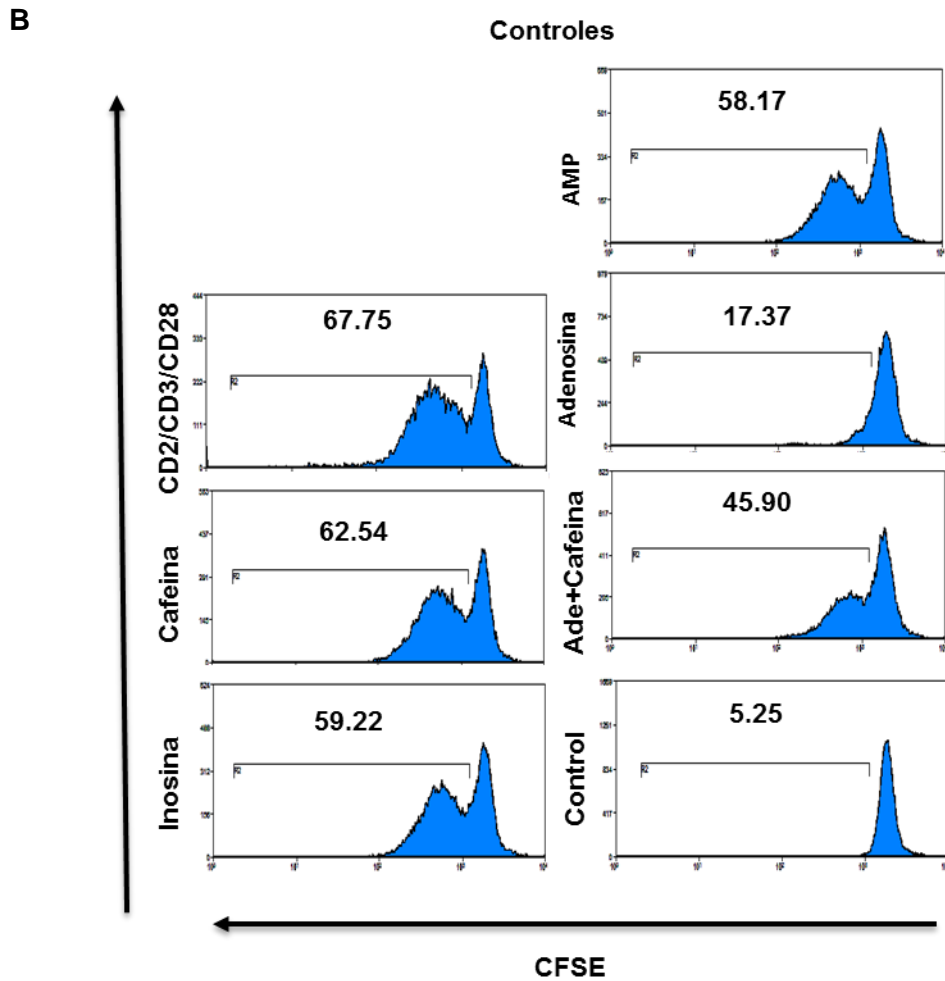
**Figura 17. Efecto inhibitorio de la adenosina pura sobre la proliferación de linfocitos T.**  $2.5 \times 10^5$  CMSP de donadores normales fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de adenosina pura (10-5000  $\mu$ M) y en presencia de perlas anti-CD2/CD3/CD28 (2:1). Las CMSP fueron previamente marcadas con 2  $\mu$ M de CFSE y posteriormente cultivadas. Las poblaciones de linfocitos en proliferación (R2), identificados con base en su tamaño (forward scatter (FSC) y granularidad (sideward scatter (SSC) (A), fueron analizados mediante citometria de flujo (B). 25000 eventos fueron considerados en cada caso, los valores representan el porcentaje de linfocitos que proliferaron durante 72h. El control fue considerado como las células marcadas a tiempo de inicio.

Para determinar si la adenosina generada por las células de CaCu, a través de la actividad funcional de CD39 y CD73, inhibe la proliferación de linfocitos T, medios condicionados de células HeLa tratadas con AMP, ADP, ADP+P y AMP+A, fueron añadidos a los cultivos de CMSP estimuladas con los anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28. Al evaluar la proliferación de linfocitos T por el método de marcaje con CFSE, la adición de los medios condicionados (1:25) de las células HeLa tratadas con ADP y AMP inhibieron la proliferación en 60% y 74% respectivamente, al compararlas con linfocitos T estimulados solo con los anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 (control positivo). Mientras que la adición de ADP+P y AMP+A, la inhibición de la proliferación de linfocitos T fue menor, obteniéndose una inhibición de 47.36 y 47.15% respectivamente (**Fig. 18B**). Valores similares también fueron observados mediante el método de MTS (**Figura complementaria 2A**). En el caso de los sobrenadantes obtenidos de las células Jurkat cultivadas bajo las mismas condiciones que la línea celular HeLa, no se detectó una disminución considerable en la proliferación de linfocitos T al adicionar cada uno de los sobrenadantes (**Fig. 18A**).

Por otro lado, tomando en consideración, que la adenosina media la supresión inmune de las células T a través de la interacción con receptores para adenosina (ARS) (Sattler *et al* 2011), y que dicha unión puede ser bloqueada por cafeína, un antagonista de estos receptores, CMSP fueron cultivados en presencia de medios condicionados de cultivos de HeLa (ADP, AMP, ADP+P y AMP+A) en presencia de cafeína a una concentración de 300  $\mu$ M, suficiente para bloquear todos los AR'S (Góngora-Alfaro *et al* 2005). Al evaluar la proliferación de linfocitos T por la técnica de marcaje con CFSE, se observó que la adición de cafeína restableció la proliferación en un 13% y 25%, cuando se adicionaron los medios condicionados de células HeLa cultivadas con ADP y AMP respectivamente; y 22 y 25% con ADP+P y AMP+A respectivamente (**Fig. 18A**). Por otra parte, cabe mencionar que la adición de adenosina pura (1 mM) inhibió en un 75% la proliferación de linfocitos T, y la adición simultánea de cafeína parcialmente restableció la proliferación, ya que se encontró una inhibición de 67%, mientras que cafeína (300  $\mu$ M), o inosina puras (1 mM) no tuvieron efecto significativo sobre la inhibición de la proliferación de los linfocitos T (**Fig. 18B**). Cabe mencionar que el mismo comportamiento en la inhibición de la proliferación de linfocitos T se obtuvo mediante el método de MTS (**Figura complementaria 2C**).







**Figura 18. Células tumorales HeLa de CaCu inhiben la proliferación de células T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP.**  $2.5 \times 10^5$  CMNSP de donadores normales previamente marcadas con  $2 \mu\text{M}$  de CFSE, fueron cultivados en presencia de anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 unidos a perlas en proporción 2:1 perlas:CMSP, y de medios condicionados de las células Jurkat o de HeLa (A), previamente cultivadas con ADP, AMP, ADP+P y AMP+A. Después de 72 hrs de cultivo, se determinó la proliferación de los linfocitos T por la disminución en el marcaje de CFSE en las células en división. En algunos cultivos se adicionó cafeína ( $300 \mu\text{M}$ ), un antagonista de los receptores de adenosina. CMSP estimuladas con los anticuerpos, también fueron cultivadas en presencia de adenosina pura ( $1 \text{mM}$ ), inosina ( $1 \text{mM}$ ) y cafeína ( $300 \mu\text{M}$ ) (B). Se muestran los porcentajes de células proliferantes, bajo las condiciones antes mencionadas, de un ensayo representativo de tres ensayos hechos de manera independiente.

## **Células tumorales de CaCu disminuyen la activación de linfocitos T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP.**

Se ha reportado que la interacción de adenosina con los receptores A2AR y A2BR en los linfocitos T citotóxicos CD8+, da por resultado el incremento de AMPc y en consecuencia la inhibición de su activación (Takayama and Sitkovsky, 1988; Sugiyama *et al* 1992; Koshiba *et al* 1999; Torgersen *et al* 2002), incluyendo la proliferación y secreción de citocinas antitumorales importantes como el IFN- $\gamma$  (Koshiba *et al* 1997; Sun *et al* 2000; Torgersen *et al* 2002).

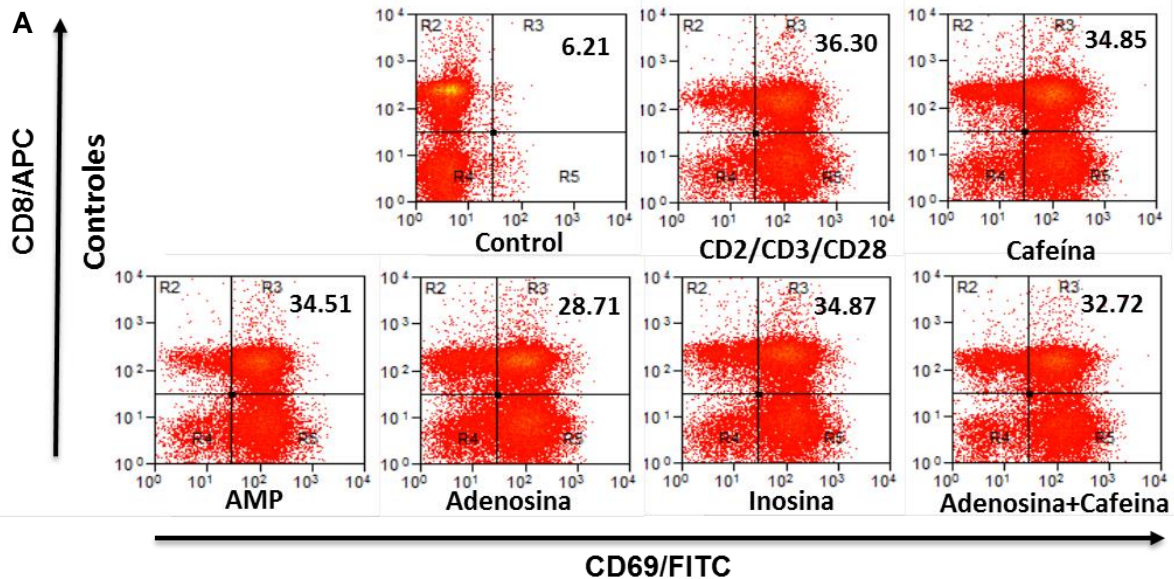
Con la finalidad de analizar el efecto de los medios condicionados de las células tumorales HeLa, cultivadas durante 5 hrs en presencia de ADP, AMP, ADP+P y AMP+A, sobre la activación temprana de los linfocitos T, a través del análisis de la expresión de la molécula CD69 y la síntesis de IFN- $\gamma$  (Sancho *et al* 2005; Schreiber *et al* 1992), se cultivaron CMNSP con anticuerpos CD2/CD3/CD28 en presencia de los diferentes medios condicionados a una dilución 1:25. El porcentaje de células CD8+CD69+ y CD8+IFN- $\gamma$ + fue evaluado mediante citometría de flujo a las 48 horas de cultivo (**Figs. 19 y 20**).

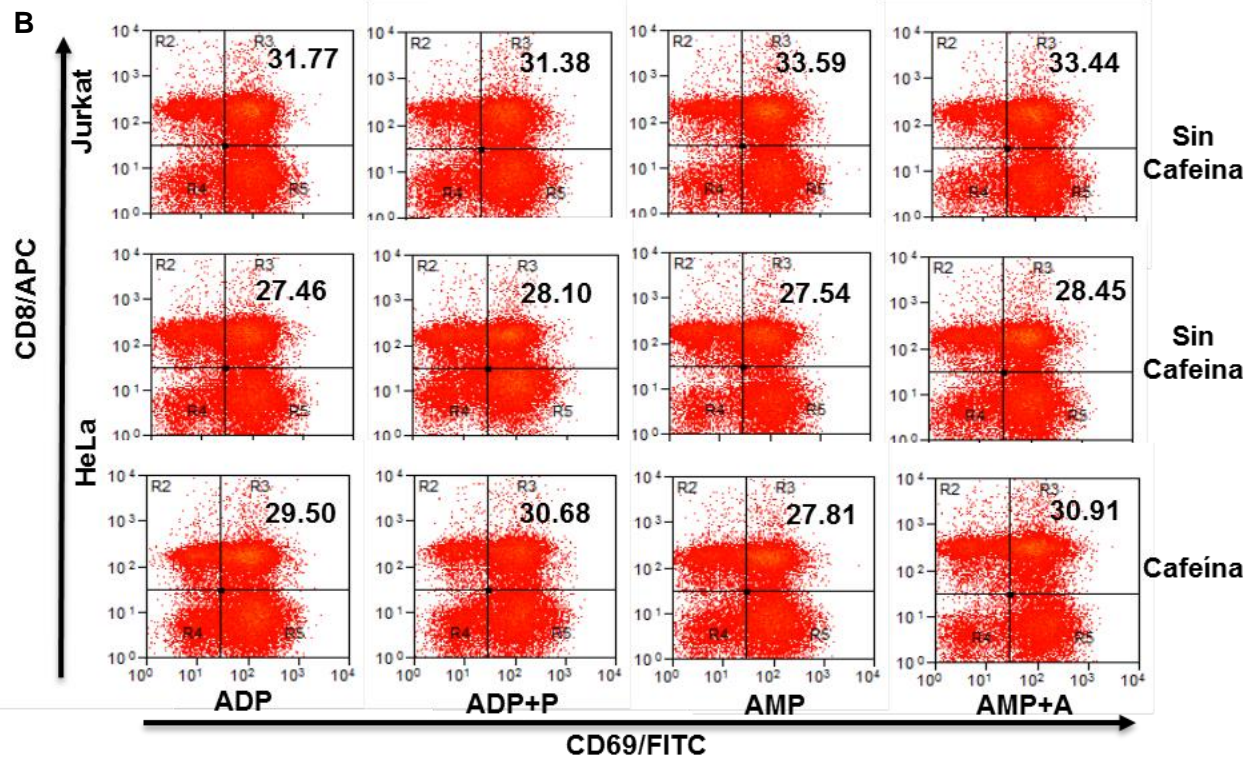
El porcentaje de linfocitos T CD8+CD69+, después de estimular las CMSP con las perlas anti-CD2/CD3/CD28 fue de 36.3%, el cual fue tomado como el control positivo de activación; mientras que la estimulación de CMSP en presencia de adenosina pura (1 mM) redujo a un 28.71% la cantidad de linfocitos T CD8+CD69+. Por su parte, la adición simultánea de adenosina y cafeína (300  $\mu$ M), antagonista de los receptores para adenosina, produjo una menor disminución en el número de linfocitos T CD8+CD69+, respecto a adenosina pura, obteniéndose un 32.72% de linfocitos TCD8+CD69+. Cabe mencionar que la adición de AMP, Inosina y cafeína no produjeron una reducción considerable en la población de linfocitos T CD8+CD69+ (**Fig. 19A**).

Por otra parte, al cultivar las CMSP en presencia de los sobrenadantes de las células HeLa cultivadas con ADP y AMP, las poblaciones de linfocitos CD8+CD69+ disminuyeron de manera importante, a aproximadamente 27.5%. Asimismo, la adición de los sobrenadantes de HeLa conteniendo ADP+P y AMP+A también produjeron disminución en la población de linfocitos T CD8+CD69+ de manera relevante, encontrándose un 28.1 y 28.45% respectivamente. Por otro lado, cuando se emplearon los mismos sobrenadantes, en presencia de cafeína 300  $\mu$ M, se obtuvo una recuperación parcial de linfocitos T CD8+CD69+, respecto al control positivo, en todos los casos. Los porcentajes de CD8+CD69+ fueron de 29.5 para ADP, 27.81 para AMP, de 30.68 para ADP+P, y de 30.91% para AMP+A (**Fig. 19 B**). Por otro lado, los sobrenadantes de Jurkat en presencia de ADP y ADP+P, AMP y AMP+A produjeron una ligera reducción, aunque no significativa, en la población de linfocitos CD8+CD69+, respecto al control positivo, obteniéndose valores de 31.77%, 31.38%, 33.59% y 33.44% respectivamente (**Fig. 19B**).

Después de estimular las CMSP con las perlas anti-CD2/CD3/CD28, se encontró que un 1.77% de las células TCD8+ mostraron positividad para IFN- $\gamma$ , el cual fue tomado como el control positivo de activación; mientras que la estimulación de CMSP en presencia de adenosina pura (1 mM) redujo de manera significativa, a un 0.66%, la población de linfocitos TCD8+ IFN- $\gamma$ +. Por su parte, la adición simultánea de adenosina y cafeína (300  $\mu$ M), produjo una menor disminución en el número de linfocitos T CD8+IFN- $\gamma$ +, respecto a adenosina pura, obteniéndose 1.01%. Por otro lado, la adición de AMP, inosina y cafeína produjeron una moderada disminución en la población de linfocitos T CD8+IFN- $\gamma$ +, obteniéndose los siguientes porcentajes: 1.24%, 1.93 % y 1.15% respectivamente (**Fig. 20A**).

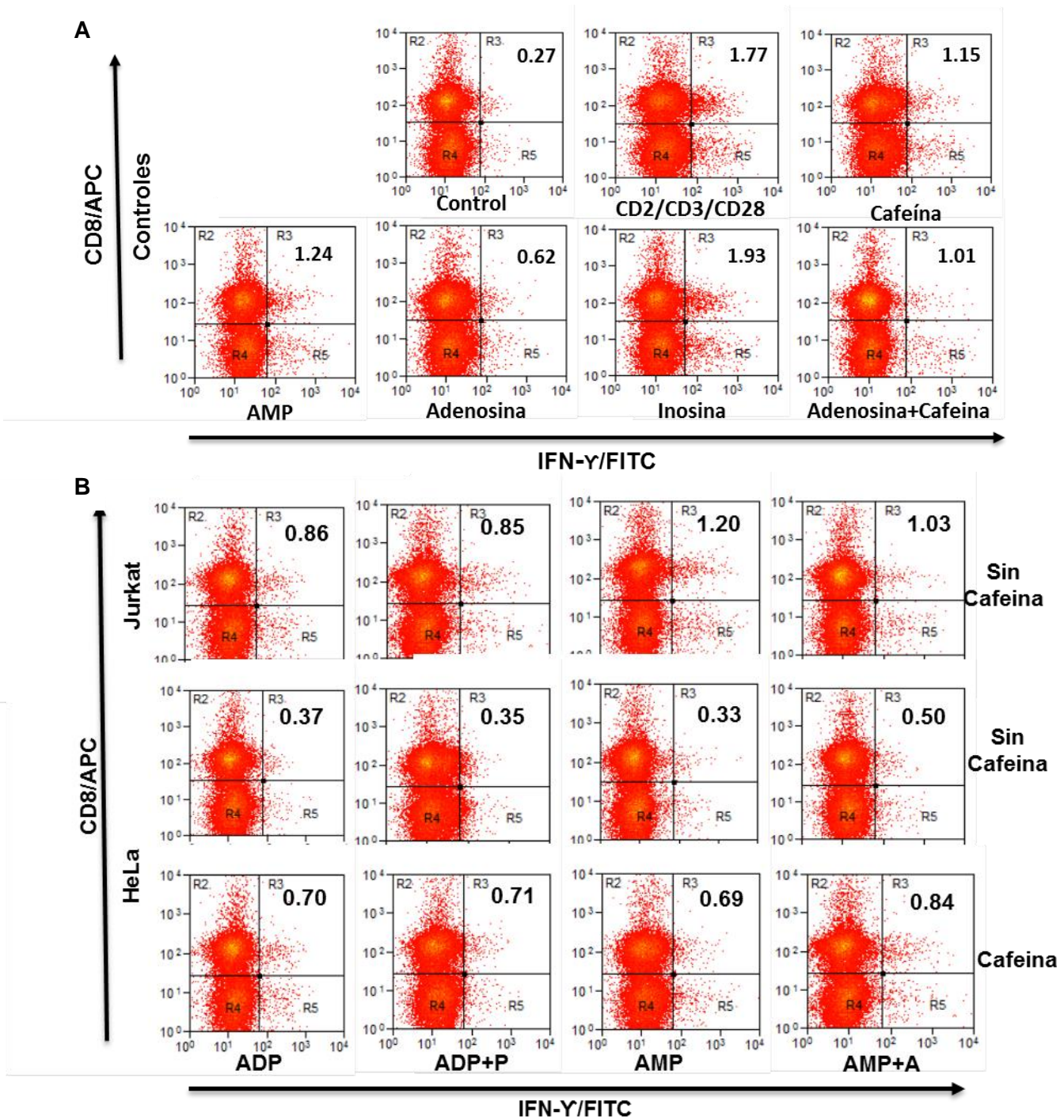
Por otra parte, al cultivar las CMSP en presencia de los sobrenadantes de las células HeLa cultivadas con ADP y AMP, las poblaciones de linfocitos CD8+IFN- $\gamma$ + disminuyeron fuertemente a un 0.37% y 0.33% respectivamente. Asimismo, la adición de los sobrenadantes de HeLa conteniendo ADP+P y AMP+A también produjeron disminución considerable en la población de linfocitos T CD8+IFN- $\gamma$ +, 0.35% y 0.5% respectivamente. Por otro lado, cuando se emplearon los mismos sobrenadantes, en presencia de cafeína 30 $\mu$ M, se obtuvo una recuperación parcial de linfocitos T CD8+IFN- $\gamma$ +, respecto al control positivo, en todos los casos. Los porcentajes de CD8+IFN- $\gamma$ + fueron de 0.70% para ADP, 0.69% para AMP, 0.71% para ADP+P, y de 0.84% para AMP+A. Por otro lado, los sobrenadantes de Jurkat en presencia de ADP y ADP+P, AMP y AMP+A también produjeron una considerable reducción, en la población de linfocitos T CD8+IFN- $\gamma$ +, respecto al control positivo, obteniéndose valores de 0.86%, 0.85%, 1.2% y 1.03% respectivamente (**Fig. 20B**).





**Figura 19. Células tumorales HeLa de CaCu inhiben la activación de células T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP.**  $2.5 \times 10^5$  CMNSP de donadores normales fueron cultivados durante 48 hrs en presencia de anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 unidos a perlas en proporción 2:1 perlas: CMSP (control positivo). El efecto de adenosina pura (1 mM), inosina (1 mM) y cafeína (300  $\mu$ M) (A); así como de sobrenadantes de las células Jurkat o HeLa previamente cultivadas durante 5 hrs con ADP, AMP, ADP+P y AMP+A a una concentración de 2.5mg/mL (B), fue analizado sobre la activación temprana de los linfocitos T CD8+, a través de la expresión del marcador CD69+. En algunos cultivos se adicionó cafeína (300  $\mu$ M), un antagonista de los receptores de adenosina. Se muestra un ensayo representativo de tres ensayos hechos de manera independiente.



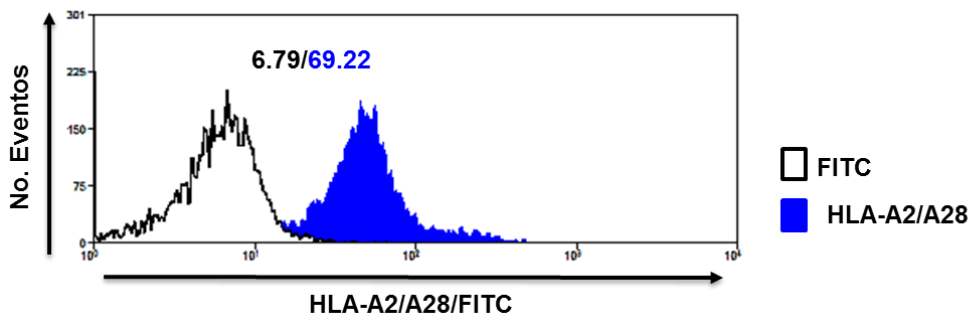


**Figura 20. Células tumorales HeLa de CaCu inhiben la generación de IFN- $\gamma$  en células T CD8+, mediante la generación de adenosina a partir de AMP y ADP.**  $2.5 \times 10^5$  CMNSP de donadores normales fueron cultivados durante 48 hrs en presencia de anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 unidos a perlas en proporción 2:1 perlas: CMSP (control positivo). El efecto de adenosina pura (1 mM), inosina (1 mM) y cafeína (300  $\mu$ M) (A); así como de sobrenadantes de las células Jurkat o HeLa previamente cultivadas durante 5 hrs con ADP, AMP, ADP+P y AMP+A a una concentración de 2.5mg/mL (B), fue analizado sobre la activación temprana de los linfocitos T CD8+, a través de la determinación de IFN- $\gamma$  en células T CD8+. En algunos cultivos se adicionó cafeína (300 $\mu$ M), un antagonista de los receptores de adenosina. Se muestra un ensayo representativo de tres ensayos hechos de manera independiente.

## La adenosina generada por células tumorales de CaCu no afecta la función citotóxica de linfocitos T citotóxicos específicos.

La adenosina potentemente inhibe la expresión de moléculas efectoras citotóxicas tales como perforinas y Fas ligando (Hoskin et al, 2002; Koshiba et al 1997), adhesión de linfocito T citotóxicos (CTL) a células tumorales (MacKenzie et al 1994,2002) y exocitosis de granulos por CTL (Koshiba et al 1997). Por lo tanto, con la finalidad de analizar si la adenosina generada por las células tumorales de CaCu bajo las diferentes condiciones de cultivo, afectan la actividad efectora de CTLs, linfocitos T activados con células dendríticas y con el péptido antigénico YMDLQPETT (secuencia 11-20) de la proteína E7 del virus de papiloma humano 16 (HPV-16), fueron retados contra células blanco T2 cargadas con el péptido YMDLQPETT, en presencia y ausencia de los sobrenadantes de células HeLa cultivadas previamente con ADP, AMP, ADP+P y AMP+A a dilución 1:25. El efecto citotóxico de los linfocitos generados bajo estas condiciones fue evaluado sobre células blanco, T2 (HLA-A\*0201+) cargadas con el péptido YMDLQPETT marcadas con CFSE y posteriormente con el colorante vital 7AAD.

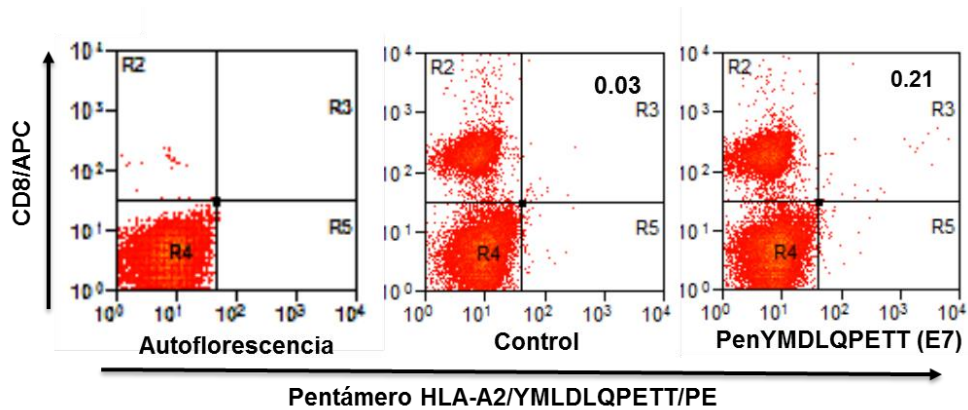
Para generar los CTLs específicos al péptido YMDLQPETT, inicialmente se seleccionó a un donador normal positivo al alelo HLA-A2, mediante el uso del anticuerpo monoclonal anti-HLA-A2 (ATCC, USA) marcado con FITC. En la **Figura 21** se observa la positividad de las CMNSP al alelo indicado, mostrando un valor de 69.22 de IMF para la tinción con el anticuerpo anti-HLA-A2, tomando como referencia las células teñidas con anticuerpo secundario marcado solo con FITC.



**Figura 21. Expresión de moléculas HLA-A2 en CMSP de un donador normal.** Los histogramas muestran la Intensidad media de fluorescencia (IMF) en las CMNSP, empleando el anticuerpo 2° FITC como control (histograma en línea negra y un anticuerpo anti-HLA-A2 (histograma en color azul).

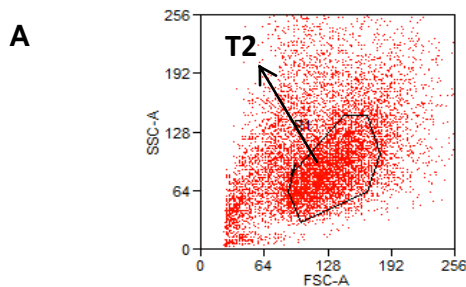


Por otro lado, después de estimular linfocitos T CD8+ con células dendríticas activadas *in vitro* en presencia del péptido antigénico YMDLQPETT, se encontró una población de 0.21% de células TCD8+ específicas al péptido YMDLQPETT, empleando al pentámero HLA-A2/YMDLQPETT (Fig. 22).

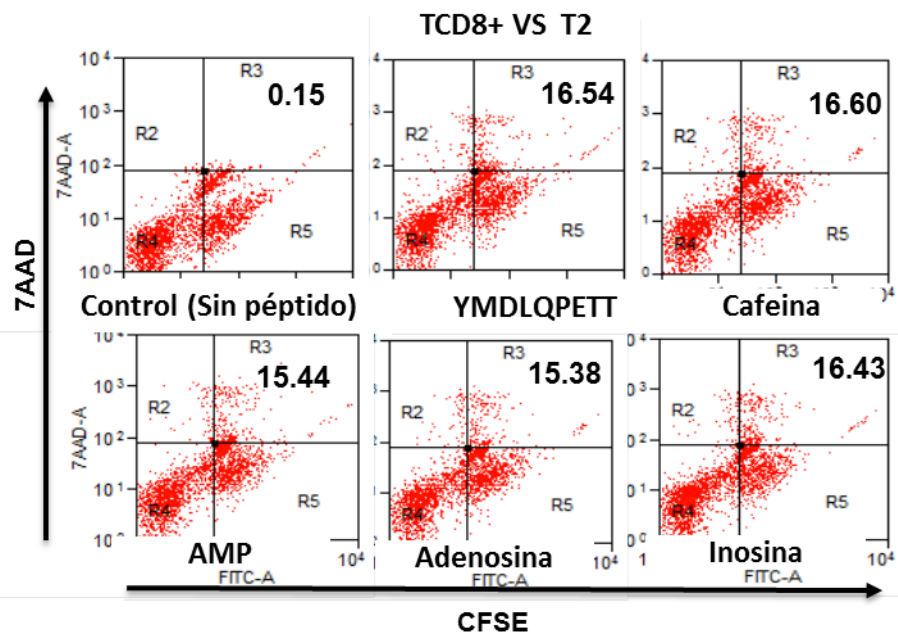
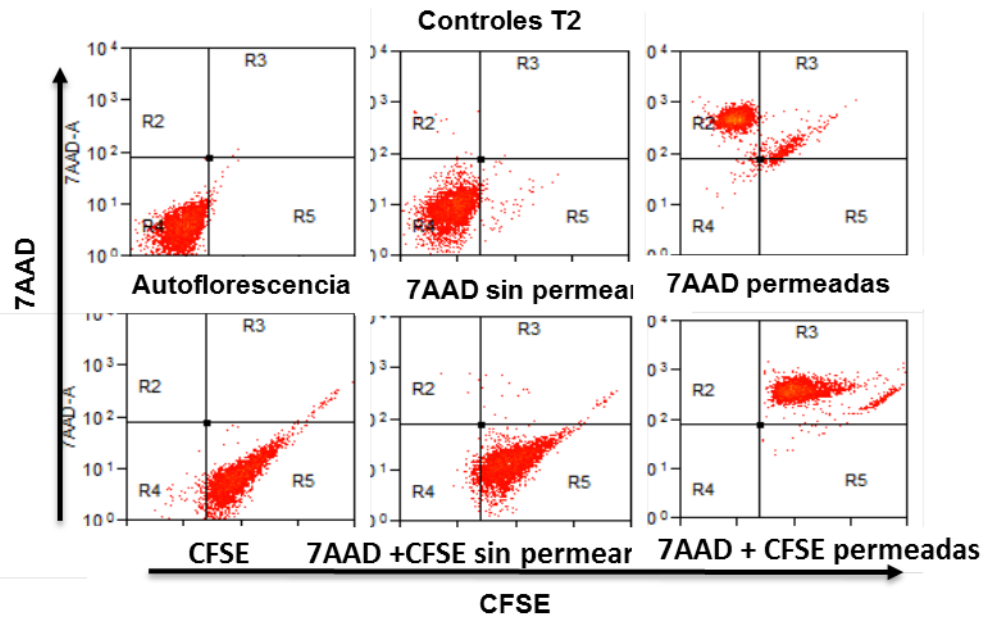


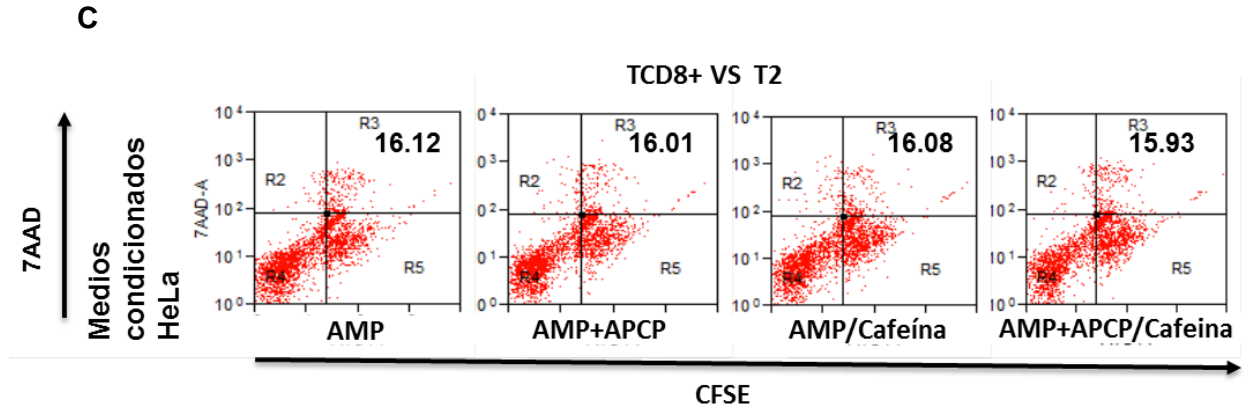
**Figura 22. Generación *in vitro* de linfocitos TCD8+ específicos al péptido YMDLQPETT.** Linfocitos T CD8+ de un donador normal positivo al alelo HLA-A2 fueron estimulados *in vitro* con células dendríticas activadas y cargadas con el péptido YMDLQPETT (secuencia 11-20) derivado de la proteína E7 de HPV-16 (ver materiales y métodos). Mediante el uso de pentámeros HLA-A2/YMDLQPETT marcados con ficoeritrina (PE), se determinó el porcentaje de linfocitos T CD8+, empleando de manera simultánea un anticuerpo monoclonal anti-CD8-APC. Ejemplo representativo de 3 experimentos.

Para los ensayos de citotoxicidad, células T2 fueron pulsadas con el péptido YMDLQPETT y utilizadas como células blanco. Las células T CD8+ estimuladas bajo las condiciones antes mencionadas fueron retadas en proporción 20:1, efectoras: blanco, y la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ fue determinada mediante el empleo del colorante vital 7AAD a través de citometría de flujo. Los resultados muestran que la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ activados con el péptido YMDLQPETT, y cultivados con los sobrenadantes de las células tumorales HeLa cultivadas bajo las diferentes condiciones (ADP, ADP+P, AMP y AMP+A), mostraron una similar actividad citotóxica, alrededor del 16% (Fig. 23C), sugiriendo que la capacidad citotóxica de los CTLs no fue afectada durante el co-cultivo con las células blanco durante el ensayo de citotoxicidad, aún en presencia de adenosina contenida en los sobrenadantes de las células tumorales HeLa cultivada bajo las diferentes condiciones.



**B**





**Figura 23. Adenosina generada por células tumorales de CaCu no afecta la función efectora de CTLs.** ( $2.5 \times 10^5$ ) CTLs, obtenidos después de la estimulación de dos rondas con células dendríticas cargadas con el péptido antigénico YMDLQPETT, fueron cultivadas con medios condicionados (dilución 1:25) de células tumorales HeLa previamente cultivadas durante 5 hrs con AMP y AMP+A a una concentración de 2.5mg/mL; y retadas contra células T2 (25 000) pulsadas con el mismo péptido y marcadas previamente con CFSE en proporción 20:1 (efectoras:blanco). Después de 4 horas de co-cultivo, las células de cada pozo fueron teñidas con el colorante vital 7AAD. La población de células blanco fue identificada con base a su tamaño (forward scatter (FSC)) y granularidad (sideward scatter (SSC)) (A). Asimismo, la lisis total o espontánea fue analizada en las células blanco tratadas o no con peróxido de hidrógeno, e identificadas mediante citometría de flujo a través del marcaje con CFSE y 7AAD (B). Porcentaje de células blanco muertas, mediado por los CTLs, en presencia o ausencia de los sobrenadantes de HeLa (C), después de 72 hrs. Se muestran los *Dot plots* representativos de la actividad efectora de CD8+ específicos sobre las células T2 sin péptido (T2 (-)) o cargadas con el péptido YMDLQPETT (T2+Pep).

## DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Es aceptado que el sistema inmune es fundamental para suprimir el inicio y la progresión de tumores establecidos, esencialmente por los linfocitos T citotóxicos (CTL), células efectoras importantes de la inmunidad antitumoral (Beavis *et al* 2012). Sin embargo, los tumores utilizan diferentes mecanismos para facilitar el escape inmune y prevenir su eliminación, incluyendo: a) la producción de citocinas anti-inflamatorias como el factor de crecimiento transformante B (TGF- $\beta$ ), interleuina 10 (IL-10), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL22) entre otras; b) el reclutamiento de células inmunosupresoras como las células T reguladoras (Tregs), células supresoras derivadas del linaje mielóide (MDSC), células NKT entre otras; c) co-inhibición de células T efectoras a través de la expresión de CTLA-4 y PD-L1; d) la producción de metabolitos inmunosupresores como arginasa y óxido nítrico sintasa, idoleamina 2-3 oxigenasa (IDO), cicloxigenasa 2 (COX-2) y prostaglandina E2 (PGE2), y la adenosina producida por la fosfohidrólisis de los nucleótidos ATP, ADP y AMP llevada a cabo por las ectonucleotidasas extracelulares CD39 y CD73 (Stewart and Smyth, 2011).

La expresión de CD39 y/o CD73, ha sido reportada en varios tipos de cáncer, incluyendo: cáncer de vejiga (Stella *et al* 2009), leucemia (Mikhailov *et al* 2008), glioma (Bavaresco *et al* 2008), glioblastoma (Ludwing *et al* 1999), melanoma (Sadej *et al* 2006), cáncer de ovario (Cho *et al* 2006), tiroides (Kondo *et al* 2006), esófago (Fukuda *et al* 2004), próstata (Hastie *et al* 2005) y mama (Spychala *et al*, 2004; Wang *et al*, 2008). Asimismo, se ha demostrado que la expresión de CD39 actúa sobre la angiogénesis tumoral y el incremento de su expresión está asociado con la diferenciación de melanocitos a células malignas en melanoma; mientras que CD73 ha sido asociada fuertemente con un fenotipo prometastático en melanoma y cáncer de mama y recientemente se ha reportado que la terapia con anti-CD73 inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis en cáncer de mama, sugiriendo entonces que la expresión de estas moléculas en tumores tiene un papel relevante en la progresión e invasión tumoral (Stagg *et al* 2010; Jin *et al* 2010). En el caso particular de CaCu, aún no se tienen reportes sobre la expresión y actividad funcional de las ectoenzimas CD39/CD73, por lo que el objetivo del presente trabajo fue el de analizar la expresión y actividad funcional de estas ectoenzimas para generar adenosina, además de analizar su efecto sobre la actividad funcional de linfocitos T citotóxicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo experimental que se estableció *in vitro*, empleando a las células tumorales HeLa de CaCu, se encontró que: 1) las células HeLa (HPV-18+), coexpresan las nucleotidasas CD39/CD73; 2) estas células tumorales tienen la capacidad de generar adenosina a través de la actividad funcional, de manera secuencial, de las ectonucleotidasas CD39/CD73, la cual fue determinada mediante cromatografía de capa fina (TLC), y cuantificada por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC); 3) la actividad funcional de CD39 y CD73 en las células de CaCu, fue inhibida de manera importante por los inhibidores específicos: polioxometalato (POM-1) y adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP), respectivamente; 4) la adenosina generada por las células tumorales cultivadas en presencia de ADP y AMP, tuvo un efecto importante sobre la inhibición de la proliferación y activación de linfocitos T estimulados con anti-CD2/CD3/CD28, pero no sobre la actividad citotóxica de linfocitos T citotóxicos.

La vía adenosinérgica, constituida esencialmente por la expresión de las ectoenzimas CD39/CD73, es un mecanismo de inmunosupresión que ha sido recientemente caracterizado y estudiado, tanto en células reguladoras de la respuesta inmune como por células tumorales. Por ejemplo, diferentes grupos de investigación han reportado la coexpresión de CD39/CD73, en células T reguladoras de ratón y humano, y han demostrado su capacidad para generar

adenosina con la finalidad de suprimir la actividad de células dendríticas, linfocitos T, B y células NK en la respuesta inmune (Deaglio *et al* 2007; Mandapathil *et al* 2010; Mandapathil *et al* 2010; Regateiro *et al* 2011). Por otro lado, se ha demostrado que esta vía de inmunosupresión, es dominante en el microambiente tumoral, ya que bajo condiciones de hipoxia, se induce la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73, y en consecuencia se produce la fosfohidrólisis de ATP/ADP y AMP para generar adenosina en grandes cantidades (Sitovsky *et al* 2008). Por tal razón, la participación de esta vía en diversos tipos tumorales ha recibido mucha atención en los últimos años. Por ejemplo, en las líneas celulares U-87 MG, T98G y U-251 de glioma, se encontró una alta expresión de CD73, mientras que la de CD39 fue baja o incluso apenas detectable (Xu *et al* 2013). Por otro lado, el grupo de Häusler *et al* 2011, recientemente detectó la expresión de CD73 en 14/15 y CD39 en 12/15 cultivos primarios de carcinoma de ovario, y una fuerte co-expresión de ambas ectoenzimas en 11/15 muestras derivadas de ascitis. Asimismo en las líneas celulares de cáncer de ovario SK-OV-3 y OAW-42 también se encontró una alta co-expresión de ambas ectoenzimas (Häusler *et al* 2014). Por otro lado, en un trabajo realizado por Clayton y colaboradores en el 2011, se mostró que las líneas celulares de cáncer de vejiga HT1376, colorectal CACO2 y de mama MCF-7, exhiben una potente actividad fosfohidrolítica de ATP y AMP, atribuido en gran parte a la expresión de CD39 y CD73 en vesículas de tamaño nanométrico denominadas exosomas.

En nuestro trabajo encontramos que en células tumorales de CaCu, la expresión de CD39 y CD73 se asoció con la capacidad de generar adenosina, cuando estas células fueron cultivadas en presencia de ADP y AMP, como sustratos específicos de ambas enzimas respectivamente. De hecho, la generación de los diferentes subproductos (AMP, Adenosina e Inosina) fueron identificados a través de cromatografía en capa fina (TLC), como compuestos que migraron de manera separada al ser comparados con sus respectivos compuestos puros. Es conveniente mencionar que la generación de adenosina, no es un evento llevado a cabo únicamente por la acción catalítica de CD39 y CD73, ya que a través de la actividad de otras ectonucleotidasas, que incluyen a los miembros de las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas, ecto-ATPasas, ectoapirinasas, EC 3.6.1.5), ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasas (E-NPP, EC 3.1.4.1), ectoalcalina fosfatasa (ALP, EC 3.1.3.1), pueden hidrolizar de manera eficiente a los nucleótidos ATP, ADP y AMP para generar adenosina (Scussel *et al* 2012). Sin embargo, la disminución importante de adenosina, observada después de la adición de los inhibidores selectivos y específicos para CD39 (polioxometalato (POM-1)), y para CD73 (adenosina 5'- $\alpha$ -metileno difosfato (APCP)) en los cultivos de las células HeLa, y células Jurkat (utilizadas como control negativo de la expresión de CD73), nos permite sugerir que la generación de adenosina es debida en gran parte, a la actividad funcional de estas enzimas. Similares resultados fueron reportados por Szychala y colaboradores (2004), para corroborar el papel funcional de CD73 en líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y BT-549; así como en células de glioma (Xu *et al* 2013; Häusler *et al* 2014). Por otra parte, resultará interesante saber si la expresión de otras ectonucleotidasas, como las mencionadas previamente, contribuyen de manera paralela a la generación de adenosina en las células tumorales HeLa. Por otra parte, al analizar, mediante TLC, los sobrenadantes de las células HeLa cultivadas en presencia de ADP y AMP, se pudo detectar la presencia de inosina, particularmente después de tres horas de cultivo, lo cual sugiere que las células tumorales también co-expresan a la enzima Adenosina Deaminasa (ADA), una enzima implicada en la regulación de adenosina, que se encarga de desaminar adenosina y convertirla a inosina, la cual sigue otra vía metabólica intracelular para la síntesis de nucleótidos (Van Linden y Eltzhig, 2007). También se ha sugerido que la presencia de ADA en células inmunosupresoras, como T reguladoras, es importante para evitar que la interacción de altas concentraciones de adenosina con receptores de alta afinidad para adenosina, como son A1 y A2A, lleve a estas células hacia un estado de inhibición (Liu *et al* 2013; Liu *et al* 2012;

Saldanha-Araujo *et al* 2011). De hecho, esta vía, también ha sido reportada en células tumorales para controlar los niveles de adenosina y evitar que ésta repercuta en su proliferación y capacidad de migración (Vanoni *et al* 2004). En consecuencia sería importante investigar si la expresión de ADA se encuentra incrementada en las células de CaCu como respuesta a los altos niveles de adenosina que éstas mismas producen.

La adenosina ejerce potentes efectos inmunosupresores sobre células TCD4+ y CD8+, incluyendo su proliferación y activación. Los linfocitos T de ratón y humano expresan los receptores A2A, A2B y A3 y su expresión es sobrerregulada después de la estimulación con mitógenos o través del receptor de linfocitos T (TCR) (Lukashev *et al* 2003; Mirabet *et al* 1999; Gessi *et al* 2003). Se ha sugerido que el receptor A2A actúa como un sensor para los niveles de adenosina extracelular (Sitovsky and Ohta, 2005) y en linfocitos T su señalización por adenosina induce la elevación de AMPc citoplasmático, involucrado en la cascada de señalización que conduce a la inhibición y activación de las células T (Sitkovsky *et al* 2004; Ohta and Sitkovsky, 2001; Gessi *et al* 2007; Fredholm *et al* 2003). En un estudio en donde se aislaron linfocitos T de bazo de ratones C57BL/6 y fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 e IL-2, la adición de adenosina inhibió a manera de dosis respuesta la proliferación de células T a muy bajas concentraciones (a partir de 0.1  $\mu$ M), tanto en poblaciones CD8+, CD4 (Th1) y CD4 (Th2) (Kobie *et al* 2006; Hoskin *et al* 2008). Por otro lado, Deaglio y colaboradores en el 2007, mostraron que la proliferación de CD4+ estimuladas por células alogénicas en cultivo, fue sustancialmente inhibida en una manera dosis dependiente con la presencia de un agonista específico de A2A (ATL146e). De manera similar, en el presente estudio encontramos que la adenosina pura, en bajas concentraciones suprime directamente la proliferación de células T de donadores normales inducida por anticuerpos CD2/CD3/CD28 de manera dependiente de la dosis, observándose un mayor efecto inhibitorio en las concentraciones de 1 y 5 mM. Por otro lado encontramos que cuando se utilizaron diluciones 1:50 y 1:25 de los sobrenadantes de la línea celular HeLa cultivada con ADP o AMP respectivamente, fueron capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T inducida por perlas estimuladoras conteniendo anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28. No obstante, en aquellos cultivos de HeLa en donde se añadieron los inhibidores específicos para CD39 (POM-1) y para CD73 (APCP), la cantidad de adenosina generada fue sustancialmente menor, lo cual resultó en un efecto menor sobre la inhibición de la proliferación y activación de linfocitos T. Esto resultó muy evidente en el caso de los sobrenadantes obtenidos de las células Jurkat, en donde no se observó una disminución consistente sobre la proliferación y activación de los linfocitos T, muy probablemente debida a la carencia en la expresión de CD73 en la membrana de estas células, como principal fuente de generación de adenosina.

Por otra parte, la inhibición en la proliferación y activación de linfocitos T, debida en gran parte por la adenosina contenida en los sobrenadantes de las células HeLa cultivadas en presencia de AMP y ADP, fue inhibida parcialmente por cafeína, un análogo de adenosina y bloqueador inespecífico de AR'S (Góngora-Alfaro *et al* 2005), como fue mostrado en los ensayos de marcaje de las células T durante la determinación de la proliferación celular. No obstante, el no haber encontrado una mayor disminución en la inhibición de la proliferación de linfocitos al adicionar cafeína, probablemente se deba a la presencia de otros factores solubles secretados por las células tumorales en el cultivo, tal como la IL-10, ya que se ha reportado que la adenosina tiene un efecto supresor adicional al inducir la liberación de esta citocina en células de microglia a través del receptor A2B, induciendo la síntesis de cantidades importantes de IL-10 (Koscsó *et al* 2012). Además nuestro grupo de trabajo, ha observado que células de CaCu al ser cultivadas con AMP incrementan la producción basal de IL-10 y ésta es disminuida cuando se agrega cafeína al cultivo (Avila Ibarra, 2011).

Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por el grupo de Jin y colaboradores en el 2010, quienes mostraron que sobrenadantes de la línea celular de cáncer de ovario de ratón, ID8 con actividad y expresión de CD73, previamente tratadas con AMP suprimieron la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ inducida por anti-CD3, asimismo la presencia del antagonista SCH58261 (específico para A2A) significativamente inhibió la supresión de la proliferación de células T inducida por adenosina; a diferencia de nuestro trabajo, encontraron que el AMP no inhibe la proliferación de linfocitos T en presencia de APCP indicando que el AMP por sí solo no tiene actividad inmunosupresora. En nuestro estudio, el hecho de haber encontrado inhibición en la proliferación de linfocitos al emplear sobrenadantes de los cultivos de las células tumorales con AMP, ADP y en presencia de POM-1 y APCP, es debido posiblemente a la presencia de otros componentes inmunosupresores contenidos en dichos medios condicionados, ya que al incluir AMP sintético al cultivo no afectó su proliferación.

En otros trabajos se demostró que puede existir un evento de inmunosupresión conjunta, dada por células inmunoregulatoras, tal como las células T CD4+ CD39+, y por células tumorales U-87MG de glioma positivas para CD73; en donde se demostró que la adición de los inhibidores específicos ARL67156 para CD39 y APCP para CD73, disminuyeron esta supresión sinérgica (Xu *et al* 2013). Asimismo, el uso de anticuerpos A1 (anti-CD39) o 7G2 (anti-CD73), fueron capaces de bloquear específicamente la función de CD39 y CD73 y en consecuencia la función inmunosupresora (Häusler *et al* 2014). Otra manera de abatir el efecto inhibitorio de adenosina ha sido a través del uso de antagonistas que funcionan como bloqueadores específicos de los receptores de adenosina. En este sentido, Jin *et al* 2010, reportó que la inhibición de la proliferación de linfocitos T, fue revertida por la adición de un antagonista del receptor A2A denominado SCH58261, indicando por tanto, la participación de este receptor en la señalización adenosinérgica. Aunado a todos estos reportes, se ha demostrado que la cafeína tiene un efecto similar al antagonista SCH58261, ya que permite que la actividad efectora de los linfocitos T citotóxicos no sea inhibida mediante la interacción de adenosina con los receptores específicos, favoreciendo la reducción en la metástasis y previniendo la angiogenia tumoral (Franco *et al* 2008). Con base en estos datos, Otha y colaboradores (2006) realizaron una estrategia de inmunoterapia del cáncer para prevenir la inhibición de los linfocitos T antitumorales en el entorno del cáncer primario y de las metástasis, bloqueando selectivamente los receptores A2A de los linfocitos T, mediante el uso de antagonistas como la cafeína, un antagonista de los receptores A2A.

La adenosina extracelular derivada de células tumorales también es capaz de inhibir la activación de linfocitos T y sus funciones efectoras, incluyendo la secreción de citocinas proinflamatorias (Hoskin *et al* 2008). Durante la fase de activación de linfocitos T, como respuesta al estímulo del TCR, estas células expresan CD69 y la síntesis de algunas proteínas como el IFN- $\gamma$ . CD69 funciona como un marcador de activación temprana, mediante el cual se puede ejercer un efecto co-estimulador en las células T (Sancho *et al* 2005; Miki-Hosokawa *et al* 2009). Lappas y colaboradores en 2005 demostraron que al cultivar células T CD4+ en la presencia de varios análogos de adenosina, resulta en la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$ . Además, la producción de IFN- $\gamma$ , fue revertida con el empleo del antagonista ZM241385 para A2A; mientras que el tratamiento de los linfocitos T con el agonista ATL146e del receptor A2A, atenúa la expresión de CD69. Por otro lado, Otha y colaboradores en el 2009 reportaron que agonistas de adenosina no alteran la inhibición de la proliferación, pero si la producción de IFN- $\gamma$  de manera significativa en linfocitos T estimulados. En tanto que Jin y colaboradores en 2010, también demostraron que la inhibición en la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos TCD8+, dada por la adición de medios condicionados de células tumorales de cáncer de ovario tratadas con AMP, es revertida en presencia de APCP y del antagonista SCH58261.



En nuestro trabajo, detectamos que la adenosina generada por las células HeLa, no altera de manera importante, la expresión del marcador de activación temprana CD69 en T CD8+ después de 48 hrs, pero si la producción de IFN- $\gamma$ . La adición de cafeína a los cultivos incremento considerablemente la generación de esta citocina, sugiriendo entonces que la inhibición en la producción de IFN- $\gamma$  se debe a la interacción de adenosina con receptores específicos dispuestos en los linfocitos T. El hecho de no haber observado un efecto inhibitorio importante de la adenosina generada por las células de CaCu sobre la expresión de CD69, probablemente se deba a la vía de señalización del linfocito, ya que el proceso de activación ya no es reversible (Cosulich *et al* 1987; Swat *et al* 1993); mientras que la disminución de IFN- $\gamma$  se debe probablemente a la disminución en la proliferación celular (Ramasamy *et al* 2008); además el incremento de AMPc provoca la fosforilación y activación de la cinasa Src mediante la proteína cinasa K inhibiendo la producción de IFN- $\gamma$  por inhibición de Lck (Torgensen *et al* 2002).

Por otra parte también ha sido reportado que la adenosina extracelular afecta la función efectora de linfocitos T citotóxicos, alterando la inmunidad antitumoral de CD8+ específicos al tumor. Por ello se generaron linfocitos T CD8+ específicos al péptido YMDLQPETT derivado de la proteína E7 del HPV-16 y fueron cultivados en presencia de adenosina generada en los cultivos de células HeLa tratadas con AMP. De acuerdo a nuestros resultados, no observamos alteración en la actividad efectora de los linfocitos T, adicionando los sobrenadantes durante el co-cultivo de las células efectoras con las células blanco. Estos resultados a diferencia de lo mostrado por diferentes grupos de investigación, en donde encuentran alteración en la generación de células T de memoria contra antígenos específicos al cultivar linfocitos T con células de cáncer de ovario positivas a CD39 y CD73 (Häusler *et al* 2011; Häusler *et al* 2014), probablemente se deba a la etapa de activación en la cual las poblaciones de CTLs fueron cultivadas con los sobrenadantes. Sin embargo nuestro grupo de trabajo previamente demostró que al evaluar la capacidad lítica de linfocitos T citotóxicos específicos al péptido YMDLQPETT para lisar las células blanco T2 pulsadas con el mismo péptido, tampoco fue afectada por la adición de la adenosina generada por células estromales mesenquimales (CEM'S) derivadas de CaCu al cultivo de los linfocitos efectores (Pérez-Mariscal, 2012). El cambio en la expresión de receptores para adenosina en estas poblaciones efectoras y/o la expresión de adenosina desaminasa (regulador de adenosina en la membrana celular), después de la activación con células dendríticas cargadas con péptidos, podría ser interesante de analizar para conocer el porque en estos linfocitos activados, la adenosina no los inhibe.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que las células tumorales de CaCu HeLa, utilizadas en este modelo experimental, co-expresan a las ectoenzimas CD39/ CD73 y desde el punto de vista funcional, son capaces de generar adenosina a través de la fosfohidrólisis de nucleótidos como ADP y AMP. Lo cual puede constituir un mecanismo potencial de inmunosupresión en el CaCu.

## CONCLUSIONES

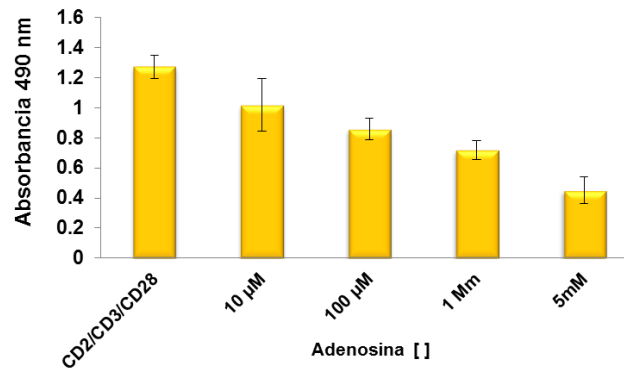
- Las células tumorales de cáncer cérvico uterino (CaCu), HeLa (HPV-18), co-expresan las ectonucleotidasas CD39/CD73 en la membrana celular.
- Las células tumorales HeLa son capaces de generar adenosina mediante la actividad funcional y secuencial de CD39/CD73, a partir de los nucleótidos ADP y AMP, lo cual fue evidenciado de manera cualitativa y cuantitativa mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC).
- La adenosina generada por las células tumorales HeLa en presencia de ADP y AMP, contribuye de manera importante a la inhibición de la proliferación de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28, a través de su interacción con receptores para adenosina.
- La adenosina generada por las células tumorales HeLa, inhibe de manera parcial la expresión del marcador de activación CD69 y la producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28, a través de su interacción con receptores para adenosina.
- La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ específicos al péptido YMDLQPETT derivado de la proteína E7 de HPV-16, no fue afectada por la adenosina generada por las células tumorales HeLa.

## PERSPECTIVAS

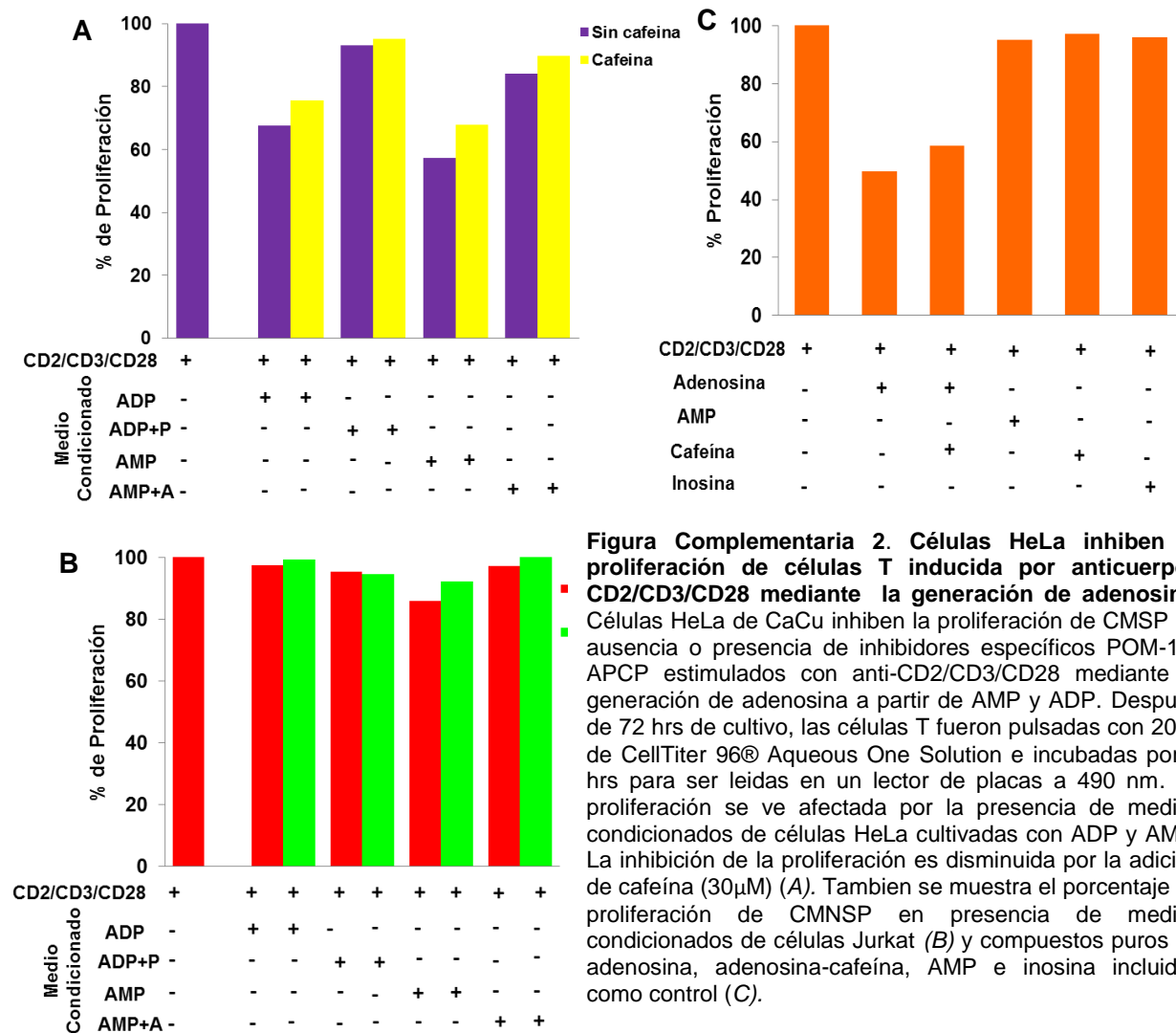
De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, será de gran importancia establecer modelos *in vitro* e *in vivo*, para:

- Evaluar la actividad de CD73 inhibiendo su expresión con RNA de interferencia en las células tumorales de CaCu.
- Analizar la expresión del complejo ADA/CD26 en la superficie celular de células tumorales de CaCu y su función en la disminución de las altas concentraciones de adenosina extracelular.
- Determinar si las funciones de CD39/CD73 están involucrados en la invasión, adhesión y migración de las células tumorales de CaCu.
- Determinar la importancia de CD73 sobre la angiogénesis, específicamente en el contexto de tumorigenesis.
- Por otro lado, resultará importante averiguar si varias líneas celulares derivadas de este tipo tumoral expresan esta vía de inmunosupresión y si en tejidos tumorales de CaCu de diferentes estados clínicos se encuentra expresada.

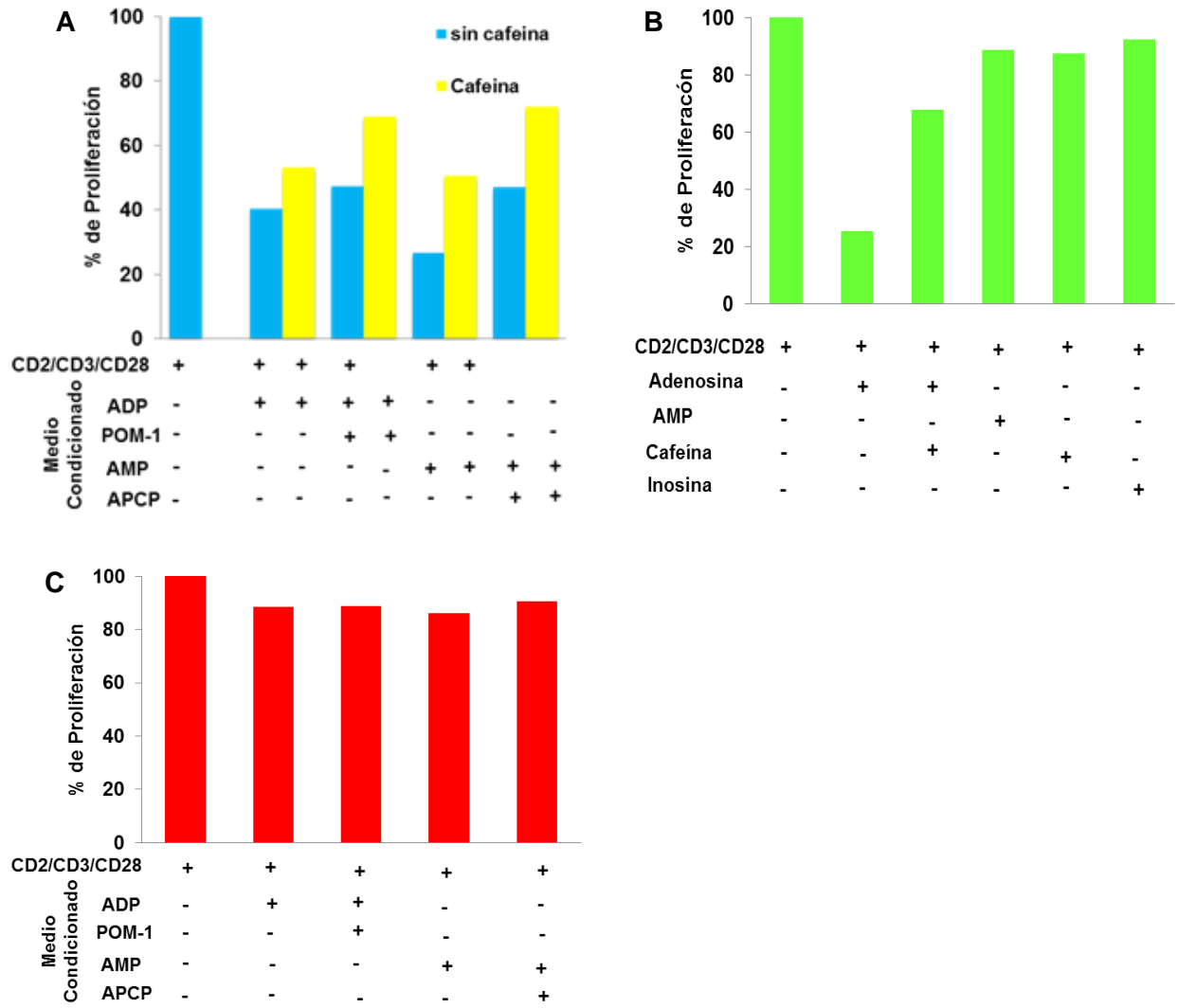
## FIGURAS COMPLEMENTARIAS



**Figura Complementaria 1. Efecto inhibitorio de la adenosina pura sobre la proliferación de linfocitos T.** 2.5 x10<sup>5</sup> CMNSP de donadores normales fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de adenosina pura (10-5000 μM) y en presencia de perlas anti-CD2/CD3/CD28 (2:1). Después de 72 hrs de cultivo, las células T fueron pulsadas con 20 μl de CellTiter 96® Aqueous One Solution e incubadas por 4 hrs para ser leídas en un lector de placas a 490 nm. Los datos se expresan como la media de la absorbancia de cultivos por triplicado de 3 experimentos diferentes.



**Figura Complementaria 2. Células HeLa inhiben la proliferación de células T inducida por anticuerpos CD2/CD3/CD28 mediante la generación de adenosina.** Células HeLa de CaCu inhiben la proliferación de CMSP en ausencia o presencia de inhibidores específicos POM-1 y APCP estimulados con anti-CD2/CD3/CD28 mediante la generación de adenosina a partir de AMP y ADP. Después de 72 hrs de cultivo, las células T fueron pulsadas con 20 μl de CellTiter 96® Aqueous One Solution e incubadas por 4 hrs para ser leídas en un lector de placas a 490 nm. La proliferación se ve afectada por la presencia de medios condicionados de células HeLa cultivadas con ADP y AMP. La inhibición de la proliferación es disminuida por la adición de cafeína (30 μM) (A). También se muestra el porcentaje de proliferación de CMNSP en presencia de medios condicionados de células Jurkat (B) y compuestos puros de adenosina, adenosina-cafeína, AMP e inosina incluidos como control (C).



**Figura Complementaria 3. Células HeLa inhiben la proliferación de células T mediante la generación de adenosina a partir de ADP y AMP.**  $2.5 \times 10^5$  CMNSP de donadores normales previamente marcadas con  $2 \mu\text{M}$  de CFSE, fueron cultivados en presencia de anticuerpos anti-CD2/CD3/CD28 unidos a perlas en proporción 2:1 perlas:CMSP, y de medios condicionados de las células HeLa (A) o de Jurkat (B), previamente cultivadas con ADP, AMP, ADP+P y AMP+A. Después de 72 hrs de cultivo, se determinó la proliferación de los linfocitos T por la disminución en el marcaje de CFSE en las células en división. En algunos cultivos se adicionó cafeína ( $300 \mu\text{M}$ ), un antagonista de los receptores de adenosina. CMSP estimuladas con los anticuerpos, también fueron cultivadas en presencia de adenosina pura ( $1 \text{mM}$ ), inosina ( $1 \text{mM}$ ) y cafeína ( $300 \mu\text{M}$ ) (C). Se muestran los porcentajes de células proliferantes, bajo las condiciones antes mencionadas, de un ensayo representativo de tres ensayos hechos de manera independiente.

## LITERATURA CITADA

- \*\*Abbas KA, Lichtman A (2009). "Basic Immunology; Functions and Disorders of the Immune System". 3 edición. Elsevier, Philadelphia. 3-27.
- \*\*Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). Biología molecular de la célula. 5ª edición. Ediciones Omega. Barcelona.1313-1316.
- \*\*Allard B, Turcotte M, Stagg J. (2012). CD73-Generated Adenosine: Orchestrating the Tumor-Stroma Interplay to Promote Cancer Growth. *J Biomed Biotechnol.* 2012. 1-8.
- \*\*Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G.(2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine.*19:355– 67.
- \*\*Avila Ibarra L. (2011). Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- \*\*Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AM. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 319:61–68.
- \*\*Bauerle J, Grenz A, Kim A, Lee H, and Eltzschig H. (2011). Adenosine Generation and Signaling during Acute Kidney Injury. *Am Soc Nephrol.* 22: 14–20.
- \*\*Beavis P, Stagg J, Darcy P, and Smyth M. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology.* 936: 1-7.
- \*\*Blay J, White T and Hoskin D. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res.* 57:2602–2605.
- \*\*Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. (2001). CTLA-4- mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.*19: 565–594.
- \*\*Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel P, Junger W. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 314:1792–1795.
- \*\*Cho S, Polster J, Engles JM, Hilton J, Abraham EH, Wahl RL. (2006). In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism. *J Nucl Med.* 47:837–845.
- \*\*Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. (2011). Cáncer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol.* 187:676–83.
- \*\*Colgan S, Eltzschig H, Eckle T and Thompson L. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling.* 2: 351–360.

- \*\*Cosulich M, Rubartelli A, Risso A, Cozzolino F, Bargellesi A. (1987). Functional characterization of an antigen involved in an early step of T- cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 4205-4209.
- \*\*Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V, Strom T and Robson S. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 204: 1257–1265.
- \*\*Dianzani U, Redoglia V, Bragardo M. (1993). Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 151:3961–3970.
- \*\*Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science.* 110: 525-541.
- \*\*Dwyer K, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom T and Robson S. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 3:171–180.
- \*\*Eltzschig H, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton K, Daniels D, Schonfeld C, Loffler M, Reyes G, Duszenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman K, Coe I and Colgan S. (2005). HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med.* 202:1493–14505.
- \*\*Eltzschig H. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. (2010). *Anesthesiology.* 111 (4): 904–915.
- \*\*Faguet B. (2008). *The War on Cancer An Anatomy of Failure, A Blue print for the Future.* Springer, Dordrecht. 37-58.
- \*\*Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. (2002). Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomavirus. *The J of Immunology.* 169:3242-3249.
- \*\*Finn O. (2008). Cancer Immunology. *N Engl J Med.* 358:2704-15.
- \*\*Franco R. (2008). Café y cáncer. *Med Clin.* 131:633-635.
- \*\*Fredholm B, Battig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 51: 83-133.
- \*\*Fredholm B, Ijzerman A, Jacobson K, Klotz K and Linden J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527–5522.
- \*\*Fredholm B, Cunha R, Svenningsson P. (2003). Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 413–426.
- \*\*Fukuda K, et al. (2004). Differential gene expression profiles of radioresistantoesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer.* 91:1543–1550.

- \*\*Gariglio P, Rangel L. (1992). Virus and cancer Review Spanish. *Salud Publica Mex.* 34:308-317.
- \*\*Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gavioli R, Fortini C, Leung E, Mac Lennan S, and Borea P.(2003).Expression of A3 Adenosine Receptors in Human Lymphocytes: Up-Regulation in T Cell Activation. *Mol Pharm.* 65 :711-719.
- \*\*Gessi S, Merighi S, Varani K, Cattabriga E, Benini A, Mirandola P, Leung E, Mac LS, Feo C, Baraldi S, Borea P. (2007). Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. *J. Cell. Physiol.* 211: 826–836.
- \*\*Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. (2012). Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *J Biomed Biotechnol.* 2012:473712.
- \*\*Góngora-Alfaro JL, Moo-Puc RE, Villanueva J, Arankowsky G, Álvarez FJ, Pineda JC, Heredia FJ, Bata JL. (2005). La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolonérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed.* 16: 99-111.
- \*\*Grünewald K and Ridley A. (2010). CD73 represses pro-inflammatory responses in human *Journal of Inflammation.* 7:10
- \*\*Guzman-Rojas L, Alcocer-Gonzalez J, Madrid-Marina V.(1998). Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cancer. Review Spanish. *Salud Publica Mex.* 40(1):38-46.
- \*\*Häusler S, Montalbán I, Diessner J, Stein R, Strohschein J, Hönig A, ADietl, Wischhusen J. (2004). Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion.
- \*\*Haskó G, Linden J, Cronstein B, and Pacher P. (2008).therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 7: 759–770.
- \*\*Hastie C, Saxton M, Akpan A, Cramer R, Masters JR, Naaby-Hansen S. (2005) Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells.*Oncogene.* 24:5905–5913.
- \*\*Hilders C, Ras L, Van Eendenburg J, Nooyen Y, Fleuren G.(1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 15:5 :805-813.
- \*\*Hosken AN, Bevan MJ. (1990). Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class-I molecules. *Science.* 248:367-370.
- \*\*Hoskin D, Butler J, Drapeau D, Haeryfar S, Blay J. (2002). Adenosine acts through an A3 receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int J Cancer* 99: 386-395.
- \*\*Hoskin D, Mader J, Furlong S, Conrad D and Blay J. (2008).Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells. *Int J Oncol.* 32:527–535.



\*\*Huang S, Koshiba M, Apasov S and Sitkovsky M. (1997). Role of A2a adenosine receptor mediated signaling in inhibition of T cell activation and expansion. *Blood*. 90: 1600–1610.

\*\*INEGI (2010). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).

\*\*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.

\*\*Kobie J, Shah P, Yang L, Rebhahn J, Fowell D and Mosmann T. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine. *J Immunol*. 177: 6780–6786.

\*\*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.

\*\*Koshiba M, Kojima H, Huang S, Apasov S, Sitkovsky M. (1997). Memory of extracellular adenosine/A2a purinergic receptor mediated signalling in murine T cells. *J Biol Chem*. 272:25881–25889.

\*\*Koshiba M, Rosin DL, Hayashi N, Linden J, Sitkovsky MV. (1999). Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol*. 55: 614–624.

\*\*Koscsó B, Csoka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virag L, Hasko G. (2012). Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol*. 188:445-453.

\*\*Lappas C, Rieger J, Linden J. (2005). A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- $\gamma$  production in murine CD4+ T cells. *J Immunol*. 174 (2): 1073-1080.

\*\*Linden J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41: 775–787.

\*\*Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. (2013). Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells via Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway. *PLoS One*. 8, e55487.

\*\*Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, Zenke M, Keating A, Zhao RC. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *J Immunol*. 189:1182-1192.

\*\*Loeb Lawrence. (2011). Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Natural Reviews*.11: 450-458.

\*\*Loffler M, Morote-Garcia J, Eltzschig S, Coe I and Eltzschig H. (2007). Physiological roles of vascularnucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:1004–1013.

- \*\*MacKenzie WM, Hoskin DW and Blay J. (1994). Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cells through an A3 receptor. *Cancer Res.* 54: 3521-3526.
- \*\*MacKenzie WM, Hoskin DW and Blay J. (2004). Adenosine suppresses  $\alpha 4\beta 7$  integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to colon adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res.* 276: 90-100.
- \*\*Mandapathil M, Szczepanski M, Szajnik M, Ren J, Jackson E, Johnson J, Gorelik E, Lang S, and Whiteside T. (2010). Adenosine and Prostaglandin E2 Cooperate in the Suppression of Immune Responses Mediated by Adaptive Regulatory T Cells. *The Journal Of Biological Chemistry.* 285 (36): 27571–27580.
- \*\*Massaia M, Perrin L, Bianchi A. (1990). Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J Immunol.* 145:1664–1674.
- \*\*McLaughlin F, Finn P, and La Thangue N. (2003). The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *Elsevier Science.* 8 : 793-802.
- \*\*Mikhailov A, et al. (2008). CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol.* 181:464–475.
- \*\*Mora-García ML, Duenas-González A, Hernández-Montes J, De la Cruz-Hernández E, Pérez-Cárdenas E, Weiss-Steider B, Santiago-Osorio E, Ortíz-Navarrete VF, Rosales VH, Cantú D, Lizano-Soberón M, Rojo-Aguilar MP and Monroy-García A. (2006). Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Journal of Translational Medicine.* 4:55.
- \*\*Mustelin T, Taskén K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J.* 371 (Pt): 15-27.
- \*\*Niemela J, Henttinen T, Yegutkin G. (2004). IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: A mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol.* 172:1646Y53.
- \*\*Ohta A, Gorelik E, Prasad S. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 103:13132-13137.
- \*\*Ohta, A and Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 414, 916–920.
- \*\*Pellegatti P, Raffaghello Z, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, and Di Virgilio F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One.* 3(7):e2599.
- \*\*Pérez-Mariscal F. (2012). Efecto inmunosupresor de la vía CD73/adenosina generada por las células estromales mesenquimales (CEM'S). Tesis de Licenciatura sobre la actividad funcional de linfocitos T citotóxicos (LTC). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

- \*\*Rabinovich G, Gabrilovich D and Sotomayor E. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 25:267–296.
- \*\*Ramadasamy R, Kong C, Fong H, Vidyadaran S, Dazzi F. (2008). The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 251: 131–136.
- \*\*Regateiro F, Howie D, Nolan K, Agorogiannis E, Greaves D, Cobbold S and Waldmann H. (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* 41: 2955–2965.
- \*\*Resta R and Thompson L. (1997). T cell signalling through CD73. *Cell Signal.* 9:131–139.
- \*\*Resta R, Yamashita Y, Thompson L. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev.* 161: 95–109.
- \*\*Robson S, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K and Enjyoji K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost.* 31: 217–233.
- \*\*Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 196 :137-51.
- \*\*Sadej R, Spychala J, 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.
- \*\*Saldanha F, Ferreira F, Palma P, Araujo A, Queiroz R, Covas D, Zago M, Panepucci R. (2011). Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res.* 7: 66–74.
- \*\*Sancho D, Gómez M, Sánchez F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26 (3): 136-140.
- \*\*Schreiber R, Farrar M, Hershey G, Fernandez J. (1992). The structure and function of interferon- $\gamma$  receptors. *Int. J. Immunopharmacol.* 14: 413–419.
- \*\*Scussel L, Braganhol E, Fernandes R, Albano M and Oliveira A. (2012). Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012: 1-10.
- \*\*Sitkovsky M and Ohta A. (2005). The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors. *Trends Immunol.* 26, 299–304.
- \*\*Sitkovsky M, Kjaergaard J, Lukashev D and Ohta A. (2008). Hypoxia adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res.* 14:5947–52.
- \*\*Sitkovsky MV (2003). Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol* 65: 493–501.

- \*\*Sitkovsky MV (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia inducible factors and adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Annu Rev Immunol* 22: 2101–2126.
- \*\*Spychala 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 Res*. 10:708–717.
- \*\*Stagg J and Smyth MJ. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 29:5346–58.
- \*\*Stagg J, Divisekera U, McLaughlina N, Sharkeya J, Pommeyb,c S, Denoyerd D, Dwyer K, and Smytha M. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Pnas*. 107: 1547–1552.
- \*\*Stewart T and Smyth MJ. (2011). Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer Metastasis Rev*. 30:125–140
- \*\*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*. 10.1016/j.urolonc.2009.01.035.
- \*\*Sugiyama H, Chen P, Hunter M, Taffs R, Sitkovsky M (1992). The dual role of the cAMP-dependent protein kinase C alpha subunit in T-cell receptor-triggered T-lymphocytes effector functions. *J Biol Chem*. 267: 25256–25263.
- \*\*Sun H, Gutierrez P, Jackson MJ, Kundu N, Fulton AM. (2000). Essential role of nitric oxide and interferon-gamma for tumor immunotherapy with interleukin-10. *J Immunother* 23: 208–214.
- \*\*Swat W, Dessing M, Von Boehmer H, Kisielow P. 1993. CD69 expression during selection and maturation de CD4+ 8+ thymocytes. *Eur. J. Immunol*. 23 (3): 739-746.
- \*\*Miki-Hosokawa T, Hasegawa A, Iwamura C, Shinoda K, Tofukuji S, Watanabe Y, Hosokawa H, Motohashi S, Hashimoto K, Shirai M, Yamashita M, Nakayama T. (2009). CD69 Controls the Pathogenesis of Allergic Airway Inflammation. *J Immunol*. 183:8203-8215.
- \*\*Takayama H, Sitkovsky MV (1988a). Potential use of antagonists of cAMP-dependent protein kinase to block inhibition and modulate T-cell receptor-triggered activation of cytotoxic T-lymphocytes. *J Pharm Sci*. 78: 8–10.
- \*\*Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*. 15 (10): 479-483.
- \*\*Thiel M, Caldwell C and Sitkovsky M. (2003). The critical role of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect*. 5: 515–526.
- \*\*Tindle R. (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Rev*. 2:1-7.

- \*\*Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, Tasken K (2002). Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal*. 14: 1–9.
- \*\*Umar Asad, Dunn Barbara K and Peter Greenwald. (2012). Future directions in cancer prevention. *Natural Reviews*. 12: 835-848
- \*\*Van Linden A, Eltzschig HK. (2007). Role of pulmonary adenosine during hypoxia: Extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert Opin Biol Ther*. 7:1437–1447.
- \*\*Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, Alvarado I, Cruz F, Hernández D, Pérez-Plascencia C, Salcedo M. (2005). Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados. *Rev Invest Clin*. 57: 434- 441.
- \*\*Vannoni D, Bernini A, Carlucci F, Civitelli S, Di Pietro MC, Leoncini R. (2004). Enzyme activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues. *Med Oncol*. 21:187–95.
- \*\*Vesely M, Kershaw M, Schreiber R and Smyth M. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol*. 29:235–71.
- \*\*Wang L, Zhou X, Zhou T. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 134:365–372.
- \*\*Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, and Munoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 189:12-19.
- \*\*Weissmuller T, Campbell E, Rosenberger P, Scully M, Beck P, Furuta G and Colgan S. (2008). PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases. *J Clin Invest*. 118:3682–3692.
- \*\*Xu S, Shao Q, Sun J, Yang N, Xie Q, HaiWang D, Huang Q, Bin Huang, YuWang X, Gang Li, and Qu X. (2013). Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro-Oncology*. 15:1160–1172.
- \*\*Zhang B. (2010). CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 70:6407–6411.
- \*\*Zur Hausen H . (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst*. 92:690-698.