



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA
(CD39/CD73/ADENOSINA) EN TUMORES DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DANIELA BERENICE TORRES PINEDA

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. FEBRERO, 2015



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.

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 03 de noviembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **TORRES PINEDA DANIELA BERENICE** con número de cuenta **304220245**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA VÍA ADENOSINÉRGICA (CD39/CD73/ADENOSINA) EN TUMORES DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO"**, realizada bajo la dirección del **DR. ALBERTO MONROY GARCIA**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Suplente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Suplente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de enero de 2015

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por las herramientas proporcionadas que enriquecieron mi formación académica y por la oportunidad de desarrollar y culminar exitosamente el presente trabajo.

El presente trabajo se desarrolló 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**: “Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) como mecanismo inmunosupresor de células tumorales de cáncer cérvico uterino”; y **FIS/IMSS/PROT/G12/1161**: “Análisis de la expresión de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) en tumores de cáncer de cuello uterino”.

Asimismo, parte del 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”.

Durante los estudios de maestría recibí los siguientes apoyos: Beca CONACYT con número de registro 282032 durante el periodo comprendido entre agosto del 2012 y julio del 2014; apoyo financiero como becaria de investigación en salud con número de matrícula 99096719 proporcionada por el Instituto Mexicano del Seguro Social en el periodo de marzo del 2013 a enero del 2015.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. María de Lourdes Mora García y el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por sus observaciones y sugerencias para mejorar esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Alberto Monroy García*, por aceptar ser mi tutor, dándome la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su tiempo, apoyo y orientación.

Al *Dr. Héctor Sánchez*, del área de ginecología en el Hospital General Zona (HGZ) No. 2-A Troncoso, IMSS y a la *Dra. Piedad Pérez Padilla* del HGZ No. 15 Ciudad de Reynosa Tamaulipas, IMSS por donar las biopsias de cuello uterino que se utilizaron para realizar este proyecto.

A la *Dra. Patricia Piña*, por sus asesorías y su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

A *Juanito*, por compartir su tiempo, sus conocimientos técnicos y por siempre resolver mis dudas.

Al *Dr. Fernando Candanedo*, por su tiempo y asesoría en la parte de histología y patología del cuello uterino.

A la *Dra. María de Lourdes Mora García*, al *Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes*, a la *Dra. Marcela Lizano Soberón*, al *Dr. Benny Weiss Steider* y al *Dr. Jaime Berumen Campos*, por sus aportaciones y comentarios, los cuales contribuyeron a mejorar y concluir de manera satisfactoria esta tesis.

A *Sofí, Toño, Nancy, Ivonne, Rosario, Carmina y Gaby*, por su amistad, compañía, apoyo dentro del laboratorio, por los buenos y malos momentos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Por su apoyo y cariño, por la dedicación y el esfuerzo que hacen a diario para que nada nos falte y por siempre estar a mi lado.

A mi hermano

Por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por hacerme enojar y reír y por compartir su vida conmigo.

A Yair

Por caminar siempre a mi lado, acompañándome y apoyándome en cada decisión, por hacer mis días únicos y felices, por creer en mí y por todo el amor que me durante ocho años me has demostrado...Te Amo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
Cáncer.....	5
Cáncer cervicouterino (CaCu).....	6
Lesiones cervicales y CaCu.....	6
Virus del Papiloma Humano (VPH).....	12
Estructura y genoma del VPH.....	13
Ciclo de vida del VPH.....	14
Inmunoedición del cáncer.....	18
Eliminación.....	18
Equilibrio.....	19
Escape.....	19
Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	21
Cambios en las células tumorales.....	21
Factores solubles derivados del tumor.....	21
Ignorancia inmunológica y tolerancia en los tumores.....	22
Vía adenosinérgica.....	24
Ectonucleotidasas.....	25
CD39 (NTPDasa 1).....	26
CD73 (Ecto-5'-nucleotidasa).....	26
Receptores para adenosina.....	28
Interleucina 10 (IL-10).....	30

Adenosina deaminasa (ADA/CD26).....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL.....	34
OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Recolección de muestras.....	35
Proceso histológico del tejido.....	36
Cortes histológicos.....	36
Tinción con Hematoxilina y Eosina (H-E).....	36
Construcción del microarreglo de tejidos.....	38
Inmunohistoquímica.....	39
Análisis de imágenes.....	40
Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	67
LITERATURA CITADA.....	68

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Correlación entre la terminología NIC y Bethesda a través de las lesiones precursoras y el CaCu.....	8
Figura 2. Progresión maligna provocada por la infección con Virus del Papiloma Humano.....	8
Figura 3. Estructura y organización del genoma del VPH.....	13
Figura 4. Eventos clave que ocurren después de la infección por VPH.....	15
Figura 5. El VPH evade eficientemente el reconocimiento inmune.....	17
Figura 6. Fases de la Inmunoedición del cáncer.....	20
Figura 7. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	23
Figura 8. Actividad enzimática de CD39 y CD73.....	25
Figura 9. Vía adenosinérgica en el desarrollo y progresión de la neoplasia.....	30
Figura 10. Fotografías de los tejidos teñidos con H-E.....	37
Figura 11. Construcción de un microarreglo de tejidos.....	38
Figura 12. La fotografía original del tejido teñido se convierte a una imagen en escala de grises.....	41
Figura 13. Selección del marcador en la imagen utilizando la herramienta <i>threshold</i>	42
Figura 14. Selección del área y ajuste de los parámetros que se analizaron en la imagen.....	42
Figura 15. Controles negativos.....	45
Figura 16. Expresión de la ectoenzima CD39.....	48
Figura 17. Expresión de la ectoenzima CD73.....	49
Figura 18. Expresión del receptor para adenosina A1.....	53
Figura 19. Expresión del receptor A2A.....	54

Figura 20. Expresión del receptor para adenosina A2B.....	55
Figura 21. Expresión del receptor para adenosina A3.....	56
Figura 22. Expresión de la enzima ADA/CD26.....	58
Figura 23. Expresión de la citocina IL-10.....	60
Tabla 1. Clasificación de la FIGO.....	11
Tabla 2. Clasificación de algunos tipos de VPH de acuerdo al riesgo oncogénico que presentan.....	12
Tabla 3. Número de muestras recolectadas por grupo.....	35
Tabla 4. Anticuerpos utilizados y las diluciones.....	40

RESUMEN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) se asocia de manera etiológica con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, en casi el 100% de los casos, lo cual sugiere que la infección por VPH es una causa necesaria, aunque no suficiente para el desarrollo de las neoplasias cervicales (Walboomers *et al.*, 1999). Diversos factores inmersos en el microambiente tumoral proveen de elementos necesarios para la sobrevivencia y proliferación de las células transformadas o células tumorales, además de facilitar la evasión de la respuesta inmune adaptativa del huésped. Recientemente se ha reportado que algunos tumores expresan ectoenzimas (CD39 y CD73) que generan adenosina a través de la fosfohidrólisis del ATP extracelular, la cual al interactuar con receptores específicos (A1, A2A, A2B y A3), les permiten generar mecanismos para evadir la respuesta inmune, entre ellos, la producción de IL-10, una citocina inmunomoduladora que se asocia fuertemente con el grado de evolución del CaCu. En el presente trabajo se analizó la expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica: las ectonucleotidasas CD39, CD73; receptores para adenosina A1, A2A, A2B, A3; adenosina-desaminasa (ADA/CD26) e interleucina 10 (IL-10), en muestras de tejidos de las diferentes etapas del desarrollo del CaCu (cérvix normal (n=10), LIEBG (n=10), LIEAG (n=10) y CaCu (n=24)). Mediante microarreglo de tejidos y tinciones inmunohistoquímicas se analizó la expresión de estos marcadores empleando análisis de imágenes a través del programa *Image J*. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de CD39 y CD73; y de los receptores A2A, A2B y A3; así como de IL-10 en las neoplasias cervicales en relación directa con el grado de evolución de la enfermedad. De manera interesante, la expresión de la enzima adenosina-desaminasa disminuyó de manera importante en los tejidos derivados de tumores de CaCu. Lo cual sugiere que la expresión diferencial de moléculas de la vía adenosinérgica (CD39, CD73, A2A, A2B, A3 y ADA) en tejidos provenientes de diferentes etapas de la evolución del CaCu, puede contribuir a la inmunosupresión en el desarrollo del CaCu.

ABSTRACT

Infection with high-risk human papilloma virus (HPV) is considered the major etiological factor of cervical cancer with almost 100% of cases, suggesting that HPV infection is necessary but not sufficient for development of cervical neoplasia (Walboomers *et al.*, 1999). Several factors involved in the tumor microenvironment provide necessary elements for the survival and proliferation of transformed or tumor cells and facilitate the evasion of the adaptive immune response. It has recently been reported that some tumors express ectoenzymes (CD39 and CD73) in order to generate adenosine from extracellular ATP. Adenosine may interact with specific adenosine receptors (A1, A2A, A2B and A3) and produce evasion mechanisms of the immune response such as the production of IL-10 an immunoregulator cytokine strongly associated with the cervical cancer progression.

This study analyzed the expression of molecules involved in adenosinergic pathway on human cervical cancer (n=24), premalignant lesions [LGSIL (n=10) and HGSIL (n=10)] and nontumoral cervix samples (n=10), including the ectonucleotidases CD39 and CD73; adenosine receptors A1, A2A, A2B and A3; Adenosine Deaminase (ADA/CD26) and interleukin 10 (IL-10). Tissue microarrays and immunohistochemistry were performed in order to detect the expression of these markers using the *Image J* program which can process and analyze images.

The results showed a significant increase of the ectoenzymes CD39 and CD73; and the adenosine receptors A2A, A2B and A3 expression, as well as IL-10 in tumor tissues with respect to premalignant lesions samples. Interestingly, the Adenosine Deaminase expression was lower for tumors when compared with LGSIL, HGSIL and nontumoral cervix. Together, our results suggest that differential expression of adenosinergic pathway (CD39, CD73, A2A, A2B, A3 and ADA) in biopsies from patients with premalignant lesions and cervix tumors may induce a local state of immunosuppression and promote the development of cervical cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) se asocia de manera etiológica con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, en casi el 100% de los casos, lo cual sugiere que la infección por VPH es una causa necesaria, aunque no la única, para el desarrollo de las neoplasias cervicales (Forman *et al.*, 2012). Se ha propuesto que diversos factores presentes en el sitio de la infección, entre ellos: citocinas inmunosupresoras, quimiocinas, factores proangiogénicos y moléculas que inhiben la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos, proporcionan los elementos necesarios para la sobrevivencia y proliferación de las células transformadas o células tumorales, además de facilitar la evasión de la respuesta inmune adaptativa del huésped (Doorbar *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha reportado que algunos tumores expresan ecto-ATPasas (CD39 y CD73) que generan adenosina a través de la fosfohidrólisis del ATP extracelular, la cual al interactuar con receptores específicos (A1, A2A, A2B y A3), les permiten generar mecanismos para evadir la respuesta inmune, entre ellos, la producción de IL-10 (Koscsó *et al.*, 2012). En el caso particular del CaCu, se ha reportado que la alta expresión de IL-10 en tejidos tumorales, se asocia fuertemente con la infección por VPH de alto riesgo y con el grado de evolución de la enfermedad (Bhairavabhotla *et al.*, 2007; Bermúdez-Morales *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2012). En estudios previos, nuestro grupo de trabajo ha detectado la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 en varias líneas celulares de CaCu, además ha evaluado su actividad funcional para generar adenosina, y de manera concomitante, la producción de IL-10 cuando se le suministran sustratos de ambas ectoenzimas (Ávila Ibarra, 2011). En el presente trabajo se analiza la expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica: las ectonucleotidasas CD39, CD73; receptores para adenosina A1, A2A, A2B, A3; adenosina-desaminasa (ADA/CD26) e interleucina 10 (IL-10), en muestras de tejidos de las diferentes etapas del desarrollo del CaCu (cérvix normal, LIEBG, LIEAG y CaCu).

Se ha reportado que algunos tumores son capaces de expresar ectoATPasas que generan adenosina a través de ATP extracelular, así como receptores de adenosina que les permiten favorecer su estado tumorigénico e invasivo, por lo que nos planteamos la siguiente pregunta: ¿la expresión de moléculas participantes en la vía adenosinérgica se asocia con el estado de progresión e invasión tumoral en el CaCu?

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer es una proliferación acelerada, desordenada e incontrolada de una o algunas células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen tanto al mismo órgano donde se inició el tumor, así como a otros tejidos sanos del organismo. Las causas que provocan tales cambios en la célula se deben a la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Karp, 2006).

Las células cancerosas presentan diversas propiedades que las hacen peligrosas para el huésped debido a que ignoran las señales internas y externas que regulan la proliferación celular, evitan el suicidio por apoptosis, son genéticamente inestables, escapan de sus tejidos de origen adquiriendo una capacidad invasiva, sobreviven y proliferan en entornos ajenos generando metástasis. La combinación de estas características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso (Alberts *et al.*, 2004; Hernández y Ríos, 1999).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial. En el año 2012 se registraron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y 8.2 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo. Más del 65% (5.3 millones) de las defunciones por cáncer se registraron en países menos desarrollados. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13.1 millones en 2030. Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon, mama, esófago, próstata y cérvico-uterino (CaCu). Sin embargo, los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer. En hombres se presentan con mayor frecuencia el cáncer de pulmón, próstata, colon y estómago, mientras que en las mujeres destacan el cáncer de mama, colon, pulmón y CaCu. (Globocan, IARC, 2014).

Cáncer cérvico-uterino (CaCu)

Según la Organización Mundial de la Salud, el CaCu es una de las principales causas de defunción por cáncer en las mujeres, representando el cuarto lugar de incidencia y mortalidad a nivel mundial con 527,624 (7.9%) nuevos casos y 265,653 (7.5%) muertes en el año 2012, de los cuales el 70% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo (OMS, 2014).

En México, la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en mujeres se debe a el cáncer de mama (29.6%); le siguen las neoplasias en órganos genitales (16.7%) (cuello uterino y útero principalmente) y en órganos digestivos (14.3%) en el año 2011.

En 2013, la principal causa de defunciones en mujeres por tumores malignos fue por neoplasias malignas en los órganos digestivos (31.49 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de cáncer de mama (15.38 por cada 100 mil) y de órganos genitales (13.43 por cada 100 mil). Según el INEGI, el porcentaje más alto de prevalencia en neoplasias malignas de cuello uterino y útero se concentra en la población de mujeres de entre 40 a 59 años (representa el 48% de las pacientes con tumores malignos) (INEGI, 2014). Sin embargo, cada vez es más común ver a mujeres que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica CaCu (4.1%). (Globocan, 2008; IARC, 2010).

Lesiones cervicales y CaCu

Los cánceres invasores del cuello uterino vienen precedidos generalmente por una larga fase de enfermedades preinvasoras. Esto se caracteriza microscópicamente por una serie de manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia o lesión intraepitelial escamosa (LIE) antes de progresar a carcinoma invasor.

La displasia se categorizó en tres grupos según el grado de afectación de la capa epitelial por las células atípicas en leve, moderada y severa.

Años más tarde se observó una correlación directa entre progresión y grado histológico. Estas observaciones condujeron al concepto de un solo proceso mórbido continuo en el que el epitelio normal evoluciona a lesiones epiteliales precursoras y a cáncer invasor. Sobre la base de dichas observaciones, en 1968 se introdujo el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para denotar las múltiples posibilidades de atipia celular confinada al epitelio. La NIC se dividió en los grados 1, 2 y 3 (Richart, 1968). NIC 1 correspondía a la displasia leve, NIC 2 a la displasia moderada y NIC 3 a la displasia grave y al Carcinoma In Situ (CIS).

En los años ochenta fueron reconociéndose cada vez más alteraciones anatomopatológicas como la atipia coilocítica o condilomatosa asociada con la infección por virus del papiloma humano (VPH). Los coilocitos son células atípicas con una cavitación o halo perinuclear en el citoplasma, que indican cambios citopáticos debidos a la infección por el VPH. Esto condujo al desarrollo de un sistema histológico simplificado en dos grados. En 1990 se propuso una terminología histopatológica basada en dos grados de la enfermedad: NIC de bajo grado, que comprendía las anomalías compatibles con atipia coilocítica y las lesiones NIC 1, y NIC de alto grado que comprendía NIC 2 y NIC 3. Se consideró que las lesiones de alto grado eran precursoras del cáncer invasor (Richart, 1990).

En 1991, el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU. convocó un seminario para proponer un esquema modificado de presentación de los resultados de la citología cervical (Kurman *et al.*, 1991) el cual fue denominado Sistema Bethesda (TBS). La característica principal del TBS fue la creación del término “lesión intraepitelial escamosa” (LIE), con dos grados: lesiones de bajo grado (LIEBG) y lesiones de alto grado (LIEAG). La clasificación TBS combina los cambios condilomatosos planos (VPH) y la NIC de bajo grado (NIC 1) en LIEBG, mientras el LIEAG abarca los NIC más avanzados, NIC 2 y NIC 3 (Alvarado *et al.*, 2009) (Figura 1). Se empleó el término lesión para recalcar que los cambios morfológicos en los cuales se basa un diagnóstico no necesariamente significan proceso neoplásico. El TBS fue diseñado para la notificación citológica, pero sirve también para comunicar resultados histopatológicos (Burd, 2003).

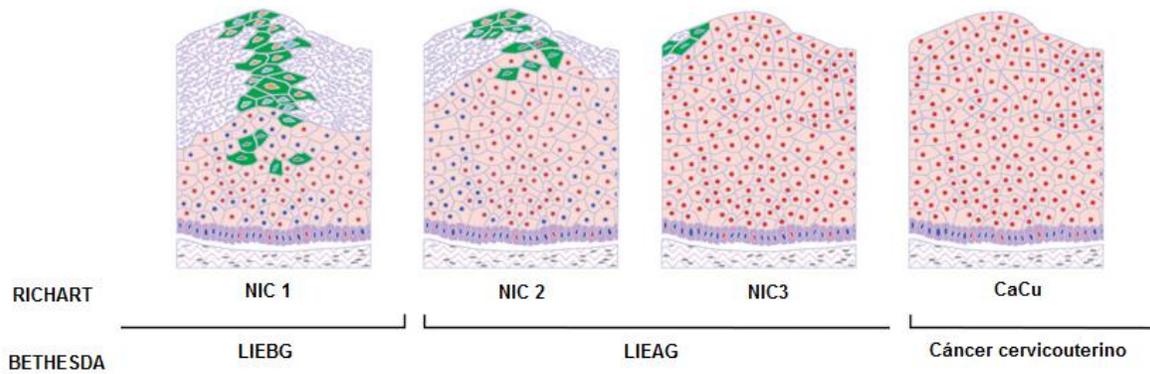


Figura 1. Correlación entre la terminología NIC y Bethesda a través de las lesiones precursoras y el CaCu (tomada y modificada de Doorbar, 2006).

Para clasificar la LIE se observa la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras y diferenciadas. Los grados más avanzados de LIE suelen tener una mayor proporción del espesor epitelial con células indiferenciadas y solo una delgada capa superficial de células maduras, diferenciadas (Figura 2).

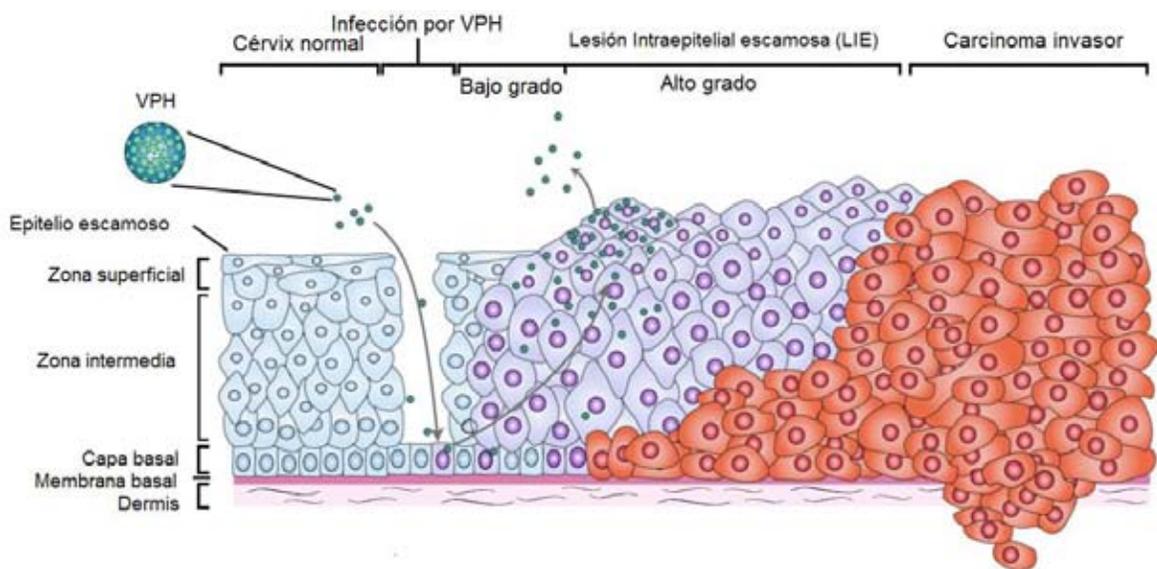


Figura 2. Progresión maligna provocada por la infección con Virus del Papiloma Humano (Piersma, 2011).

Al realizar el diagnóstico se evalúan anomalías nucleares como la dilatación, la mayor relación núcleo/citoplasma, la hiperchromasia, el polimorfismo y la variación

del tamaño nuclear (anisocariosis). A menudo existe una fuerte correlación entre la proporción del epitelio que presenta maduración y el grado de anomalía nuclear. Las figuras mitóticas de las células en división son poco frecuentes en el epitelio normal y, cuando existen, se ven solo en la capa parabasal. Conforme se incrementa la gravedad de la LIE aumenta el número de figuras mitóticas, que pueden verse en las capas epiteliales superficiales. Cuanto menos diferenciado es un epitelio, más alto es el nivel en que pueden verse figuras mitóticas. Las configuraciones anormales de las figuras mitóticas también se tienen en cuenta al establecer el diagnóstico final.

En la LIEBG existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Las células indiferenciadas se encuentran en las capas epiteliales más profundas (tercio inferior). Se observan figuras mitóticas, pero no muchas. Pueden verse cambios citopáticos debidos a la infección por el VPH en todo el espesor del epitelio.

La LIEAG es la precursora del CaCu y se caracteriza por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior de la lesión. Debido a la infección por tipos virales oncogénicos, la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el tercio superficial del epitelio, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anormalidades genéticas que favorecen la malignidad (López A. y Lizano M., 2006).

El cáncer de cuello uterino es una neoplasia maligna del cuello del útero, desde el punto de vista histológico, el cáncer suele aparecer en la zona de transformación cervical, es decir, el área de la mucosa cervical situada entre la unión escamosa-cilíndrica original y la unión escamosa-cilíndrica nueva o restaurada.

En los países en desarrollo, entre el 90 y 95% de los cánceres invasores del cuello uterino corresponden histológicamente a tumores de células escamosas o carcinomas y entre el 2 y el 5% son adenocarcinomas.

Conforme avanza la invasión del estroma, la enfermedad se vuelve clínicamente evidente y revela varios patrones de proliferación. En las fases más tempranas de la invasión estrómic, el carcinoma cérvico-uterino puede no causar síntomas ni manifestaciones clínicas, y por consiguiente, se le conoce como carcinoma invasor preclínico. La forma más temprana del carcinoma invasor se reconoce histológicamente como carcinoma microinvasor. Son cánceres que no han invadido más allá de 5 mm de profundidad y 7 mm de ancho hacia el estroma cervical subyacente.

En las etapas avanzadas de la enfermedad se presenta metástasis a distancia, que suele afectar a los nódulos para-aórticos, los pulmones, el hígado, los huesos y otro tipo de estructuras. En la tabla 1 se presenta el sistema de clasificación más difundido para el carcinoma cérvicouterino, elaborado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Se trata básicamente de un sistema de clasificación clínica basado en el tamaño del tumor, la extensión del cáncer en la pelvis y la diseminación de la enfermedad a órganos distantes (Montalvo *et al.*, 2011).

Etapa	Descripción
I	Tumor confinado al cuello uterino
IA	Tumor con invasión diagnosticado por Patología con una profundidad máx. de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IA1	Invasión estromal menor o igual a 3 mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IA2	Invasión estromal mayor de 3 mm pero menor de 5 mm, y extensión horizontal menor o igual a 7 mm.
IB	Tumor clínicamente visible confinado al cérvix o etapas pre-clínicas mayores al estadio IA.
IB1	Lesión clínicamente visible menor o igual a 4 cm en su dimensión mayor.
IB2	Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm en su dimensión mayor.
II	Tumor que se extiende más allá del cuello uterino sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
IIA	Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial.
IIA1	Tumor menos de 4 cm.

IIA2	Tumor mayor de 4 cm.
IIB	Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica.
III	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IIIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis o presente involucro comprobado por biopsia de la mucosa vesical o rectal. El edema buloso no se considera enfermedad metastásica.
IVA	El tumor invade a la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.
IVB	Metástasis a distancia.

Tabla 1. Clasificación de la FIGO.

El riesgo de desarrollar cáncer cérvicouterino incrementa con el comienzo temprano de la actividad sexual, el número de parejas sexuales, el uso prolongado de anticonceptivos orales y el tabaquismo. En México se ha asociado con factores relacionados con la pobreza, tales como baja escolaridad, desempleo, residencia en áreas rurales y falta de acceso a los servicios de salud (López *et al.*, 2008).

Zur Hausen propuso y más tarde demostró que los virus del papiloma humano son los agentes infecciosos responsables de la transformación neoplásica del epitelio cervical. Esta hipótesis fue validada por hallazgos de secuencias genómicas del VPH en el 99.7% de los casos de CaCu invasor (López A. y Lizano M., 2006; Walboomers *et al.*, 1999).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los virus del papiloma son miembros de la familia *Papillomaviridae* la cual comprende una serie de virus específicos del huésped, que han sido detectados en muchas especies animales, así como en humanos (Burd, 2003).

Se han descrito más de 200 papilomavirus en base a diferencias en sus secuencias genómicas, identificándose alrededor de 180 tipos específicos para humanos (de Villiers *et al.*, 2004), de los cuales al menos 30 o 40 son capaces de infectar la mucosa genital de hombres y mujeres (Stanley, 2012).

Los VPH se clasifican de acuerdo a las diferencias en las secuencias del gen L1 que codifica la proteína mayoritaria de la cápside L1. Se trata de un gen bien conservado entre todos los miembros de la familia *Papillomaviridae*.

Así se habla de género de VPH, cuando existe menos de un 60% de homología, de especie entre 60 y 70%, de tipo entre 71 y 89%, de subtipo entre 90 y 98% y de variante cuando existe más de un 98% de homología en la secuencia del gen que codifica la proteína L1 (Burd, 2003).

De acuerdo en su asociación con el CaCu y las lesiones precursoras, los VPHs pueden ser agrupados en tipos de alto riesgo y bajo riesgo (Tabla 2) (Burd, 2003, Zur Hausen, 2002). Sin embargo, los tipos de VPH que se han encontrado con mayor frecuencia en aproximadamente el 50-70% de los carcinomas son el 16 y 18, mientras que otros tipos como el 31, 33, 35, 51, 52, 58 dan cuenta de los casos restantes (Melo *et al.*, 2003; Muñoz y Bosch, 1997).

TIPO DE VPH	RIESGO ONCOGÉNICO
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26, 53, 66, 73	Alto riesgo
6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	Bajo riesgo

Tabla 2. Clasificación de algunos tipos de VPH de acuerdo al riesgo oncogénico que presentan (Muñoz, 2000; Burd, 2003).

Estructura y genoma del VPH

El VPH es un virus pequeño, sin envoltura y mide aproximadamente 55 nm de diámetro. Tiene una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, la cual contiene por lo menos 2 proteínas, L1 y L2. Cada capsómero es un pentámero de la proteína L1 (Knipe *et al.*, 2006).

El genoma del VPH está compuesto de una sola molécula de doble cadena, ADN circular que contiene aproximadamente 7,900 pares de bases (pb) asociado con histonas (Santin *et al.*, 2005). El genoma está funcionalmente dividido dentro de 3 regiones, la primera es la región reguladora de 400 a 1,000 pb, la cual es conocida como Región Larga de Control (RLC); la segunda es una región temprana, que consiste de fragmentos abiertos de lectura E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las cuales están involucradas en la replicación viral y oncogénesis; la tercera es una región tardía, la cual codifica las proteínas estructurales de la cápside del virus L1 y L2 (Figura 3) (Burd, 2003; Lupiani y Fraga, 2008).

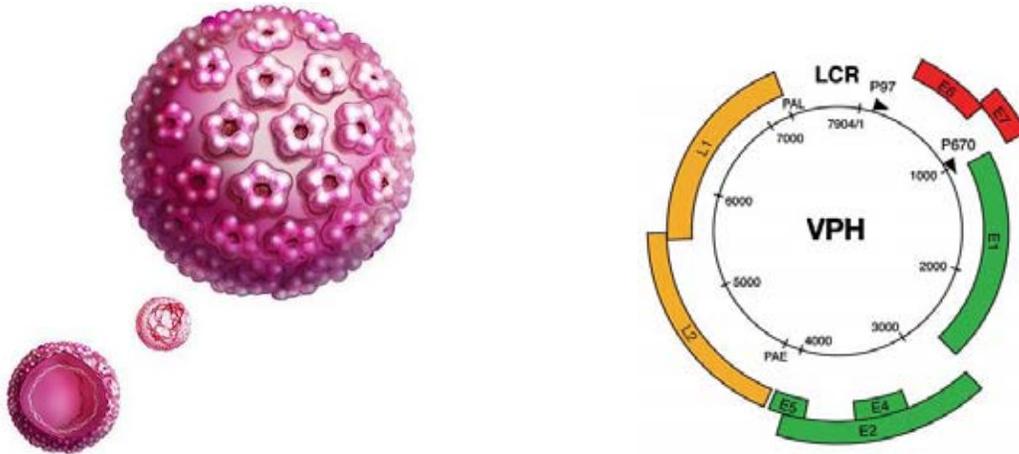


Figura 3. Estructura y organización del genoma del VPH, donde se muestran las regiones del genoma viral y sus principales proteínas (Tomado y modificado de Doorbar, 2006; Picconi, 2013).

Ciclo de vida del VPH

Aunque el epitelio escamoso parece ser el principal sitio de infección por el VPH, también se ha visto que ésta puede ocurrir sobre las células primitivas o “de reserva”, que dan origen tanto al epitelio exo como al endocervical del tracto genital femenino.

Se cree que el virus entra al organismo a través de pequeños cortes o abrasiones de la piel o las mucosas. El virus debe llegar a la capa basal del epitelio o a células de metaplasia escamosa inmadura (Burchell *et al.*, 2006). Dependiendo de una variedad de factores pobremente entendidos la infección puede permanecer latente o volverse productiva. La infección latente se define como el mantenimiento de una infección viral sin la producción de virus infeccioso, en la que el ADN viral permanece en el núcleo como una molécula circular libre llamada episoma. En general los efectos citopáticos del virus no están presentes en estas células. En la infección productiva la replicación del ADN viral ocurre de manera independiente al ADN cromosomal, lo cual produce grandes cantidades de material genético del virus y lleva a la producción de viriones. Este proceso ocurre especialmente en las células superficiales, estimulado por los factores transcripcionales específicos de diferenciación celular y en relación con la maduración epitelial, terminando con la producción de proteínas de la cápside y el ensamble de nuevas partículas virales. Estas células sí muestran los efectos citopáticos característicos de la infección por VPH que pueden ser detectados citológica e histológicamente.

Estos efectos aparecen aproximadamente 3 meses después de la infección genital con el virus, con un rango de tres semanas a ocho meses, aunque puede prolongarse por años. El inicio de la replicación viral puede observarse en el estrato basal del epitelio, en donde sólo se expresan los genes de la región temprana, pero la producción de partículas virales completas ocurre sólo en el superficial, cuando la célula deja de dividirse y pasa a la diferenciación terminal, lo que implica una conexión entre la diferenciación celular y la expresión genómica viral. Además, el virus puede ser estable extracelularmente, ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos (Frattini *et al.*, 1996).

De acuerdo al tiempo en que los genes virales se expresan, son designados como tempranos y tardíos. Los genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6, E7) son reguladores no estructurales y están relacionados con el control de la replicación del ADN viral y expresión genética del virus (Zur Hausen, 2002). Las proteínas E1 y E2 facilitan la correcta segregación de los genomas durante la división celular (Wilson *et al.*, 2002). Los genes E5, E6 y E7 tienen que ver con las propiedades transformadoras del virus, y E4 codifica una serie de proteínas importantes para la replicación y maduración viral. En la mayoría de VPHs la proteína E2 se une a la región del promotor temprano y disminuye y regula la expresión de E6/E7; la pérdida de E2 es por lo tanto el primer paso en la transformación y es lo que ocurre cuando sucede la integración viral, al romperse el punto de transcripción de los genes E1 y/o E2, lo que resulta en una sobreexpresión de los genes E6/E7. La expresión de las proteínas E6 y E7 estimula el progreso de la fase del ciclo celular G1 a S (Chow *et al.*, 2010; Doorbar, 2007).

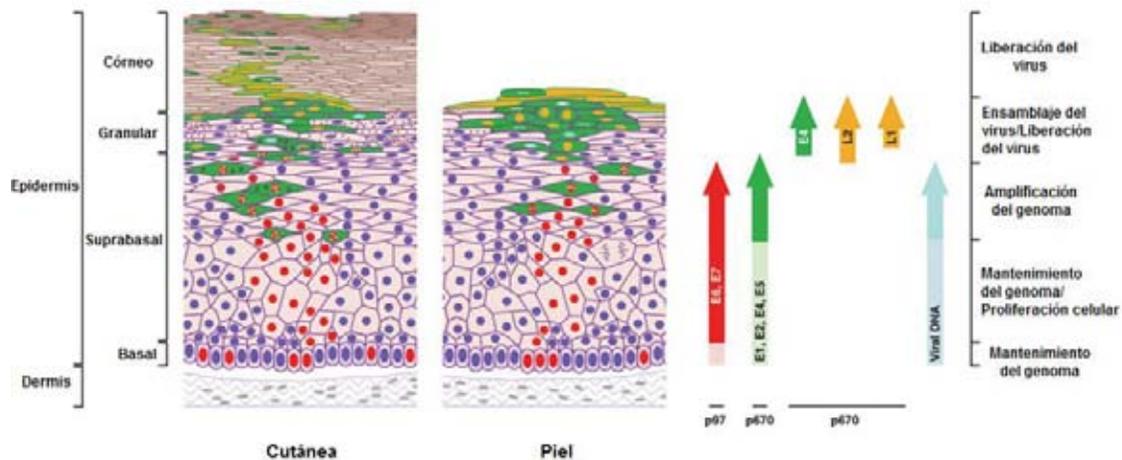


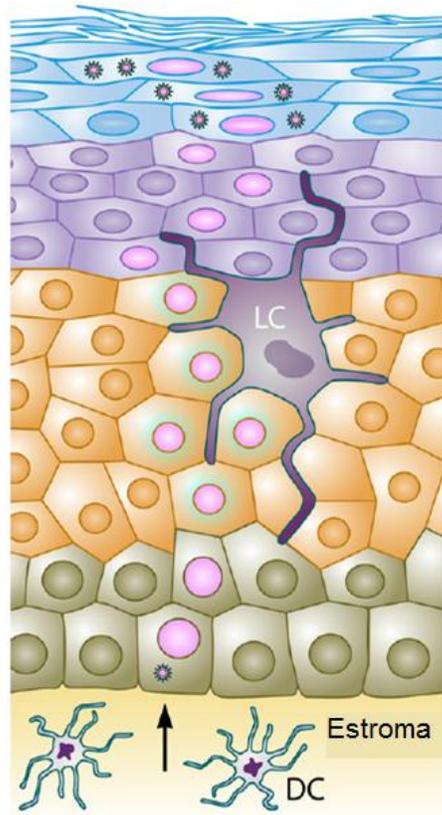
Figura 4. Eventos clave que ocurren después de la infección por VPH, tales como la expresión de las proteínas virales a lo largo de las capas epiteliales (Doorbar, 2006).

Los genes tardíos (L1 y L2) se expresan en las fases finales de la infección y codifican proteínas estructurales relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales (proteínas de la cápside). La transcripción de estos genes parece estar mediada por reguladores celulares de la transcripción, producidos sólo cuando la célula escamosa se diferencia (célula intermedia y superficial), lo que explica su baja concentración en LIE de alto grado o en carcinomas invasivos (Figura 4) (Doorbar, 2007; Stanley, 2012).

No obstante, el hecho de que solo una pequeña cantidad de las infecciones por VPH persistentes progresan eventualmente a cáncer indica que debe haber otros factores que incrementan la progresión a la malignidad (Muñoz y Bosch, 1997). Por lo tanto, la infección con VPH no es necesaria ni una causa suficiente para generar cáncer de cérvix. Entre los factores que pueden influir, se encuentran los tipos virales, factores genéticos, hormonales e inmunosupresión (Burd, 2003; Melo *et al.*, 2003; Zur Hausen, 2002).

El VPH puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con un bajo perfil de expresión, lo que genera una muy pobre respuesta inmune innata (Figura 5) (Tindle, 2002). Cuando logra establecerse, una respuesta adaptativa es más eficiente, y por eso, aunque la tasa de infección es muy alta, no todas las infecciones progresan hasta CaCu (Doorbar, 2006). La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes.

Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por virus del papiloma humano (VPH). Sin embargo, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una lesión de bajo grado (LEIBG). Después, solo del 20% al 40% de estas pacientes progresarán a lesiones de alto grado (LIEAG). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo 5 o 10% de ellas desarrollarán una lesión de alto grado, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses (Hildesheim *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1998).



En la ausencia de inflamación

- + Los queratinocitos no liberan citocinas proinflamatorias.
- + No se activan las células de Langerhans ni las células dendríticas estromales.
- + No hay estímulos para la activación de células dendríticas, migración, procesamiento y presentación de antígenos.

El VPH evade la respuesta inmune innata y retrasa la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Figura 5. El VPH evade eficientemente el reconocimiento inmune. No hay viremia ni muerte celular inducida por el virus, por lo tanto, no hay inflamación ni señales de daño para el sistema inmune (Tomado y modificado de Stanley, 2012).

El estado inmune tiene un impacto significativo sobre la capacidad de detectar la infección o sobre la progresión de la infección por el VPH, encontrándose una incidencia 17 veces mayor de infección genital por el virus en pacientes inmunosuprimidos.

Sin embargo, cuando la infección es persistente y el sistema inmune está deprimido, puede darse lugar a la integración del genoma del VPH a la célula hospedera y eventualmente, al desarrollo de una lesión que puede derivarse hacia tumores avanzados (Zur Hausen, 2000; Gariglio *et al.*, 1992; Hilders *et al.*, 1994; Guzmán-Rojas *et al.*, 1998).

Inmunoedición del cáncer

Desde los años 1950 Lewis Thomas propuso el concepto de inmunovigilancia, el cual predice que el sistema inmune puede reconocer precursores del cáncer y, en la mayoría de los casos, destruir aquellos precursores antes de que se manifiesten clínicamente (Zitvogel *et al.*, 2006).

Sin embargo, la idea de la inmunovigilancia del cáncer fue aceptada en los años noventa cuando modelos experimentales con animales utilizando ratones *knockout* validaron la existencia de la inmunovigilancia del cáncer. Actualmente, el proceso que va de la inmunovigilancia al escape inmune, forma parte de un concepto actual conocido como Inmunoedición del cáncer, el cual se compone de tres fases esenciales: eliminación, equilibrio y escape (Dunn *et al.*, 2002) (Figura 6).

Eliminación

En esta fase, las moléculas y células de la inmunidad innata y adaptativa trabajan en conjunto para detectar, localizar y reconocer la presencia de células tumorales nacientes, así como destruirlas para prevenir el desarrollo de una neoplasia maligna. En el caso de la respuesta inmune innata, muchas de las células efectoras como natural killer (NK), NKT y $\gamma\delta$ T son activadas por citocinas proinflamatorias, las cuales son liberadas por las células tumorales en crecimiento. Las citocinas secretadas reclutan más células del sistema inmune, las cuales producen otras citocinas proinflamatorias tales como interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- γ) (Wolf *et al.*, 2012). La eliminación de células tumorales mediada por perforinas, ligando Fas (FasL) y TRAIL a través de las células NK libera antígenos tumorales (TAs), los cuales inducen la respuesta inmune adaptativa (Mori *et al.*, 1997). En la comunicación entre las células NK y las células dendríticas (DCs), las células NK promueven la maduración de las DCs y su migración hacia células tumorales, lo que da como resultado la mejora de la presentación de antígenos a las células T vírgenes para la expansión clonal de linfocitos T citotóxicos (CTLs) (Zitvogel *et al.*, 2006). Finalmente, los linfocitos T son reclutados en el sitio del tumor primario, y atacan y matan directamente a las células tumorales con la producción de IFN- γ citotóxico.

Las siguientes 4 fases se han propuesto para el proceso de eliminación. 1) El reconocimiento de las células tumorales por las células del sistema inmune innato y su eliminación limitada. 2) La maduración y migración de las DCs y *cross-priming* para las células T. 3) Generación de linfocitos T específicos para antígenos tumorales (TAs). 4) Albergue de células T específicas para TAs en el sitio del tumor y la eliminación de las células tumorales. Sin embargo, aunque la inflamación local limitada puede estar involucrada en las respuestas inmunes iniciales, la inflamación excesiva puede promover la progresión tumoral (Dunn *et al.*, 2002). Esto puede ser en parte a causa de las reacciones antiinflamatorias en las células presentadoras de antígeno, las cuales liberan citocinas antiinflamatorias tales como la IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF- β) que inhibe la activación de las células efectoras (Kim *et al.*, 2005).

Equilibrio

En esta fase, las variantes de células tumorales pueden no ser eliminadas completamente, ya que se vuelven resistentes a los efectos de las células inmunes efectoras. Este proceso permite la selección inmune de células tumorales con inmunogenicidad reducida. Estas células son más capaces de sobrevivir en un huésped inmunocompetente. Aunque pueden ocurrir mutaciones genéticas al azar en los tumores produciendo variantes tumorales inestables, la presión de la selección inmune también favorece el crecimiento de células tumorales con un fenotipo no inmunogénico (Zou, 2005).

Es probable que la fase de equilibrio sea la más larga de las tres fases ya que puede ocurrir en un periodo de varios años, durante el cual las células tumorales pueden volverse latentes funcionalmente y permanecer clínicamente inaparente para la vida del huésped (Malmberg, 2004).

Escape

Finalmente, ya sea como resultado de los cambios que ocurren en la población tumoral debido a un proceso activo de inmunoedición o en el sistema inmune del huésped, incrementa la inmunosupresión inducida por el cáncer o la

segregación del sistema inmune debido al proceso natural de envejecimiento, la latencia funcional de la población celular tumoral puede romperse, permitiendo la progresión de estas células en la fase de escape, donde comienzan a crecer de una manera inmunológicamente sin restricción para emerger como una enfermedad clínicamente aparente (Kim *et al.*, 2007).

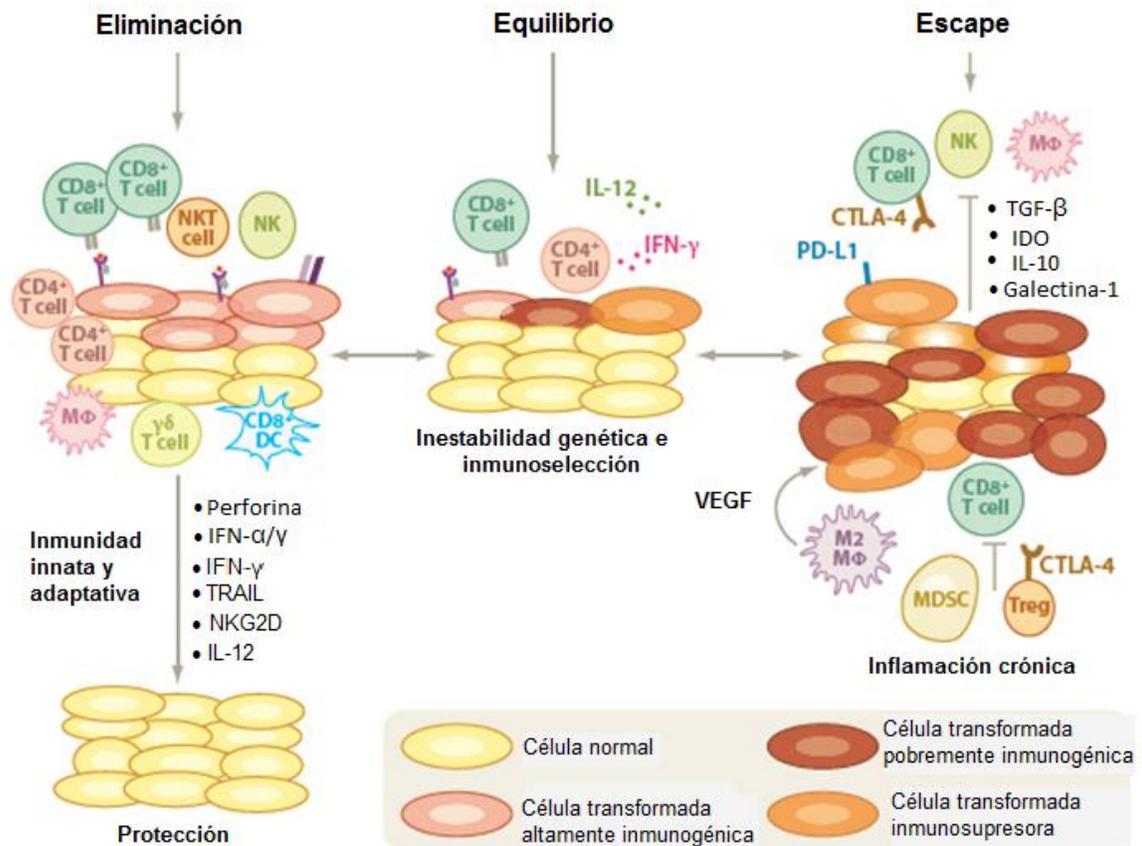


Figura 6. Fases de la Inmunoección del cáncer, las células y citocinas que participan en cada una de ellas (Schreiber *et al.*, 2011).

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Las células tumorales desarrollan durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T anti-tumorales. Estos mecanismos comprenden 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 (Rivoltini *et al.*, 2002).

Los conceptos más recientes sobre como las células tumorales pueden escapar o inhibir las funciones normales del sistema inmune son los cambios en las células tumorales, los factores solubles derivados del tumor y la ignorancia inmunológica y tolerancia en los tumores (Figura 7).

Cambios en las células tumorales

Dada la falta de reconocimiento de los antígenos tumorales, la cual es mediada por alteraciones de las moléculas efectoras y es importante para el reconocimiento y activación por el sistema inmune, la pérdida de transductores de señales ha sido atribuida a la evasión inmune en la cooperación de citocinas inmunosupresoras. Las células tumorales pueden presentar defectos en la vía de señalización Fas/FasL o una sobreexpresión de Bcl-2. También se puede generar la pérdida de las moléculas de coestimulación, como es el caso de las de la familia B7, así como factores de transducción de señales, tales como CD3 ζ , p56^{lck}, JAK-2, señalización de calcio, NF κ Bp65 y la producción de IL-2 (Khong y Restifo, 2002) (Lockhart *et al.*, 2001).

Factores solubles derivados del tumor

Una variedad de factores solubles derivados del tumor contribuye a la aparición de complejas redes inmunosupresoras regionales y locales, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IL-10, TGF- β , prostaglandina E₂, fofatidilserina soluble, Fas soluble, FasL soluble y MICA soluble (Teraben *et al.*, 2000). Aunque son depositados en el sitio del tumor primario, estos factores

secretados pueden ampliar los efectos inmunosupresores en los nódulos linfáticos locales y en el vaso, por lo tanto, promueven la invasión y la metástasis (Kim *et al.*, 2007).

La secreción de factores inmunosupresores como el TGF- β inhibe proliferación, activación y diferenciación de células T (Li *et al.*, 2006), las células NK también pueden suprimir la eficacia de las respuestas de linfocitos T citotóxicos a través de mecanismos relacionados con la producción de IL-13 y TGF- β (Teraben *et al.*, 2000), IL-10 afecta la funcionalidad de las células dendríticas (Gerlini *et al.*, 2004) y protege a las células tumorales de citotoxicidad mediada por LTC (Kurte *et al.*, 2004).

Ignorancia inmunológica y tolerancia en los tumores

Una respuesta inmune específica contra el tumor está regulada por los niveles de antígenos tumorales y las etapas de maduración de las células presentadoras de antígenos tales como DCs. Varios tumores sólidos expresan antígenos específicos tumorales que pueden servir como blancos para las células T efectoras (Ochsenbein *et al.*, 1999). Sin embargo, las células tumorales son capaces de inducir una respuesta protectora de células T citóxicas si se transfieren a una suspensión de células individuales. Sin embargo, si son transplantadas como pequeñas piezas de tumores, los tumores crecen fácilmente por que el nivel de antígeno tumoral puede ser modulado en el microambiente tumoral. Por lo tanto, las células tumorales están rodeadas por células no tumorales, incluyendo células derivadas de la médula ósea, tales como DCs inmaduras y células no derivadas de la médula ósea, tales como fibroblastos, endotelio y matriz extracelular. La matriz extracelular se une a los antígenos tumorales y los fibroblastos y las células endoteliales compiten con las DCs por el antígeno, lo que permite la progresión tumoral. Se sabe que los niveles suficientes de antígenos tumorales pueden producir una respuesta inmune, la cual es mediada por DCs maduras que presentan los antígenos tumorales a las células T (Spiotto *et al.*, 2002). Sin embargo, incluso en la presencia de niveles suficientes de antígeno tumoral, las DCs inmaduras

pueden inhibir la maduración de las DCs y la activación de las células T, lo que resulta en tolerancia inmunológica (Mahnke *et al.*, 2002).

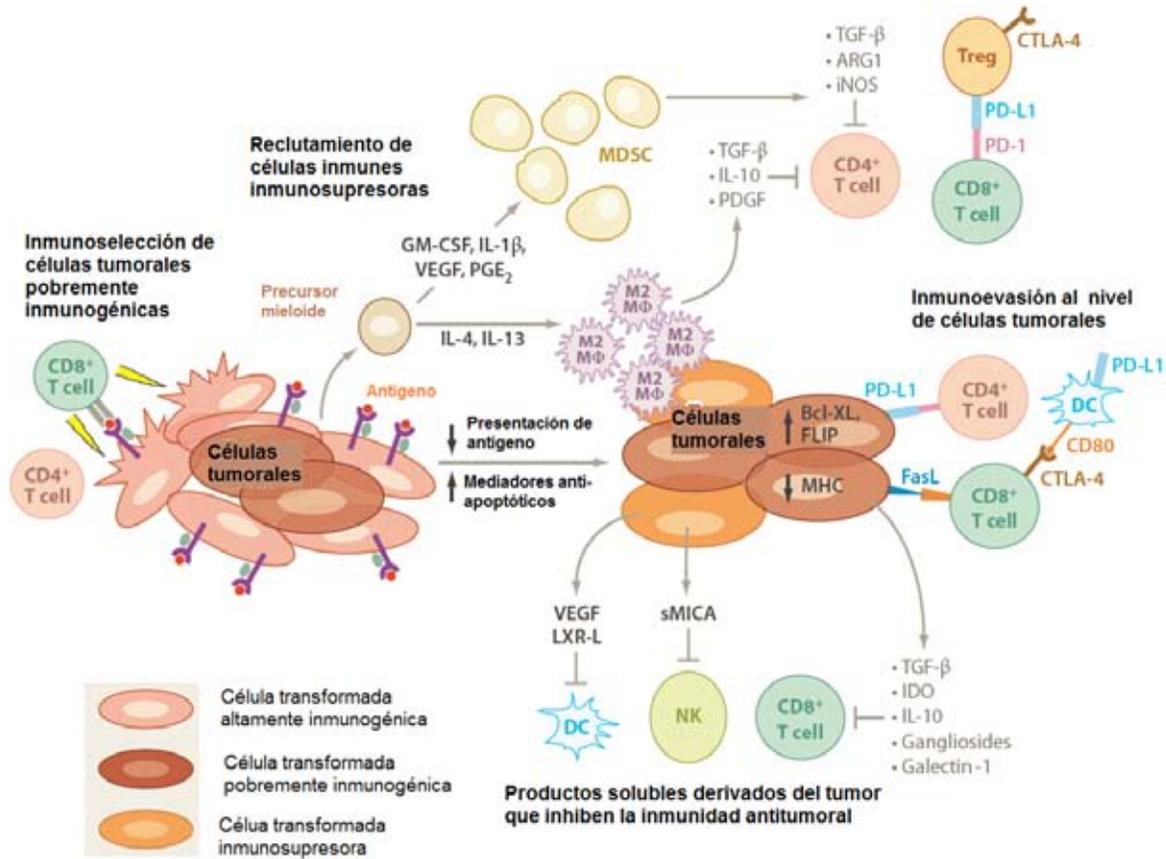


Figura 7. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Schreiber *et al.*, 2011).

Vía adenosinérgica

Recientemente, se ha propuesto otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune, conocido como vía adenosinérgica, durante la cual se acumula adenosina extracelular en tejidos tumorales, lo cual constituye un importante mecanismo de escape inmune por parte del tumor (Stagg *et al.*, 2010). La generación de adenosina extracelular implica la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina, y es catalizada por la 5' ecto-nucleotidasa (CD73) (Thompson *et al.*, 2004).

Los nucleótidos son moléculas que cumplen funciones de gran importancia en la fisiología celular. Particularmente el trifosfato de adenosina (ATP). Actualmente se sabe que bajo diferentes estímulos, el ATP puede ser liberado al espacio extracelular y actuar como transmisor al estimular de manera autócrina o parácrina a las células adyacentes. Existe un gran número de células que son capaces de liberar ATP, y el tipo de estímulos que lo induce son de diversa índole. Dentro de los estímulos que promueven la liberación de ATP, se encuentran: los impulsos eléctricos, los estímulos mecánicos, el cambio de volumen celular, la isquemia, la hipoxia, la liberación por estímulos químicos (neurotransmisores) y la lisis celular. El ATP, se sabe que, una vez que éste se encuentra en el espacio extracelular, puede ser hidrolizado por ectoATPasas generándose ADP, AMP y finalmente adenosina (Jacobson *et al.*, 2012).

La adenosina es un nucléosido púrico endógeno que está presente constitutivamente en bajos niveles fuera de las células pero puede incrementar dramáticamente su concentración seguida de condiciones de estrés metabólico como aquellos inducidos por hipoxia e isquemia (Gessi *et al.*, 2007).

En la hidrólisis enzimática de ATP extracelular, la generación de adenosina extracelular es provocada por la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1 (CD39) y 5' ectonucleotidasa (CD73) que representan una importante vía de generación de adenosina extracelular (Kobie *et al.*, 2006).

Ecto-nucleotidasas

Existen diferentes familias de las ecto-nucleotidasas que actúan en el espacio extracelular y son responsables de la generación de adenosina a partir de nucleótidos de adenina (ATP, ADP o AMP): 1) La familia de la ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa (ENTPDasa), que incluye cuatro miembros unidos a la membrana celular (NTPDasa1 o CD39, NTPDasa2, NTPDasa3, NTPDasa8); estas enzimas se expresan diferencialmente e hidrolizan con afinidades diferentes. 2) La familia de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), capaz de hidrolizar nucleósido trifosfatos a monofosfatos y pirofosfatos (PPi). 3) La familia de la fosfatasa alcalina (AP), incluye enzimas que degradan un amplio rango de sustratos, liberando fosfato inorgánico (Pi). 4) La familia 5'-nucleotidasa (CD73), con un solo miembro anclado a la membrana plasmática que hidroliza ATP a adenosina (Aliagas *et al.*, 2014) (Figura 8).

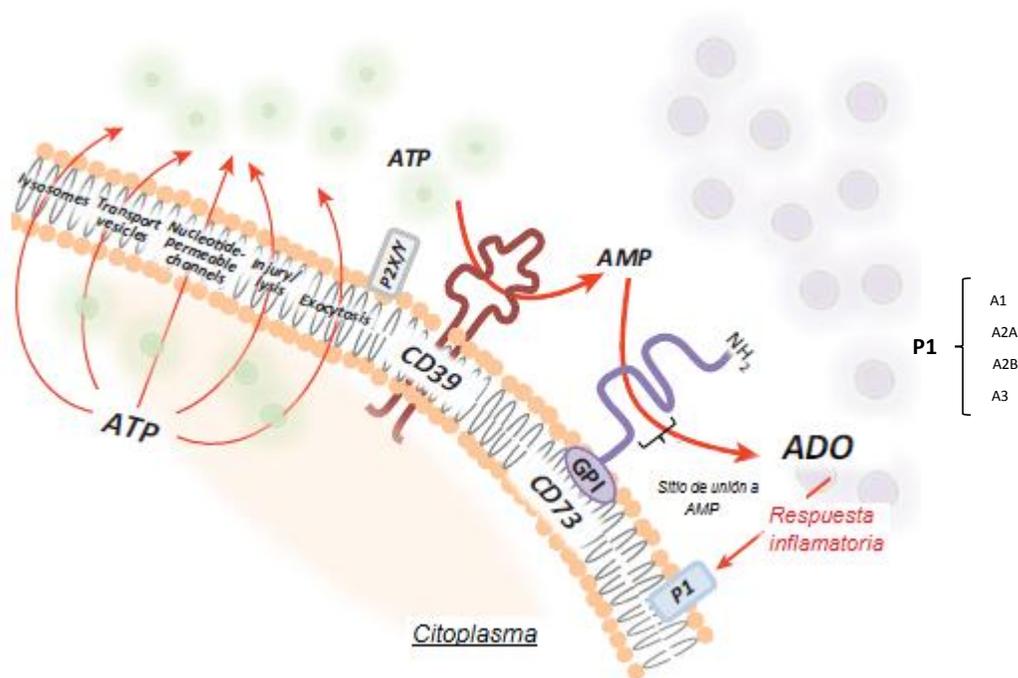


Figura 8. Actividad enzimática de CD39 y CD73 (Tomado y modificado de Antonioli *et al.*, 2013).

CD39 (NTPDasa1)

CD39 es una proteína integral de membrana, está constituida por 510 aminoácidos. Estructuralmente, tiene dos dominios transmembrana, un dominio citoplasmático pequeño que comprende los segmentos NH₂- y COOH- terminal, y un dominio hidrofóbico extracelular grande. CD39 se vuelve activo catalíticamente tras su localización en la superficie celular, y su glicosilación es importante para el correcto plegamiento de la proteína y la actividad enzimática.

CD39 se expresa constitutivamente en vaso, timo, pulmón y placenta, en células endoteliales y en células del sistema inmune, tales como células B, NK, DCs, células de Langerhans, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células T reguladoras. Además, la expresión de CD39 incrementa en varios tumores sólidos (cáncer colorrectal, de páncreas y de cabeza y cuello) también como en leucemia crónica, sugiriendo que esta enzima puede estar involucrada en el desarrollo y progresión de neoplasias malignas (Antonioli *et al.*, 2013).

CD73 (ecto-5'-nucleotidasa)

CD73 también conocida como ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'-NT, EC 3.1.3.5), es una ectoenzima de superficie celular unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 70 kDa, su expresión es inducida por la activación de HIF-1 α (factor inducible de hipoxia), la exposición a IFNs tipo I y por la activación de la vía de señalización Wnt (Stagg *et al.*, 2011). Además, CD73 se encuentra en muchos tipos de cáncer en humano y en ratón, donde produce elevadas concentraciones de adenosina que pueden promover el crecimiento tumoral por la estimulación de la angiogénesis e inhibiendo las respuestas inmunes antitumorales (Wang *et al.*, 2011).

CD73 se expresa constitutivamente en células endoteliales, células epiteliales, células T reguladoras Foxp3⁺ y subpoblaciones de leucocitos y ampliamente en muchas líneas celulares tumorales y está regulada en diversos carcinomas, incluidos los de colon, glioma, pulmón, páncreas y ovario (Spychala, 2000); y el aumento de los niveles de expresión se asocia con neovascularización tumoral, invasión, migración, adhesión y metástasis, y con menor tiempo de

supervivencia en los pacientes con cáncer de mama (Stagg *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la expresión de CD73 en conjunto con CD39 (ecto-ATPasa) en un tumor o en exosomas derivados de las células tumorales limita la inmunidad antitumoral de células T citotóxicas mediante la generación de adenosina extracelular y su interacción de ésta sobre receptores para adenosina en los linfocitos T (Gessi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011) (Figura 9).

Se ha propuesto que CD73 modula las interacciones entre las células endoteliales y los linfocitos como una molécula de adhesión. Además, CD73 juega papeles importantes *in vivo* para mantener la integridad del endotelio vascular durante la hipoxia, ya que puede suprimir el tráfico transendotelial de los leucocitos a través de su actividad enzimática. También la adenosina generada por CD73 del endotelio limita el acceso de células T reactivas al tumor principalmente a través de la vía de activación del receptor para adenosina A2B. Es posible que la activación del receptor A2B mejore la barrera endotelial y dificulta la adhesión de leucocitos al endotelio a través de señales intracelulares dependientes de AMPc, que a su vez puede incrementar la expresión y actividad de CD73 y además previene la adhesión de leucocitos. Es posible que CD73 endotelial estimula la angiogénesis patológica para promover el crecimiento tumoral, similar a CD39, como la adenosina es conocida para inducir incremento en la expresión de VEGF (Spychala, 2000; Wang *et al.*, 2011; Zhang, 2010).

La habilidad de las células inmunes para reconocer y eliminar las células tumorales es fundamental para la defensa exitosa del huésped contra el cáncer. Sin embargo, cada vez incrementa la evidencia que indica que existe una comunicación dinámica entre un tumor y el sistema inmune que puede controlar el crecimiento tumoral. Durante la progresión tumoral, las células tumorales fomentan un microambiente tolerante y la activación de múltiples mecanismos inmunosupresores, lo cuales pueden actuar en conjunto para bloquear una respuesta inmune efectiva. CD73 está altamente expresado en muchos tumores sólidos y su expresión y actividad elevada están asociadas con la invasión y

metástasis tumoral y con menor tiempo de supervivencia de los pacientes, lo que indica que hay una estrecha relación entre CD73 y la progresión del cáncer (Jin *et al.*, 2010).

Los tumores sólidos, debido a su vasculatura anormal, son comúnmente hipóxicos y muestran altos niveles de adenosina en el microambiente tumoral a través de la actividad enzimática de CD73, lo cual puede ser un importante mediador de la inmunosupresión asociada al tumor y los altos niveles de expresión de CD73 en el tumor probablemente sean inducidos en el microambiente tumoral local, (Gessi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).

Receptores para adenosina

Después de su liberación, la adenosina induce sus efectos biológicos a través de la interacción con cuatro receptores de superficie celular clasificados por datos moleculares, bioquímicos y farmacológicos en cuatro subtipos: A1, A2A, A2B y A3 (Gessi *et al.*, 2007). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas. Dichos receptores ejercen su acción en las células regulando la concentración de segundos mensajeros tales como el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3) (Rangel *et al.*, 2007).

Bajo condiciones normales, la adenosina es constantemente producida tanto intracelular como extracelularmente y se mantiene a bajos niveles intracelulares (cerca de 100 nM) a través de la actividad metabólica ejercida por la adenosina cinasa y la adenosina deaminasa. En condiciones de deficiencia de ADA, hipoxia, isquemia o inflamación, la producción intracelular de adenosina incrementa a muy altas concentraciones micromolares y es transportada a través de la membrana celular por agentes específicos que finalmente conducen a la activación de todos los receptores para adenosina (Gessi *et al.*, 2007).

A excepción del subtipo A1, los demás receptores se expresan en linfocitos T humanos y parece que su activación representa una potente vía inmunosupresora

endógena que regula la excesiva respuesta inmune contra potentes estímulos externos (Gessi *et al.*, 2007).

En particular, se conoce que la adenosina ejerce sus efectos sobre la proliferación y muerte celular principalmente a través del subtipo A3, el cual está altamente expresado en células tumorales. Estos descubrimientos confirman los datos recientes indicando que la sobreexpresión del receptor A3 puede ser un buen candidato como un marcador tumoral. La adenosina también juega un papel en la promoción de la angiogénesis. La regulación de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular angiogénico (VEGF) a través de los receptores para adenosina se ha demostrado en varios tipos celulares (Merighi *et al.*, 2005) (Figura 9).

Se ha reportado que la adenosina modula la migración de células tumorales del colon y que agonistas del receptor A3 inhiben la proliferación o estimulan la apoptosis en cáncer de mama y células de carcinoma de colon. También se ha reportado que los agonistas del receptor A1 inducen apoptosis en células cancerosas de colon, mientras que otros estudios sugieren que el receptor A1 en células de carcinoma de mama media la progresión del ciclo celular y la proliferación celular (Kalhan *et al.*, 2012).

También, se ha propuesto que el receptor A2A dispuesto en la membrana de los linfocitos T, protege a los tumores de la actividad antitumoral por estas células efectoras en un microambiente rico en adenosina (Otha *et al.*, 2006; Stagg *et al.*, 2011). La señalización vía el receptor A2A en las células T resulta en la inhibición de la activación y de la expresión del receptor del linfocito T y muchas otras funciones efectoras, incluyendo proliferación mediante la inhibición de IL-2, la citotoxicidad, expansión y la secreción de citocinas importantes con función antitumoral como IFN- γ , TNF- α e IL-4, además de promover la anergia de las mismas (Figura 9) (Sevigny *et al.*, 2007; Sitkovsky and Ohta, 2005; Otha *et al.*, 2006).

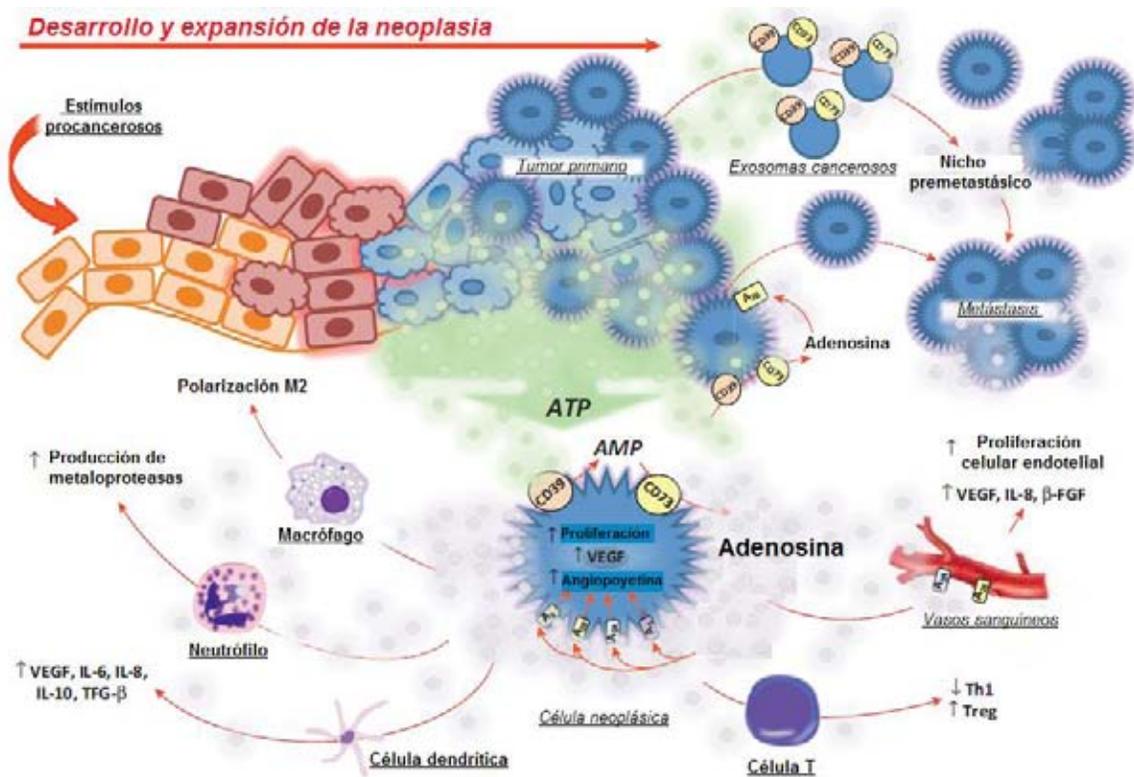


Figura 9. Vía adenosinérgica en el desarrollo y progresión de la neoplasia. La adenosina promueve el crecimiento tumoral activando los receptores para adenosina A1, A2A, A2B y A3 y mejorando la habilidad invasiva y metastásica (Tomado y modificado de Antonioli *et al.*, 2013).

Interleucina 10 (IL-10)

Recientemente, se ha demostrado que la activación del receptor A2B en células de la microglia induce el incremento de la producción de interleucina-10 (IL-10), mientras que suprime la producción de citocinas proinflamatorias. Además, se ha comprobado que la IL-10 promueve el crecimiento del tumor en cáncer de mama, pulmón y melanoma y tiene un efecto inhibitor en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad en las células tumorales (Koscsó *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2006; Terrazzano *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 1997). Asimismo, se ha reportado que en tejidos tumorales de cuello uterino, existe una mayor expresión de IL-10 en relación al grado de evolución de los tumores (Clerici *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1998).

Adenosina deaminasa (ADA/CD26)

Adenosina deaminasa (ADA) es una enzima que cataboliza adenosina a su metabolito, inosina, de esta forma desregula los efectos biológicos de la adenosina *in situ*. ADA está presente tanto en la superficie celular como dentro de la célula, pero no tiene dominio transmembranal propio y está asociada con CD26, una glicoproteína de superficie con actividad dipeptidil peptidasa IV. CD26 funciona como una proteína para ADA extracelular en humanos, anclándola a la superficie celular de tal manera que reduce los niveles locales de adenosina. Con niveles muy elevados de adenosina, como es el caso en el microambiente tumoral, tal sobrerregulación de ADA en respuesta a la hipoxia puede agotar las reservas de las células resultando en su baja expresión sobre la superficie de las células T efectoras, incremento de los niveles de adenosina y supresión mejorada de las funciones de las células efectoras (Mandapathil *et al.*, 2012).

CD26 es una glicoproteína de superficie celular tipo II multifuncional ampliamente expresada en las células T, B y natural killer (NK). Una de sus funciones es la de unir a la adenosina deaminasa. La unión de ADA a CD26 es capaz de reducir la concentración local de adenosina y tiene un papel enzimático en proteger a las células T de una inhibición de la proliferación mediada por la adenosina. En efecto, se ha reportado que la actividad de la adenosina deaminasa es significativamente más baja en los linfocitos periféricos de los pacientes con cáncer, sugiriendo el incremento de la susceptibilidad de las células T a la inhibición mediada por la adenosina dentro del microambiente tumoral (Gessi *et al.*, 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que algunos tumores son capaces de expresar ectonucleotidasas que generan adenosina a través de ATP extracelular, así como receptores de adenosina que les permiten favorecer su estado tumorigénico, invasivo e inmunosupresor, por lo que nos planteamos la siguiente pregunta: ¿La expresión de moléculas participantes en la vía adenosinérgica se asocia con el estado de progresión e invasión tumoral a lo largo de la evolución natural del CaCu?

HIPÓTESIS

La vía adenosinérgica tiene un papel importante en la supresión de la respuesta inmune antitumoral, así como en favorecer el crecimiento e invasión del tumor. Recientemente se ha encontrado en varios tipos tumorales una correlación entre el incremento de la expresión de varias moléculas participantes en la vía adenosinérgica, como CD73, la supresión de la respuesta inmune y la consecuente progresión tumoral. Por lo que en el caso específico del cáncer cervical, se espera que la expresión de las moléculas de la vía adenosinérgica (CD39, CD73, A1, A2A, A2B, A3), de CD26 e IL-10 sea mayor en lesiones avanzadas (CaCu invasor I-IV) respecto a las lesiones pre-invasoras (LIEBG y LIEAG).

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica: las ectonucleotidasas CD39, CD73; receptores para adenosina A1, A2A, A2B, A3; adenosina-desaminasa (ADA/CD26) e interleucina 10 (IL-10), en muestras de tejidos de las diferentes etapas del desarrollo del CaCu.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en tejidos de cuello uterino normal, con lesiones premaligas (lesiones de bajo y alto grado) y cáncer invasor.
- Analizar la presencia de receptores para adenosina A1, A2A, A2B y A3 en células de cortes histológicos de las diferentes etapas del desarrollo del CaCu.
- Evaluar la expresión de ADA/CD26 en células tumorales de cortes histológicos de tejidos normales de cuello uterino, lesiones de bajo y alto grado, así como de cáncer invasor.
- Analizar la presencia de IL-10 en tejidos cervicales normales, lesiones de bajo y alto grado y en cáncer invasor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Las biopsias de mujeres que presentaron lesiones cervicales de bajo grado se obtuvieron a través de electrocirugía (LEEP), la cual consistió en emplear corriente eléctrica de radiofrecuencia para cortar tejidos, siendo el principal objetivo extirpar las lesiones y la zona de transformación en su totalidad.

Las biopsias de lesiones cervicales de alto grado, de cérvix normal y de CaCu se obtuvieron mediante histerectomías radicales (extirpación del útero y del cuello uterino), en el caso de las muestras de tejidos normales, la histerectomía se realizó por causas diferentes a una lesión cervical de alto grado o a un cáncer de cuello uterino (cervicitis, miomas, etcétera).

Las muestras de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, las de carcinoma *in situ* e invasor y las de tejido cervical normal se obtuvieron del Hospital General Zona (HGZ) No. 15 Ciudad de Reynosa Tamaulipas, IMSS.

Un pequeño número de muestras de LIE de bajo grado fueron donadas por el Dr. Héctor Sánchez, del área de ginecología en el HGZ No. 2-A Troncoso, IMSS.

Lesión	Núm. de muestras
Normal (sin lesión)	10
LIE de bajo grado	10
LIE de alto grado	10
Cáncer cérvicouterino	24

Tabla 3. Número de muestras recolectadas por grupo.

Proceso histológico del tejido

Los tejidos colectados se fijaron en formol al 10% en PBS por lo menos durante 24 horas a temperatura ambiente. Después las muestras pasaron por un proceso histológico que consiste en la deshidratación del tejido en alcoholes ascendentes (OH 70%, 90%, 96% y 100%) durante 30 minutos en cada uno, el aclaramiento del tejido en xilol durante una hora y su inclusión en bloques de parafina.

Cortes histológicos

De cada bloque de parafina se obtuvo un corte histológico con un espesor de entre 4 y 5 μm , los cortes se llevaron a cabo con la ayuda de un micrótomo (Leica).

Tinción con Hematoxilina y Eosina (H-E)

La técnica del microarreglo de tejidos, permite la realización de diferentes ensayos en cientos de muestras simultáneamente. Sin embargo, para identificar las zonas de especial interés de las piezas donantes, los tejidos incluidos en bloques de parafina necesitan ser analizados y marcados de forma convencional con tinciones de H-E.

Los cortes de tejido se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 30 minutos, posteriormente se les dieron 10 baños en xilol, 10 baños en una mezcla 1:1 de alcohol y xilol, otros 10 en alcohol absoluto y 10 baños más en alcohol al 96%, se tiñeron con Hematoxilina (tiñe núcleos) y como contraste se agregó Eosina (tiñe citoplasma y fibras de colágena), los tejidos ya teñidos se deshidrataron con baños en alcohol al 96%, alcohol absoluto, alcohol y xilol (1:1) y en xilol para finalmente hacer el montaje de los tejidos con medio de montaje (Entellan®, Merck).

Una vez teñidos, los tejidos pudieron ser observados a través de un microscopio óptico (Leica Galen III, Leica), de este modo se logró localizar el epitelio cervical de cada una de las muestras e identificar la región de interés, es decir, donde se encuentra el epitelio transformado característico de las lesiones intraepiteliales escamosas o de los tumores (Figura 10).

Cabe mencionar que todos los cortes histológicos de los tejidos de cuello uterino fueron diagnosticados con la ayuda de un patólogo para determinar si los tejidos pertenecían al grupo de muestras normales, de lesiones premalignas o de cáncer cervicouterino.

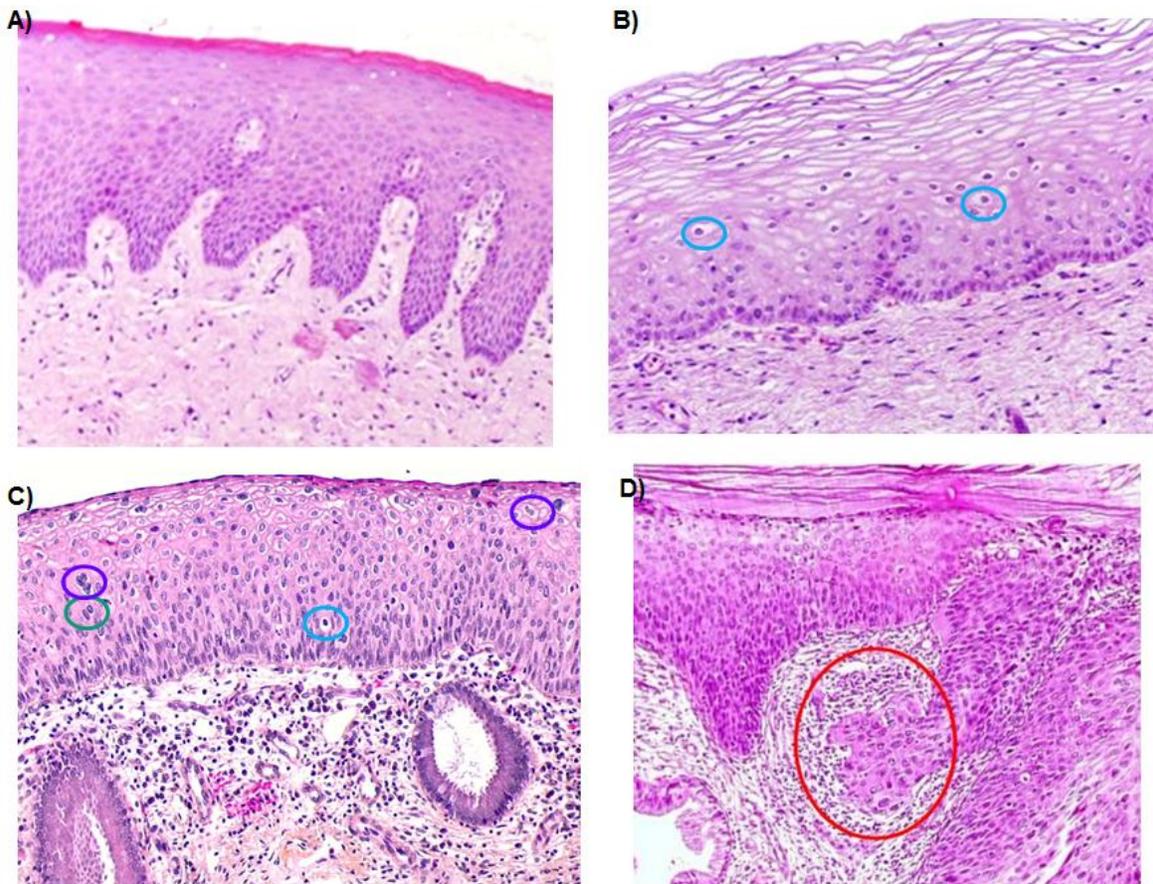


Figura 10. Fotografías de los tejidos teñidos con H-E **A)** Cuello uterino normal; **B)** Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado (LIEBG), donde en un círculo azul se seleccionó un coilocito; **C)** Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado (LIEAG), en círculos verdes se observan células binucleadas mientras que en los círculos morados se pueden ver figuras mitóticas anormales y **D)** Carcinoma de cérvix invasor (CaCu), en un círculo rojo se muestra una región en donde las células tumorales han roto la membrana basal e invadido el estroma.

● **Construcción del microarreglo de tejidos**

Una vez identificada la región de interés, se obtuvieron cilindros de 1mm de diámetro y de aproximadamente 5mm de largo, con la ayuda de un equipo para microarreglos de tejidos (Chemicon ATA-100, USA). Los cilindros fueron insertados en un cubo de parafina blanco (bloque receptor) con una matriz de perforaciones previamente diseñadas. Una vez completado el arreglo de tejidos, el bloque fue sellado con una capa de parafina dispuesta de manera uniforme sobre los cilindros del bloque. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 4µm con un micrótopo (Leica USA) y se colocaron sobre portaobjetos electrocargados (Starfrost® Plus) para llevar a cabo las tinciones por inmunohistoquímica (Figura 11). Un único ensayo o reacción proporciona información de todos los especímenes de la laminilla a la vez, reproduciéndose fidedignamente las condiciones del ensayo para todas las muestras.

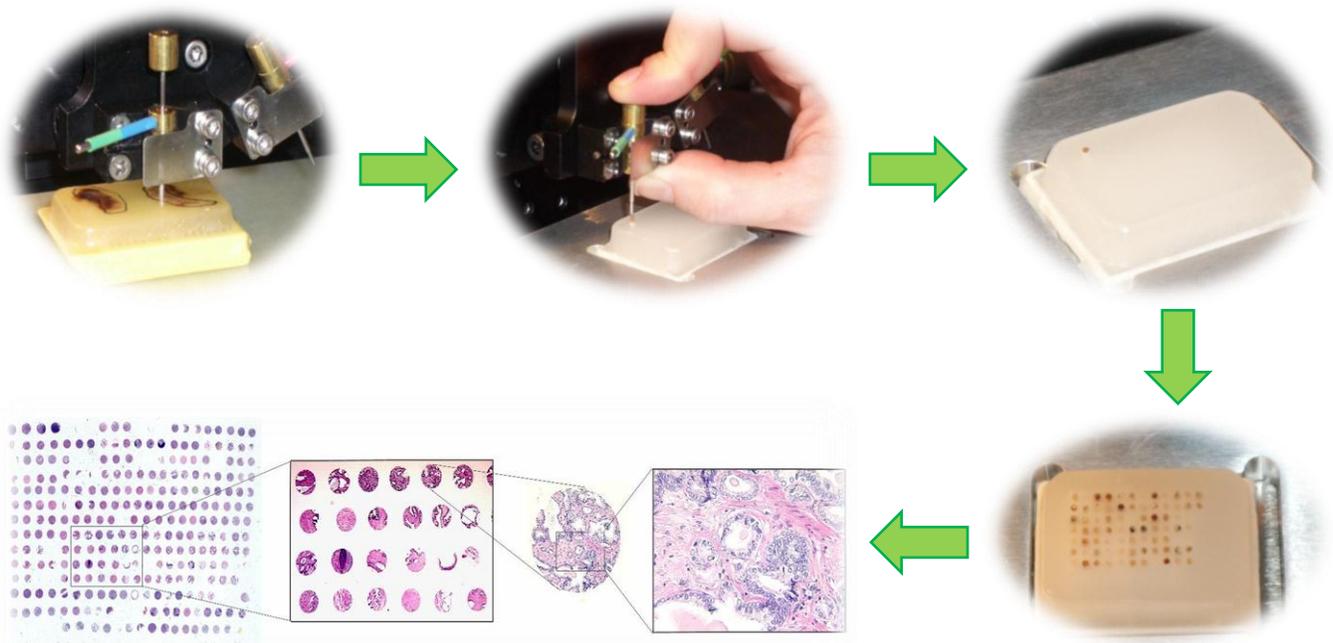


Figura 11. En esta figura se muestran los pasos a seguir para construir un microarreglo de tejidos.

Inmunohistoquímica

Los cortes obtenidos del microarreglo de tejidos fueron procesados para llevar a cabo tinciones inmunohistoquímicas con la finalidad de detectar la presencia de marcadores como CD39, CD73, A1, A2A, A2B, A3, CD26 y IL-10, empleando un sistema de detección denominado *UltraView Universal DAB Detection KitTM*, las tinciones se hicieron con ayuda de un equipo automatizado denominado *Ventana Benchmark® XT*. El proceso de tinción consistió de los siguientes pasos:

1. Las laminillas, conteniendo los microarreglos de tejidos, se calentaron en un horno a 60°C durante 24 horas para desparafinar los tejidos.
2. Para la recuperación antigénica, las muestras se trataron durante 30 minutos con una solución tampón de citratos (CC1) para dejar expuestos los sitios antigénicos.
3. Posteriormente se añadieron agentes inhibidores (H₂O₂) para reducir al mínimo la tinción de fondo que produce la peroxidasa endógena o la unión de proteínas no específicas.
4. Cada laminilla tratada fue incubada durante 32 minutos, con el anticuerpo primario de interés: CD39, CD73, A1, A2A, A2B, A3, CD26 e IL-10 con las diluciones estandarizadas de cada anticuerpo (Tabla 4).
5. Se adicionó un anticuerpo secundario, el cual está unido a una enzima (peroxidasa de rábano) y se procedió a incubar durante 60 minutos.
6. El revelado conformado por un sistema cromogénico (diaminobenzidina) formó un producto visible color marrón localizado en los puntos de unión antígeno-anticuerpo.
7. A continuación, se aplicó una contratinción en la muestra con hematoxilina durante 8 minutos.
8. Finalmente, las laminillas se sacaron del equipo de *Ventana Benchmark® XT*, se lavaron con agua jabonosa entre 3 y 5 minutos para eliminar los residuos del líquido sellador.
9. Los tejidos se deshidrataron gradualmente con alcohol al 96%, posteriormente con alcohol absoluto, y se aclararon con xilol durante 5

minutos. Posteriormente las laminillas fueron cubiertas con medio de montaje (Entellan®, Merck) para depositar en ellas cubreobjetos de vidrio.

Anticuerpo	Dilución
CD39	1:150
CD73	1:100
A1	1:100
A2A	1:150
A2B	1:100
A3	1:150
CD26/ADA	1:100
IL-10	1:150
IgG2a	1:150

Tabla 4. Anticuerpos utilizados y las diluciones estandarizadas para las muestras de tejidos.

Análisis de imágenes

Los resultados se interpretaron utilizando un microscopio óptico con cámara integrada para fotografías (Leica) y el análisis de la expresión de los marcadores en las imágenes se realizó con la ayuda del programa *Image J*.

Para cuantificar el tejido teñido es necesario seguir el protocolo del programa para mediciones de intensidad, de la siguiente manera:

1. Abrir la imagen que se va a analizar.
2. Convertir la imagen a escala de grises usando el comando *Image > Type > RGBStack*. Es necesario convertir la imagen, ya que la herramienta *Threshold* solo trabaja con imágenes en escala de grises (Figura 12).
3. Para usar la herramienta *Threshold* se selecciona en la barra de tareas *Image > Adjust > Threshold* (Figura 13). Sin embargo, el programa no es capaz de seleccionar correctamente la expresión del marcador en el tejido, así que, la selección debe ser ajustada manualmente.
4. Finalmente se selecciona la herramienta *Analyse > Set Measurements*; seleccionar “*Area*”, “*Area fraction*”, “*Limit to threshold*” y “*Display label*” en la ventana de ajustes. Nuevamente presionar *Analyse > Measure* (Figura 14).

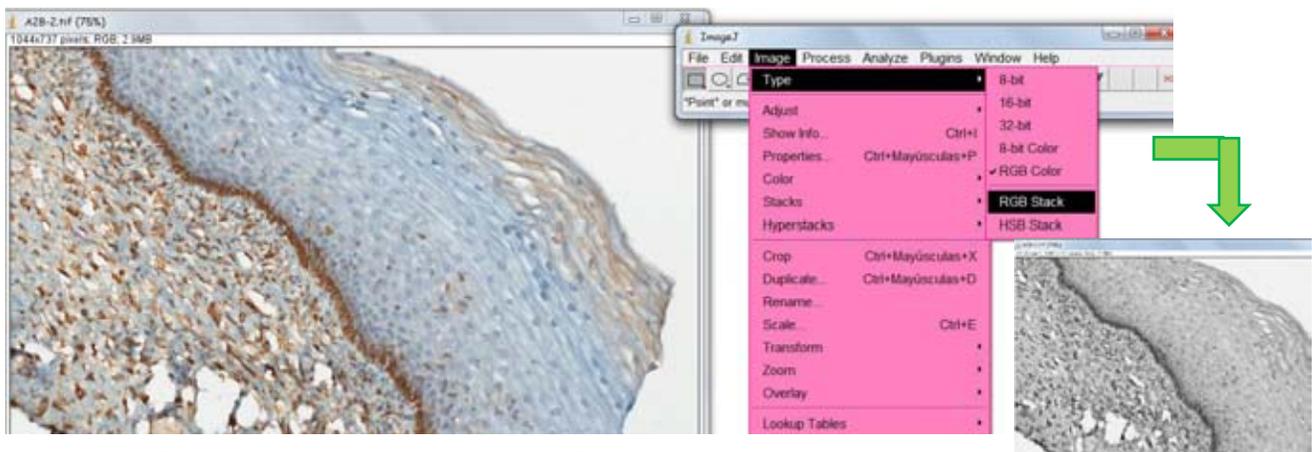


Figura 12. La fotografía original del tejido teñido se convierte a una imagen en escala de grises.



Figura 13. Selección del marcador en la imagen utilizando la herramienta *threshold*, la cual ilustra de color rojo las regiones que muestran la ubicación del marcador teñido de color marrón en el tejido.

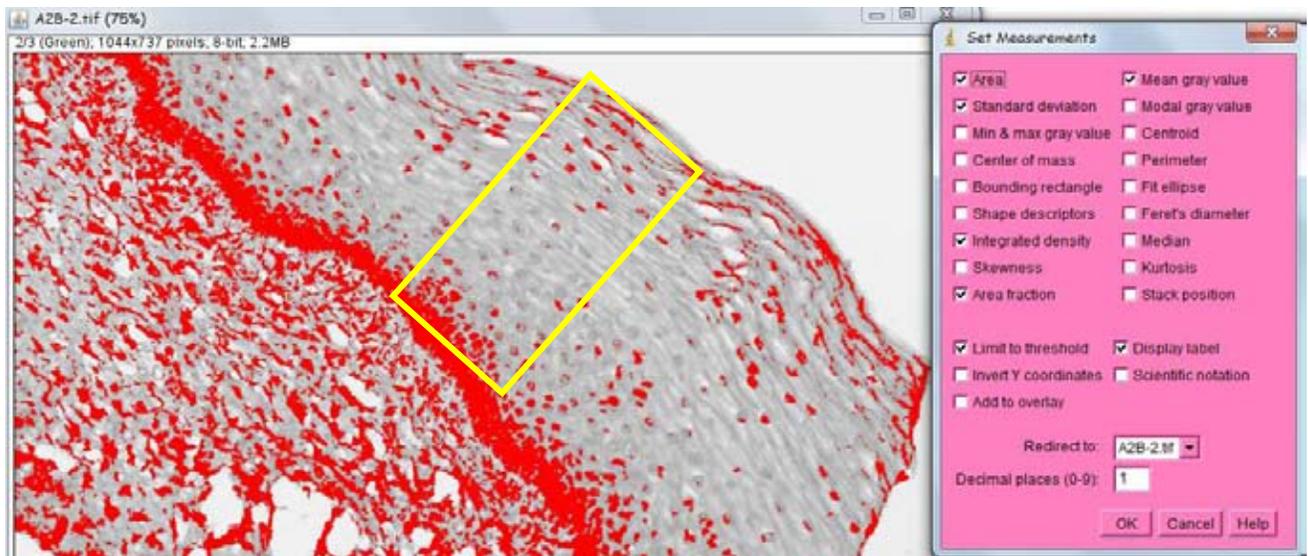


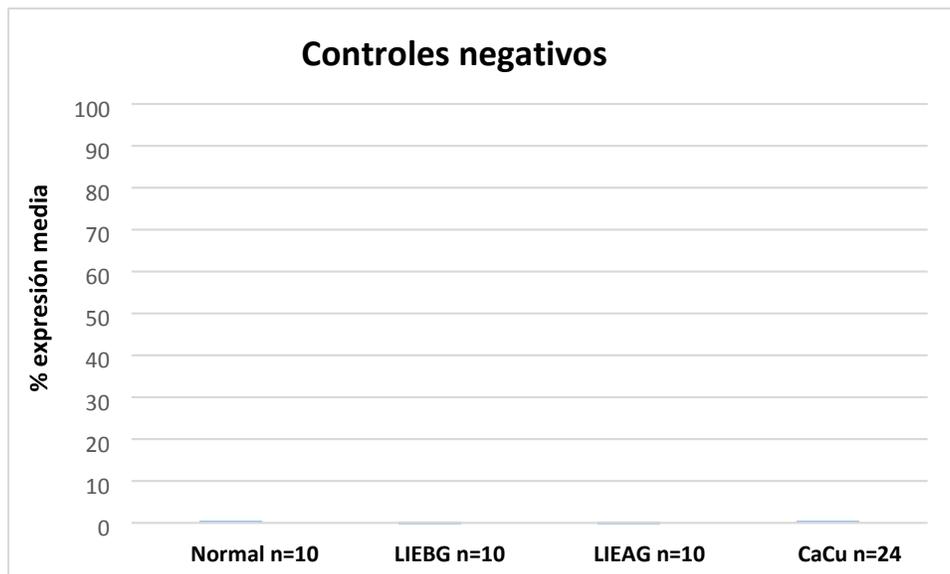
Figura 14. Selección del área y ajuste de los parámetros que se analizaron en la imagen.

Análisis estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar entre medias y una prueba de Tukey para comparar cada grupo con todos los demás utilizando el programa GraphPad Prism 6. La significancia fue determinada como $p < 0.05$.

RESULTADOS

La adenosina producida a través de la vía adenosinérgica, tiene un papel importante en la supresión de la respuesta inmune en tumores (Haskó *et al.*, 2008). Con el propósito de analizar la expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica en tejidos del cuello uterino, de las diferentes etapas en la historia natural del CaCu: cérvix normal, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG); y CaCu, se construyó un microarreglo de tejidos conteniendo 10 muestras de cérvix normal, 10 muestras de LIEBG, 10 muestras de LIEAG y 24 muestras de CaCu. Mediante la técnica de inmunohistoquímica se procedió a analizar la presencia de las ectonucleotidasas CD39 y CD73; los receptores para adenosina A1, A2A, A2B y A3; la enzima adenosina desaminasa (ADA/CD26) y la citocina IL-10. Inicialmente se hicieron tinciones con anticuerpos irrelevantes y contrateñidos con hematoxilina-eosina para uno de los tejidos, en la figura 15 se muestran tinciones representativas de tejidos de los cuatro grupos antes mencionados y en la gráfica 1 el promedio de tinción inespecífica al emplear un anticuerpo irrelevante IgG2a.



Gráfica 1. Controles negativos para los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu, teñidos con anticuerpo irrelevante IgG2a y contrateñidos con hematoxilina.

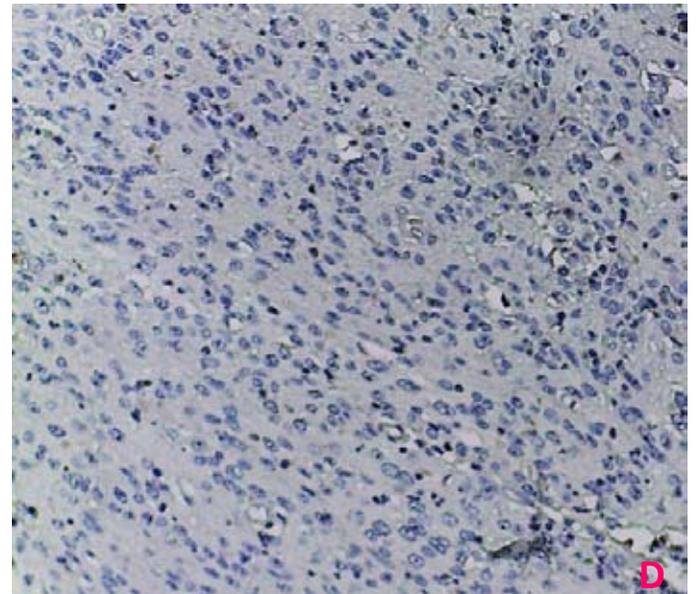
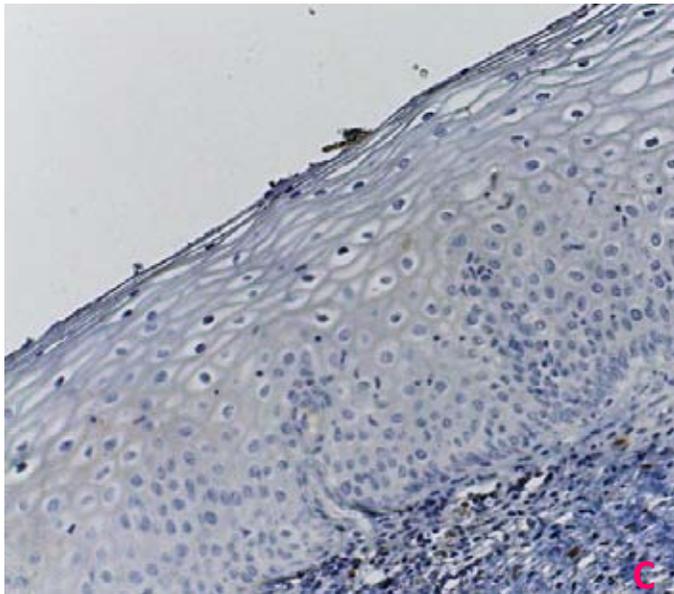
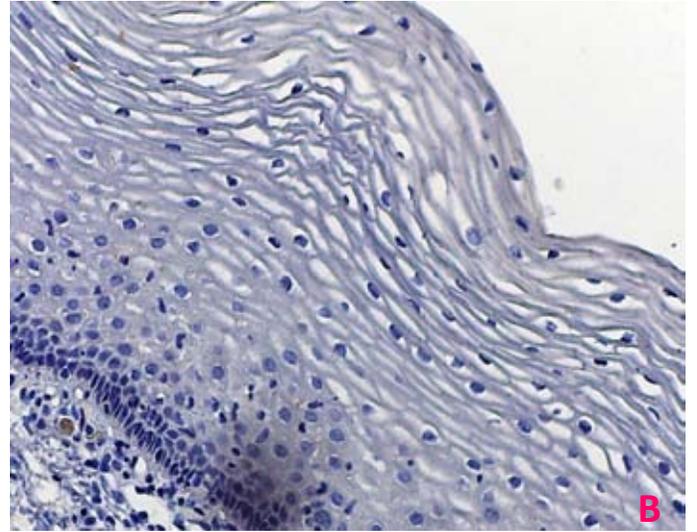
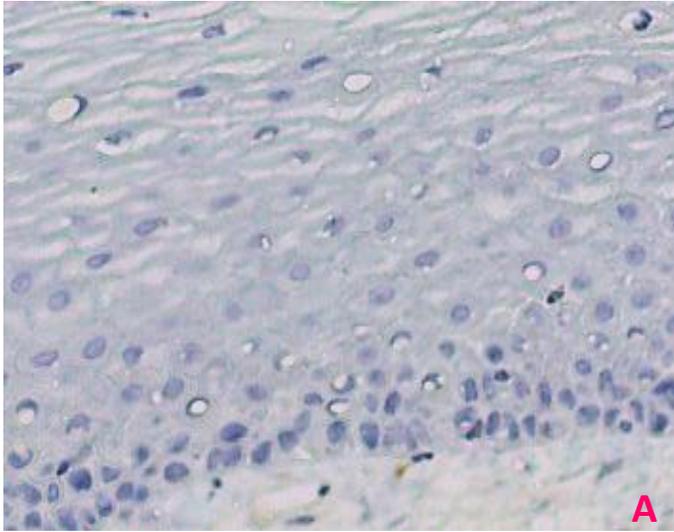
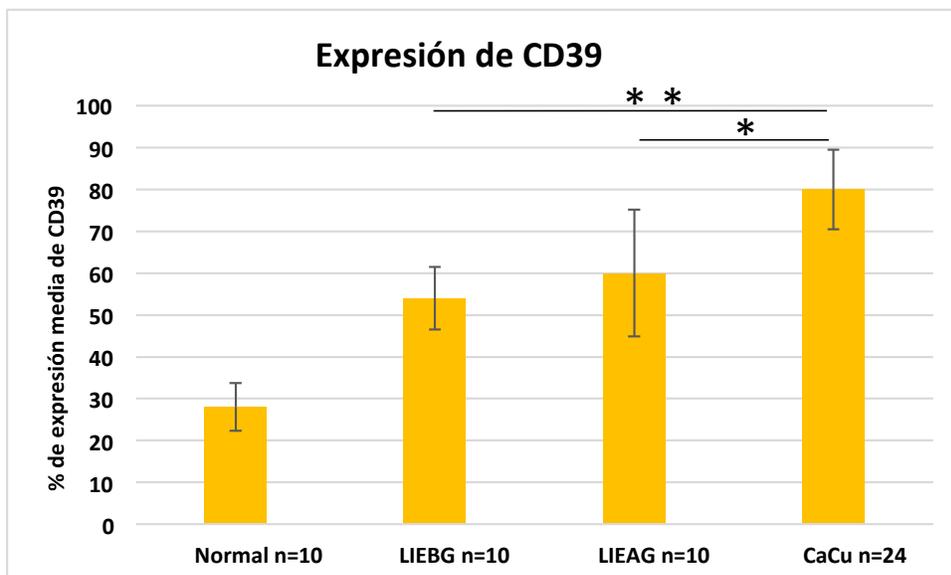


Figura 15. Controles negativos para **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Los tejidos fueron teñidos con anticuerpo irrelevante IgG2a y contrateñidos con hematoxilina. Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

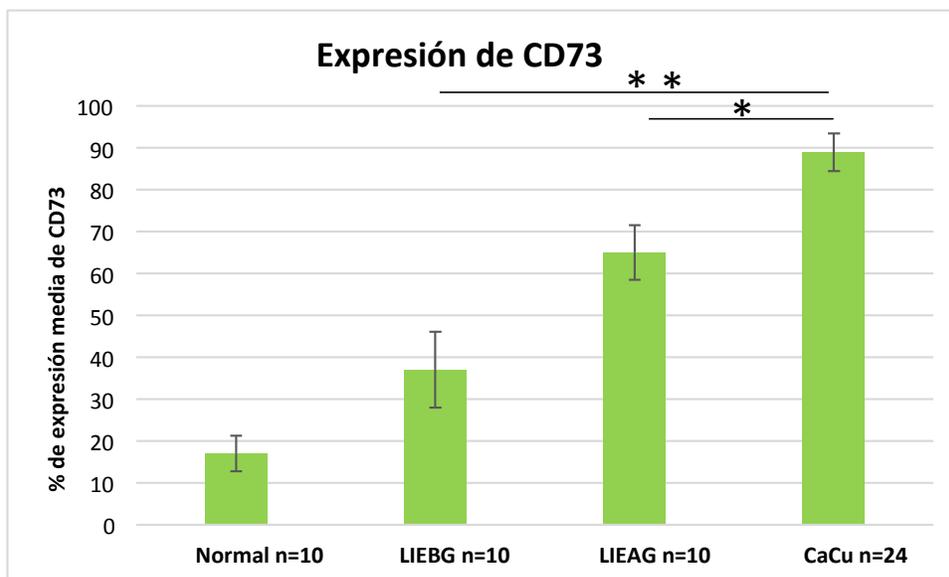
Análisis de la expresión de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 en las muestras de tejidos cervicales normales y con neoplasias.

Al analizar la expresión de CD39, se encontró que los tejidos normales mostraron un porcentaje de expresión promedio (número de células positivas que expresan el marcador, es decir, células teñidas de color marrón) del 28%, en donde la mayor parte de la tinción se concentró en las células de la membrana basal; mientras que en los tejidos correspondientes a LIEBG y LIEAG se detectó un promedio de expresión de 54% y 60% respectivamente (Gráfica 2). En estos tejidos se detectó una fuerte expresión de esta ectoenzima en el citoplasma y la membrana de las células de la capa basal y parabasal, así como en las células de la capa superficial de los tejidos como se muestra en la Figura 16. Por otra parte, los tejidos tumorales de CaCu mostraron una expresión muy intensa de CD39 y heterogénea en la mayoría de las células que conforman el tumor (Figura 16), la expresión promedio fue del 80% (Gráfica 2). La expresión de CD39 en las diferentes lesiones neoplásicas fue significativamente mayor que la expresada en los tejidos normales de cuello uterino $p < 0.05$.

Por otra parte, al analizar la expresión de CD73 en tejidos cervicales normales, se observó una tinción muy intensa en las células de la membrana basal, y en menor grado en las células de las capas parabasales; mientras que en los tejidos de LIEBG y LIEAG, la expresión de CD73 fue más intensa en las capas suprabasales; de manera contrastante, los tejidos tumorales de CaCu mostraron una intensa expresión en la membrana de la mayoría de las células que conforman el estroma tumoral (Figura 17). El porcentaje de expresión promedio de CD73 fue de 17% para tejidos cervicales normales, 37% para LIEBG, y 65% para LIEAG; mientras que en los tejidos tumorales de CaCu la expresión de CD73 fue 89% (Gráfica 3).



Gráfica 2. Expresión de CD39 en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.



Gráfica 3. Expresión de CD73 en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.

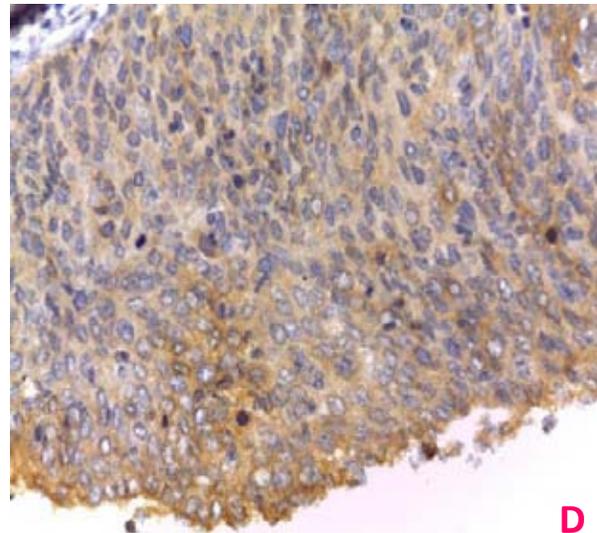
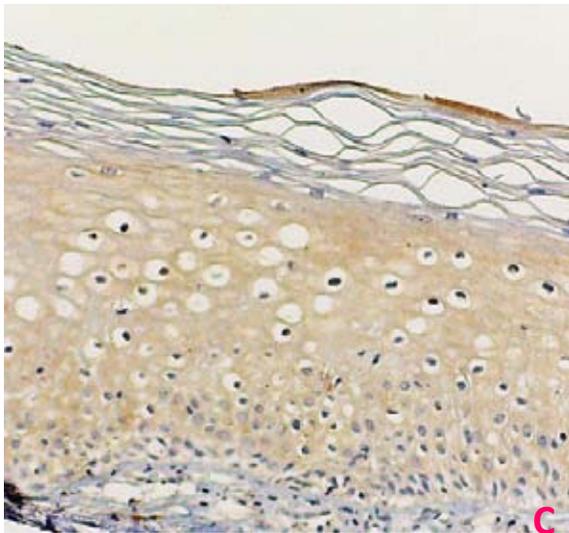
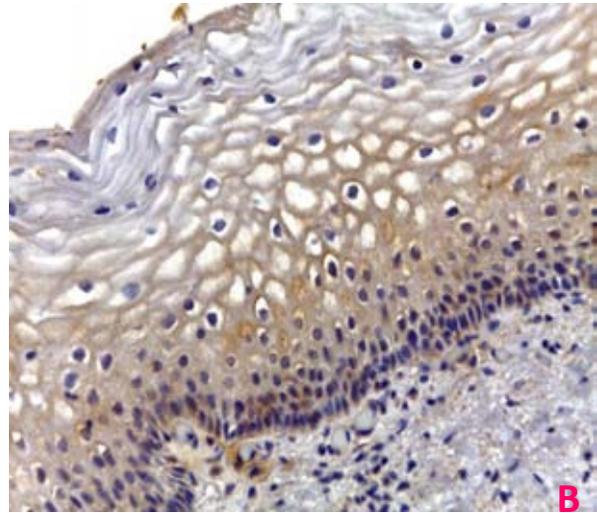
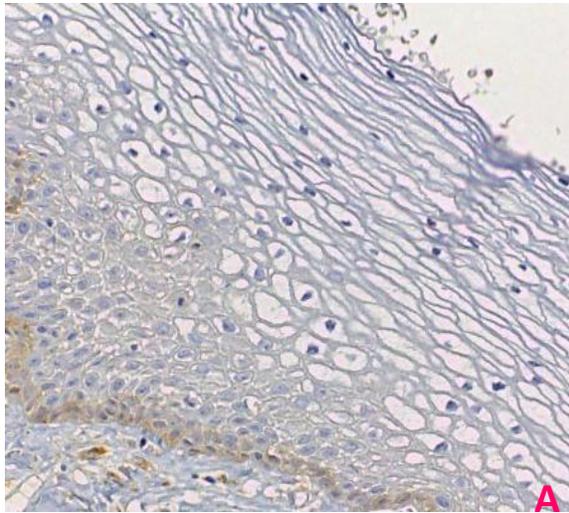
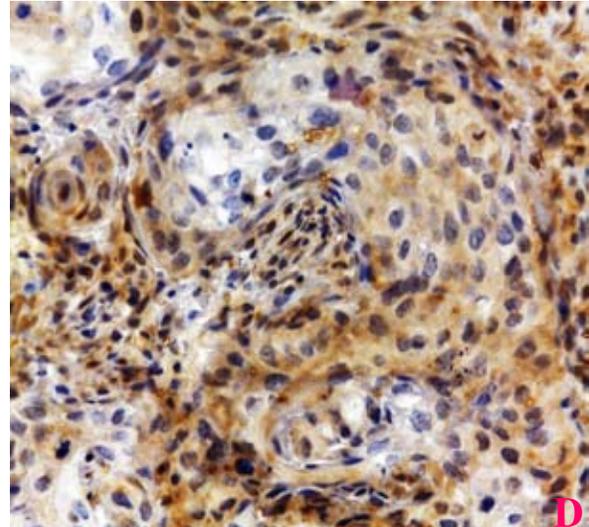
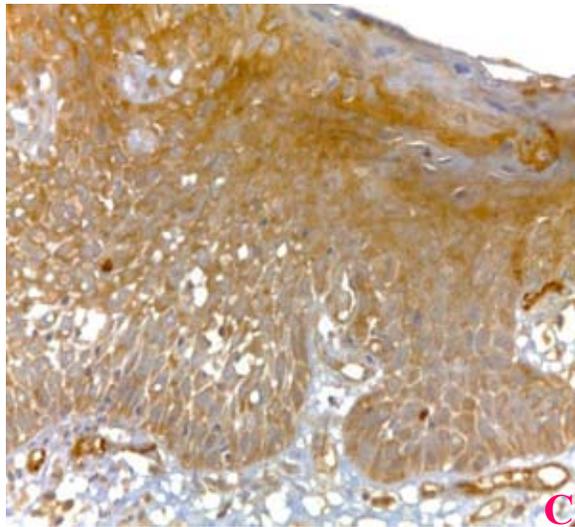
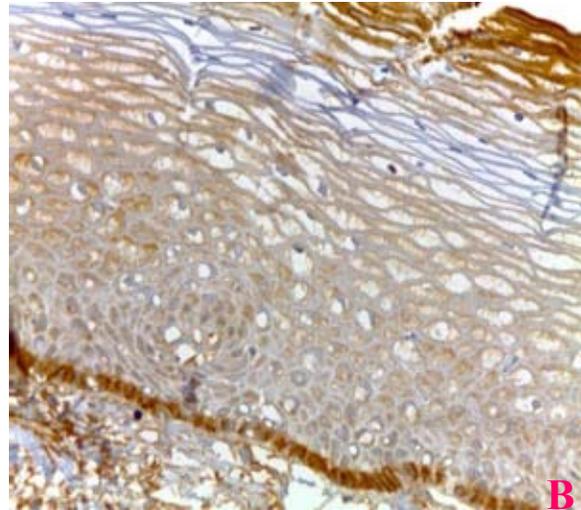
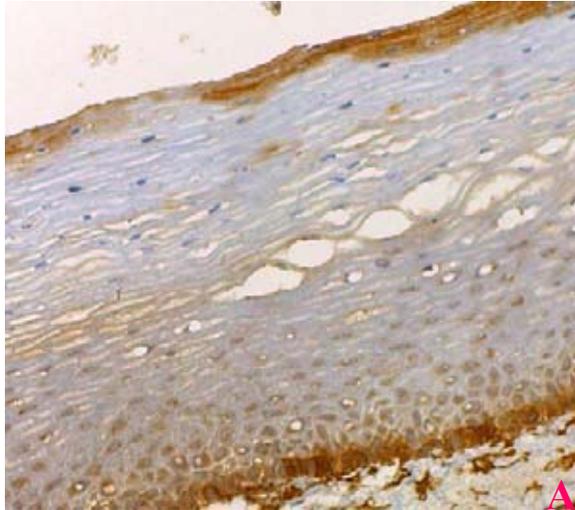


Figura 16. Expresión de la ectoenzima CD39 en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.



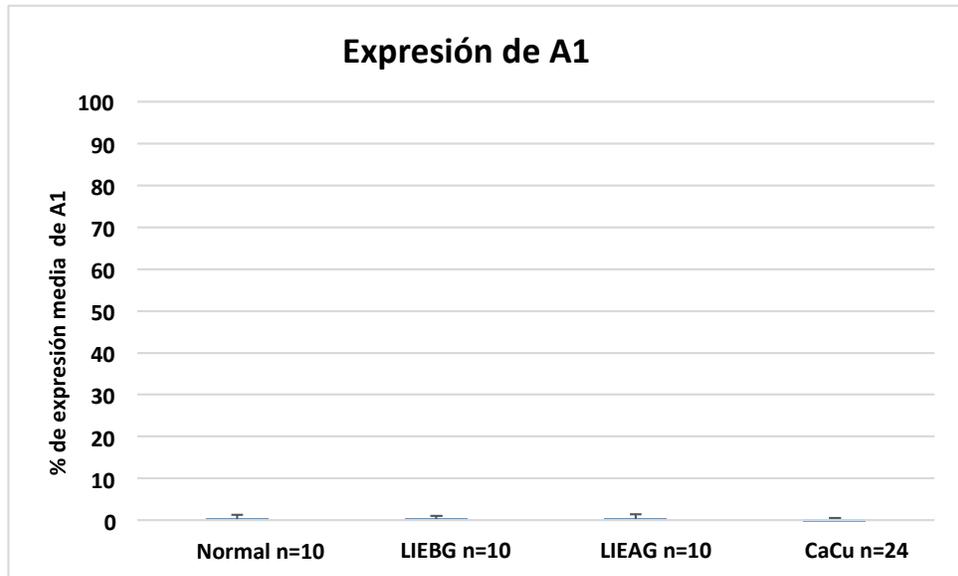
17. Expresión de la ectoenzima CD73 en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

Análisis de la expresión de los receptores para adenosina A1, A2A, A2B Y A3 en las muestras de tejidos cervicales normales y con neoplasias.

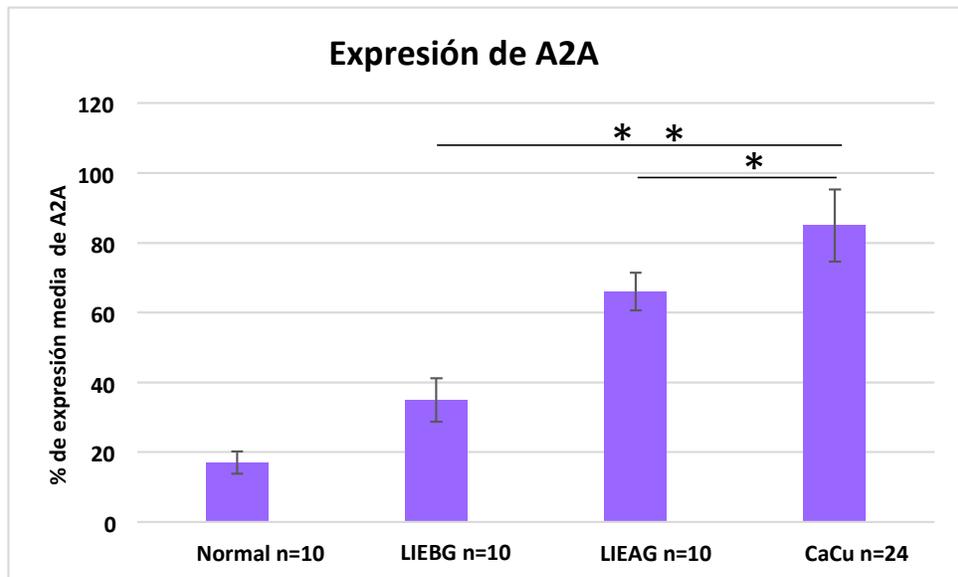
Al evaluar la expresión de los receptores para adenosina, encontramos que el receptor A1 presentó una baja expresión en los tejidos de los cuatro grupos de muestras (Figura 18 y Gráfica 4). Sin embargo, el receptor A2A se expresó en membrana y citoplasma de las células de todas las capas del epitelio de los tejidos normales, con LIEBG y LIEAG, mostrando valores diferenciales en los porcentajes de expresión media de 17%, 35% y 66% respectivamente. De manera interesante, los tejidos tumorales mostraron una expresión intensa y homogénea en citoplasma y membrana de la mayoría de las células tumorales que constituyen el estroma, mostrando una expresión media de 85% (Figura 19 y Gráfica 5).

La presencia del receptor A2B se observó en citoplasma y membrana de las células de la capa basal y de la capa superficial en los tejidos normales con un 7% de expresión, mientras que en las LIEBG y LIEAG se obtuvieron valores de 20% y 52% de expresión respectivamente. En los tejidos tumorales, se encontró una importante expresión de A2B en el citoplasma y membrana de la gran mayoría de las células epiteliales que conforman el tumor y que ha invadido el estroma, el valor promedio de expresión en los tumores de CaCu fue de 83% (Figura 20 y Gráfica 6).

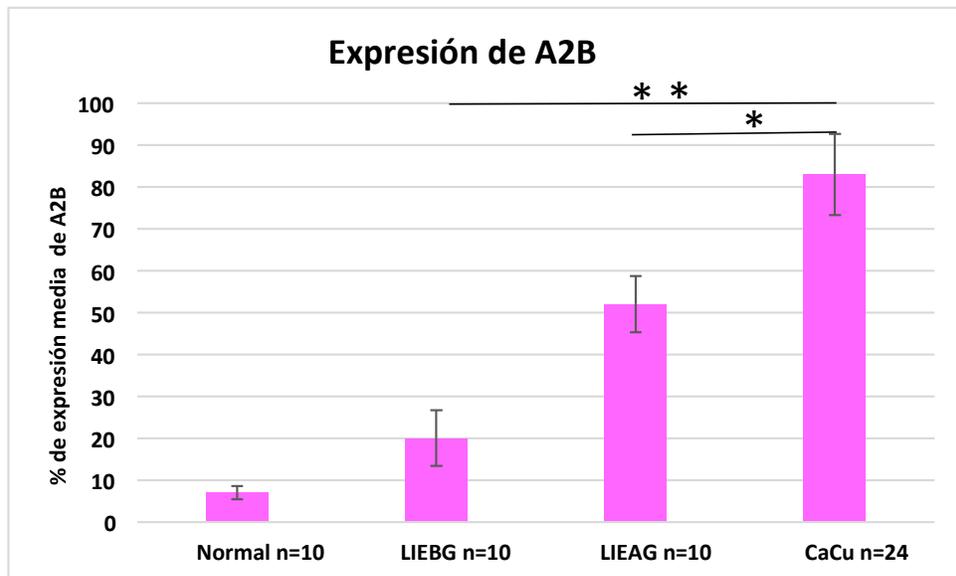
Finalmente, el receptor A3 mostró una baja expresión (2%), esencialmente en las células de la membrana basal de los tejidos normales; mientras que en las LIEBG y LIEAG se encontró un valor promedio de expresión de 16%, la distribución de este receptor se mostró particularmente en la membrana y el citoplasma de células basales y parabasales, al igual que en los tejidos de LIEAG; no obstante en éstos últimos, el porcentaje de expresión fue mayor (62%). En los tejidos tumorales, se encontró una fuerte expresión en la membrana y citoplasma de las células epiteliales que han invadido el estroma, el porcentaje de expresión de A3 fue 89% (Figura 21 y Gráfica 7).



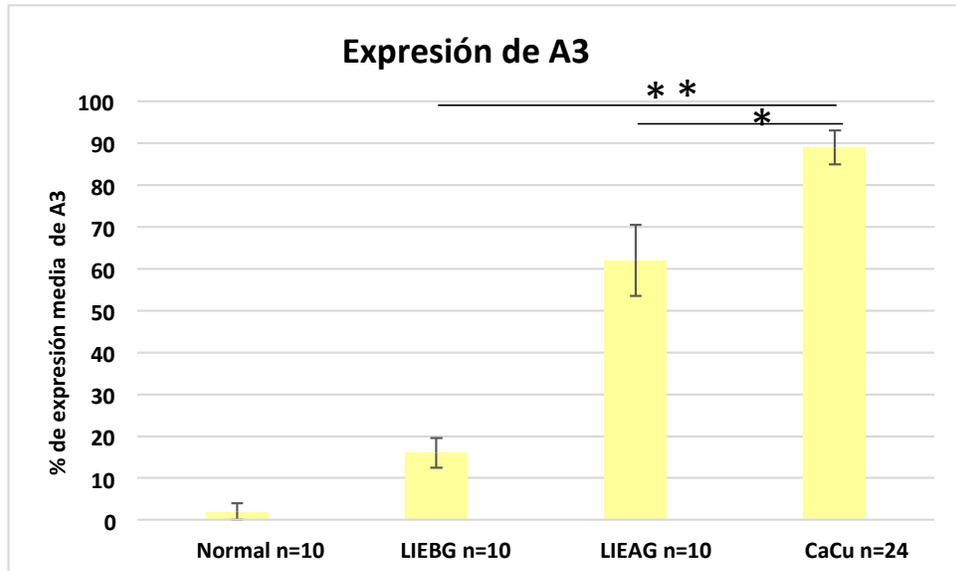
Gráfica 4. Expresión del receptor A1 en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.



Gráfica 5. Expresión del receptor A2A en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.



Gráfica 6. Expresión del receptor A2B en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.



Gráfica 7. Expresión del receptor A3 en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.

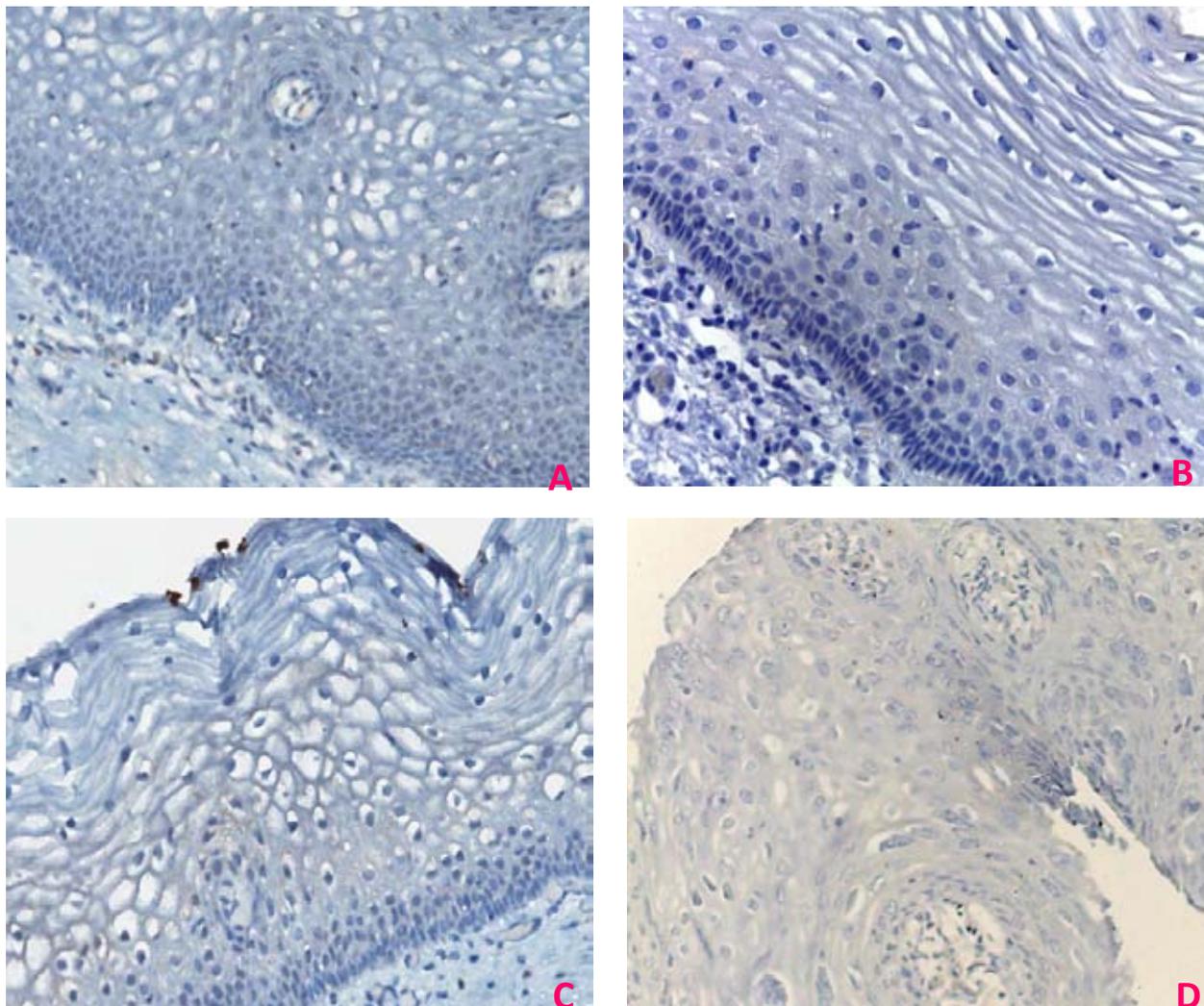


Figura 18. Expresión del receptor para adenosina A1 en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

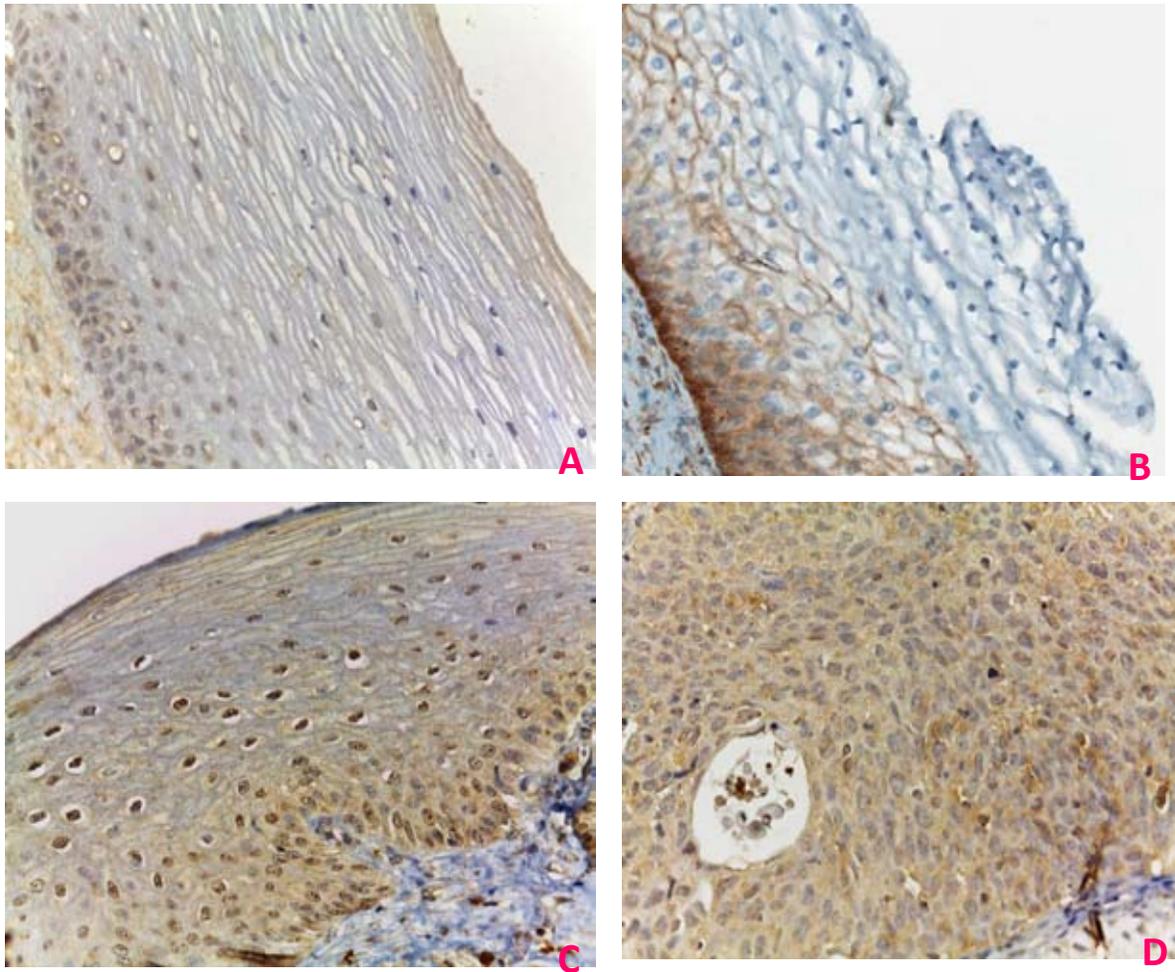


Figura 19. Expresión del receptor A2A en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

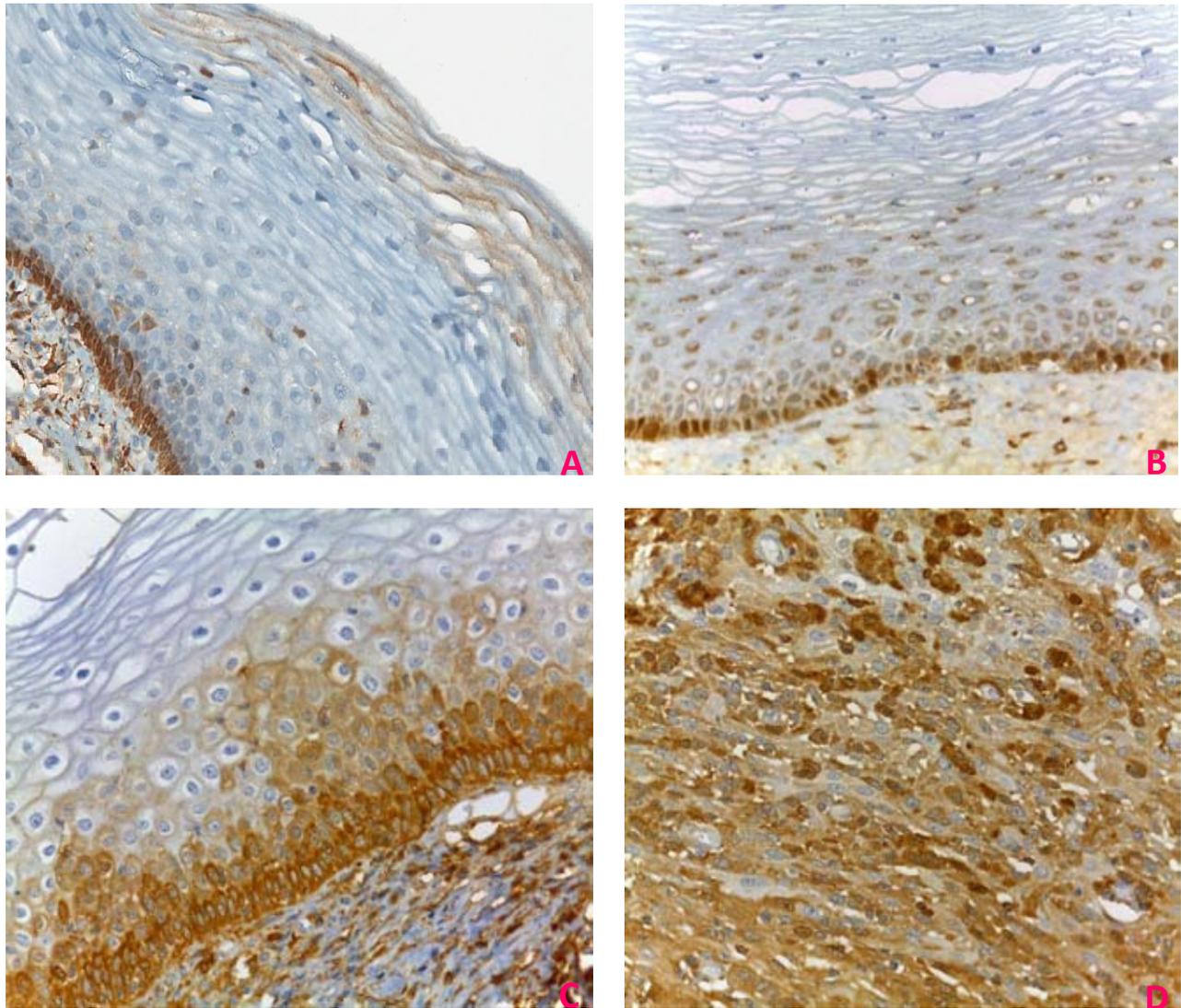


Figura 20. Expresión del receptor para adenosina A2B en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

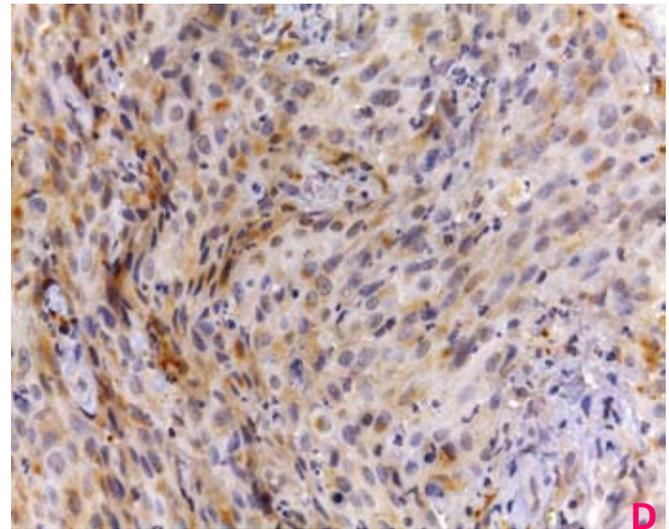
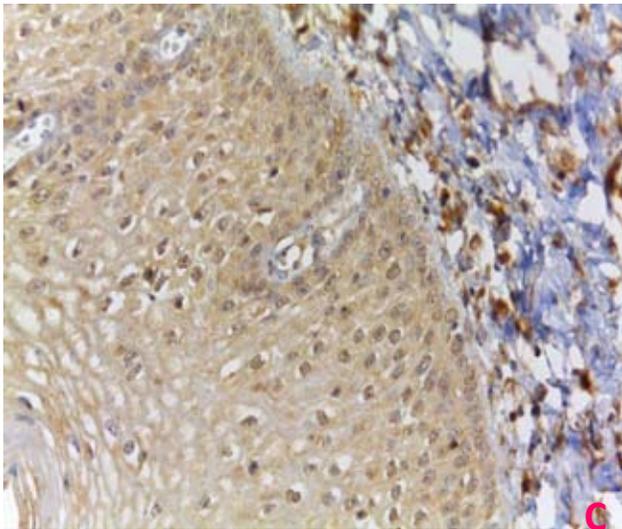
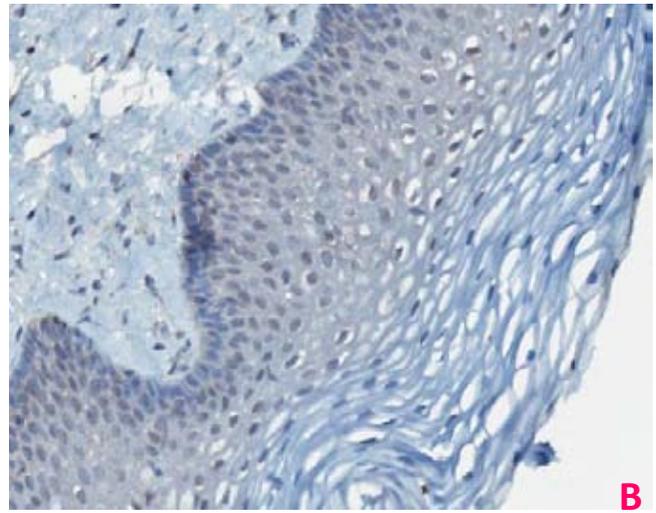
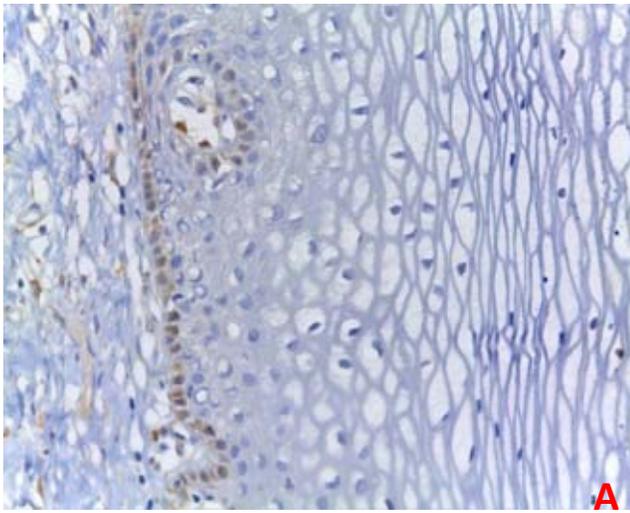
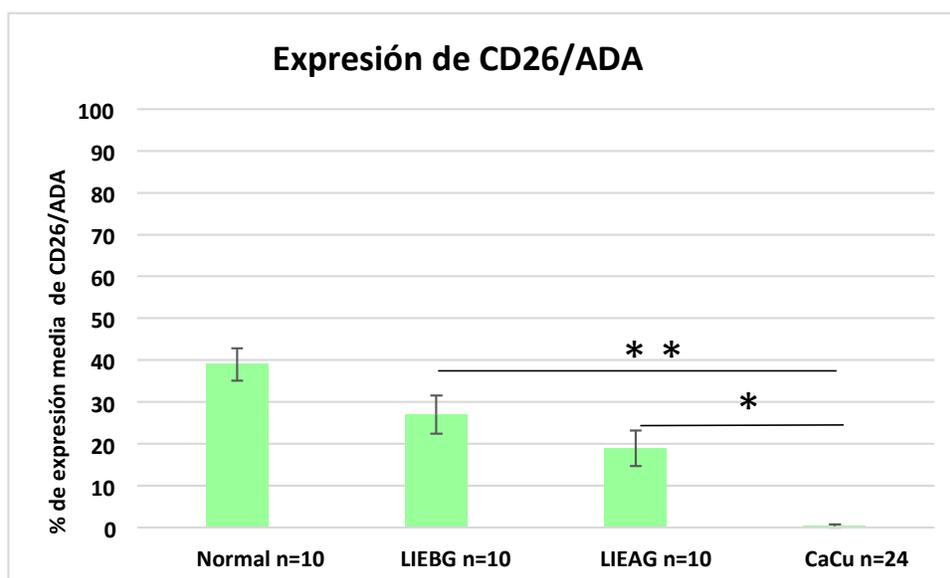


Figura 21. Expresión del receptor para adenosina A3 en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

Análisis de la expresión de la enzima Adenosina Desaminasa (ADA/CD26) en tejidos cervicales normales y con neoplasias.

En el caso de la proteína Adenosina Desaminasa (ADA/CD26), que se encuentra anclada con CD26, se observó una mayor expresión en la membrana y citoplasma de las células que conforman la membrana basal y el estrato parabasal de los tejidos normales de cuello uterino, en donde se determinó un porcentaje promedio de expresión del 39%. Sin embargo, contrario a lo que ha sucedido con la expresión de los receptores, ADA/CD26, disminuyó de manera importante conforme al grado de evolución de las lesiones hacia CaCu, debido a que en LIEBG y LIEAG se encontraron porcentajes de expresión promedio de 27% y 19 % respectivamente; mientras que en los tejidos de CaCu la expresión fue prácticamente nula (Figura 22 y Gráfica 8).



Gráfica 8. Expresión de la enzima ADA/CD26 en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.

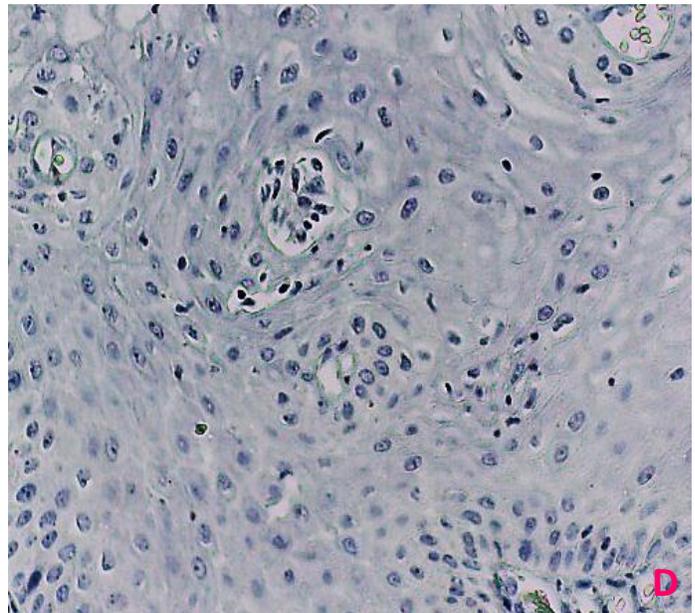
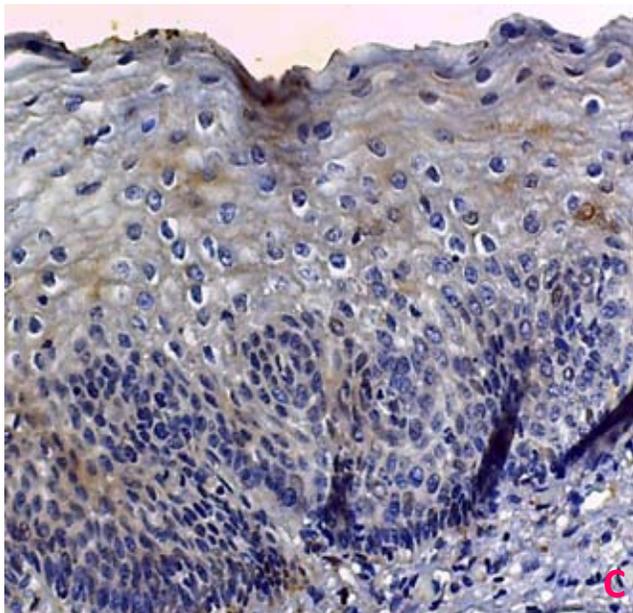
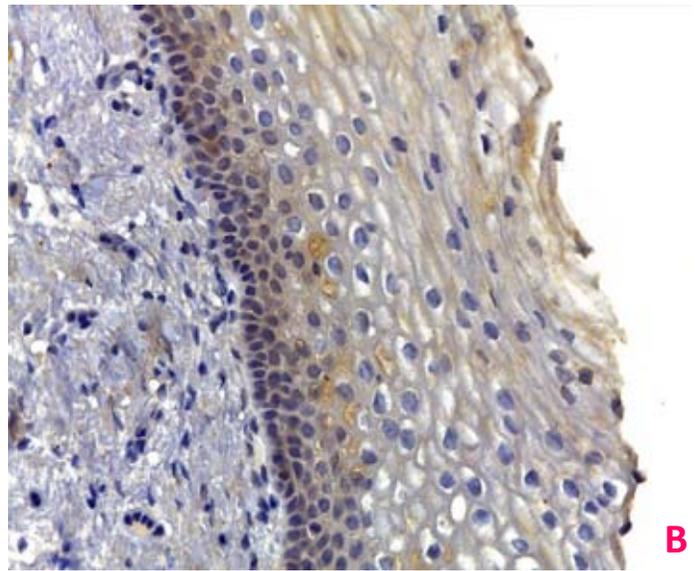
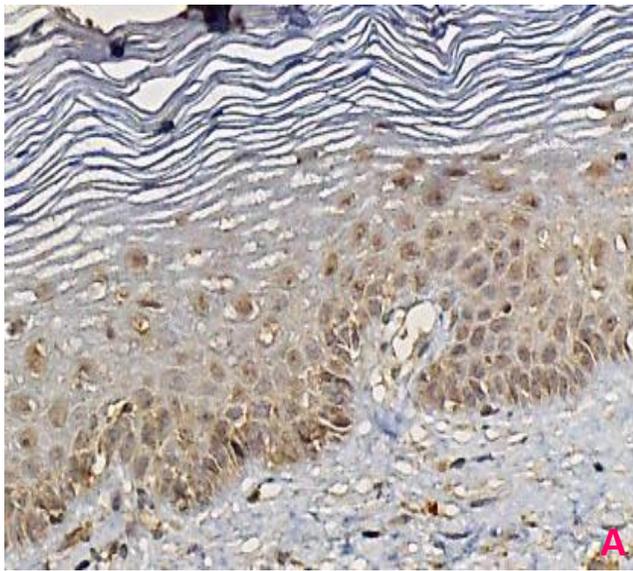
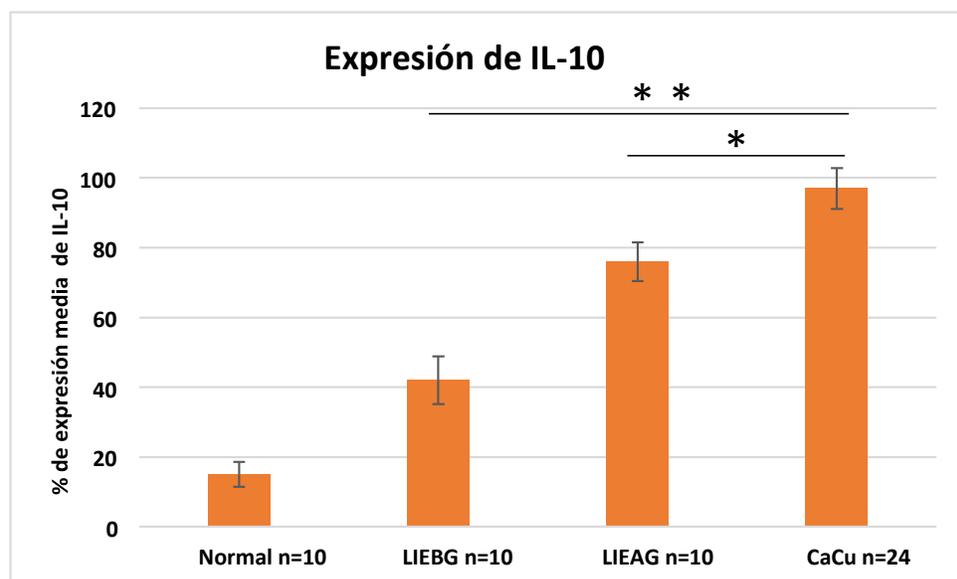


Figura 22. Expresión de la enzima ADA/CD26 en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

Análisis de la presencia de IL-10 en tejidos cervicales normales y con neoplasias.

La citocina IL-10 es una citocina inmunomoduladora que frecuentemente esta sobre expresada en varios tipos de cáncer (Koscsó *et al.*, 2012). La presencia de IL-10 en metástasis avanzadas y la correlación positiva entre los niveles de suero de IL-10 y la progresión de la enfermedad indica un importante papel de esta citocina en el microambiente tumoral (Wang *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 1998).

En el caso de tejidos de cuello uterino normales, la expresión de la citocina IL-10 se observó fuertemente en membrana y citoplasma de las células basales con 15% de expresión; mientras tanto, en el citoplasma de las células de todo el estrato epitelial de LIEBG y LIEAG se encontraron porcentajes de expresión media de 42% y 76%. De manera interesante, todos los tejidos de CaCu analizados mostraron una intensa expresión de IL-10, encontrándose valores de expresión promedio de 97% (Figura 23 y Gráfica 9).



Gráfica 9. Expresión de la citocina IL-10 en los tejidos normales de cuello uterino, LIEBG, LIEAG y CaCu. Diferencia significativa de LIEAG con respecto a tejidos tumorales * $p < 0.05$ y de LIEBG en relación a tejidos tumorales ** $p < 0.001$.

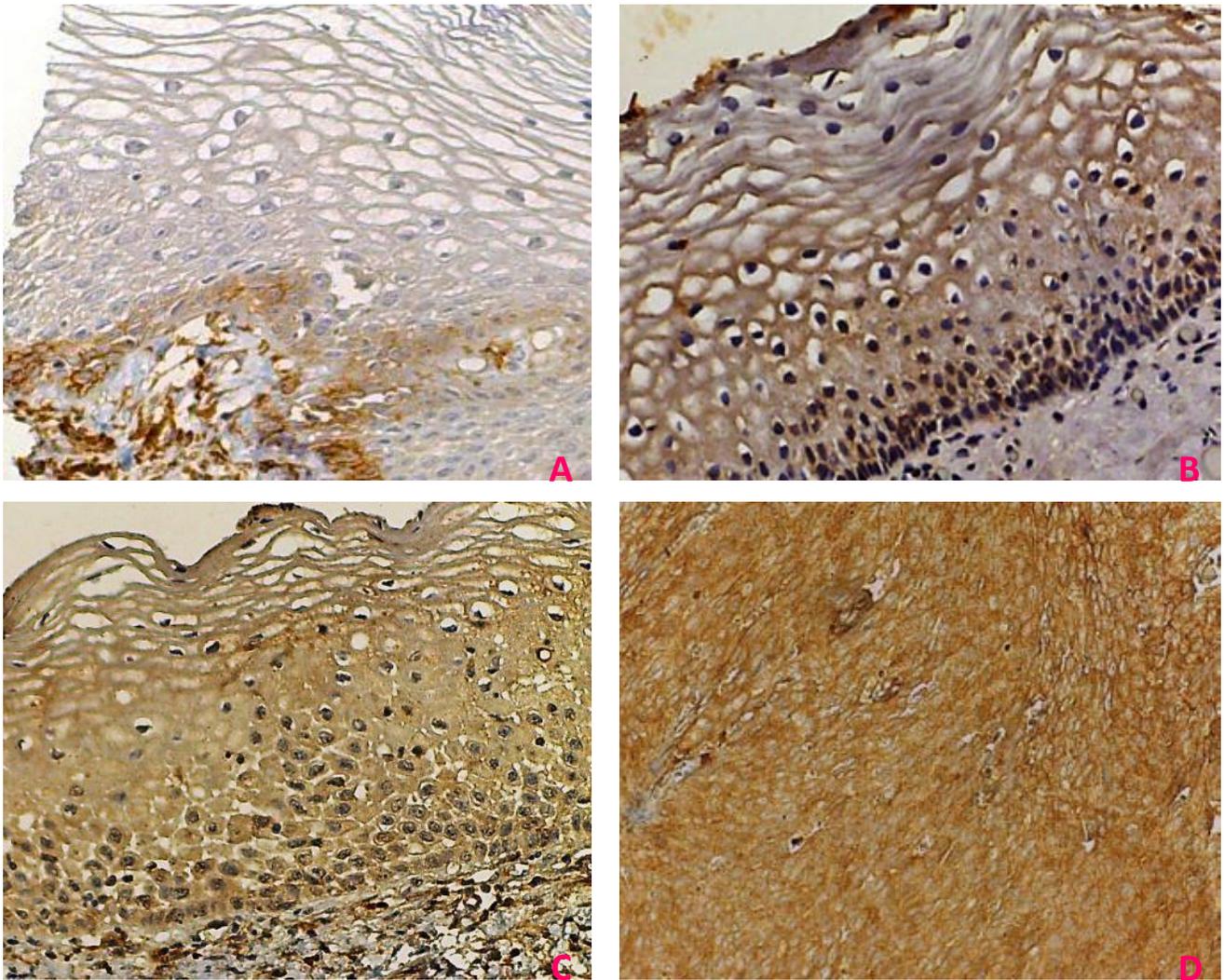


Figura 23. Expresión de la citocina IL-10 en **A)** Tejido de cuello uterino normal; **B)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (LIEBG); **C)** Tejido de Lesión Intraepitelial de Alto Grado (LIEAG); **D)** Tejido de cáncer cervicouterino (CaCu). Todas las fotos fueron tomadas a un aumento de 20X.

DISCUSIÓN

Durante la tumorigénesis las células transformadas interactúan con su microambiente, donde la hipoxia, el daño y el estrés celular inducen la liberación de ATP al espacio extracelular, el cual es fosfohidrolizado a adenosina por las ectonucleotidasas. CD39 que hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP a sus respectivos nucleósidos (Robson *et al.*, 2006), y CD73 que degrada el fosfato de adenosina (AMP) a adenosina (Resta *et al.*, 1998). La adenosina acumulada en el microambiente tumoral ejerce un profundo efecto inmunosupresor, además de promover el crecimiento y metástasis tumoral (Haskó *et al.*, 2008). Las ectoenzimas CD39 y CD73 se encuentran altamente expresados en varios tumores, por ejemplo, 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). Se ha demostrado que la expresión de CD39 favorece la angiogénesis tumoral; mientras que CD73 ha sido asociada fuertemente con un fenotipo prometastásico (Feng y Chen, 2009; Takedachi *et al.*, 2007). 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). Por otro lado, la adenosina generada por estas ectoenzimas activa 4 receptores específicos acoplados a proteínas G, denominados receptores A1, A2A, A2B y A3, que participan de manera importante en la señalización de las células tumorales para promover proliferación, metástasis y angiogénesis (Ghiringhelli *et al.*, 2012). En el caso particular del CaCu, aún no se tienen reportes sobre la expresión de estas ectoenzimas y sus receptores, por lo que el objetivo del presente trabajo fue el de analizar la expresión de CD39, CD73 y sus receptores, así como el de la enzima adenosina desaminasa e IL-10 que participan en la supresión de la respuesta inmune en el microambiente tumoral junto

con las moléculas participantes de la vía adenosinérgica, para lo cual se emplearon muestras de tejidos de 4 etapas que caracterizan la historia natural del CaCu: tejido cervical normal, LIEBG, LIEAG y CaCu.

De acuerdo a nuestros resultados, se pudo detectar que tanto las ectoenzimas CD39 y CD73 como los receptores para adenosina A2A, A2B y A3, incrementaron su expresión en los tejidos derivados de neoplasias cervicales, en relación con el avance de la enfermedad; mientras que la expresión del receptor A1 fue prácticamente nula en los tejidos normales y derivados de neoplasias. De manera interesante, se encontró que la expresión de la enzima ADA acoplada a CD26 disminuyó su expresión en los tejidos neoplásicos en relación inversa con el grado de avance de la enfermedad. En contraste, la expresión de IL-10 incrementó de manera notable en las neoplasias de mayor etapa de evolución.

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 la cual tiene fuertes efectos supresores sobre la actividad de células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y células NK (Deaglio *et al.*, 2007; 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. En el caso particular de las muestras analizadas en el presente estudio, la expresión de ambas ectoenzimas desde las LIEBG hasta las lesiones de CaCu, fue significativamente mayor que la expresada en los tejidos cervicales normales, lo cual permite sugerir que la actividad de estas enzimas es intrínseca al

desarrollo de la enfermedad, y que podría tener un papel importante en la inhibición de la respuesta inmune, así como para generar un microambiente que permita la proliferación de las células neoplásicas y la generación de nuevos vasos sanguíneos, como se ha reportado en varios tipos de cáncer, tales como glioma, glioblastoma, melanoma, cáncer colorrectal y de mama (Leth-Larsen, 2009; Wang *et al.*, 2011; Zhang, 2010; Aliagas *et al.*, 2014; Antonioli *et al.*, 2013). En estudios previos, nuestro grupo de investigación ha determinado la actividad funcional de CD39 y CD73 en líneas celulares de CaCu, su expresión se asoció con la capacidad de generar adenosina cuando las células tumorales fueron cultivadas en presencia de ADP y AMP; asimismo, los sobrenadantes que contenían adenosina inhibieron de manera importante la proliferación, activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos (Ávila-Ibarra, 2014).

Por otra parte, la adenosina es un nucleósido de purina la cual se encuentra dentro del microambiente tumoral a concentraciones capaces de modular el crecimiento tumoral a través de la interacción con los cuatro receptores para adenosina acoplados a proteínas G (Fishman *et al.*, 2009). Se ha reportado que la interacción de adenosina con el receptor A1 induce apoptosis en células cancerosas de colon y en tumores de la microglia; mientras que otros estudios, contrario a este fenómeno, sugieren que este mismo receptor en carcinoma de mama media la progresión del ciclo celular y por lo tanto la proliferación de las células tumorales, debido a que el receptor A1 está implicado principalmente en la proliferación celular tumoral e induce la activación del ciclo celular; de hecho, a través del receptor A1 se puede inhibir a p27, una molécula que promueve la senescencia y limita la proliferación celular (Mirza *et al.*, 2005). En consecuencia la ausencia de este receptor en las neoplasias cervicales, como lo encontrado en el presente estudio, pudiera estar asociado con el incremento de la proliferación de células tumorales de cuello uterino.

Por otra parte, en nuestro estudio encontramos que la expresión de los receptores A2A, A2B y A3 incrementó de manera importante en relación con el grado de avance de la enfermedad, lo cual puede estar asociado con propiedades

intrínsecas del microambiente tumoral. Por ejemplo, en algunos estudios se ha reportado que células de leucemia linfocítica crónica humana (CLL) (Serra *et al.*, 2011) mieloma (Rickles *et al.*, 2012), células de melanoma (Merighi *et al.*, 2002), tumores neuroendócrinos, de colón y de mama (Kalhan *et al.*, 2012) expresan receptores A2A funcionales, y que estos receptores, al interactuar con adenosina, podrían modular la proliferación celular a través de varias vías de señalización. Asimismo, la interacción de adenosina con el receptor A2B se asocia con un incremento en la proliferación celular y con la producción de VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), lo que promueve la angiogénesis, la invasión y la migración celular (Kalhan *et al.*, 2012; Allard *et al.*, 2013). Adicionalmente, la sobreexpresión del receptor A3 en células cancerosas promueve la angiogénesis de manera dependiente de adenosina debido a un incremento en el factor inducible de hipoxia 1alfa (Kocsó *et al.*, 2011) y a la producción de VEGF y angiopoyetina (Feoktistov *et al.*, 2003), tal como se ha descrito en melanoma humano, glioblastoma, y las células de cáncer de colon (Merighi *et al.*, 2005; Merighi *et al.*, 2006; Merighi *et al.*, 2007).

La enzima Adenosina Desaminasa (ADA), es una enzima implicada en la regulación de adenosina extracelular, de tal manera que al desaminarla la convierte en inosina, la cual sigue otra vía metabólica intracelular para la síntesis de nucleótidos (Van Linden y Eltzschig, 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 la superficie celular ADA está asociada con CD26, la cual esta última funciona como una proteína de anclaje para ADA en las células humanas (Mandathil *et al.*, 2012). De manera interesante, al determinar la expresión de ADA/CD26 en los diferentes grupos de tejidos cervicales, observamos un patrón contrario al que se presentó con las ectonucleotidasas y los

receptores para adenosina A2A, A2B y A3, debido a que su expresión disminuyó de 39% en LIEBG hasta 0.4% en tejidos tumorales, lo cual podría sugerir que la disminución de ADA/CD26 en los tumores de CaCu contribuya a mantener altos niveles de adenosina en el microambiente tumoral, para suprimir la respuesta inmune y/o promover mecanismos de proliferación, angiogénesis y migración de las células tumorales en los estados avanzados de la enfermedad.

Recientemente, se ha demostrado que la activación del receptor A2B a través de su interacción con adenosina en células de la microglia, induce el incremento de la producción de interleucina-10 (IL-10), mientras que suprime la producción de citocinas proinflamatorias (Koscsó *et al.*, 2012). Durante el desarrollo del CaCu se ha reportado que existe un incremento en la expresión de IL-10 en los tejidos tumorales en relación al grado de evolución de los tumores (Clerici *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2011), y que esta citocina promueve el crecimiento tumoral e inhibe la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad en las células tumorales (Koscsó *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2006; Terrazzano *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 1997). Acorde con estos reportes, en nuestro estudio también encontramos que la expresión de esta citocina en los tejidos cervicales incrementó con el grado de avance de la enfermedad, encontrándose una expresión de 15% en tejidos de LIEBG y cercana al 100%. En estudios previos hemos encontrado que la adición de AMP y adenosina a células tumorales de CaCu inducen la producción de IL-10, la cual es bloqueada cuando antagonistas de receptores de adenosina son adicionados al medio de cultivo (Ávila-Ibarra, 2011; Ávila-Ibarra, 2014), por lo cual es posible sugerir que la producción de IL-10 en tejidos de neoplasias intraepiteliales cervicales y CaCu encontrada en el presente estudio, esté inducida, al menos en parte, por la adenosina producida en el microambiente tumoral en la que participan las ectoenzimas CD39, CD73 y receptores de adenosina. No obstante, aunque es indispensable incrementar el número de muestras para reforzar lo encontrado en este estudio, las pruebas funcionales de la vía adenosinérgica en las células que se encuentran en el microambiente tumoral del CaCu podrán revelar de manera importante la

participación de esta vía en la supresión de la respuesta inmune y en la progresión tumoral del CaCu.

CONCLUSIONES

- En el análisis de la expresión, los marcadores de la vía adenosinérgica correspondientes a las ectoenzimas CD39 y CD73, y los receptores para adenosina A2A, A2B y A3, mostraron un incremento significativo en tejidos provenientes de neoplasias cervicales en relación directa con el grado de avance de la enfermedad: cérvix normal<LIEBG<LIEAG<CaCu.
- La enzima adenosina desaminasa (ADA/CD26) disminuyó su expresión en los tejidos cervicales de manera inversa al grado de evolución de la enfermedad: cérvix normal>LIEBG>LIEAG>CaCu.
- La IL-10 se expresó en los cuatro grupos de tejidos cervicales, no obstante su expresión fue significativamente mayor en las neoplasias cervicales, en relación directa con el grado de avance de la enfermedad: cérvix normal<LIEBG<LIEAG<CaCu.
- La expresión diferencial de moléculas de la vía adenósinérgica (CD39, CD73, A2A, A2B, A3 y ADA) en tejidos provenientes de diferentes etapas de evolución del CaCu, puede contribuir a la inmunosupresión y al desarrollo del CaCu.

LITERATURA CITADA

1. Alberts B., Jhonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2004). *Biología Molecular de la Célula*. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona.
2. Aliagas E., Vidal A., Texidó L., Ponce J., Condom E. y Satué M. M. (2014). *High expression of ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 in human endometrial tumors*. Mediators of inflammation; 1-9.
3. Alvarado D., Mantilla D. L. y González M. (2009). *Lesión intraepitelial de bajo grado endocérvix: conducta*. Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela; 69 (1): 41-47.
4. Antonioli L., Pacher P., Vizi E. S. y Haskó György. (2013). *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends in Molecular Medicine; 19 (6): 355-367.
5. Ávila-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, Fes Zaragoza, UNAM.
6. Ávila-Ibarra L. (2014). *Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) como mecanismo inmunosupresor de células tumorales de cáncer de cuello uterino*. Tesis de Maestría, Fes Zaragoza, UNAM.
7. Bavaresco L., Bernardi A., Braganhol E., Cappellari A. R., Rockenbach L., Farias P. F., Wink M. R., Cañedo D. A. y Battastini A. M. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 319: 61-68.
8. Burchell A. N., Winer R. L., De Sanjosé S. y Franco E. (2006). *Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. Vaccine; 3: 52-61.
9. Burd E. M. (2003). *Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. *Clinical Microbiology Reviews*; 16 (1): 1-17.

10. Cho S., Polster J., Engles J., Hilton J., Abraham E. y Wahl R. (2006). *In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism*. The Journal of Nuclear Medicine; 47: 837-845.
11. Chow L. T., Broker T. R. y Steinberg B. M. (2010). *The natural history of human papillomavirus infections of mucosal epithelial*. APMIS; 118: 422-449.
12. Clerici M., Merola M., Ferrario E., Trabattoni D., Villa M. L., Stefanon B., Venzon D. J., Shearer G. M., De Palo G. y Clerici E. (1997). *Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection*. Journal of National Cancer Institute; 89: 245-250.
13. Deaglio S., Dwyer K. M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J. F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V. K., Strom T. B. y Robson S. C. (2007). *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediate immune suppression*. The Journal of Experimental Medicine; 204: 1257-1265.
14. De Villers E. M., Fauquet C. y Broker T. R. (2004). *Classification of papillomaviruses*. Virology; 324: 17-27.
15. Doorbar J. (2006). *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clinical Science; 110: 525-541.
16. Doorbar J. (2007). *Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection*. Disease Markers; 23: 297-313.
17. Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., y Schreiber R. D. (2002). *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunology; 3: 991-8.
18. Feng B. y Chen L. (2009). *Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells*. Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals; 24: 717-721.
19. Feoktistov I., Ryzhov S., Goldstein A. E. y Biaggioni I. (2003). *Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors*. Circulation Research; 92 (5): 485-492.

20. Fernández L., Álvarez R., Arango M., Alcocer J. M., Cruz J., Escobar X., Orozco M., Franco S., Camacho R., Guerra M. E., Madrid V., Tamez R. y Rodríguez C. (2006). *Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cáncer patients*. The Breast; 15 (4): 482-489.
21. Frattini M. G., Lim H. B. y Laimins L. A. (1996). *In vitro synthesis of oncogenic HPVs requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America; 93: 3062–7.
22. Fukuda K., Sakakura C., Miyagawa K., Kuriu Y., Kin S., Nakase Y., Hagiwara A., Mitsufuji S., Okazaki Y., Hayashizaki Y. y Yamagishi. (2004). *Differential gene expression profiles of radio resistant esophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation*. British Journal of Cancer; 91:1543-1550.
23. Gariglio P. y Rangel L. (1992). *Virus and cancer*. Review Spanish. Salud Pública México; 34(3):308-317.
24. Gerlini G., Tun-Kyi A., Dudli C., Burg G., Pimpinelli N. y Nestle F. (2004). *Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions*. American Journal of Pathology; 165:1853–63.
25. Gessi S., Varani K., Merighi S., Fogli E., Sacchetto V., Benini A., Leung E., Mac-Lennan S. y Borea P. A. (2007). *Adenosine and lymphocyte regulation*. Purinergic Signalling; 3:109-116.
26. GLOBOCAN, IARC, *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, [Consulta: jueves, 27 de febrero de 2014].
27. Guzmán L., Alcocer J. y Madrid V. (1998). *Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cancer*. Review Spanish. Salud Pública México; 40(1):38-46.
28. Haskó G., Linden J., Cronstein B. y Pacher P. (2008). *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. Drug Discovery; 7: 759-770.

29. Hastie C., Saxton M., Akpan A., Cramer R., Masters R. J. y Naaby S. H. (2005). *Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells*. *Oncogene*; 24: 5905-5913.
30. Hernández M. M. y Ríos H. M. A. (1999). *Oncogenes y Cáncer*. *Revista Cubana de Oncología*; 15 (2): 131-139.
31. Hilders C., Ras L., Van Eendenburg J., Nooyen Y. y Fleuren G. (1994). *Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma*. *International Journal of Cancer*; 15:57(6):805-813.
32. Hildesheim A., Schiffman M. H., Gravitt P. E. (1994). *Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women*. *Journal of Infectious Diseases*; 169 (2): 235 – 40.
33. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, 1998: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine*; 338 (7): 423–8.
34. INEGI, *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*, 2014, <http://www.inegi.org.mx/>, [Consulta: lunes, 3 de marzo de 2014].
35. Jacobs N., Giannini S. L., Doyen J., Baptista A., Moutschen M., Boniver J. y Delvenne P. (1998). *Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix*. *Clinical and Experimental Immunology*; 111: 219-224.
36. Jacobson K. A., Balasubramanian R., Deflorian F. y Gao Z. (2012). *G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions*. *Purinergic Signalling*; 8:419-436.
37. Jin D., Fan J., Wang L., Thompson L. F., Liu A., Daniel B. J., Shin T., Curiel T. J. y Zhang B. (2010). *CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression*. *Cancer Research*; 70 (6): 2245-2255.
38. Kalhan A., Gharibi B., Vázquez M., Jasani B., Neal J., Kidd M., Modlin I. M., Pfragner R., Rees D. A. y Ham J. (2012). *Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptor*

expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy. Purinergic Signalling; 8:265-274.

39. Karp G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill. México.
40. Khong H. y Restifo N. (2002). *Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes.* Nature Immunology; 3: 999-105.
41. Kim R., Emi M. y Tanabe K. (2005). *Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses.* Cancer Biology and Therapy; 4: 924-933.
42. Kim R., Emi M. y Tanabe K. (2007). *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape.* Immunology; 121: 1-14.
43. Knipe D., Lamb R., Howley P., Griffin D. y Martin M. (2006). *Papillomaviruses, Section II: Specific virus families.* Virology; 3091.
44. Kobie J., Shah P., Yang L., Rebhahn J., Fowell D. y 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.* Journal of Immunology; 177: 6780-6786.
45. Kondo T., Nakasawa T., Murata S. y Katoh R. (2006). *Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas.* Histopathology; 48: 612-614.
46. Koscsó B., Csóka B., Pacher P. y G. Haskó. (2011). *Investigational A3 adenosine receptor targeting agents.* Expert Opinion on Investigational Drugs; 20 (6): 757-768.
47. Koscsó B., Csóka B., Selmeczy Z., Himer L., Pacher P., Virág L. y Haskó G. (2012). *Adenosine Augments IL-10 Production by Microglial Cells through an A_{2B} Adenosine Receptor-Mediated Process.* Journal of Immunology; 188: 445-453.
48. Li M., Wan Y., Sanjabi S., Robertson A. y Flavell R. (2006). *Transforming growth factor- β regulation of immune responses.* Annual Review of Immunology; 24:99-146.
49. Liu W. H., Liu J. J., Wu J., Zhang L. L., Liu F., Yin L., Zhang M. M. y Yu B. (2013). *Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by*

Mesenchymal Stem Cells vía Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway. PLoS One; 8 (1): e55487.

50. Liu X., Qu X., Chen Y., Liao L., Cheng K., Shao C., Zenke M., Keating A., Zhao R. C. (2012). *Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation*. Journal of Immunology; 189:1182-1192.
51. Lockhart D. C., Chan A. K., Mak S. et al. (2001). *Loss of T-cell receptor-CD3zeta and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma*. Surgery; 129: 749-756.
52. López A. y Lizano M. (2006). *Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina*. Instituto Nacional de Cancerología; 1: 31-55.
53. López R., Martínez L. A. y Sánchez M. (2008). *Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma*. Infectious Agents and Cancer; 3 (3): 1-13.
54. Lupiani C. L. y Fraga H. M. (2008). *Vacunas del papiloma humano: Se amplía el calendario vacunal*. Sociedad Canaria de Pediatría; 22: 1-32.
55. Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A. H. y Jonuleit H. (2002). *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. Immunology and Cell Biology; 80: 477-483.
56. Malmberg K. J. (2004). *Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape?*. Cancer Immunology Immunotherapy; 53: 879-892.
57. Mandapathil M., Szczepanski M. J., Harasymczuk M., Ren J., Cheng D., Jackson E. K., Gorelik E., Johnson J. T., Lang S. y Whiteside T. L. (2012). *CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4⁺T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. OncoImmunology; 1 (5): 659-669.
58. Melo A., Montenegro S., Hooper T., Capurro I., Roa J. C. y Roa I. (2003). *Tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas*

- y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile. Revista Médica de Chile; 131: 1382-1390.*
59. Merighi S., Mirandola P., Milani D., Varani K., Gessi S., Klotz K., Leung E., Baraldi P. G. y Borea P. A. (2002). *Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells.* Journal of Investigative Dermatology; 119 (4): 923-933.
 60. Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S., Baraldi P. G. y Borea P. A. (2005). *A₃ Adenosine Receptors Modulate Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Human A375 Melanoma Cells.* Neoplasia; 7 (10): 894-903.
 61. Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S. y Borea P. A. (2006). *Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells.* Biochemical Pharmacology; 72 (1): 19-31.
 62. Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S., Baraldi P. G. y Borea P. A. (2007). *Hypoxia inhibits paclitaxel-induced apoptosis through adenosine-mediated phosphorylation of bad in glioblastoma cells.* Molecular Pharmacology; 72 (1): 162-172.
 63. Mikhailov A., Sokolovskaya A., Gennady G., Amdahl Y., Anne H., West A., Yagita H., Lahesmaa R., Linda F., Thompson N., Jalkanen S., Blokhin D. y Eriksso J. E. (2008). *CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis.* Immunology; 181: 464-475.
 64. Mirza A., Basso A., Black S., Malkowski M., Kwee L., Pachter J. A., Lachowicz E., Wang Y. y Lui S. (2005). *RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis.* Cancer Biology and Therapy; 4 (12): 1355-1360.
 65. Montalvo G., Coronel J. A., Alvarado A., Cantú D., Flores D., Ortega A., González A., Isla D., Muñoz D. E., Robles J. U., Solorza G., Mota A., Gallardo D., Morales F., Cetina M. L. y Herrera A. (2011). *Oncoguía: Cáncer Cervicouterino.* Cancerología; 6: 61-69.

66. Mori S., Jewett A., Murakami-Mori K., Cavalcanti M., Bonavida B. (1997). *The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent*. Cancer Immunology Immunotherapy; 44: 282-290.
67. Muñoz N. (2000). *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence*. Journal of Clinical Virology; 19:1-5.
68. Muñoz N. y Bosch F. X. (1997). Cervical cáncer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. Salud Pública de México; 39 (4): 274-282.
69. Ochsenbein A. F., Klenerman P., Karrer U., Ludewing B., Pericin M., Hengartner H. y Zinkernagel R. M. (1999). *Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance*. Proceedings of the National Academy of Science USA; 6: 2233-2238.
70. Ohta A., Gorelik E. y Prasad S. (2006). *A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America; 103: 13132-13137.
71. Organización Mundial de la Salud, *Cáncer*, 2014, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>, [Consulta: martes, 25 de marzo de 2014].
72. Picconi M. A. (2013). *Detección de virus de papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino*. Medicina (Buenos Aires); 73 (6): 585-596.
73. Piersma S. J. (2011). *Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients*. Cancer Microenvironment; 4: 361-375.
74. Rangel G., Garay T. y Arellano R. (2007). *El ATP como transmisor químico extracelular*. Revista Mexicana de Neurociencia; 8 (3): 276-285.
75. Resta R., Yamashita Y. y Thompson L. F. (1998). *Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocytes CD73*. Immunology; 161: 95-109.
76. Richart R. (1990). *A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia*. Obstetrics and Gynecology; 75 (1): 131-133.
77. Rickles R. J., Tam W. F., Giordano T. P., Pierce L. T., Farwell M., McMillin D. W., Necheva A., Crowe D., Chen M., Avery W., Kansra V., Nawrocki S. T.,

- Carew J. S., Giles F. J., Mitsiades C. S., Borisy A. A., Anderson K. C. y Lee Margaret S. (2012). *Adenosine A2A and Beta-2 adrenergic receptor agonists: novel selective and synergistic multiple myeloma targets discovered through systematic combination screening*. *Molecular Cancer Therapeutics*; 11 (7): 1432-1442.
78. Rivoltini L., Carrabba M., Huber V., Castelli C. y Novellino L. (2002). *Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction*. *Immunology Review*; 188: 97-113.
79. Robson S. C., Sévigny J y Zimmermann H. (2006). *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. *Purinergic Signaling*; 2:409-430.
80. Sadej R., Sychala J. y Skladanowski A. (2006). *Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells*. *Nucleotides Nucleic Acids*; 25: 1119-1123.
81. Saldanha F., Ferreira F., Palma P., Araujo A., Queiroz R., Covas D., Zago M. y Panepucci R. (2011). *Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes*. *Stem Cell Research*; 7 (1): 66-74.
82. Santin D. A., Bellone S., Roman J. J., Burnett A., Cannon J. M., y Pecorelli S. (2005). *Therapeutic vaccines for cervical cancer: Dendritic cell-based immunotherapy*. *Pharmaceutical Design*; 11: 3485-3500.
83. Serra S., Horenstein A. L., Vaisitti T., Brusa D., Rossi D., Laurenti L., D'Arena G., Coscia M., Tripodo C. Inghirami G., Robson S. C., Gaidano G., Malavasi F. y Deaglio S. (2011). *CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death*. *Blood*; 118 (23): 6141-6152.
84. Sevigny C., Li L., Awad A., Huang L., McDuffie M., Linden J., et al. (2007). *Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition*. *Journal of Immunology*; 178:4240-4249.
85. Sitkovsky M. y Ohta A. (2005). *The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?* *Trends in Immunology*; 26: 299-304.

86. Sitkovsky M., Kjaergaard J., Lukashev D. y Ohta A. (2008). *Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: Tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia*. *Clinical Cancer*; 14: 5947-5952.
87. Spiotto M. T., Yu P., Rowley D. A., Nishimura M. I., Meredith S. C., Gajewski T. F., Fu Y., X. y Schreiber H. (2002). *Increasing tumor antigen expression overcomes 'ignorance' to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells*. *Immunity*; 7: 737-747.
88. Spychala J. (2000). *Tumor-promoting functions of adenosine*. *Pharmacology and Therapeutics*; 87: 161-173.
89. Spychala J., Lazarowski E., Ostapkowicz A., Ayscue L., Jin A. y Mitchell B. (2004). *Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer*. *Clinical Cancer Research*; 10: 708-717.
90. Stagg J., Divisekera U., McLaughlin N., Sharkey J., Pommey S., Denoyer D., Dwyer K. y Smyth M. (2010). *Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 107 (4): 1547-1552.
91. Stagg J., Divisekera U., Duret H., et al. (2011). *CD73-Deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis*. *Research Cancer*; 71:2892-2900.
92. Stanley M. A. (2012). *Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus*. *Clinical Microbiology Reviews*; 25 (2): 215-222.
93. Stella J., Bavaresco L., Braganhol E., Rockenbach L., Fernandes P. Wink M., Azambuja A., Barrios C., Bueno F. y Oliveira A. (2009). *Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines*. *Urologic Oncology*; 1016: 021-035.
94. Takedachi M., Colgan S. P. y Thompson L. P. (2007). *The role of CD73 in generation of extracellular adenosine for adenosine signaling in adenosine receptors-therapeutic aspects for inflammatory and immune disease*. CRC Press: 39-48.

95. Teraben M., Matsui S., Noben-Trauth N., Chen H. y Watson C. (2000). *NK T cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway*. Nature Immunology; 1: 515–20.
96. Terrazzano G. et al. (2000). *HLA class I antigen downregulation by interleukin (IL)-10 is predominantly governed by NF-kB in the short term and by TAP1-2 in the long term*. Tissue Antigens; 55: 326–332.
97. Thompson L., Eltzschig H., Ibla J., Van De Wiele C., Resta R., Morote-Garcia J. y Colgan S. (2004). *Crucial Role for Ecto-5-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia*. Journal of Experimental Medicine; 200 (11): 1395–1405.
98. Tindle R. (2002). *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. Nature Reviews; 2: 1-7.
99. Van Linden A. y Eltzschig H. K. (2007). *Role of pulmonary adenosine during hypoxia: Extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26*. Expert Opinion on Biological Therapy; 7: 1437-1447.
100. Vannoni D., Bernini A., Carlucci F., Civitelli S., Di Pietro M. C. y Leoncini R. (2004). *Enzyme activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues*. Medical Oncology; 21(2):187-95.
101. Walboomers J., Jacobs M., Manos M., Bosch F., Kummer J., Shah K., Snijders P., Peto J., Meijer C., y Muñoz N. (1999). *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. Journal of Pathology; 189: 12-19.
102. Wang L., Zhou X. y Zhou T. (2008). *Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology; 134: 365–372.
103. Wang L., Fan J., Thompson L., Zhang Y., Shin T., Curiel T. y Zhang B. (2011). *CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice*. Journal of Clinical Investigation; 121 (6): 2371–2382.

104. Wilson V. G., West M. y Woytek K. (2002). *Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features*. *Virus Genes*; 24: 275-90.
105. Wolf H. F., Pagès F., Sautès-Fridman C. y Galon J. (2012). *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. *Nature Reviews Cancer*; 12: 298-306.
106. Yue F. Y., Dummer R., Geertsen R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S. y Burg G. (1997). *Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA Class-II and I ICAM-1 molecules*. *International Journal of Cancer*; 71, 630–637.
107. Zhang B. (2010). *CD73: A novel target for cancer immunotherapy*. *Cancer Research*; 70 (16): 6407–6411.
108. Zitvogel L., Tesniere A y Kroemer G. (2006). *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. *Nature Reviews Tumor Immunology*; 6: 715-727.
109. Zou W. (2005). *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. *Nature Reviews Cancer*; 5: 263-274.
110. Zur Hausen H. (2000). *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis*. *Journal of the National Cancer Institute*; 92: 690-698.
111. Zur Hausen H. (2002). *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. *Nature Reviews*; 2: 342-350.