



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
ONCOLÓGICAS, HOSPITAL DE ONCOLOGÍA,
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y CÁNCER

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS
MARCADORES CD39/CD73/A2A-R/A2B-R/IL-10 EN
CITOLOGÍAS EXFOLIATIVAS DE NEOPLASIAS
INTRAEPITELIALES CERVICALES DE GRADO 1
(NIC-1).**

T E S I S

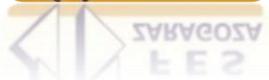
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

DIANA SOFÍA LÓPEZ CISNEROS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA
ASESORA INTERNA: Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
México D.F., 2015.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **LÓPEZ CISNEROS DIANA SOFÍA**, con número de cuenta **306057348**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **7 de abril de 2015** a las **16:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. BENNY WEISS STEIDER
- VOCAL** Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA*
- SECRETARIO** Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
- SUPLENTE** M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ
- SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

El título de la tesis que presenta es: **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES (CD39/CD73/A2A-R/A2B-R/IL-10) EN CITOLOGÍAS EXFOLIATIVAS DE NEOPLASIAS INTRAEPITELIALES CERVICALES DE GRADO 1 (NIC-1).**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 13 de febrero de 2015.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

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/G11/957; y FIS/IMSS/PROT/G12/1161.

AGRADECIMIENTOS

** A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme el privilegio de pertenecer a esta gran casa de estudios.

**A la Dra. María de Lourdes Mora García y al Dr. Alberto Monroy García, por abrirme las puertas de sus laboratorios y permitirme ser parte de un gran grupo de trabajo.

**A todas y cada una de las mujeres que apoyaron donando las muestras exfoliativas de cuello uterino que se utilizaron en éste proyecto.

** Al Dr. Héctor Sánchez Peña, del área de ginecología en el Hospital General Zona Troncoso y a la Dra. Florentina López Toledo, del área de ginecología de la Clínica Médica Ángel del Mar de Puerto Escondido, Oaxaca, por obtener y proporcionarnos las muestras usadas en este proyecto.

**A la Dra. Patricia Piña, por el apoyo experimental para la realización de éste trabajo.

** Al Dr. Benny Weiss Steider, a la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez y al Dr. Hugo López Muñoz, por su atinada revisión y observaciones dadas para la mejora de éste trabajo.

**A los miembros del Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI, IMSS, por su amistad y su gran apoyo, tanto académico como moral, para la realización y mejora de éste gran proyecto.

**A los miembros del Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza, en especial al Dr. Jorge Hernández Montes, por su gran aporte para la realización y mejora de este trabajo.

**A todos mis amigos que estuvieron presentes durante toda mi carrera, por todos los buenos momentos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este trabajo implicó mucha dedicación, apoyo, fortaleza y carácter, yo no hubiera podido sola, por eso quiero agradecer de manera individual a los que fueron parte de este gran camino:

**A mis padres, por apoyarme cuando más los necesitaba y por qué siempre han dado hasta lo imposible por nosotros. A mi papi, por ser un gran padre y el mejor ejemplo a seguir, por enseñarme el valor de las cosas, por todo tu amor y por el gran apoyo que siempre me has dado. A mi mami, por su infinito amor y por su apoyo incondicional, por ser mi mejor amiga y consejera, y por darme un gran carácter para luchar por lo que quiero. Gracias a su esfuerzo y sacrificio, he llegado hasta aquí. Los amo con todo mí ser.

**A mi hermano, por ser cómplice de todas mis locuras, por protegerme y por siempre poner una sonrisa en mi rostro.

**A Ferchis y Regis. Gracias por enseñarme una nueva manera de amar a alguien y por ser mis angelitos. Ustedes son la mayor inspiración para culminar este trabajo. Las amo con todo mi corazón.

**A Luis Antonio, tú has sido mi mayor soporte, gracias por siempre confiar en mí y ayudarme a ser una mejor persona, gracias por estar siempre ahí para mí, gracias por secar cada lágrima, calmar cada incertidumbre y aplaudir cada logro que éste trabajo ha dejado consigo. Gracias más que nada, por llenar de amor mi vida, éste logro también es tuyo. Te amo.

**Gracias a la familia Marín Aquino, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, y por el apoyo ofrecido para culminar mí trabajo.

**Lo mejor que me pudo haber dejado este trabajo fue la gran amistad de maravillosas personas como ustedes, Azucena y Juan, gracias por todo su apoyo y enseñanzas.

**A Chayito, gracias por tu amistad, tu apoyo y tu gran ayuda, pero más que nada gracias por confiar en mí, eres una gran persona nunca lo olvides.

**No podrías faltar tu Bere, gracias por tu amistad y por ayudarme tanto en mí trabajo, por enseñarme las técnicas y resolverme tantas dudas.

“Las grandes cosas no se logran por impulso, sino por la suma de pequeños hechos”... Vicent Van Gogh

“Empieza por hacer lo necesario, después lo que es posible y sin darte cuenta, estarás haciendo lo imposible”... Francisco de Assis

“El cáncer abre muchas puertas. Una de las más importantes es tu corazón”... Greg Anderson

ÍNDICE.

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Cáncer.....	4
3.2 Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU).....	5
3.3 CaCU y Virus del Papiloma Humano (VPH).....	5
3.3.1 El VPH.....	5
3.3.2 Ciclo de replicación del VPH.....	7
3.3.3 Clasificación de los VPH.....	9
3.4 Desarrollo de CaCU.....	11
3.4.1 NIC- 1.....	13
3.4.2 NIC- 2 y 3.....	14
3.5 Sistema inmune.....	15
3.5.1 Respuesta inmune contra el VPH.....	18
3.5.2 Mecanismos de evasión inmune.....	19
3.6 Vía adenosinérgica.....	21
3.6.1 Receptores de adenosina.....	24
3.6.2 Receptores de adenosina y cáncer.....	25
3.6.3 Interleucina 10.....	27
4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
5. HIPÓTESIS.....	31
6. OBJETIVO GENERAL.....	32
6.1 Objetivos particulares.....	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
7.1 Colecta de muestras.....	33
7.2 Detección de VPH en células cervicales.....	33
7.3 Detección de CD39, CD73, A2A-R, A2B-R e IL-10.....	34
7.3.1 Controles de referencia.....	35
7.4 Análisis densitométrico de la expresión de CD39, CD73, A2A-R, A2B-R e IL-10.....	36
7.5 Análisis estadístico.....	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1 Tipificación de muestras citológicas de pacientes con NIC-1.....	37
8.2 Expresión de CD39 y CD73 en citologías exfoliativas de NIC-1.....	39
8.3 Expresión de receptores para adenosina A2A-R y A2B-R en citologías exfoliativas de NIC-1.....	43
8.4 Expresión de IL-10 en citologías exfoliativas de NIC-1.....	47
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	50
10. CONCLUSIONES.....	55
11. PERSPECTIVAS.....	56
12. BIBLIOGRAFÍA.....	57
13. APÉNDICE.....	69

1. ABREVIATURAS

ADA	Adenosina deaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Del inglés adenosine diphosphate (adenosina difosfato)
AMP	Del inglés adenosine monophosphate (adenosina monofosfato)
ATP	Del inglés adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
A2B-R	Receptor A2B
A2A-R	Receptor A2A
CaCU	Cáncer cérvico-uterino
cAMP	AMP cíclico
CD39	Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1 o ENTPD1; EC 3.6.1.5
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa o EC 3.1.3.5
CPA	Célula presentadora de antígeno
CxN	Cérvix normal
DCs	Del inglés dendritic cells (células dendríticas)
ERK	Del inglés extracelular signal-regulated kinases (quinasas reguladas por señales extracelulares)
GPCRs	Del inglés G protein-coupled receptors (receptores acoplados a proteínas G)
HIF	Del inglés hypoxia-inducible factor (factor inductor de hipoxia)
HLA	Del inglés human leukocyte antigens (antígeno leucocitario humano)
IARC	Del inglés International Agency of Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer)
ICESCC	International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (Colaboración Internacional de Estudios Epidemiológicos de Cáncer Cervical)
IFN	Del inglés interferon (Interferón)
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IOD	Del inglés integrated optical density (densidad óptica integrada)
I-VPH	Infección por virus del papiloma humano
JAK	Del inglés janus kinase (quinasa de Janus)
JNK	Del inglés JUN N-terminal kinase (quinasas JUN n-terminal)
LCR	Del inglés large control región (región larga de control)
LCs	Del inglés Langerhans cells (células de Langerhans)
LTC	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T cooperador

MAPK	Del inglés mitogen-activated protein kinases (proteínas quinasas activadas por mitógenos)
MHC	Del inglés major histocompatibility complex (complejo mayor de histocompatibilidad)
mM	Milimolar
NF-κB	Del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIC	Neoplasia cervical intraepitelial
NK	Del inglés natural killer (células asesinas naturales)
ORF	Del inglés open reading frame (marco de lectura abierta)
PAP	Papanicolaou
PCR	Del inglés polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
pRb	Proteína del retinoblastoma
PV	Papilomavirus
p53	Proteína supresora de tumores
SI	Sistema inmune
STAT	Del inglés signal transducer and activator of transcription (transductor de señal y activador de la transcripción)
TAP	Proteína transportadora asociada al procesamiento de antígeno
TGF-β	Del inglés transforming growth factor beta (factor de crecimiento transformante beta)
TLR	Del inglés Toll-like receptor (receptor tipo Toll)
TNF-α	Del inglés tumor necrosis factor alfa (factor de necrosis tumoral alfa)
Treg	Linfocito T regulador
VEGF	Del inglés vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular)
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo
VPH-BR	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo
VPH	Virus del Papiloma Humano
WHO	Del inglés World Health Organization (Organización Mundial de la salud)

2. RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCU), es el tercer cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo y su desarrollo se asocia etiológicamente con la infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Sin embargo, otros factores como los ambientales y propios del hospedero, contribuyen al proceso carcinogénico además del VPH, en donde las células tumorales desarrollan múltiples mecanismos para evadir al sistema inmune y suprimir la respuesta antitumoral. Recientemente se ha descrito que la acumulación de adenosina extracelular, producida por la fosfohidrólisis de nucleótidos como ATP por acción enzimática de la ectonucleotidasas CD39 y CD73, tiene efectos inmunosupresivos y promotores del crecimiento y migración de las células tumorales, a través de su interacción con sus receptores específicos (A1-R, A2A-R, A2B-R y A3-R). Además, se ha reportado que A2B-R puede inducir la producción de la citocina IL-10, la cual tiene un importante papel en el microambiente tumoral promoviendo tolerancia y supresión del sistema inmune. En el presente trabajo se analizó la expresión de los marcadores CD39, CD73, A2A-R, A2B-R e IL-10, en citologías exfoliativas del cuello uterino de 25 mujeres libre de I-VPH y de 25 mujeres con neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (NIC-1), a través de la técnica de inmunocitoquímica y análisis de expresión mediante la Densidad Óptica Integrada (IOD). De acuerdo con los resultados, la IOD promedio de CD39, CD73 y A2A-R en las muestras de NIC-1 fue de 7605, 6275 y 14270 unidades respectivamente, las cuales fueron significativamente mayores ($p < 0.05$), a las expresadas en las muestras de cérvix normal, obteniéndose en ellas 1070, 1985 y 2160 unidades respectivamente. De manera interesante las muestras de NIC-1 con los valores más altos de IOD para CD39 y CD73, fueron positivas para VPH-16. Por otro lado, la presencia de A2B-R e IL-10 fue muy baja en ambos grupos de muestras. Estos resultados nos permiten sugerir que la expresión incrementada de las ectonucleotidasas CD73 y CD39 y del A2A-R en las etapas tempranas de la enfermedad, como NIC-1, puede constituir una vía para favorecer el crecimiento de las células tumorales y la supresión de la respuesta inmune local a través de la generación de adenosina.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Cáncer

El cáncer es un importante problema de salud en todo el mundo y una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en niños y adultos (GLOBOCAN, 2014). El cáncer no es una única enfermedad, más bien es un grupo heterogéneo de trastornos, resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), caracterizado por la presencia de células que rompen las reglas más básicas del comportamiento celular mediante las cuales se forman y mantienen los organismos pluricelulares con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos (Pierce, 2009; Alberts *et al.*, 2014). Las células normales reciben señales estimuladoras e inhibitoras y su crecimiento y división son regulados por un equilibrio delicado; en una célula cancerosa, una o varias de estas señales está alterada, lo que determina que las células proliferen con una velocidad anormalmente alta, en consecuencia, se multiplican sin control, amontonándose y generando tumores que desplazan y comprimen a las células normales y roban nutrientes a tejidos sanos (Pierce, 2009; Curtis *et al.*, 2007).

Las estadísticas revelan que el cáncer afectará a una de cada tres personas en el mundo. Recientemente se atribuyeron 8,2 millones de defunciones en todo el mundo en el 2012; y más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos. Existen alrededor de 200 diferentes tipos de cáncer, pero en particular seis; cáncer pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y cérvico-uterino, representan más de la mitad de todos los nuevos casos (WHO, 2014). Dentro de los principales tipos de cáncer que afectan a la población femenina de todo el mundo se encuentran el cáncer de mama, colorrectal, cérvico uterino y de pulmón (GLOBOCAN, 2014). En México durante el 2011, se observó que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) son el cáncer de mama (29.6%), le siguen las neoplasias en órganos genitales (16.7%) –del cuello del útero y útero principalmente- y cáncer de órganos digestivos (14.3 %) (INEGI, 2014).

3.2 Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU)

El cáncer cérvico-uterino (CaCU), también conocido como cáncer de cuello uterino o cáncer de cérvix, es el tercer cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo, con alrededor de 527,624 nuevos casos y 265,653 muertes registrados anualmente (GLOBOCAN, 2014). El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo, siendo América Latina la población con la mayor incidencia de este padecimiento (Parkin *et al.*, 1997; Eluf-Neto and Nascimento, 2001). En México, el CaCU es una de las principales causas de mortalidad en mujeres jóvenes (35 a 59 años), registrándose alrededor de 4,769 muertes y 13,960 nuevos casos anualmente (GLOBOCAN, 2014).

Actualmente, es reconocido por la Organización Mundial de la Salud que el desarrollo de CaCU se asocia estrechamente con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) y que la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más propagada (Bosch *et al.*, 2002). El doctor Harald zur Hausen fue el primero en demostrar, por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de CaCU, contienen genomas del VPH y que la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad (Zur Hausen, 1982; Alonso *et al.*, 2005).

3.3 CaCU y Virus del Papiloma Humano (VPH)

3.3.1 El VPH

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles (Carreras *et al.*, 2008). Hasta la fecha, más de 170 tipos de VPH se han secuenciado completamente, de ellos alrededor de 40 infectan epitelios del tracto ano-genital y de éstos la mitad se consideran de alto potencial oncogénico (De Villiers, 2013).

La partícula viral del VPH tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 45-55 nm y contiene en su interior el genoma viral. El VPH es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses (López-Saavedra y Lizano, 2006).

El genoma viral, está constituido por alrededor de 8.000 pares de bases (Fig. 1) y consiste en una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular bicatenario, del que sólo una hebra es codificante y consta de tres regiones: la región temprana (E, del inglés: *Early*), que codifica proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) (Tabla 1), y la región tardía (L, del inglés: *Late*) que codifica las proteínas de la cápside (L1 y L2) (Baldauf *et al.*, 2013).

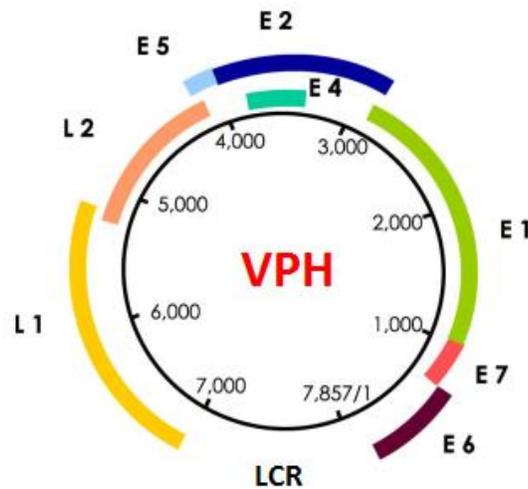


Figura 1. Representación esquemática del genoma de VPH, se muestra la disposición de los genes tempranos E, los genes de la cápside L (L1 y L2) y la región larga de control LCR. Tomado y modificado de Muñoz *et al.*, 2006.

Tabla 1. Funciones de las proteínas del VPH. Tomado de: Stanley *et al.*, 2007; IARC, 2007.

Proteína	Función
E1	Codifica a una helicasa esencial para la replicación del ADN viral.
E2	Principal regulador de la transcripción de genes virales (E6 y E7); se une al promotor transcripcional viral como un dímero; implicada en la replicación del ADN viral; interactúa con E1 para facilitar la replicación.
E4	Interacciona con la queratina del citoesqueleto y los filamentos intermedios para facilitar el ensamblaje del virus y la liberación; induce la detención en G2.
E5	Tiene una actividad transformadora débil; induce la proliferación celular; puede activar factores de crecimiento y otras proteínas cinasas. Inhibe el tráfico de MHC a la superficie celular.
E6	Induce la síntesis de ADN; induce la telomerasa; impide la diferenciación celular; interactúa con cuatro clases de proteínas celulares: co-activadores transcripcionales, proteínas implicadas en la polaridad y motilidad celular, supresores tumorales e inductores de apoptosis, principalmente p53, inhibiendo la muerte celular programada.
E7	Se une a la proteína del retinoblastoma principalmente p105Rb; desregula el punto de control G1/S del ciclo celular; induce proliferación celular descontrolada.
L1	Principal proteína de la cápside viral; ensambla en capsómeros; interactúa con receptores celulares; codifica epítomos neutralizantes.
L2	Proteína minoritaria de la cápside viral; interactúa directamente con el ADN viral; contribuye al empaquetamiento viral y es esencial para la infectividad de los viriones.

Ambos conjuntos de genes están separados por una Región Larga de Control (LCR, del inglés: *Large Control Region*) de aproximadamente 1000 pb, que no codifica para proteínas, pero contiene elementos cis requeridos para la regulación de la expresión génica, la replicación del genoma, y el ensamblaje de partículas virales (Muñoz *et al.*, 2006).

3.3.2 Ciclo de replicación del VPH

Los VPH inducen proliferaciones benignas epiteliales o fibroepiteliales de piel y mucosa en humanos. Estos virus tienen un tropismo específico por las células del epitelio escamoso cervical (Fig. 2) y epitelio del conducto anal. La biología de estos epitelios permite que estas infecciones persistan y provoquen trastornos genéticos en forma acumulada e irreversible; su ciclo de reproducción sólo se produce en éstas células (Doorbar, 2006). Una vez que entra el VPH al organismo, infecta las células basales probablemente a través de heridas o abrasiones de la piel o las mucosas, aunque también se cree que algunos virus infectan en lugares donde el acceso a capas basales se facilita de forma natural,

como por ejemplo, la zona de transformación. El ciclo de vida del VPH es regulado por el estado de diferenciación de la célula huésped, el queratinocito (Evander *et al.*, 1997; Stubenrauch and Laimins, 1999).

Durante el ciclo infeccioso se distinguen dos etapas, una no productiva y otra productiva (Fig. 3). La primera etapa inicia cuando las partículas infectan la capa basal y con la entrada del ADN viral al núcleo de la célula, el genoma del virus se establece como elemento extracromosómico (episoma) y el número de copias virales puede ser entre 50-100 por célula. El ADN viral se distribuye entre las células hijas y al mantenerse en bajo número de copias, impide la activación de la respuesta inmune (Muñoz *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2006). Los patrones de expresión de proteínas durante esta etapa han mostrado que las proteínas E1 y E2 se expresan específicamente, por lo que se postula que son importantes en el mantenimiento del estado episomal del genoma viral (Stanley *et al.*, 2007).

Cuando la célula infectada con VPH se divide, una célula hija migra lejos de la capa basal y comienza un programa de diferenciación. La otra célula hija permanece en la capa basal y proporciona un continuo reservorio de células indiferenciadas que mantienen latente el ADN viral. Las células infectadas se diferencian y el promotor tardío se activa, y desencadena la fase productiva del ciclo de vida viral, que conduce a la amplificación del genoma viral a miles de copias, la expresión de genes tardíos; existe una abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7, y el ensamble de viriones. Las oncoproteínas E6 y E7 alteran la regulación del ciclo celular al interaccionar con ciertos blancos celulares,

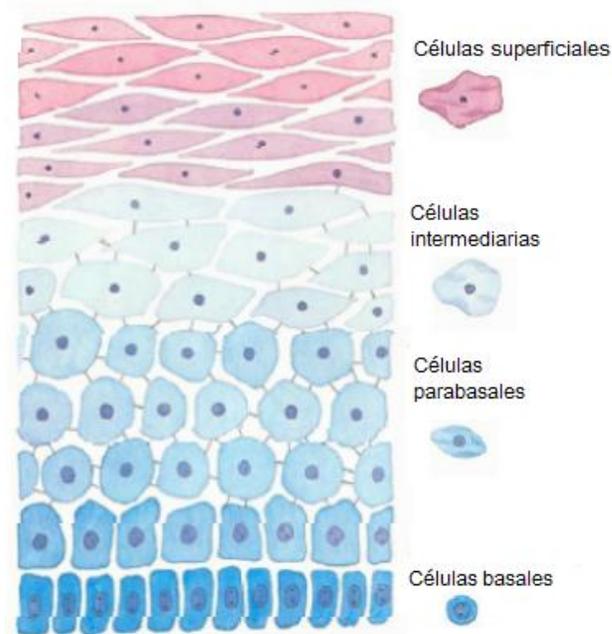


Figura 2. Esquema representativo de la estructura de un epitelio escamoso estratificado normal y la morfología de las células que lo componen. Tomado y modificado de Kumar *et al.*, 2010.

como por ejemplo, la proteína supresora de tumores p53 y la proteína de retinoblastoma pRb, respectivamente. Esta interacción conlleva a la supresión de la progresión del ciclo celular, restringiendo y retrasando la diferenciación terminal, inmortalizando a las células malignas. Paradójicamente, estos eventos ocurren en células que normalmente han salido del ciclo celular y han cesado su proliferación. En gran medida a través de las actividades de las proteínas E6 y E7, el VPH altera la regulación del ciclo celular y mantiene un subconjunto de células infectadas activas, asegurando la expresión de factores celulares necesarios para la replicación del ADN viral (Stanley *et al.*, 2007; Doorbar *et al.*, 2012; Stanley *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2014).

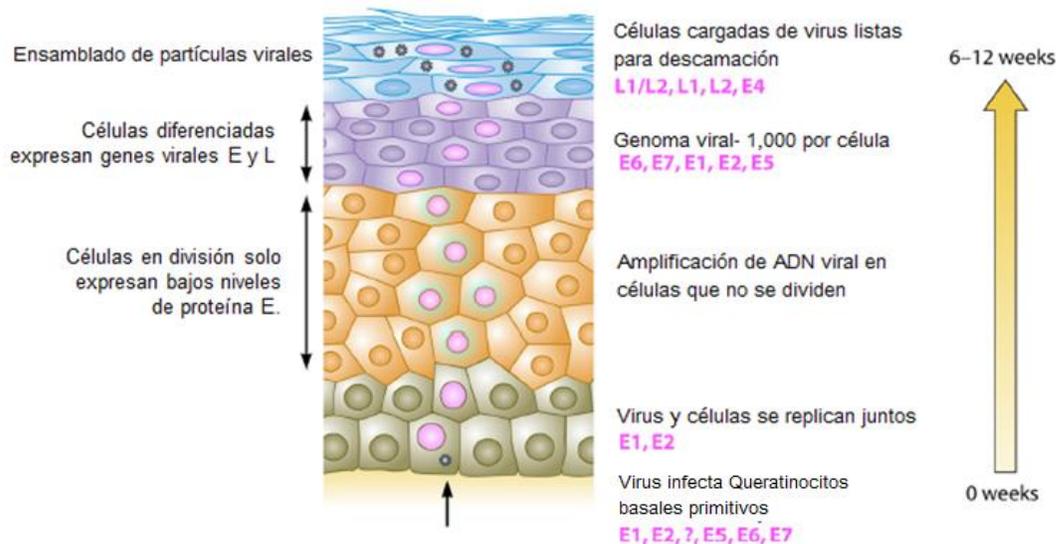


Figura 3. Ciclo de vida de VPH en epitelio cervical. La infección inicia tras la entrada del VPH a las células basales del epitelio cervical, donde expresa los genes tempranos, E1, E2, E5, E6 y E7. El ADN viral se replica en forma episomal. Con la migración de células infectadas a la superficie, el ADN viral aumenta su número de copias por célula y se expresan los genes tardíos L1 y L2, y E4. L1 y L2 encapsulan el genoma viral formando viriones que podrán iniciar una nueva infección. Tomada y modificada de Stanley, 2012.

3.3.3 Clasificación de los VPH

Los Papilomavirus se identifican por las abreviaturas PV y por una o dos letras que indican la especie. En 2001, la clasificación taxonómica de los PV, se estableció en 13 géneros caracterizados por compartir menos de 60% de la secuencia nucleotídica en el gen L1 y entre 23% y 43% de la secuencia completa. Cada uno de los géneros se subdivide en especies, las cuales entre cada género

comparten entre 60 y 70% de identidad en su secuencia; mientras que los tipos de VPH entre las especies comparten entre 71 a 89% de identidad en el marco de lectura abierto L1 (ORF, del inglés: *Open Reading Frame*) (De Villiers, 2001).

En la revisión sobre la clasificación taxonómica de los PV hecha por De Villiers (2013), se incorporan nuevos tipos virales y se actualiza la nomenclatura, registrando 29 géneros identificados por las letras del alfabeto Griego, de los cuales los VPH se encuentran en los géneros alfa (α), beta (β), gama (γ), mu (μ) y nu (ν); con un registro total de 170 tipos virales. Se registra un nuevo tipo viral cuando se confirma que la secuenciación completa de un aislado muestra una diferencia nucleotídica en el ORF L1 mayor al 10% respecto a cualquier otro reportado previamente (De Villiers *et al.*, 2004).

En el género alfa se encuentran las especies 7 y 9, las cuales contienen VPH-18 y VPH-16 respectivamente; éstos son de particular interés debido a que son los tipos virales oncogénicos de mayor frecuencia en CaCU. Estos tipos virales comparten homología en la secuencia de los genes E6 y E7; mientras que las secuencias L1 y L2 son divergentes, por lo que no necesariamente tienen un origen monofilético (Narechania *et al.*, 2005).

Además de la clasificación filogenética de los VPH, existe la clasificación epidemiológica, la cual consiste en agrupar a los VPH en alto riesgo (VPH-AR) y VPH bajo riesgo (VPH-BR), con base a la asociación epidemiológica en cáncer, encontrando una relación entre ambas clasificaciones. El trabajo seminal para la clasificación epidemiológica fue publicado por el grupo multicéntrico para el estudio de CaCU de la IARC (International Agency for Research on Cancer). En este estudio determinan que 15 tipos virales son de alto potencial oncogénico ó VPH-AR: VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH68, VPH73, y VPH82; mientras que los VPH-BR son: VPH6, VPH11, VPH40, VPH42, VPH43, VPH44, VPH54, VPH61, VPH70, VPH72, VPH81 y VPHCP6108 (Muñoz *et al.*, 2003). Un estudio posterior considera además de los 15 tipos de alto riesgo mencionados anteriormente a:

VPH26, VPH53, VPH66, VPH67, VPH69, VPH70, VPH85, y VPHIS39, y dentro de los VPH-BR a: VPH32, VPH55, VPH62, VPH64, VPH71, VPH74, VPH83, VPH84, VPH87, VPH89, y VPH 91, haciendo un total de 23 tipos virales de alto riesgo y 23 tipos virales de bajo riesgo (Dunne *et al.*, 2007).

Como es lógico, los estudios epidemiológicos atribuyen variaciones poblacionales importantes en la prevalencia y la relación causa-efecto de los diferentes tipos virales, sin embargo, es indudable la gran prevalencia (Doorbar, 2005). Los tipos de bajo riesgo, como el VPH-6 y VPH-11, inducen proliferaciones benignas de células epiteliales, que a menudo resultan en el desarrollo de verrugas genitales (condiloma acuminado). En contraste, los tipos de VPH de alto riesgo son agentes etiológicos del CaCU, el 99% de los carcinomas contienen ADN viral de este tipo (Walboomers *et al.*, 1999). Los cuatro tipos de VPH-AR más comunes que se encuentran en casos de CaCU, son el VPH-16 que representa aproximadamente más de la mitad de los casos (70%), mientras que los tipos 18, 31 y 45 representan alrededor del 25-30% de los casos (Clifford *et al.*, 2006; Parkin and Bray, 2006). Por razones que aún no entendemos claramente, los tipos de VPH de alto riesgo han desarrollado la capacidad de persistir, a menudo durante muchos años (Doorbar *et al.*, 2012).

3.4 Desarrollo de CaCU

En mujeres jóvenes la frecuencia de infección por el VPH es muy alta: hasta un 50% de las mujeres adolescentes y adultas jóvenes adquieren la infección en los primeros 4-5 años de vida sexual activa. Un 75% de las infecciones por VPH son transitorias e intermitentes, especialmente en las mujeres menores de 30 años de edad, de éstos, cerca del 70% desaparecen aproximadamente en un año, y el 91% en dos años, y solamente el 9% de estas mujeres continúan infectadas y desarrollan alteraciones en el epitelio del cuello uterino; y alrededor de 1-3% de casos progresan a cáncer. Las lesiones precursoras causadas por el VPH progresan a cáncer invasor tardando en promedio entre 10 y 15 años; por lo tanto

el cáncer puede prevenirse mediante la detección temprana y el tratamiento anticipado de las lesiones precancerosas (IARC, 2007).

Diversos factores adicionales actúan conjuntamente con el VPH e influyen en el riesgo de la aparición de la enfermedad. Estos factores de riesgo guardan relación con características tanto del huésped como del virus. Entre ellos se incluyen: inicio temprano de las relaciones sexuales; múltiples parejas sexuales; pareja sexual de alto riesgo (promiscuidad, infección por VPH) (Castle *et al.*, 2002; ICESCC *et al.*, 2006); infección persistente por VPH con riesgo oncogénico alto, p. ej., VPH 16 o VPH 18; inmunosupresión o ineficacia de la respuesta inmunitaria; historia previa de displasia vulvar o vaginal; antecedentes familiares; uso prolongado de anticonceptivos orales, ya que se ha visto que los adenocarcinomas parece tener mayor asociación con el uso de anticonceptivos orales que el carcinoma epidermoide, y se relaciona con la duración de su uso (Franco *et al.*, 2003); consumo de nicotina, se asocia con un aumento del riesgo de padecer carcinoma epidermoide pero no adenocarcinoma (ICESCC *et al.*, 2007; Castle *et al.*, 2002); la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que también se asocia frecuentemente con el CaCU (Sirera *et al.*, 2006).

El desarrollo de CaCU es precedido por una serie de anormalidades celulares caracterizadas por cambios histológicos y citológicos en la maduración de citoplasma e irregularidades en el núcleo (Fig. 4) (Walboomers *et al.*, 1999). En 1973, Ralph Richart propuso que todas las lesiones del cuello uterino podían evolucionar a un cáncer invasor, e introdujo el concepto de Neoplasia Intraepitelial Cervical, más conocido por sus siglas como NIC. Esta propone tres grados de la enfermedad que corresponden con las alteraciones morfológicas que involucran al epitelio, teniendo entonces el grado 1 (NIC-1) (alteraciones sólo en el tercio inferior del epitelio), grado 2 (NIC-2) (involucra dos tercios del epitelio) y grado 3 (NIC-3) (involucra casi la totalidad del epitelio) (Richart, 1973).

3.4.1 NIC- 1

- Histología. La displasia leve se caracteriza por una maduración mermada y alteraciones celulares confinadas al tercio inferior del epitelio escamoso nativo o metaplásico del cérvix (Fig. 4c). La maduración está presente en el tercio superior del epitelio y las células superficiales contienen una atipia variable, pero generalmente es leve. Los cambios celulares consisten en: pérdida de la madurez epitelial; reducción moderada de la polaridad; anormalidades nucleares con hiperchromasia y anisonucleosis leve; así como algunas figuras de mitosis, con persistente estratificación y diferenciación de las capas intermedias y superficiales, frecuentemente asociada con los cambios citopáticos de la infección por el VPH (Alonzo *et al.*, 2005; Tavassoli and Devilee, 2003).

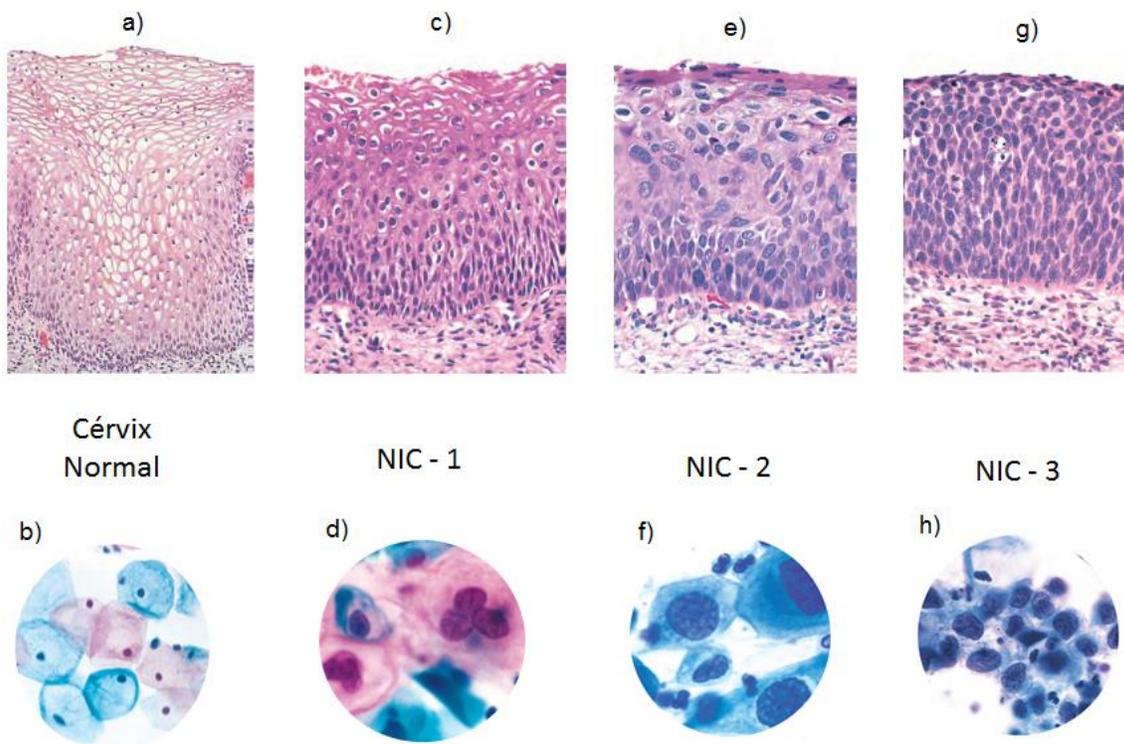


Figura 4. Espectro de la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). a) epitelio escamoso normal para comparación; b) citología de células escamosas superficiales exfoliadas normales para comparación; c) NIC-1 con atipia coilocítica; d) coilocitos representativos de una NIC-1; e) NIC-2 con atipia progresiva y expansión de las células basales inmaduras por encima del tercio inferior del grosor epitelial ; f) citología de NIC-2; g) NIC-3 con atipia difusa, pérdida de maduración y expansión de las células basales inmaduras hasta la superficie epitelial ; h) citología de NIC-3. Tomado y modificado de Kumar *et al.*, 2010.

- Citología. Los cambios morfológicos clásicos de la infección por VPH también se manifiestan sobre las células maduras y corresponden al coilocito (Fig. 4d), que consiste en una célula superficial o intermedia con un halo o cavidad bien definido rodeando al núcleo, marginación periférica del citoplasma y uno o dos núcleos aumentados de tamaño (menos de un tercio de la célula), finamente granular, que varían desde hipercromáticos hasta exhibir una cromatina borrosa o difuminada, así como un contorno nuclear irregular. Los bordes citoplasmáticos están bien definidos. Otras células acompañantes son los disqueratocitos, que presentan una queratinización anormal, se disponen en grupos, tienen citoplasma denso, anaranjado, además de núcleos alargados e hipercromáticos (Alonzo *et al.*, 2005).

3.4.2 NIC- 2 y 3

El aspecto típico de estas neoplasias consiste en una proliferación de las células parabasales atípicas; cuando ocupan más de 2/3 del espesor epitelial se denominan NIC-2, mientras que si abarcan todo el espesor se llaman NIC-3.

-Histología. Las células son inmaduras, con pérdida de la polaridad, sobreposición de los núcleos y asinucleosis; el núcleo es oval o levemente alargado, orientado en forma vertical y sin nucléolo; además el citoplasma es muy escaso en las capas basales y mejor definido en las más superficiales; se pueden detectar coilocitos y disqueratocitos, principalmente en las lesiones correspondientes a una NIC-2. Es común observar mitosis anormales (mitosis frecuentes hasta dos tercios del grosor en las NIC-2 y en todo el grosor en las NIC-3) y la atipia nuclear es marcada; estos dos últimos criterios son los que definen realmente el grado de la lesión y no solo el tercio del epitelio que se encuentre afectado (Fig. 4e y 4g) (Alonzo *et al.*, 2005; Angulo *et al.*, 2009).

-Citología. Los cambios se observan sobre las células parabasales o metaplásicas, con un marcado aumento de la relación núcleo/citoplasma; las alteraciones se deben buscar principalmente en el núcleo, que acrecienta más de 4 veces su tamaño normal, mientras que la cromatina exhibe grumos gruesos y

distribuidos de manera irregular. Algunos autores describen esta cromatina como “en profase detenida”. Otro hallazgo importante es el reforzamiento y la irregularidad de la membrana nuclear. En las células disqueratóticas atípicas correspondientes a la paraqueratosis atípica el citoplasma es reducido, pálido o denso y toma fácilmente una coloración naranja. El citoplasma es un tanto variable, pues entre más agresiva es la lesión aparece menor cantidad de citoplasma. Las células atípicas pueden ser muy pequeñas. Suelen aparecer aisladas o agrupadas en acúmulos sincitiales. Su parecido con las células metaplásicas inmaduras, glandulares distróficas o atróficas provoca en ocasiones un diagnóstico falso negativo o positivo (Fig. 4f y 4h) (Alonzo *et al.*, 2005 Angulo *et al.*, 2009).

3.5 Sistema Inmune

La capacidad del cuerpo para protegerse de virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos se conoce como inmunidad. El sistema inmune (SI) humano está constituido por tejidos linfoides del cuerpo, células inmunitarias y sustancias químicas (tanto intracelulares como secretadas) que coordinan y ejecutan funciones inmunológicas. La defensa contra los microorganismos tiene lugar a través de las primeras reacciones correspondientes a la inmunidad innata y las respuestas posteriores a cargo de la inmunidad adaptativa (o adquirida) (Silverthorn *et al.*, 2014; Regueiro *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

La inmunidad innata incluye mecanismos moleculares y celulares que se montan antes de una infección y cuyo fin es prevenirla o eliminarla. Los elementos de reconocimiento de este sistema distinguen de manera precisa entre lo propio y lo extraño, pero no están especializados para distinguir diferencias pequeñas en las moléculas extrañas (Kindt *et al.*, 2007). Esta respuesta está conformada por tres fases importantes: 1.- prevención de la infección, 2.- eliminación de microorganismos y 3.- estimulación de la respuesta inmune adaptativa. Para la correcta función de cada una de las fases, se necesita la interacción de varios elementos, tales como: barreras físicas (barreras naturales), como el epitelio y las

mucosas; componentes celulares, como las células dendríticas (DCs, del inglés: *dendritic cells*), el sistema monocito/macrófago, las células asesinas naturales (NK, del inglés: *natural killer*), mastocitos, fagocitos y granulocitos; compuestos químicos y enzimáticos y un sistema de receptores celulares (especialmente los receptores tipo Toll; TLR, del inglés: *Toll-like receptor*). De manera íntegra todos estos elementos generan los pasos necesarios para la eliminación no específica de microorganismos a través de procesos como la fagocitosis y la inflamación (Anaya *et al.*, 2005).

Es importante apreciar que los sistemas inmunitarios innato y adaptativo no operan de manera independiente entre sí; funcionan en un sistema altamente interactivo y cooperativo, produciendo una respuesta combinada más eficaz de lo que cualquiera de las dos ramas podría producir por sí misma.

La inmunidad adaptativa constituye una segunda línea de defensa amplia que elimina los patógenos que evaden las reacciones innatas o persisten a pesar de éstas. A diferencia de las reacciones inmunitarias innatas, las adaptativas no son iguales en todos los miembros de una especie, sino que son respuestas a retos antigénicos específicos. La inmunidad adaptativa posee cuatro atributos característicos:

- Especificidad antigénica (permite reconocer diferencias sutiles entre los antígenos, los anticuerpos pueden distinguir entre dos moléculas proteínicas que difieren sólo en un aminoácido).
- Diversidad (genera una enorme diversidad de moléculas de reconocimiento, lo cual posibilita identificar miles de millones de estructuras únicas en antígenos extraños).
- Memoria inmunitaria (si el mismo agente patógeno u otro estrechamente relacionado infectan al organismo en una segunda ocasión, las células de memoria aportan los medios para que el sistema inmunitario adaptativo monte un ataque rápido y a menudo muy eficaz contra el invasor).

- Reconocimiento de lo propio y lo extraño (es la capacidad del inmunosistema de diferenciar lo propio de lo ajeno y reaccionar sólo a moléculas extrañas) (Kindt *et al.*, 2007).

Básicamente hay dos tipos de respuesta inmune adaptativa, una de ellas es la inmunidad humoral y la otra es la inmunidad celular.

La inmunidad humoral, está mediada por moléculas solubles vertidas a la sangre y las secreciones mucosas, conocidas como anticuerpos, los cuales son producidos por los linfocitos B activados. Los anticuerpos reconocen antígenos microbianos, los identifican de manera específica, y los neutralizan, contrarrestando así la infectividad de los microorganismos. Igualmente, los anticuerpos tienen la función de marcar la superficie celular de los microorganismos para que luego sean eliminados por diferentes mecanismos efectores tales como inducción celular, promoción de la fagocitosis y estimulación de síntesis de mediadores de inflamación como son las citocinas proinflamatorias.

La inmunidad celular, está mediada por los linfocitos T. Los microorganismos y moléculas intracelulares como los virus, pueden proliferar y mantenerse al interior de las células, especialmente dentro de macrófagos y fagocitos en general, quedando inaccesibles a la acción de los anticuerpos circulantes y es sobre este tipo de antígenos que la inmunidad celular ejerce su función. Existen tres subpoblaciones de células T que ejercen ésta función: Linfocitos T cooperadores (LTh) (CD4+; producen señales que fomentan las inmunorreacciones, subdividiéndose en Th1 o Th2, según el estímulo recibido); Linfocitos T citotóxicos (LTC) (CD8+; que destruye células blanco de manera específica según el antígeno) y linfocito T regulador (Treg) (CD4+ CD25+ FoxP3+; regula respuestas inmunes mediadas por Th y LTC) (Abbas *et al.*, 2012; Anaya *et al.*, 2005; Kindt *et al.*, 2007).

3.5.1 Respuesta inmune contra el VPH

A escala cervical, como defensa tras la primera infección de las células del epitelio por VPH, se desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células NK, e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de la inmunidad innata. Las células de Langerhans (LCs, del inglés: *Langerhans cells*) y algunos queratinocitos funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA). Las LCs son células dendríticas inmaduras de origen mieloide que residen en el epitelio escamoso, incluyendo piel y mucosa genital. Las LCs reconocen agentes patógenos, capturan antígenos por micropinocitosis o receptores de manosa, para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación, que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés: *major histocompatibility complex*; denominado HLA en humanos: *Human leukocyte antigens*) clase II, CD40 y B7, así como la migración a los ganglios linfáticos locales (Mota *et al.*, 1999; Matthews *et al.*, 2003). Las LCs junto con el HLA, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y citocinas como la IL-2 o IL-12, activan a los linfocitos T *naive* (Niedergang *et al.*, 2004). Si una célula T *naive* reconoce un antígeno tumoral presentado por una CPA que presenta señales coestimuladoras se activará y proliferará originando un clon de linfocitos efectores, que adquirirán además la capacidad de migrar al tumor y extravasarse infiltrándolo, y provocando inflamación y destrucción de las células tumorales (Williams *et al.*, 1992). En estos procesos son críticos los niveles y la señalización inducida por los correceptores para señales coestimuladoras CD28, cuyos ligandos en las CPA son CD80 y CD86. Por tanto, la expresión de estas moléculas en la CPA constituye un factor crítico en la decisión que conduce a la activación del linfocito T, o a la anergia o apoptosis (en su ausencia) (Wing *et al.*, 2008).

Los linfocitos T CD8 citotóxicos efectores, tras haber sido activados en el órgano linfoide secundario, retornan a la sangre y se extravasan en territorios

inflamados. Si infiltran el tumor, reconocerán antígenos presentados por las células tumorales en moléculas de MHC clase I. La expresión de estas moléculas de clase I que funcionan como vehículos que transportan y presentan antígenos a los linfocitos CD8 es inducida por el IFN- γ (del inglés: *interferon gamma*), secretado por los linfocitos CD4 Th1. Estos linfocitos infiltran el tumor provocando inflamación y atrayendo células fagocíticas y LTC, que eliminan eficazmente las células tumorales (Romero *et al.*, 2006). Los linfocitos T CD4 producen IFN- γ al reconocer antígenos tumorales. El IFN- γ provoca que el endotelio de los vasos que irrigan el tumor aumente su expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I y II y atraiga células efectoras que infiltran el nódulo tumoral y amplifican la reacción inflamatoria. La producción intratumoral de IFN- γ provoca que las células tumorales aumenten su expresión de moléculas MHC clase I. Los antígenos tumorales expresados por células del tumor son presentados en las moléculas de clase I a los linfocitos T CD8 citotóxicos. Estas células secretan citotoxinas hacia las células tumorales y provocan su muerte celular programada. Los LTC y los linfocitos T CD4 también liberan TNF- α (del inglés: *tumor necrosis factor alfa*), que promueve la inflamación del tejido tumoral y la atracción de más leucocitos. Estos mecanismos de respuesta pueden eliminar grandes números de células tumorales (Beerenwinkel *et al.*, 2007).

Sin embargo, determinadas células del tumor pueden evadir estos mecanismos y continuar su crecimiento. Así, la propia respuesta inmune, si no consigue eliminar todas las células tumorales, seleccionará las variantes con menor o nula inmunogenicidad (expresión de antígenos tumorales), ante las cuales la respuesta inmune es menos eficaz.

3.5.2 Mecanismos de evasión inmune

Es importante distinguir los mecanismos utilizados por el virus y los usados por las células tumorales para la evasión del SI. En el caso del VPH la primera estrategia para evadir el SI es precisamente evitar ser detectado por éste. El VPH infecta a las células epiteliales sin provocarles daños que pudieran inducir señales

de alerta. El genoma viral codifica niveles muy bajos de proteínas que no se secretan al medio extracelular. La producción de virus se lleva a cabo dentro de las células, que son descamadas en la etapa final de su proceso de diferenciación, es decir, el VPH no tiene una fase de viremia por lo que no llega a las células infectadas, y por lo tanto, la cantidad de viriones que se exponen a la vigilancia inmunológica es mínima (O'Brien y Campo, 2002).

Diversos estudios también han demostrado que las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR pueden regular negativamente componentes particulares de las vías de señalización de interferones (IFN). Los IFN son moléculas muy importantes para el control de infecciones virales, ya que tienen funciones antivirales, anti-proliferativas e inmunoestimuladoras; inhibiendo así la respuesta natural que la célula infectada debería manifestar ante la presencia de los IFN (Barnard and McMillan, 1999; Chang and Laimins, 2000).

La presencia de VPH en este tipo de cáncer genital, también se ha asociado con las fallas en la respuesta inmune celular mediada por LTh1 y por LTC (Visser *et al.*, 2007). Dentro de los principales mecanismos asociados a la deficiente respuesta inmune celular destacan:

- Defectos en la función inmunoestimuladora mediante citocinas y moléculas co-estimuladoras de células dendríticas (Gabrilovich *et al.*, 2001);
- La expresión defectuosa y disminuida de moléculas del MHC y de los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP) (Brady *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001)
- A la asociación de ciertos alelos HLA clase I y II que conducen a una deficiente presentación de antígenos a linfocitos T;
- La liberación de IL-10 y TGF- β (del inglés: *transforming growth factor beta*) que directamente inhibe la activación de linfocitos T y suprime la función de las CPA al inhibir la expresión de moléculas del MHC, moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86) (Sojka *et al.*, 2008).

Otro mecanismo inmunosupresor, recientemente propuesto para las células T reguladoras, es la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular. Este compuesto es generado a partir de nucleótidos extracelulares (ATP, ADP) catalizados por ectonucleotidasas como CD39 y CD73 expresados en linfocitos Treg, DCs foliculares, células endoteliales, monocitos, células estromales mesenquimales y células tumorales, entre otros (Kobie *et al.*, 2006; Deaglio *et al.*, 2007).

3.6 Vía adenosinérgica

La adenosina es un nucleósido endógeno modulador liberado por casi todas las células y se genera en el espacio extracelular, principalmente se deriva de la fosfohidrólisis de moléculas precursoras, en particular de la adenosina trifosfato (ATP, del inglés: *adenosine triphosphate*) y de adenosina monofosfato (AMP, del inglés: *adenosine monophosphate*). De hecho, durante las condiciones de disponibilidad limitada de oxígeno, inflamación o una herida aguda, varias células liberan nucleótidos extracelulares, en particular en la forma de ATP y adenosina difosfato (ADP, del inglés: *adenosine diphosphate*). Las concentraciones de ATP intracelulares son relativamente altas (5mM) y durante condiciones perjudiciales el ATP intracelular se libera, a partir de células apoptóticas o necróticas (Linden, 2001; Novak, 2003).

Como tal, el ATP y AMP se someten a pasos de fosfohidrólisis enzimática para generar adenosina extracelular (Fig. 5) (Eltzschig *et al.*, 2003). El primer paso de este proceso es iniciado por la actividad enzimática de la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1 (ENTPD1; EC 3.6.1.5 o CD39) (Robson *et al.*, 2006; Robson *et al.*, 2005). CD39 es una proteína que su función principal es fosfohidrolizar ATP / UTP y en menor cantidad al ADP / UDP para producir AMP (Heine *et al.*, 2001). El CD39 se expresa constitutivamente en el bazo, timo, pulmón y la placenta, y en estos órganos se asocian principalmente con células endoteliales y poblaciones de células inmunes, tales como células B, células NK, DCs, LCs, monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos Treg (Enjyoji *et al.*, 1999;

Zimmermann, 1999; Mizumoto *et al.*, 2002; Kapojos *et al.*, 2004; Dwyer *et al.*, 2007). La expresión de CD39 es regulada por varias citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo e hipoxia, a través del factor de transcripción Sp1 y Stat3 (Deaglio and Robson, 2011; Eltzschig *et al.*, 2009; Chalmin *et al.*, 2012).

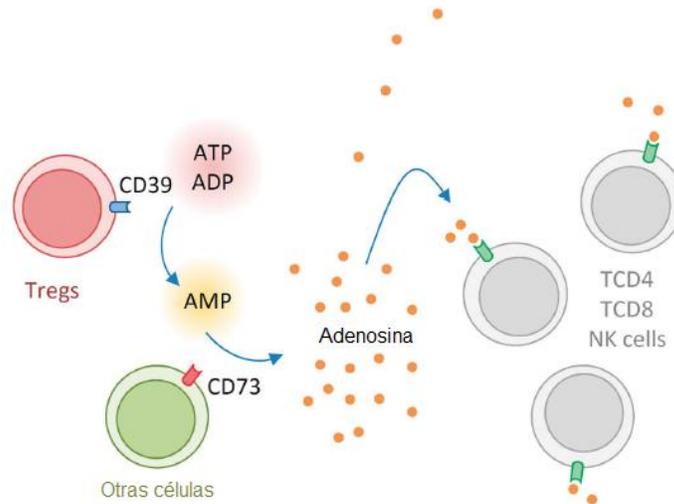


Figura 5. Vía adenosinérgica. Esquema representativo de la inmunosupresión de Treg mediada a través de la generación de adenosina. CD39 se expresa en superficie celular y convierte el ATP a ADP y éste a AMP. A su vez, AMP es convertida por CD73 en adenosina, un potente inmunosupresor. La adenosina se une a sus receptores en células blanco como células CD4+, CD8+ y células NK, e inhibe la respuesta de células efectoras, que conduce a la progresión tumoral. Tomado y modificado de Bastid *et al.*, 2013.

El segundo paso en el metabolismo de nucleótidos es realizado por la enzima ecto-5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5 o CD73), que desfosforila AMP extracelular a adenosina (Sträter, 2006). CD73 se encuentra en una gran variedad de tejidos, incluyendo el colon, hígado y corazón. Se han encontrado altas concentraciones en riñones, cerebro, pulmones e intestinos. También está presente en leucocitos derivados de sangre periférica, bazo, nódulos linfáticos, timo, médula ósea así como en endotelio (Thompson *et al.*, 2004; Lennon *et al.*, 1998).

El paso final de esta vía es la degradación de la adenosina acumulada en el medio extracelular, esto se logra a través de un sistema de receptación que comprende a la adenosina cinasa y la adenosina deaminasa (ADA), que se

encargan de convertir a AMP o a inosina respectivamente (Latini and Pedata, 2001).

La acumulación de adenosina extracelular ocurre tras daño en el tejido y se ha demostrado que tiene efectos protectores hacia las células o tejidos para evitar una respuesta inflamatoria excesiva, y media la respuesta inmune hacia el daño. Sin embargo la persistencia del aumento de concentraciones más allá de la fase aguda de la lesión puede llegar a ser perjudicial para los tejidos. La adenosina también se puede acumular crónicamente en el ambiente tumoral y el estroma, esto se ha asociado con una generación de microambiente inmunosuprimido que favorece la aparición de una neoplasia (Chan and Cronstein, 2010; Karmouty-Quintana *et al.*, 2013; Sitkovsky *et al.*, 2008). La hipoxia, que también está presente en tumores, aumenta la expresión de CD39 y CD73 en las células endoteliales y como resultado incrementa la concentración de adenosina (Eltzschig *et al.*, 2003).

Estudios recientes han confirmado la presencia de CD39 y CD73 en diversos carcinomas humanos. Por su parte, CD73 se ha visto altamente expresado en cáncer de colón, pulmón, páncreas y ovario. Se ha confirmado que CD73 promueve la invasión, migración y adhesión de células tumorales de cáncer de mama (Zhang, 2012). CD39 también se ha visto implicado en varios tipos de cáncer, como: leucemias, hígado, próstata, pulmón, melanoma, mama, vejiga, páncreas y otros (Bastid *et al.*, 2013).

CD39/CD73 participan en procesos de inmunoescape tumoral, por la inhibición de la activación de linfocitos T, así como su expansión clonal, afectando principalmente a células T cooperadoras y citotóxicas. Recientes evidencias han demostrado que la terapia dirigida a la inhibición de CD73 tiene el potencial de reducir la tumorigénesis y metástasis, así como la mejora de la respuesta inmune mediada por Linfocitos T (Bastid *et al.*, 2013; Zhang, 2012).

En general, la evidencia sugiere que la evaluación de la expresión y actividad de CD39 y/o CD73 pueden servir como potenciales marcadores de

pronóstico en pacientes con cáncer, así como la exploración de la modulación farmacológica de estas enzimas como estrategias innovadoras para frustrar el desarrollo y la progresión neoplásica (Beavis *et al.*, 2012).

3.6.1 Receptores de adenosina

La concentración de adenosina se mantiene en equilibrio por mecanismos de recaptación operados a través de la acción de transportadores específicos. Los efectos de este nucleósido se medían a través de la activación de una familia de cuatro receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés: *G protein-coupled receptors*), llamados A1-R, A2A-R, A2B-R, y A3-R (Fig. 6). Estos receptores difieren en su afinidad hacia la adenosina, en el tipo de proteínas G que reclutan y finalmente en las vías de señalización corriente abajo que se activan en las células diana (Fredholm *et al.*, 2001). La adenosina activa a los receptores con diferentes afinidades; los de alta afinidad como A1-R (3-30nM) y A2A-R (1-20nM) son activados con concentraciones fisiológicas y los receptores de baja afinidad como A2B-R (5000 – 20000 nM) y A3-R (>1000nM) requieren de altas concentraciones de adenosina (Latini and Pedata, 2001; Yuzlenko and Kiec-Kononowicz, 2006).

En general, los receptores A1-R y A3-R están acoplados con proteínas G, como G_i, G_q y G_o. La estimulación de A1-R y A3-R decrece la actividad de adenilciclase, y esto afecta la producción de AMP cíclico (cAMP), y a su vez, la estimulación de estos receptores provoca la liberación de iones Ca⁺ (Ryzhov *et al.*, 2006; Jacobson and Gao, 2006; Gessi *et al.*, 2008). Mientras que la estimulación de A2A-R y A2B-R resulta en un aumento en la actividad de adenilciclase. Esto se debe a que estos receptores están acoplados a proteínas G como G_s y G_{olf}. En adición, el A2B-R también está acoplado a proteínas G_q, lo que resulta en una activación de la fosfolipasa C (Ryzhov *et al.*, 2006; Jacobson and Gao, 2006). Cascada abajo, más allá de la activación/inhibición de la adenilciclase y producción de cAMP, la señal de la adenosina a través de los receptores modifica la actividad de distintas vías como la del Factor Nuclear κB (NF-κB), JAK-STAT y

ERK, en última instancia regulando su transcripción y función celular (Fig. 6) (Milne and Palmer, 2011).

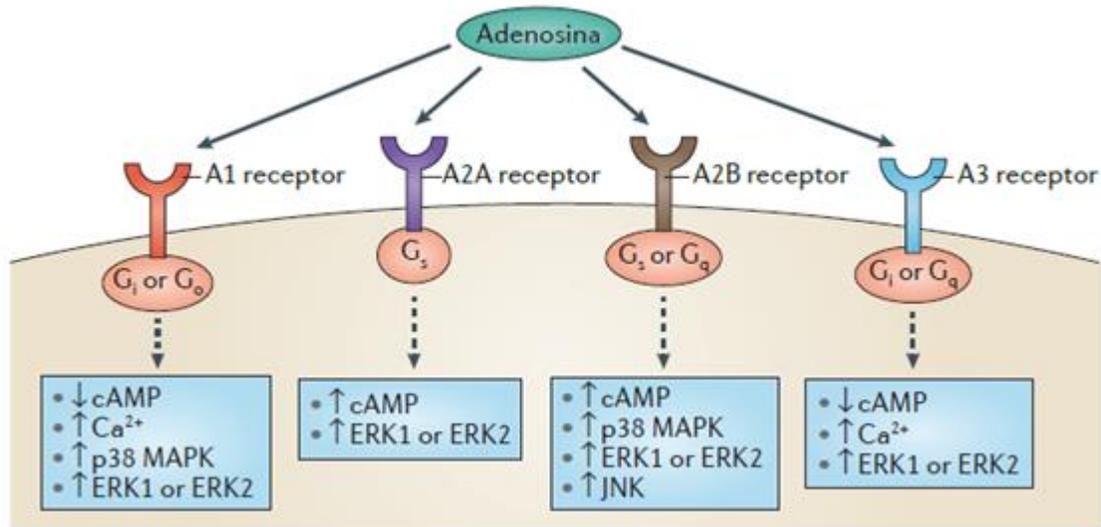


Figura 6. Receptores de adenosina. Diagrama esquemático que ilustra las vías de los segundos mensajeros que están acoplados a los subtipos de receptores de adenosina. La adenosina extracelular se puede unir a cuatro diferentes receptores acoplados a proteínas G que estimulan (A2A-R y A2B-R) o inhiben (A1-R y A3-R) la actividad de la enzima adenilciclasa. Además todos los receptores se acoplan a vías de MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*), incluyendo ERK1 (del inglés *extracellular signal-regulated kinase 1*), ERK2 y p38 MAPK. **cAMP**, AMP cíclico; **JNK**, del inglés *JUN N-terminal kinase*. Tomado y modificado de: Antonioli *et al.*, 2013.

3.6.2 Receptores de adenosina y cáncer.

Como ya se ha mencionado, la concentración de adenosina aumenta en tejidos tumorales y tiene un papel crucial para la alteración de la respuesta inmune; esto es posible a que la regulación de los receptores también se ve modificada en tumores, permitiendo así, la transformación y el crecimiento de células malignas. De los cuatro receptores, se ha observado que A2A-R y A2B-R están mayormente implicados en estas alteraciones, ya que están expresados predominantemente en células T CD8⁺ y su interacción con adenosina desencadena la inhibición de la activación y proliferación de estas células.

Por su parte, el receptor de adenosina A2A-R está expresado en muchas células del sistema inmune, incluyendo neutrófilos, monocitos, macrófagos, células

T y células NK, y su activación por adenosina o análogos de la adenosina, resulta en un amplio rango de respuestas inmunosupresivas y anti-inflamatorias (Blackburn *et al.*, 2009; Haskó and Pacher, 2008; Hasko *et al.*, 2008).

El A2A-R ha sido encontrado en la membrana de diferentes líneas de células tumorales como: células de neuroblastoma SH-SY5Y y NG108-15, células de linfoma monocítico U937, células de leucemia Jurkat, células de melanoma A375, células epidermoides A431, células de carcinoma de colon HT29 y DLD-1, células de glioblastoma humano U87MG y células de cáncer de mama MCF-7 (Gessi *et al.*, 2001; Merighi *et al.*, 2001; Hillion *et al.*, 2002; Mundell and Kelly, 1998; Mayne *et al.*, 2001; van der Ploeg *et al.*, 1996; Tey *et al.*, 1992; Gessi *et al.*, 2007; Gessi *et al.*, 2010; Etique *et al.*, 2009). Se ha demostrado que en células neoplásicas el A2A-R promueve la angiogénesis, esto a través de la liberación de VEGF (del inglés: *vascular endothelial growth factor*), y la angiogénesis no solo es importante para el crecimiento continuo del tumor, sino también promueve la metástasis (Montesinos *et al.*, 2002; Leibovich *et al.*, 2002; Sexl *et al.*, 1997). Otra función importante es que tras su activación, inhibe la expresión de IL-6, lo que mejora la producción de TGF- β (Zarek *et al.*, 2008).

El A2B-R se ha visto altamente expresado en células de músculo liso, células endoteliales y macrófagos. De manera normal, se expresa en linfocitos, DCs, mastocitos y neutrófilos (Yang *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2007; Mirabet *et al.*, 1999; Novitskiy *et al.*, 2008). Se ha determinado la presencia de este receptor en algunos tipos de cáncer como: mastocitos humanos derivados de mastocitoma indiferenciado (HMC-1), en la línea celular U87MG de glioblastoma, en células de astroglioma humano, y en las células derivadas de cáncer de mama MDA-MB-231 ER-negativo. Se ha descrito que el papel que desempeña es inducir la liberación de IL-6, IL-8 y VEGF (Feoktistov *et al.*, 2003; Merighi *et al.*, 2007; Fiebich *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio reciente se ha demostrado que la vía adenosinérgica (CD73-Adenosina) a través de la producción de adenosina y su interacción con receptores A2B incrementa la producción de IL-10 en células de microglia (Koscsó *et al.*, 2012).

3.6.3 Interleucina 10

La interleucina 10 (IL-10) es una potente citocina que es producida por distintos tipos de células, como células T, células B, macrófagos, monocitos y DCs (Biswas *et al.*, 2007). Esta citocina tiene una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la inmunosupresión, capacidad antiinflamatoria y propiedades inmunomoduladoras, que regulan la diferenciación de una gran variedad de las células inmunes y sus eventos de proliferación (Liu *et al.*, 2013). La IL-10 inhibe la expresión de moléculas MHC clase II y las moléculas coestimuladoras B7-1/B7-2 expresadas en monocitos y macrófagos, y limita la producción de citocinas proinflamatorias (incluyendo IL-1 α y β , IL-6, IL-12, IL-18, y TNF- α) y quimiocinas (MCP1, MCP5, IL-8, IP-10, y MIP-2). IL-10 actúa directamente sobre las células T CD4+, inhibiendo la proliferación y la producción de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 y TNF- α . Por lo tanto, IL-10 puede regular directamente las respuesta innata y adaptativa de Th1 y Th2 mediante la limitación de la activación de células T y la diferenciación en los ganglios linfáticos, así como la supresión de las respuestas proinflamatorias en los tejidos, dando lugar a problemas de control de patógenos y/o reducción de la inmunopatología (Couper *et al.*, 2008).

Diferentes estudios han informado la presencia de altos niveles de IL-10 en tumores humanos recién extirpados, como carcinomas de ovario, mama, riñón, pulmón y melanoma. Esto sugiere que el incremento de los niveles de IL-10 puede estar relacionado con el control de respuestas antiinflamatorias y con el desarrollo de cáncer (Wang *et al.*, 2013).

En pacientes con CaCU, la expresión de IL-10 está directamente asociada con el grado de las lesiones cervicales, es decir, que una mayor expresión de IL-10 corresponde con lesiones de alto grado (Bermudez-Morales *et al.*, 2011). Además, los polimorfismos en el gen promotor de la IL-10 se han asociado con la susceptibilidad a lesiones precursoras asociadas a infección por VPH (Bermudez-Morales *et al.*, 2008; Mindiola *et al.*, 2008; Azar *et al.*, 2004) y que la producción de

IL-10 es regulada por proteínas del VPH como lo es la proteína E2 (Bermudez-Morales *et al.*, 2011).

Los macrófagos asociados a tumores y células supresoras mieloides expresan IL-10, entre otras citocinas, como parte del mecanismo de la supresión de respuestas antitumorales de las células T, induciendo la expansión de células Treg específicas a VPH, posiblemente inhibiendo la actividad antitumoral de células T efectoras. Curiosamente, el aumento del número de macrófagos por el área de lesión se ha asociado con la enfermedad cervical de alto grado. En varios trabajos se sugiere que éste es uno de los posibles mecanismos que subyacen a los datos epidemiológicos que correlacionan al VPH con la progresión del tumor y el aumento de la expresión de IL-10 (Bolpetti *et al.*, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección persistente de la mucosa cervical por el virus del papiloma humano (VPH) constituye una condición necesaria para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (CaCU) y de sus lesiones precancerosas. Diversos factores inmersos en el microambiente celular proveen elementos necesarios para la sobrevivencia y proliferación de las células tumorales, además de facilitar la evasión de la respuesta inmune del huésped (Albini and Sporn, 2007). Recientemente se ha demostrado que la adenosina acumulada en los tejidos tumorales ejerce un profundo efecto inmunosupresor, además de la promoción del crecimiento y metástasis tumoral (Haskó *et al.*, 2008). Esta molécula es generada por las ectoenzimas CD39 que hidroliza ATP y ADP a sus respectivos nucleósidos (Robson *et al.*, 2005) y CD73 que degrada el fosfato de adenosina (AMP) a adenosina (Resta *et al.*, 1998). La adenosina ejerce los efectos biológicos mencionados vía 4 receptores específicos: A1-R, A2A-R, A2B-R y A3-R. A través del receptor A2A-R, notablemente se inhibe la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos (Huang *et al.*, 1997); mientras tanto, el receptor A2B-R ha sido implicado en la inducción de metástasis (Stagg *et al.*, 2010), así como en la producción de IL-10 por células blanco (Koscsó *et al.*, 2012). Se ha reportado una asociación entre la producción de IL-10 con la infección por VPH de alto riesgo y la susceptibilidad a lesiones precursoras del epitelio cervical uterino; además se ha postulado que una mayor expresión de IL-10 en tejido cervical correlaciona con lesiones de alto grado (Bermudez-Morales *et al.*, 2008; Mindiola *et al.*, 2008; Azar *et al.*, 2004).

Nuestro grupo de trabajo ha detectado mediante análisis de citometría de flujo e inmunocitoquímica, la expresión y actividad funcional de moléculas participantes en la vía adenosinérgica tales como CD39 y CD73 en varias líneas celulares de CaCU, y en tejidos de tumores de diferentes etapas del CaCU, sugiriendo que la expresión de estas moléculas puede estar asociada con el desarrollo de la enfermedad. Por lo que el presente trabajo se realizó con la finalidad de analizar el patrón de expresión de las principales moléculas

implicadas en la vía adenosinérgica (CD39, CD73, A2A-R, A2B-R) y la presencia de IL-10 en citologías exfoliativas neoplasias intraepiteliales cervicales de grado 1 (NIC-1), y compararlo con el expresado en cérvix normal.

5. HIPÓTESIS

La vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina) tiene un papel importante en la supresión de la respuesta inmune antitumoral, así como en favorecer el crecimiento e invasión del tumor, a través de la interacción de adenosina con receptores específicos A2A-R y A2B-R respectivamente. Por otro lado, se ha reportado que la adenosina es capaz de inducir la producción de IL-10 y que esta citocina es expresada de manera importante en lesiones intraepiteliales grado 1 (NIC-1) asociadas con la infección por VPH de alto riesgo. Por tanto, se espera que en citologías exfoliativas de NIC-1 con infección por VPH de alto riesgo, exista un incremento en la expresión de las moléculas de la vía adenosinérgica (CD39, CD73, A2A-R y A2B-R) y de IL-10.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los marcadores CD39/CD73/A2A-R/A2B-R/IL-10 en citologías exfoliativas de neoplasias intraepiteliales cervicales de grado 1 (NIC-1).

6.1 Objetivos particulares

- Obtener y tipificar el tipo de VPH en muestras de citologías exfoliativas de NIC-1.
- Determinar la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 en citologías exfoliativas de NIC-1.
- Determinar la presencia de receptores para adenosina A2A, A2B en citologías exfoliativas de NIC-1.
- Determinar la expresión de IL-10 en citologías exfoliativas de NIC-1.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Colecta de muestras

Las muestras fueron tomadas de mujeres que acudieron a consulta de ginecología en el Hospital General de Zona Troncoso y de la Clínica Médica Ángel del Mar, con previo consentimiento informado. En la sala de exploración, con ayuda de un espejo vaginal y un citocepillo cervical (Digene, USA), se adquirieron células del exocérvix y parte del endocérvix (ver apéndice I). Las muestras celulares obtenidas mediante citocepillo se depositaron en un vial para Pap líquido ThinPrep® de Cytoc Corporation (Marlborough, Massachusetts) PreservCyt, el cual está validado para conservación y transporte de células cervicales a una temperatura comprendida entre 2 y 30° C y pueden almacenarse a temperatura ambiente durante 21 días o de 2-8°C durante 12 semanas.

7.2 Detección de VPH en células cervicales

A partir de las muestras adquiridas de pacientes y donadoras normales, se obtuvo el ADN de una muestra de las células, empleando un paquete de extracción “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega, USA). Brevemente, se agregó amortiguador de lisis nuclear y se incubó a 55°C durante una hora para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se adicionó solución de precipitación de proteínas y se centrifugaron a 10,000g por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se agregó isopropanol para la precipitación del ADN y posteriormente se centrifugó a 16000g por 5 minutos para la recuperación del botón de ADN. Después se realizaron dos lavados con etanol al 70% y se centrifugó a 16000g por 2 minutos cada una. Finalmente el botón de ADN se hidrató con agua libre de DNAsas. La integridad del ADN obtenido de cada una de las muestras se verificó en un gel de agarosa al 1.5%. Se cuantificó el ADN en un equipo de Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek®) a una absorbancia de 260/280. Las muestras con ADN mayor a 30ng/uL serán incluidas para determinar el tipo de VPH.

La presencia o ausencia de VPH en las muestras de determinó mediante un ensayo de PCR (del inglés: polymerase chain reaction) en punto final utilizando oligonucleótidos consenso marcados con biotina, los cuales son específicos para el gen que codifica a proteína L1 de los diferentes genotipos de VPH: MY09 (CGTCCMARR-GGAWACTGATC) y MY11 (GCMCAGGGWCATAAYAATGG). Estos oligonucleótidos, son degenerados y están dirigidos para amplificar un fragmento de 450 pares de bases del gen L1.

Aquellas muestras positivas se analizaron mediante la prueba “Linear Array HPV genotyping Test” (Roche), que puede detectar 37 tipos virales: VPH-6, -11, -16, -18, -26, -31, -33, -35, -39, -40, -42, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -58, -59, -61, -62, -64, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73, -81, -82, -83, -84). Para ello, el ADN de la muestra fue sometido a un PCR en punto final, empleando los oligonucleótidos biotinilados para un amplio espectro de tipos virales y el producto final se hibridó con sondas fijadas en membranas de nylon. La reacción fue revelada mediante un método colorimétrico (Jamison *et al.*, 2009; Monsonego *et al.*, 2008; Steinau *et al.*, 2008; van Hamont *et al.*, 2006).

7.3 Detección de CD39, CD73, A2A-R, A2B-R e IL-10

Para la detección de las proteínas CD39, CD73, receptores para adenosina A2A-R y A2B-R, y la IL-10, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de acuerdo a las diluciones sugeridas por el proveedor.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales y sus diluciones empleadas en el estudio.

ANTICUERPO	MARCA	DILUCIÓN
CD73	Invitrogen	1:200
CD39	Invitrogen	1:150
A2A	Millipore	1:150
A2B	Millipore	1:200
IL-10	Peptotech	1:150

Las muestras de las células cervicales se fijaron en laminillas de vidrio cargadas positivamente (Kling-On HIER Slides, BIOCARE MEDICAL), y posteriormente la inmunocitoquímica para la detección de los diferentes

marcadores se realizó en un equipo denominado *Ventana™ UltraView Universal DAB Detection Kit*. Para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

1. Recuperación antigénica por 8 minutos en amortiguador básico basado en TRIS (CC1).
2. Inhibición de la peroxidasa endógena con H₂O₂.
3. Incubación con anticuerpo primario correspondiente por 30 minutos a 37°C.
4. Adición del anticuerpo secundario basado en el sistema multímero marcado con peroxidasa de rábano.
5. Revelado con diaminobenzidina y contraste con hematoxilina.

En seguida, se lavaron las laminillas, se deshidrataron en alcoholes de diferentes concentraciones (70-100%) y después se aclararon en xilol; éstas se montaron en resina sintética y se dejaron secar perfectamente. Cada laminilla se observó mediante un microscopio óptico, se tomaron las fotos correspondientes a cada muestra teñida y se llevó a cabo un análisis de imágenes para determinar la densidad de expresión de los diferentes marcadores.

7.3.1 Controles de referencia

Como control negativo se emplearon células de la misma muestra citológica contrateñidas con la técnica de Papanicolaou (Apéndice II) y como control positivo se emplearon preparaciones de la línea celular tumoral INBL, derivada de un carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizado en estadio clínico IVB, positiva para la infección de VPH tipo 18 y a su vez positiva para la expresión de las moléculas analizadas.

7.4 Análisis densitométrico de la expresión de CD39, CD73, A2A-R, A2B-R e IL-10

Para evaluar la expresión de las proteínas CD73, CD39, A2A-R, A2B-R e IL-10 se determinó la Densidad Óptica Integrada (IOD, del inglés: *Integrated Optical Density*), la cual representa la densidad media de al menos 100 células de cada muestra analizada mediante el programa ImageProPlus versión 6.0 para Windows, siguiendo el protocolo del programa para mediciones de intensidad.

7.5 Análisis estadístico

Para comparar si existe diferencia estadística significativa entre los grupos de donadoras normales versus pacientes con NIC-1 y células tumorales, se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar entre medias, seguida de una prueba de Tukey para múltiples comparaciones, con ayuda del programa GraphPad PRISM 6.0 para Windows.

8. RESULTADOS

Para llevar a cabo el presente estudio, se colectó un total de 50 muestras de citologías exfoliativas, de las cuales 25 correspondieron a pacientes que acudieron al Servicio de Ginecología del HGZ Troncoso IMSS, que de acuerdo con la valoración clínica y estudio histopatológico presentaron colposcopia positiva para NIC-1 y positividad a la infección por VPH (I-VPH); las otras 25 muestras correspondieron a mujeres que acudieron a la Clínica Médica Ángel del Mar, las cuales fueron negativas la I-VPH y cuya colposcopia fue negativa para el diagnóstico de neoplasia intraepitelial. Todas las muestras fueron obtenidas bajo consentimiento informado de cada una de las mujeres que participaron en el estudio.

8.1 Tipificación de muestras citológicas de pacientes con NIC-1

Las muestras citológicas de las 25 pacientes con NIC-1 fueron positivas para la I-VPH: 11 presentaron infección por VPH tipo 16; 5 presentaron positividad para VPH-52/33/35/58 -cabe mencionar que por la alta similitud entre las secuencias de estos VPHs, estas pacientes podrían presentar, un tipo o varios tipos de VPH-; 4 para VPH-53; 4 para 58; 4 para 61; 3 para VPH- 39; 3 para VPH-54; 2 para VPH-18; 2 para VPH-62;2 para VPH-70; 1 para VPH-56; 1 para VPH-59; y 1 para VPH-83 (Tabla 3). Es importante destacar que 10 pacientes presentaron coinfecciones por dos o más tipos de VPH. Por otro lado, las 25 mujeres normales fueron negativas a I-VPH, la cual fue corroborada mediante PCR punto final.

Tabla 3. Resultados de la tipificación de muestras de pacientes con NIC-1.

No. de muestra	Tipo de VPH
1	52/ 33/ 35/ 58, 54, 58, 62
2	61; 62
3	16
4	58
5	ND
6	16
7	18
8	ND
9	58
10	54, 18
11	16
12	39
13	53
14	39, 53, 70
15	16
16	59, 52/ 33/ 35/ 58
17	16,54,56,83
18	16
19	16
20	53
21	39, 53, 70
22	16
23	16, 52/33/35/58, 61
24	16, 52/33/35/58, 61
25	16, 52/33/35/58, 58, 61

*ND: no determinado

8.2 Expresión de CD39 y CD73 en citologías exfoliativas de NIC-1.

Debido a que la generación de adenosina extracelular tiene un papel importante en la supresión de la respuesta inmune antitumoral en pacientes con cáncer, la sobre-expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 que se encargan de generar adenosina a partir de los nucleótidos ATP, ADP y AMP respectivamente, se ha considerado como una vía de inmunosupresión en estos pacientes, por tanto la detección de estas moléculas en neoplasias cervicales intraepiteliales puede ser de gran importancia en el pronóstico de la enfermedad. Con la finalidad de analizar la expresión de CD39 y de CD73 en muestras citológicas cervicales de pacientes con NIC-1, se realizaron tinciones inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD39 y anti-CD73. Para ello, se utilizaron muestras cervicales de epitelio cervical de donadoras normales, para contrastarlas con las obtenidas de las pacientes y células tumorales de CaCU derivadas de la línea celular INBL, las cuales fueron utilizadas como control positivo de expresión de ambas ectoenzimas.

Las citologías obtenidas de cérvix normal mostraron débil tinción para la expresión de CD39, tanto en citoplasma como en la membrana celular (Fig. 7). No obstante, en el caso de las muestras de pacientes con diagnóstico de NIC-1, la expresión de esta molécula mostró un incremento muy importante, presentando un color marrón intenso (característico de la reacción de la diaminobenzidina). La expresión de CD39 fue visible a nivel de membrana celular, citoplasma y núcleo. Por otra parte, la línea celular INBL como era de esperarse, presentó una expresión intensa de CD39 particularmente en núcleo y citoplasma.

El análisis de la densidad óptica integrada (IOD) en las muestras analizadas reveló que las muestras de cérvix normal tuvieron un promedio de 1,070 unidades, mientras que las muestras de NIC-1 presentaron un promedio de 7,605 unidades y las células tumorales INBL mostraron un promedio de 18,048 unidades (Gráfica 1).

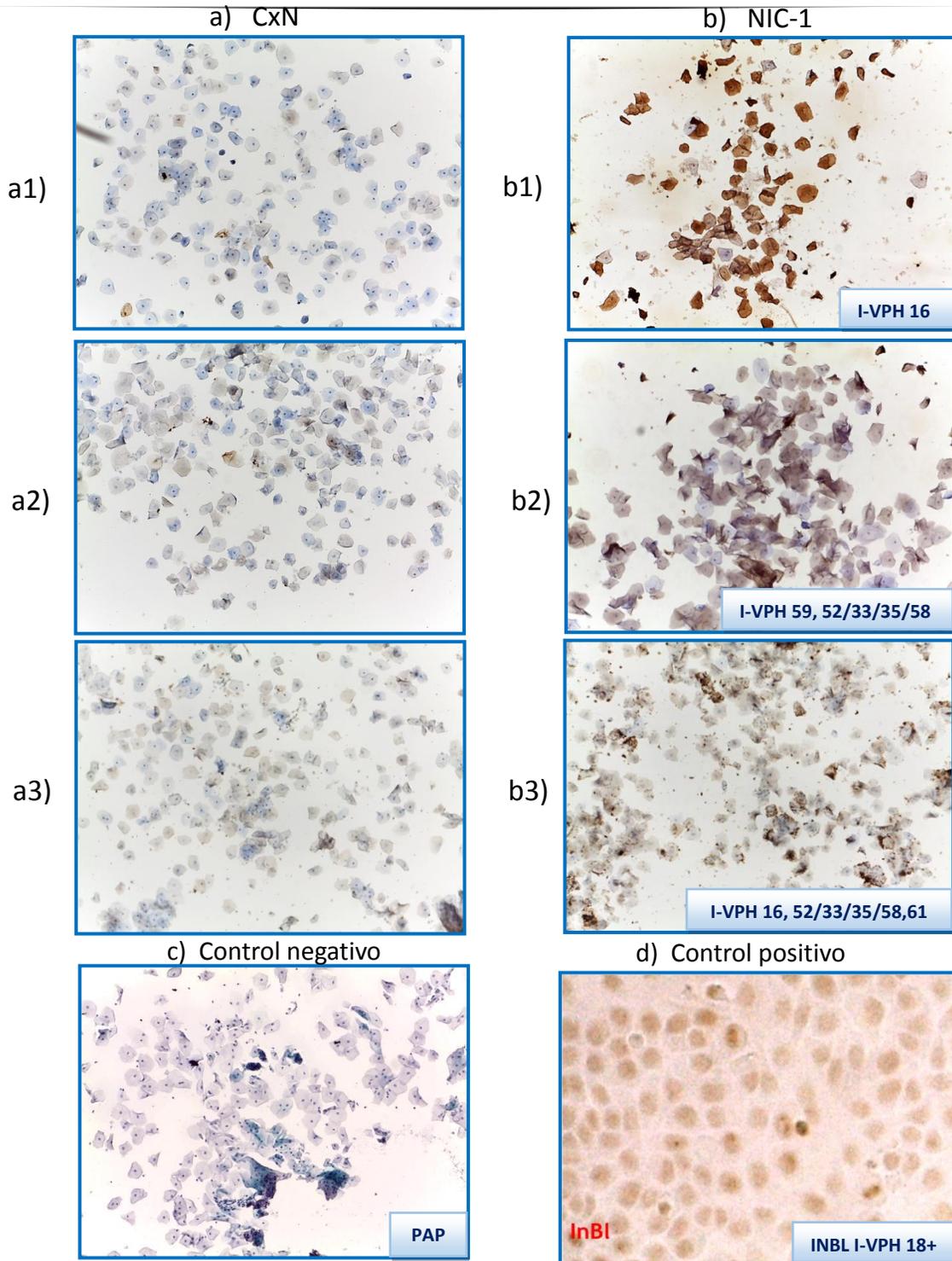
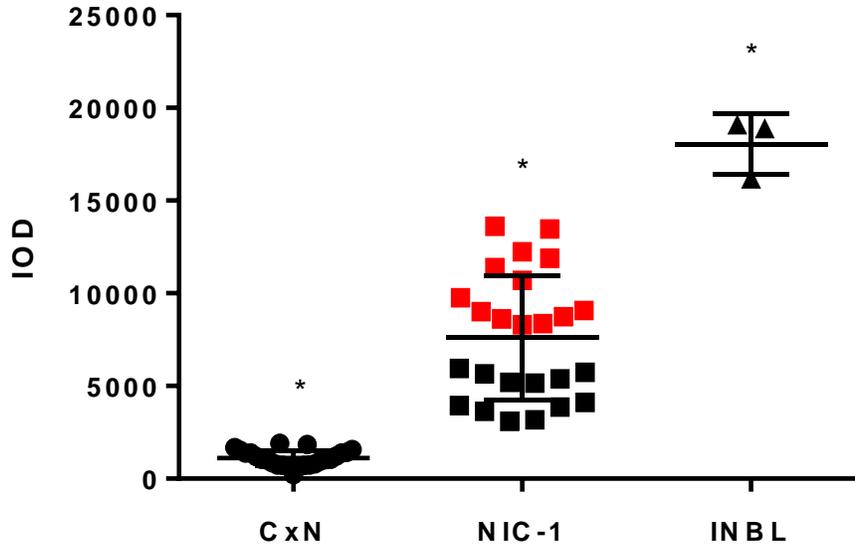


Figura 7. Expresión de CD39 en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunocitoquímicas para determinar la expresión de la ectoenzima CD39, en color marrón, en muestras de citologías de cérvix normal (a1, a2 y a3) y de muestras de pacientes con NIC-1 con infección por VPH-16 (b1), y con infecciones múltiples con diferentes tipos de VPH de alto riesgo (b2 y b3). También se muestra una imagen representativa de una muestra citología teñida mediante la técnica de Papanicolaou (c), control negativo; y la tinción de células tumorales de la línea celular INBL (d), control positivo. **CxN**: cérvix normal; **I-VPH**: infección por virus de papiloma humano; **NIC-1**: neoplasia intraepitelial cervical – 1; **PAP**: Papanicolaou. Objetivo 10X.

Es importante destacar que las muestras de pacientes con infección por VPH-16, -18 y -53, mostraron los valores más altos de IOD para CD39 (Gráfica 1, valores mostrados en rojo).



Gráfica 1. Análisis densitométrico de la expresión de CD39 en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de CD39 en muestras de citologías de pacientes con NIC-1 (n=25); de donadoras normales (n=25) y de células tumorales de CaCu derivadas de la línea celular INBL (n=3). Los datos muestran las medias y las desviaciones estándar de la Densidad Óptica Integrada (IOD) de cada grupo de muestras analizadas. Se destacan en color rojo aquellas muestras de NIC-1 positivas para VPH-16, -18 y -53 y expresan mayor cantidad de CD39. *, denota diferencia significativa a una $p \leq 0.05$.

Por otro lado, el marcador CD73 mostró también una expresión diferencial entre los diferentes grupos de muestras analizadas. En las citologías del epitelio cervical normal se observó baja expresión de este marcador, mientras que en las muestras de NIC-1 la expresión de CD73 fue considerablemente más intensa (Fig. 8). Al analizar cuantitativamente su expresión a través de la IOD, se encontró que las citologías de las muestras de cervix de donadoras normales mostraron una IOD promedio de 1,985 unidades, mientras que las muestras de pacientes con NIC-1 mostraron un promedio de 6,275 unidades, la cual fue significativamente mayor que las de cervix normal. Como era de esperarse, las células INBL mostraron el valor de IOD más alto de 12,845 unidades (Gráfica 2). Es importante destacar que las muestras de pacientes con infección solo por VPH-16, mostraron los valores más altos de IOD para CD73 (Gráfica 2, valores mostrados en rojo).

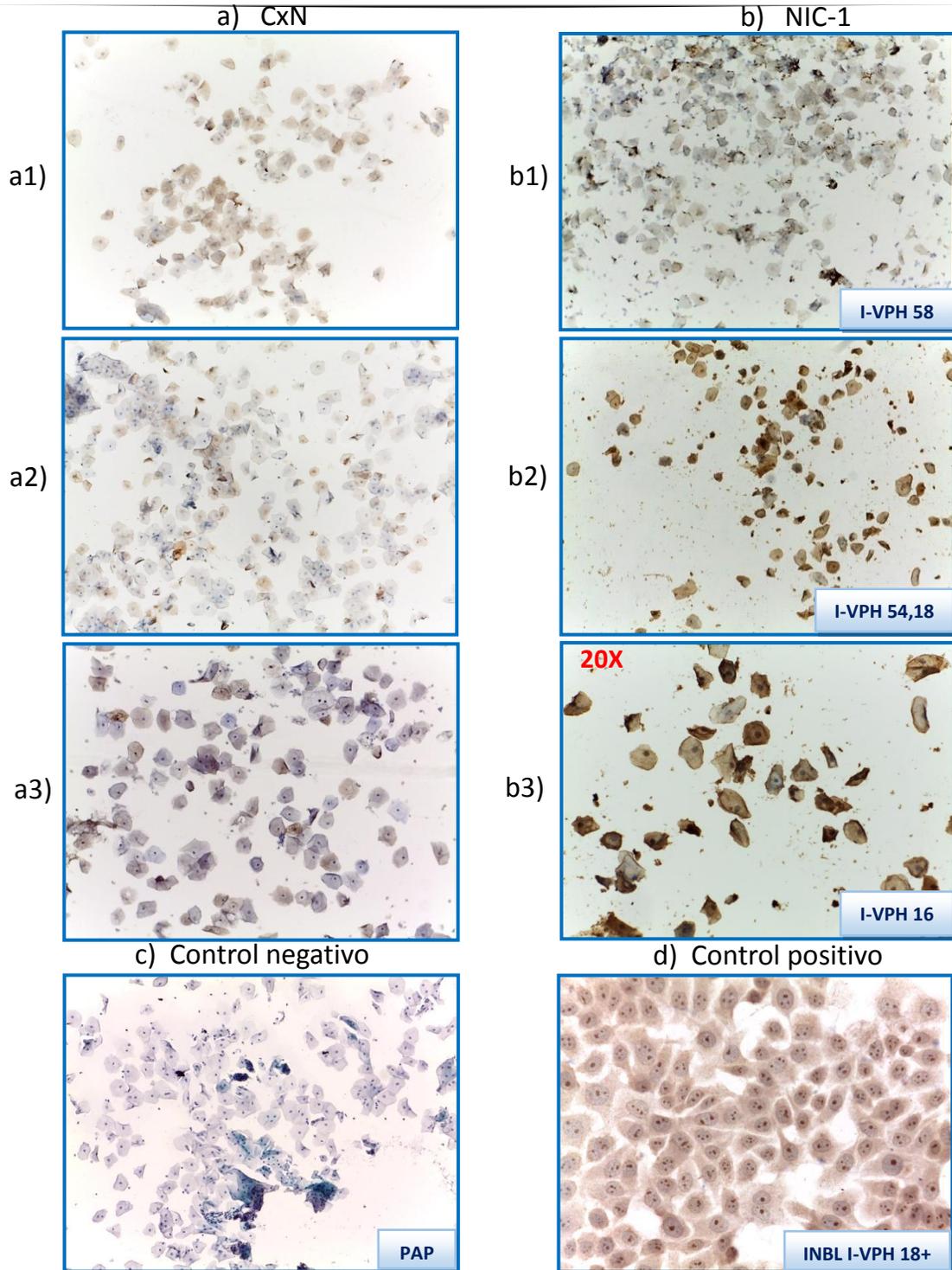
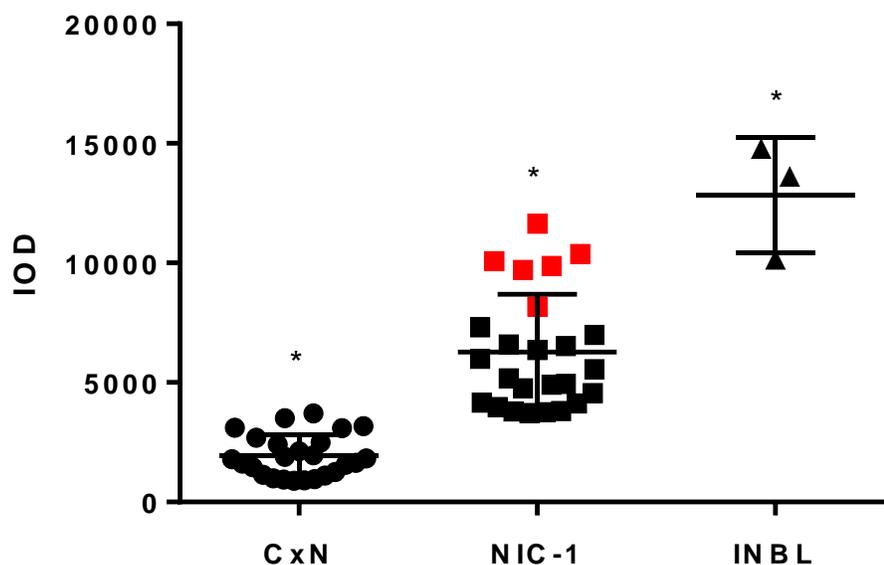


Figura 8. Expresión de CD73 en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunocitoquímicas para determinar la expresión de la ectoenzima CD73, en color marrón, en muestras de citologías de cérvix normal (a1, a2 y a3) y de muestras de pacientes con NIC-1 con infección por VPH-58 (b1), con co-infección por VPH-18 y -54 (b2), y con infección por VPH-16 (b3). También se muestra una imagen representativa de una citología teñida mediante la técnica de Papanicolaou (c), control negativo; y la tinción de células tumorales de la línea celular INBL (d), control positivo. **CxN**: cérvix normal; **I-VPH**: infección por virus de papiloma humano; **NIC-1**: neoplasia intraepitelial cervical – 1; **PAP**: Papanicolaou. Objetivo 10X.



Gráfica 2. Análisis densitométrico de la expresión de CD73 en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de CD73 en muestras de citologías de pacientes con NIC-1 (n=25); de donadoras normales (n=25) y de células tumorales de CaCu derivadas de la línea celular INBL (n=3). Los datos muestran las medias y las desviaciones estándar de la Densidad Óptica Integrada (IOD) de cada grupo de muestras analizadas. Se destacan en color rojo aquellas muestras de NIC-1 positivas para VPH-16 y expresan mayormente CD73. *, denota diferencia significativa a una $p \leq 0.05$.

8.3 Expresión de los receptores para adenosina A2A-R y A2B-R en citologías exfoliativas de NIC-1.

Tomando en cuenta que a través de la interacción de adenosina con los receptores A2A-R y A2B-R, las células tumorales favorecen su proliferación celular y angiogénesis, así como su capacidad de producir factores inmunosupresores como la IL-10 respectivamente, se procedió a determinar la presencia de estos receptores en células obtenidas del epitelio cervical escamoso de donadoras normales y de pacientes con NIC-1.

Al analizar la presencia A2A-R, se observó que en citologías de mujeres con epitelio normal existe baja expresión de este receptor. No obstante, en citologías de pacientes con NIC-1 se observó una mayor expresión del mismo, tanto en membrana celular como en citoplasma, incluso en algunos casos se observó fuerte tinción en el núcleo (Fig. 9).

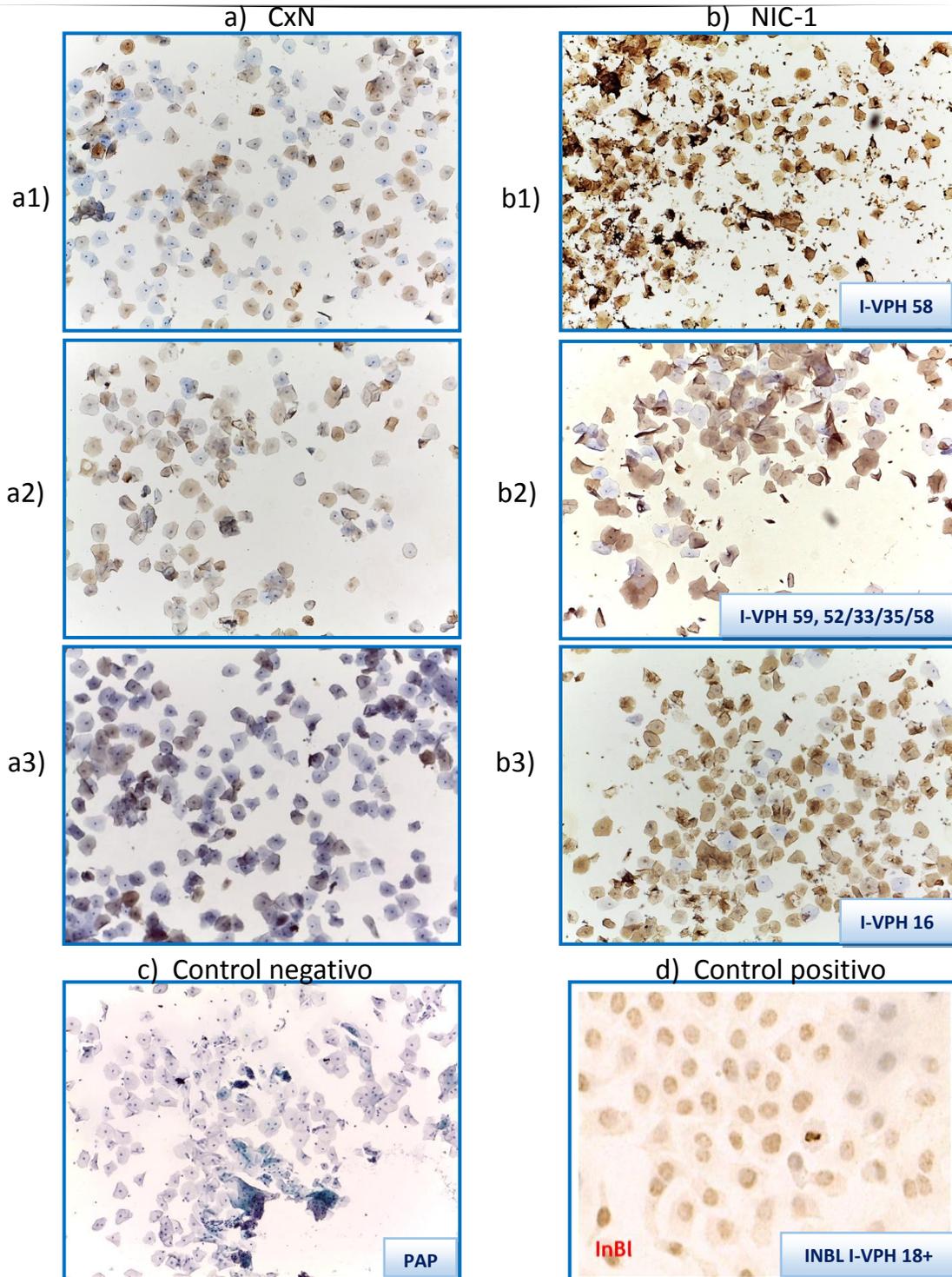
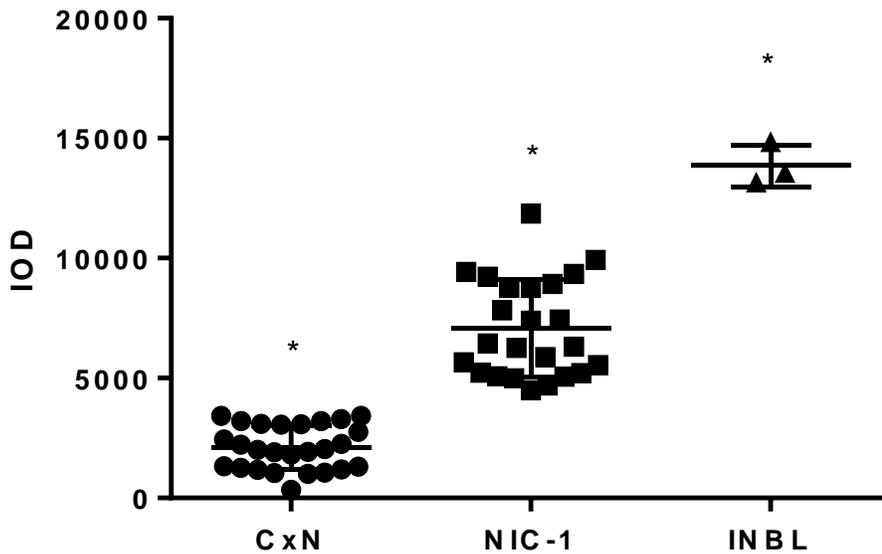


Figura 9. Expresión de A2A-R en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunocitoquímicas para determinar la expresión de A2A-R, en color marrón, en muestras de citologías de cérvix normal (a1, a2 y a3) y de muestras de pacientes con NIC-1 con infección por VPH-58 (b1), con infección múltiple por varios tipos de VPH de alto riesgo (b2), y con infección por VPH-16 (b3). También se muestra una imagen representativa de una citología teñida mediante la técnica de Papanicolaou (c), control negativo; y la tinción de células tumorales de la línea celular INBL (d), control positivo. **CxN**: cérvix normal; **I-VPH**: infección por virus de papiloma humano; **NIC-1**: neoplasia intraepitelial cervical – 1; **PAP**: Papanicolaou. Objetivo 10X.

Al determinar la expresión de A2A-R (Gráfica 3), en las muestras citológicas de pacientes con NIC-1 se encontró que la IOD mostró una diferencia de aproximadamente tres veces más (7,071) respecto al valor de IOD mostrado en las muestras de cérvix normal (2,160); mientras que en las células INBL, la IOD de A2A-R duplicó el valor de IOD determinada en las muestras de las pacientes con NIC-1, mostrando un valor de 14,270.



Gráfica 3. Análisis densitométrico de la expresión de A2A-R en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de A2A-R en muestras de citologías de pacientes con NIC-1 (n=25); de donadoras normales (n=25) y de células tumorales de CaCu derivadas de la línea celular INBL (n=3). Los datos muestran las medias y las desviaciones estándar de la Densidad Óptica Integrada (IOD) de cada grupo de muestras analizadas. *, denota diferencia significativa a una $p \leq 0.05$.

Por otro lado, en el caso particular de la expresión de A2B-R en las citologías exfoliativas de las muestras de cérvix normal y de NIC-1, se observó tinción muy similar entre las muestras citológicas de ambos grupos, en especial en la membrana celular y en el citoplasma (Fig. 10). De hecho los valores de IOD fueron aproximados entre ambos grupos de muestras, mostrando un valor de 1,200 para cérvix normal y 2,000 para NIC-1: sin embargo, las células tumorales INBL mostraron fuerte expresión de este receptor, mostrando un valor promedio de 13,500 de IOD (Gráfica 4).

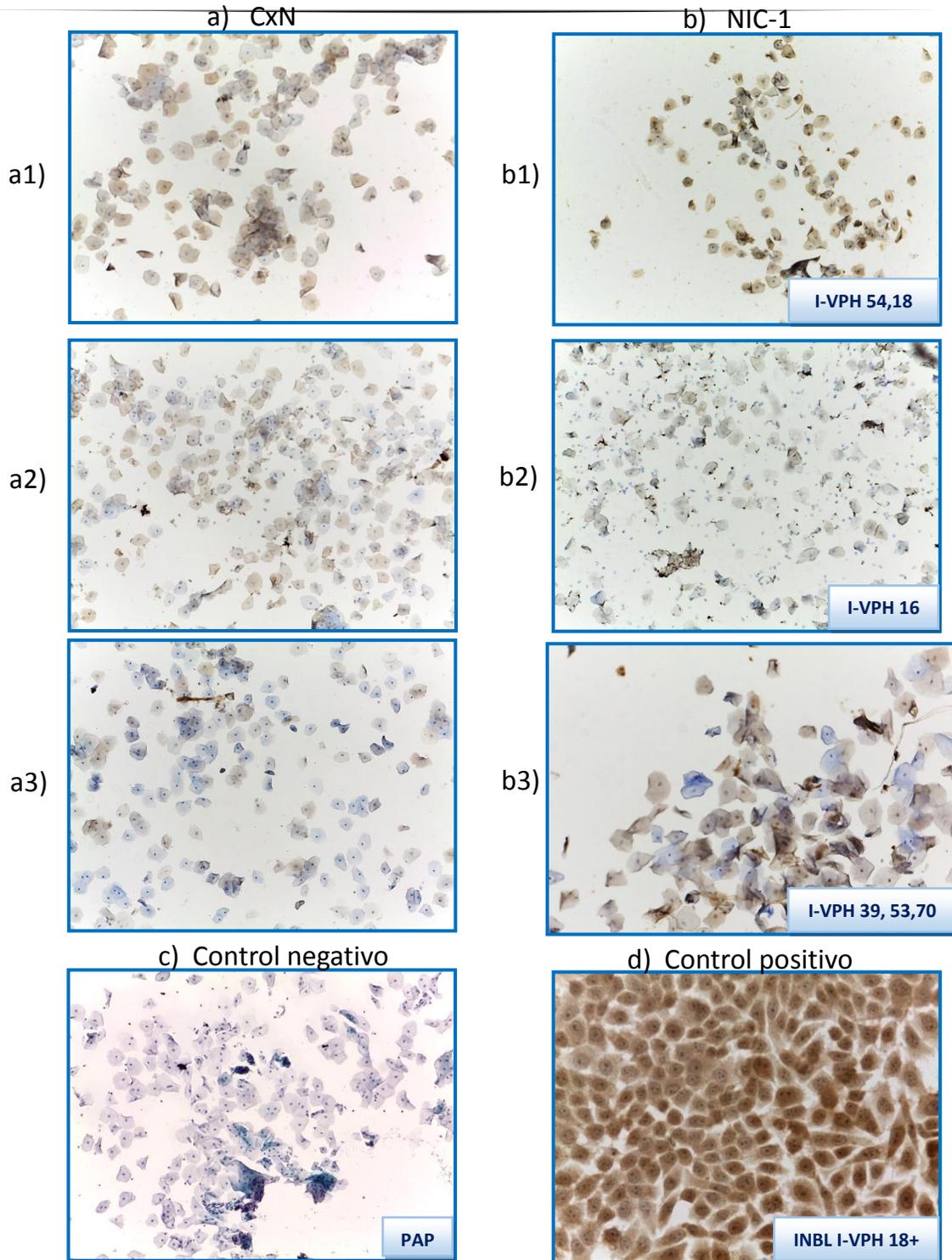
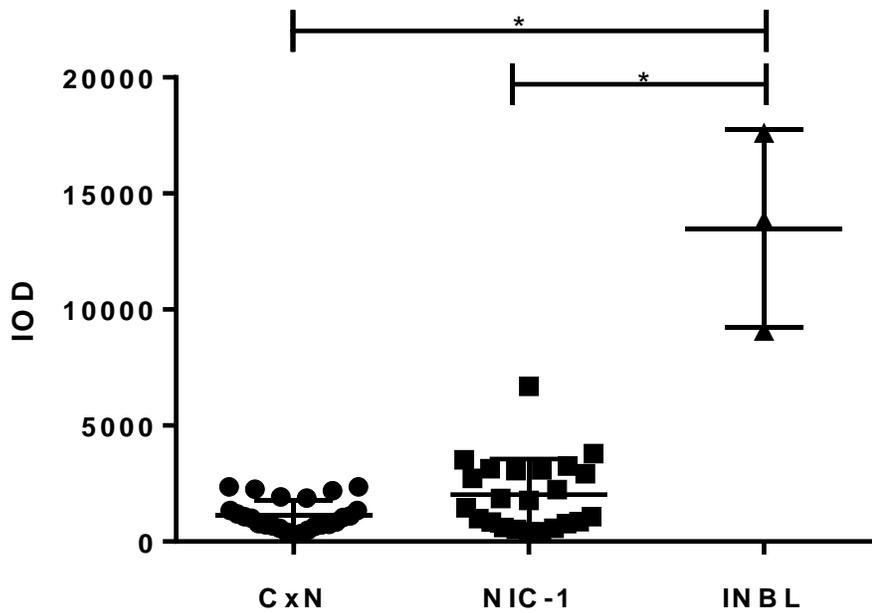


Figura 10. Expresión de A2B-R en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunocitoquímicas para determinar la expresión de A2B-R, en color marrón, en muestras de citologías de cérvix normal (a1, a2 y a3) y de muestras de pacientes con NIC-1 con infección por VPH-18 y -54 (b1), con infección por VPH-16 (b2), y con infección múltiple por varios tipos de VPH de alto riesgo (b3). También se muestra una imagen representativa de una citología teñida mediante la técnica de Papanicolaou (c), control negativo; y la tinción de células tumorales de la línea celular INBL (d), control positivo. **CxN**: cérvix normal; **I-VPH**: infección por virus de papiloma humano; **NIC-1**: neoplasia intraepitelial cervical – 1; **PAP**: Papanicolaou. Objetivo 10X.



Gráfica 4. Análisis densitométrico de la expresión de A2B-R en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de A2B-R en muestras de citologías de pacientes con NIC-1 (n=25); de donadoras normales (n=25) y de células tumorales de CaCu derivadas de la línea celular INBL (n=3). Los datos muestran las medias y las desviaciones estándar de la Densidad Óptica Integrada (IOD) de cada grupo de muestras analizadas. *, denota diferencia significativa a una $p \leq 0.05$.

8.4 Expresión de IL-10 en citologías exfoliativas de NIC-1.

Se sabe que la producción de interleucina 10 juega un papel muy importante en la supresión de la respuesta inmune tanto en neoplasias precursoras como en tumores avanzados de CaCu (Wang *et al.*, 2013), por lo cual se procedió a analizar la expresión de esta citocina en muestras citológicas de pacientes con NIC-1 y con I-VPH de alto riesgo. Al determinar la expresión de IL-10 en las citologías exfoliativas tanto en las muestras citológicas de donadoras normales como de pacientes con NIC-1, se encontró una tinción muy tenue (Fig. 11).

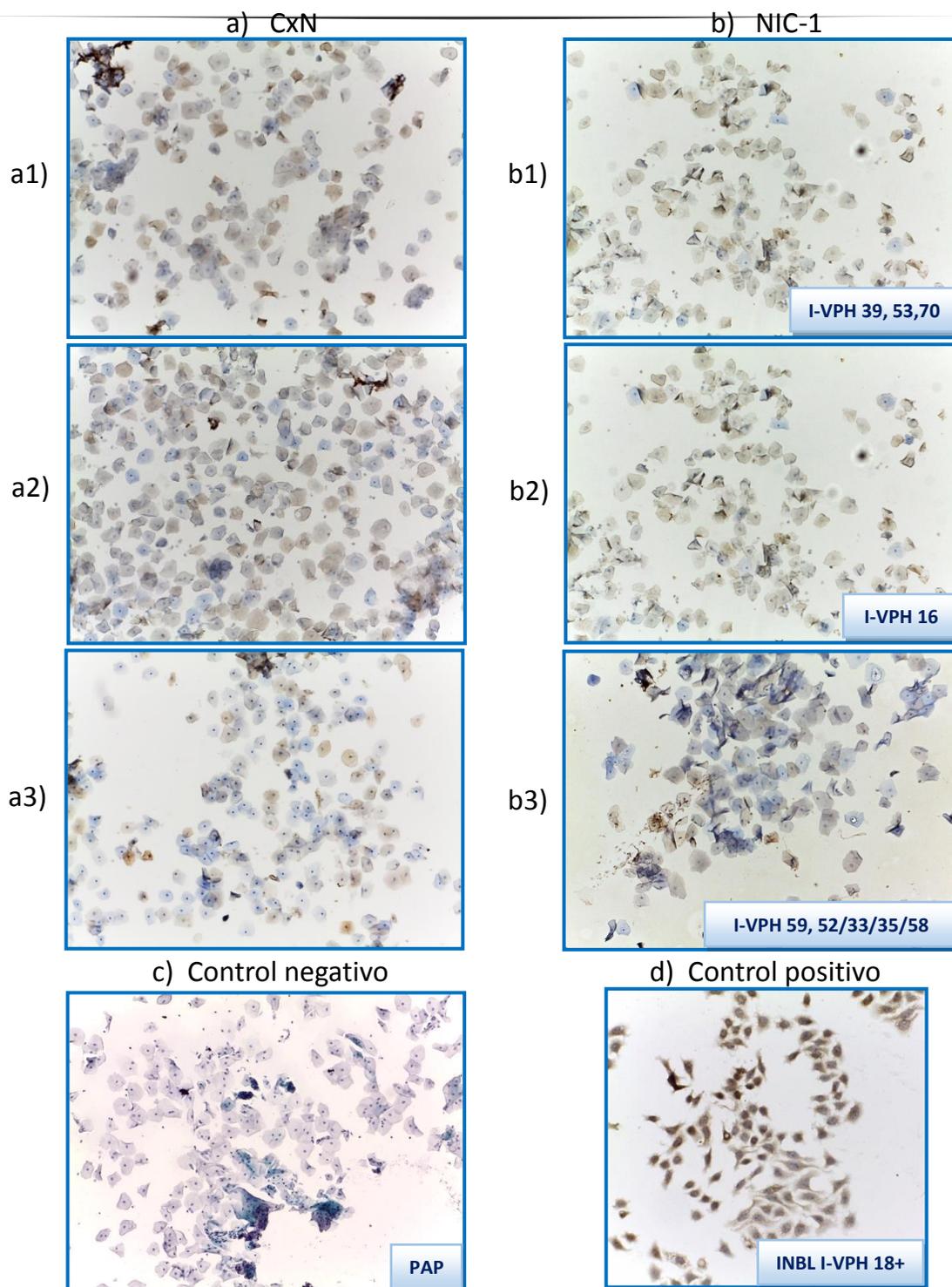
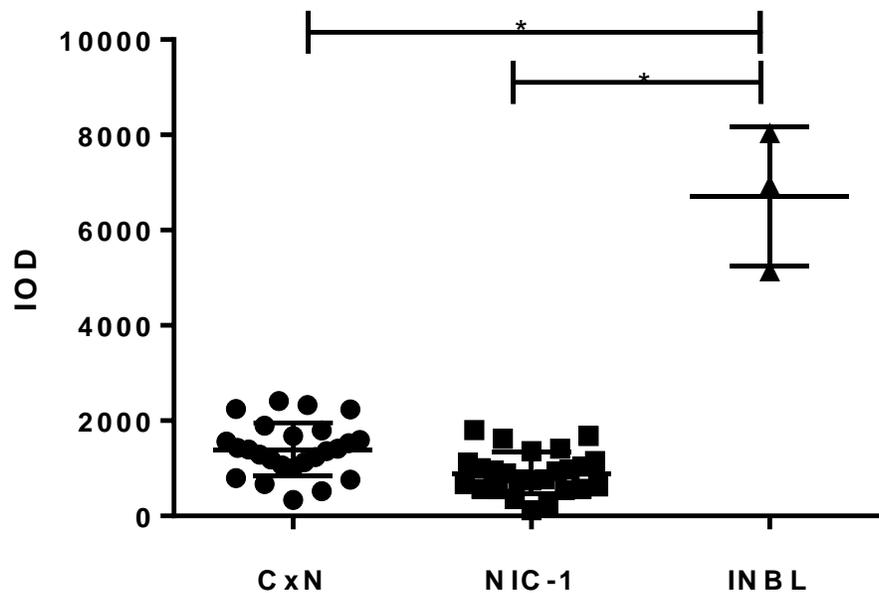


Figura 11. Expresión de IL-10 en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunocitoquímicas para determinar la expresión de IL-10, en color marrón, en muestras de citologías de cérvix normal (a1, a2 y a3) y de muestras de pacientes con NIC-1 con infecciones múltiples por VPH de alto riesgo (b1, b3), con infección por VPH-16 (b2). También se muestra una imagen representativa de una citología teñida mediante la técnica de Papanicolaou (c), control negativo; y la tinción de células tumorales de la línea celular INBL (d), control positivo. **CxN**: cérvix normal; **I-VPH**: infección por virus de papiloma humano; **NIC-1**: neoplasia intraepitelial cervical – 1; **PAP**: Papanicolaou. Objetivo 10X.

Los valores de IOD determinados en ambos casos fueron muy similares: las muestras de cérvix normal mostraron un IOD promedio de 1,400; mientras que las muestras de NIC-1 de 1,000, por lo que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de IL-10 entre ambos grupos de muestras. No obstante, como se esperaba, las células INBL mostraron una fuerte expresión de esta citocina, debido a que su IOD promedio fue de 6,800, lo que sugiere que dicha citocina es liberada en estadios más avanzados de la enfermedad (Gráfica 5).



Gráfica 5. Análisis densitométrico de la expresión de IL-10 en citologías cervicales de pacientes con NIC-1 y donadoras normales. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de IL-10 en muestras de citologías de pacientes con NIC-1 (n=25); de donadoras normales (n=25), y de células tumorales de CaCu derivadas de la línea celular INBL (n=3). Los datos muestran las medias y las desviaciones estándar de la Densidad Óptica Integrada (IOD) de cada grupo de muestras analizadas. *, denota diferencia significativa a una $p \leq 0.05$

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Recientemente se ha descrito que la vía adenosinérgica, en la cual se genera adenosina a través de la fosfohidrólisis de los nucleótidos ATP, ADP y AMP por acción de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 que actúan de manera secuencial, es una vía que suprime la respuesta inmune antitumoral y favorece la proliferación y metástasis de las células tumorales (Resta *et al.*, 1998; Beavis *et al.*, 2012; Bastid *et al.*, 2013; Robson *et al.*, 2006). El incremento de la expresión de CD39 y CD73 se ha descrito en varios tipos de cáncer, en su mayoría asociados a malos pronósticos; sin embargo, su expresión en CaCU y en lesiones pre-cancerosas del cérvix es escasa.

Nuestro grupo de trabajo previamente ha determinado la expresión y actividad funcional de CD73 en líneas celulares derivadas de CaCU, encontrando que las células tumorales positivas a la I-VPH mostraron una mayor expresión de CD73 en membrana, citoplasma y núcleo, además de tener mayor capacidad para generar adenosina a partir de AMP, en relación a las líneas negativas a I-VPH; (Titla, 2012; Ávila, 2011; Ávila 2014). Por lo cual resulta interesante conocer si en lesiones precancerosas ya se presenta una sobre-expresión tanto de CD73 como de CD39 en relación al cérvix normal. En consecuencia, en el presente trabajo de investigación se analizó la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 en citologías exfoliativas de mujeres libres de I-VPH y de pacientes con neoplasias intraepiteliales cervicales de grado 1 (NIC-1).

De acuerdo a nuestros resultados se encontró que existe un aumento significativo en la expresión de los marcadores CD39 y CD73 en citologías de pacientes con NIC-1 respecto a las citologías de cérvix normal. Además, de manera muy interesante, la expresión de estos marcadores fue mayor en aquellas muestras positivas a la infección por VPH de alto riesgo, particularmente aquellas positivas a VPH-16 y VPH-18. El incremento en la expresión de CD39 y CD73, se ha reportado en diversos modelos tumorales experimentales, por ejemplo el grupo de Aliagas y colaboradores (2014), analizaron la expresión de CD39 y CD73, tanto

de la proteína como del gen y su actividad enzimática en adenocarcinomas endometriales humanos y sus homólogos, encontrando altos niveles de expresión de ambas enzimas que correlacionaba con el grado de avance del tumor. En otro experimento muy interesante, llevado a cabo por el grupo de investigación de Allard y colaboradores (2013), se determinó que la alta expresión de CD73 impulsada por el factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1), contribuyó a la angiogénesis tumoral, mediante un incremento en la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que favoreció el crecimiento y migración de células tumorales. En otro estudio, un modelo *in vitro*, se encontró que las oncoproteínas de VPH-16 (E6 y E7) contribuyen al aumento de la actividad angiogénica en células de CaCU a través de la expresión de HIF-1 y VEGF (Tang *et al.*, 2007). Lo cual permite sugerir que HIF-1, además de favorecer la angiogénesis tumoral en el CaCu, puede participar en la sobre-expresión de CD39 y CD73 en las células con I-VPH y en las células tumorales, por lo cual será interesante analizar en estudios posteriores, si la mayor expresión de CD73 en muestras de pacientes con VPH de alto riesgo se asocian con mayor expresión de HIF-1.

Por otro lado, la adenosina producida por las células tumorales regula diversos aspectos tales como la proliferación de las propias células tumorales, la angiogénesis en el tumor y la metástasis a través de la estimulación de sus receptores A2A-R y A2B-R (Allard *et al.*, 2013). Diversos autores, han reportado la presencia de estos receptores de adenosina en distintos tipos de cáncer (Gessi *et al.*, 2001; Merighi *et al.*, 2001; Hillion *et al.*, 2002; Mundell and Kelly, 1998; Mayne *et al.*, 2001; van der Ploeg *et al.*, 1996; Tey *et al.*, 1992; Gessi *et al.*, 2010; Etique *et al.*, 2009 ; Feoktistov *et al.*, 2003; Merighi *et al.*, 2007; Fiebich *et al.*, 1996), pero hasta el momento no se ha determinado su presencia en tejidos de CaCU.

Nuestro grupo de trabajo ha determinado a través de ensayos de inmunocitoquímica la presencia de A2A-R en líneas celulares derivadas de CaCU, encontrando que las líneas celulares positivas para la infección de VPH-16 y VPH-

18, mostraron una mayor expresión de este receptor en membrana, citoplasma y núcleo, en relación a las líneas VPH negativas (Titla, 2012). En el presente trabajo, se encontró una mayor expresión de A2A-R en las citologías de pacientes positivas a la I-VPH y con NIC-1, con respecto a las citologías de donadoras normales. Esto concuerda con diversos reportes, como el establecido por Ahmad y colaboradores (2009), en donde se determina que la expresión de A2A-R incrementa durante los estadios tempranos de cáncer pulmonar para promover el crecimiento de vasos sanguíneos dentro del tumor, e impulsar la proliferación y el crecimiento tumoral. En ese estudio también se encontró un aumento en la expresión de A2A-R en células endoteliales debido a la activación del factor inductor de hipoxia 2α (HIF- 2α). De hecho, la expresión de A2A-R en células endoteliales promueve la proliferación celular, migración y síntesis de factores importantes para el crecimiento angiogénico, como el factor de crecimiento endotelial vascular, lo que sugiere que este receptor está ampliamente implicado en la angiogénesis y la vasodilatación tumoral. Por otro lado, se ha evaluado que al utilizar antagonistas de A2A-R, se mejora la vasodilatación de vasos sanguíneos intratumorales, lo cual mejora la entrega de drogas anticancerígenas al tejido tumoral (Montesinos *et al.*, 2002; Leibovich *et al.*, 2002; Luty and McLeod, 2003; Sexl *et al.*, 1997). También, se ha demostrado, que en células MCF7 (derivadas de cáncer de mama), la expresión de A2A-R puede facilitar la transcripción de receptor de estrógenos y así promover la proliferación celular (Etique *et al.*, 2009)

Por otro lado, en nuestro estudio observamos que la presencia de A2B-R en citologías de pacientes con NIC-1 e infección por VPH fue muy baja y que su expresión no fue significativamente diferente a la detectada en citologías de donadoras normales; sin embargo, las células tumorales INBL mostraron alta expresión de este receptor. En otro estudio realizados por nuestro grupo de trabajo, se encontró que la expresión de A2B-R incrementa en relación con el grado de avance del tumor (Torres-Pineda, 2015), lo que permite sugerir que la presencia de otros factores inducidos en estadios más avanzados de la

enfermedad podrían promover la expresión de este receptor en las células tumorales.

La expresión del receptor A2B en células tumorales se ha asociado con el crecimiento tumoral, ya que estimula la liberación de VEGF por varios tipos celulares, incluidos músculo liso vascular, células endoteliales y células inmunes (Ryzhov *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado, a través de análisis de inmunohistoquímica, un incremento en la expresión de A2B-R en secciones de tejido tumoral colorrectal comparado con tejido normal de colon. Asimismo, se observó que la inhibición farmacológica del receptor A2B, mediante el antagonista selectivo MRS1754, redujo el crecimiento tumoral (Ma *et al.*, 2010). De manera similar, se ha mostrado una alta expresión de A2B-R en células de cáncer de próstata dependientes e independientes de andrógenos y se ha asociado que la activación del A2B-R favorece la proliferación celular, sin embargo, el mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado (Wei *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha reportado la asociación entre la liberación de adenosina y su interacción con su receptor A2B, para inducir la producción de IL-10 por células de la microglia (Koscsó *et al.*, 2012). La expresión de IL-10 en CaCU se ha correlacionado directamente con el grado de evolución de las lesiones cervicales y se ha asociado con la presencia de infección por VPH (Clerici *et al.*, 1987; Bhairavabhotla *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Bermúdez y colaboradores (2008), se encontró una correlación entre la expresión del gen de IL-10 y la infección por VPH en CaCU, además de un incremento en su expresión con respecto al grado de avance de la enfermedad. Esto concuerda con otros estudios, como el de Azar y colaboradores (2004), donde muestra un incremento de IL-10 conforme progresa la neoplasia. Todos estos estudios sugieren que la relación entre la expresión de IL-10 y el estado de CaCU es muy estrecha y contribuye por tanto a la generación de un microambiente de inmunosupresión que favorece la progresión tumoral. En el presente estudio encontramos que la expresión de IL-10 en las citologías de cérvix normal y de NIC-1 fue muy baja en relación a la detectada en células tumorales de CaCU, concordando con lo ya

publicado, donde se demuestra que en etapas tempranas del CaCU la producción de IL-10 es menor a los demás estadios; sugiriendo así, que su expresión es inducida probablemente por otros factores que se producen durante el desarrollo de la enfermedad, tal como TGF- β 1 como recientemente se ha propuesto (Torres-Poveda *et al*, 2014).

Finalmente, tomando en consideración los resultados obtenidos, el presente trabajo exhibe por primera vez el aumento en la expresión de CD73, CD39 y A2A-R en muestras de citologías exfoliativas de pacientes diagnosticadas con NIC-1 y su relación con el tipo de VPH.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- Las ectoenzimas CD39 y CD73 se encuentran mayormente expresadas en células del epitelio escamoso cervical de pacientes con NIC-1 e infección por VPH-AR, en comparación con células de epitelio cervical normal.
- Se encontró una mayor expresión de A2A-R en el citoplasma y membrana de células del epitelio escamoso cervical de pacientes con NIC-1, en comparación con células de epitelio cervical normal.
- No existe un aumento de la expresión de A2B-R e IL-10 en células del epitelio escamoso cervical de pacientes con NIC-1, en relación a células de epitelio cervical normal.
- Estos resultados nos permiten sugerir que la expresión incrementada de las ectonucleotidasas CD73 y CD39 y del A2A-R en las etapas tempranas de la enfermedad como NIC-1, puede constituir una vía para favorecer el crecimiento de las células tumorales y la supresión de la respuesta inmune local, a través de la generación de adenosina.

11. PERSPECTIVAS

En nuestro modelo experimental encontramos un aumento en la expresión de CD39, CD73 y A2A-R en citologías de pacientes con NIC-1, sugiriendo que la producción de adenosina y su recaptación es importante para el desarrollo tumoral, lo cual nos permite cuestionar futuros campos de investigación como lo son:

- * Determinar la actividad funcional de A2A-R en queratinocitos o en líneas celulares derivadas de CaCu para favorecer la proliferación y crecimiento tumoral.
- * Determinar los factores que regulan la expresión de CD39 y CD73 y el papel de HIF-2 α .
- * Determinar si existe una asociación entre la expresión de CD39-CD73- HIF-1, A2A-R y VEGF empleando un modelo tumoral de CaCu.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH y Pillai S. (2012). Inmunología celular y molecular. 7ª edición en español. Ed. Elsevier, Madrid, España.
- Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, Franklin WA, Bridges JP, Schaack JB, Colgan SP and White CW. (2009). Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 α in pulmonary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 106:10684–9.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Mrogan D, Raff M, Roberts K y Walter P. (2014). Molecular biology of the cell. 6ª edición. Ed. Garland Science. New York, EU.
- Albini A and Sporn MB. (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews Cancer*. 7:139-47.
- Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E and Martín-Satué M. (2014). High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators of Inflammation*. 1: 1-8.
- Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I and Stagg J. (2013) Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*. 134:1466-73.
- Alonso P, Lazcano EC and Hernández M. (2005). Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. D.F., México.
- Anaya JM, Shoenfeld Y, Correa PA, García M and Cervera R. (2005). Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. 1ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia.
- Angulo MM, Martínez-Amores B, Navarro F and Álvarez-Mon M. (2009). Cáncer de cérvix. *Medicine*. 10(24):1606-12.
- Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P and Haskó G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading roles for adenosine. *Nature Reviews Cancer*. 13: 842-57.
- Ávila Ibarra, LR. (2011). Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa o CD73 (EC3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino. *Tesis de licenciatura*. UNAM. México, D.F.
- Ávila Ibarra, LR. (2014). Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina) como mecanismo inmunosupresor en células tumorales de cáncer de cuello uterino. *Tesis de Maestría*. Programa de Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM.
- Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M and Sasagawa T. (2004). Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Human Pathology*. 35:1376-84.
- Baldauf JJ, Averous G, Baulon E, Thoma V, Talha-Vautravers A, Sananes N and Akladios YC. (2013). Neoplasias intraepiteliales del cuello uterino. *EMC-Ginecología y Obstetricia*. 49(3): 1-23.
- Barnard P and McMillan NA. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*. 259:305-13.

- Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF and Bensussan A. (2013). ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 32(14): 1743-51.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK and Smyth MJ. (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*. 33(5): 231–7.
- Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B and Nowak MA. (2007). Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Computational Biology*. 3(11):e225.
- Bermudez-Morales VH, Gutiérrez LX, Alcocer-González JM, Burguete A and Madrid-Marina V. (2008). Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Investigation*. 26:1037-1043.
- Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Alcocer-González JM, Moreno J and Madrid-Marina V. (2011). IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 4:369-75.
- Bhairavabhotla RK, Verm V, Tongaonkar H, Shastri S, Dinshaw K and Chiplunkar S. (2007). Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 44: 350-6.
- Biswas PS, Pedicord V, Ploss A, Menet E, Leiner I and Pamer EG. (2007). Pathogen-Specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10. *Journal of Immunology*. 179:4520-8.
- Blackburn MR, Vance CO, Morschl E and Wilson CN. (2009). Adenosine receptors and inflammation. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 193: 215-69.
- Bosch FX, Lorinc Z A, Muñoz N, Meijer CJ and Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 55:244-65.
- Bolpetti A, Silva J, Villaand L and Lepique A. (2010). Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunology*. 11:1-13.
- Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen M, Glanville S, Telford N, Little A, Davidson J, Jimenez P, Ruiz F, Garrido F and Stern P. (2000). Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens*. 55: 401-11.
- Carreras R, Xercavins J and Checa MA. (2008). Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero. 1ª edición. *Ed Médica Panamericana*. Madrid, España.
- Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE and Schiffman M. (2002). A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *Journal of the National Cancer Institute*. 94 (18): 1406-14.
- Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, Ladoire S, Derangère V, Vincent J, Masson D, Robson SC, Eberl G, Pallandre JR, Borg C, Ryffel B, Apetoh L, Rébé C and Ghiringhelli F. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. 36 (3): 362–73.

- Chan ES and Crostein BN. (2010). Adenosine in fibrosis. *Modern Rheumatology*. 20(2): 114-122.
- Chang YE and Lamins LA. (2000). Microarray analysis identifies interferón-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *Journal of Virology*. 501:139-45.
- Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR and Chow LT. (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes & Development*. 9:2335-49.
- Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trwabatonni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G and Clerici E. (1987). Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute*. 89: 185-7.
- Clifford G, Franceschi S, Díaz M, Muñoz N and Villa LL. (2006). Chapter 3: HPV type distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 24: S26-34.
- Couper KN, Blount DG and Riley EM. (2008). IL-10: The master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 180 (9): 5771-7.
- Curtis H, Barnes NS, Schnek A and Flores G. (2007). *Biología*. 7ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V, Strom T and Robson S. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*. 204: 1257-65.
- Deaglio S and Robson SC. (2011). Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances in Pharmacology*. 61, 301–32.
- De Villiers EM. (2001). Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papers and Reports*. 12:57–63.
- De Villiers EM. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 445 (1-2): 2-10.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324:17–27.
- Doorbar J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 32:S7-15.
- Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110: 525-41.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo I, Stoler M, Broker and Stanley M. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 30S: F55-70.
- Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS and Markowitz LE. (2007). Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 297:813-9.

- Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB and Robson SC. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling*. 3(1-2): 171–180.
- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC and Colgan SP. (2003). Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: Role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 198: 783–96.
- Eltzschig HK, Köhler D, Eckle T, Kong T, Robson SC and Colgan SP. (2009). Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood*. 113: 224–32.
- Eluf-Neto J and Nascimento CM. (2001). Cervical cancer in Latin America. *Seminars in Oncology*. 28: 188-97.
- Enjyoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC and Rosenberg RD. (1999). Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Medicine*. 5: 1010–1017.
- Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J and Flament S. (2009). Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER alpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Reports*. 21:977-81.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K and McMillan NA. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology*. 71: 2449-2456.
- Evans M, Borysiewicz L, Evans A, Rowe M, Jones M, Gileadi U, Cerundolo V and Man S. (2001). Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16- E6. *Journal of Immunology*. 167: 5420-28.
- Evans MF, Peng Z, Clark KM, Adamson CS, Ma XJ, Wu X, Wang H, Luo Y and Cooper K. (2014). HPV E6/E7 RNA *In situ* hybridization signal patterns as biomarkers of three-tier Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade. *PLoS ONE*. 9 (e91142): 1-12.
- Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE and Biaggioni I. (2003). Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circulation Research*. 92: 485-92.
- Fiebich BL, Biber K, Gyufko K, Berger M, Bauer J and van Calker D. (1996). Adenosine A2b receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astroglia cells. *Journal of Neurochemistry*. 66: 1426-31.
- Finzer P, Aguilar-Lemarroy A and Rösl F. (2002). The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Letters*. 188: 15-24.
- Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D and Lambert PF. (2000). The human papillomavirus type 16 -E7 oncogene is required for the productive stage of the viral cycle life. *Journal of Virology*. 74:6622-31.

- Franco EL, Schlecht NF and Saslow D. (2003). The epidemiology of cervical cancer. *Cancer Journal*. 9: 348-59.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Kloz KN and Linden J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*. 53: 527–52.
- Gabrilovich D, Velders M, Sotomayor E and Kast M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *Journal of Immunology*. 166: 5398-5406.
- Garner-Hamrick PA, Fostel JM, Chien WM, Banerjee NS, Chow LT, Broker TR and Fisher C. (2004). Global effects of human papillomavirus tipe 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. *Journal of Virology*. 78:9041-50.
- Gessi S, Merighi S, Varani K, Cattabriga E, Benini A, Mirandola P, Leung E, Mac Lennan S, Feo C, Baraldi S and Borea PA. (2007). Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A3 adenosine subtype. *Journal of Cellular Physiology*. 211: 826-36.
- Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S and Borea PA. (2008). The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacology & Therapeutics*. 117: 123-40.
- Gessi S, Sacchetto V, Fogli E, Merighi S, Varani K, Baraldi PG, Tabrizi MA, Leung E, MacLennan S and Borea PA. (2010). Modulation of metalloproteinase-9 in U87MG glioblastoma cells by A3 adenosine receptors. *Biochemical Pharmacology*. 79: 1483-95.
- Gessi S, Varani K, Merighi S, Morelli A, Ferrari D, Leung E, Baraldi PG, Spalluto G and Borea PA. (2001). Pharmacological and biochemical characterization of A3 adenosine receptors in Jurkat T cells. *British Journal of Pharmacology*. 134: 116-26.
- Haskó G and Pacher P. (2008). A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of Leukocyte Biology*. 83: 447-55.
- Haskó G, Linden J, Cronstein B and Pacher P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7: 759-70.
- Heine P, Braun N, Sévigny J, Robson SC, Servos J and Zimmermann H. (2001). The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *European Journal of Biochemistry*. 268: 364-73.
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S and Fuxe K. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 18091-7.
- Hua X, Kovarova M, Chason KD, Nguyen M, Koller BH and Tilley SL. (2007). Enhanced mast cell activation in mice deficient in the A2b adenosine receptor. *Journal of Experimental Medicine*. 204: 117-28.

- Huang S, Koshiba M, Apasov S and Sitkovsky M. (1997). Role of A2a adenosine receptor-mediated signaling in inhibition of T cell activation and expansion. *Blood* 90: 1600-10.
- International Agency of Research on Cancer (IARC). (2007). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 90. *Human Papillomaviruses*. Lyon, France.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (ICESCC), Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Collin D, Franceschi S, Goodhill A, Green J, Peto J, Plummer M and Sweetland S. (2006). Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *International Journal of Cancer*. 118: 1481-95.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer (ICESCC), Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Collin D, Franceschi S, Goodhill A, Green J, Peto J, Plummer M and Sweetland S. (2007). Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*. 370: 1609-21.
- Jacobson KA and Gao ZG. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5:247–64.
- Jamison J, Wilson RT and Carson J. (2009). The evaluation of human papillomavirus genotyping in cervical liquid-based cytology specimens; using the Roche Linear Array HPV genotyping assay. *Cytopathology*. 20:242-8.
- Kapojos JJ, van den Berg A, Borghuis T, Banas B, Huitema S, Poelstra K and Bakker WW. (2004). Enhanced ecto-apyrase activity of stimulated endothelial or mesangial cells is downregulated by glucocorticoids in vitro. *European Journal of Pharmacology*. 501: 191–8.
- Karmouty-Quintana H, Xia Y and Blackburn, MR. (2013). Adenosine signaling during acute and chronic disease states. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. 91: 173–81.
- Kindt TJ, Goldsby RA and Osborne BA. (2007). Inmunología de Kuby. 6ª edición en español. Ed. McGraw- Hill Interamericana. EU.
- Kobie J, Shah P, Yang L, Rebhahn J, Fowell D and Mosmann T. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine. *Journal of Immunology*. 177: 6780-6.
- Koscsó B, Csóka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virág L and Haskó G. (2012). Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *Journal of Immunology*. 188:445-53.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N and Aster JC. (2010). Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 8ª edición en español. Ed. Elsevier. Barcelona, España.
- Latini S and Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry*. 79: 463-84.

- Linden, J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 41: 775–87.
- Leibovich SJ, Chen JF, Pinhal-Enfield G, Belem PC, Elson G, Rosania A, Ramanathan M, Montesinos C, Jacobson M, Schwarzschild MA, Fink JS and Cronstein B. (2002). Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin. *American Journal of Pathology*. 160: 2231-44.
- Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL and Colgan SP. (1998). Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *Journal of Experimental Medicine*. 188:1433-43.
- Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM and Yu B. (2013). Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One*. 8: e55487.
- López-Saavedra A. and Lizano M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerologia 1*; 31-55.
- Lutty GA and McLeod DS. (2003). Retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy: a role for adenosine. *Progress in Retinal and Eye Research*. 22: 95–111.
- Ma DF, Kondo T, Nakazawa T, Niu DF, Mochizuki K, Kawasaki T, Yamane T and Katoh R. (2010). Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. *Human Pathology*. 41: 1550–7.
- Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J and Hibma M. (2003). Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *Journal of Virology*. 77:8378-85.
- Mayne M, Fotheringham J, Yan HJ, Power C, Del Bigio MR, Peeling J and Geiger JD. (2001). Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Annals of Neurology*. 49 (6): 727-35.
- Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Simioni C, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG and Borea PA. (2007). Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and interleukin- 8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 72 (2):395-406.
- Merighi S, Varani K, Gessi S, Cattabriga E, Iannotta V, Ulouglu C, Leung E and Borea PA. (2001). Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line. *British Journal of Pharmacology*. 134 (6): 1215-26.
- Milne GR and Palmer TM. (2011). Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor. *Scientific World Journal*. 11:320–39.

- Mindiola R, Caulejas D, Nùñez-Troconis J, Araújo M, Delgado M and Mosquera J. (2008). Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. *Investigación Clínica*. 49:533-545.
- Mirabet M, Herrera C, Cordero OJ, Mallol J, Lluís C and Franco R. (1999). Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *Journal of Cell Science*. 112: 491–502.
- Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enyoji K and Takashima A. (2002). CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nature Medicine*. 8(4):358–365.
- Monsonogo J, Pollini G, Evrard MJ, Sednaoui P, Monfort L, Quinzat D, Dachez R and Syrjänen K. (2008). Linear array genotyping and hybrid capture II assay in detecting human papillomavirus genotypes in women referred for colposcopy due to abnormal Papanicolaou smear. *International Journal of STD & AIDS*. 19:385-92.
- Montesinos MC, Desai A, Chen JF, Yee H, Schwarzschild MA, Fink JS and Cronstein BN. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors. *American Journal of Pathology*. 160 (6): 2009-18.
- Mota F, Rayment M, Chong S, Singer A and Chain B. (1999). The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clinical & Experimental Immunology*. 116: 33-40.
- Mundell SJ and Kelly E. (1998). Evidence for co-expression and desensitization of A2a and A2b adenosine receptors in NG108-15 cells. *Biochemical Pharmacology*. 55 (5) 595–603.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. 348:518-27.
- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A and Gissmann L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24 Suppl 3:S3/1-10.
- Narechania A, Chen Z, DeSalle R and Burk RD. (2005). Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *Journal of Virology*. 79:15503-10.
- Niedergang F, Didierlaurent A, Kraehenbuhl JP and Sirard JC. (2004). Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens. *Trends Microbiology*. 12:79-88.
- Novak I. (2003). ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News in Physiological Sciences*. 18: 12–17.
- Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, Blackburn MR, Biaggioni I, Carbone DP, Feoktistov I and Dikov MM. (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood*. 112: 1822-31.
- O'Brien PM and Campo S. (2002). Evasion of host immunity directed by human papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research*. 88:103-17.

- Parkin DM and Bray F. (2006). Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 24 Suppl 3, S11-25.
- Parkin DM, Whelan SL and Ferlay J. (1997). Cancer incidence in five continents, vol VII. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC.
- Pierce, BA. (2009). Genética. Un enfoque conceptual. 3ª edición, Ed. *Médica Panamericana*. Madrid, España.
- Regueiro JR, López C, González S and Martínez E. (2010). Inmunología. Biología y patología del sistema inmunitario. 4ª edición. Ed. *Médica Panamericana*. Madrid, España.
- Resta R, Yamashita Y and Thompson LF. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunology Reviews*. 161: 95–109.
- Richart, R. (1973). Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology anual*. 8:301-28.
- Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R and Larraín A. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 71:135-40.
- Robson SC, Sevigny J and Zimmermann H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*. 2(2): 409–30.
- Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K and Enjyoji K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*. 31(2): 217–33.
- Romero P, Cerottini JC and Speiser D. (2006). The human T cell response to melanoma antigens. *Advances in Immunology*. 92:187-224.
- Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I and Feoktistov I. (2006). Cross-talk between Gs- and Gq-coupled pathways in regulation of interleukin-4 by A2B adenosine receptors in human mast cells. *Molecular Pharmacology*. 70: 727–35.
- Ryzhov S, Novitskiy SV, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Carbone DP, Biaggioni I, Dikov MM and Feoktistov I. (2008). Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia*. 10:987–95.
- Sexl V, Mancusi G, Holler C, Gloria-Maercker E, Schutz W and Freissmuth M. (1997). Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 5792-9.
- Silverthorn DU, Ober W, Garrison C, Silverthorn AC and Johnson BR. (2014). Fisiología Humana. Un enfoque integrado. 6ª edición en español. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Sirera G, Videla S, Herranz P and Corzo-Delgado JE. (2006). Virus del papiloma humano y virus de la inmunodeficiencia humana/sida. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 24 (Supl. 2): 40-7.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashov D and Ohta A. (2008). Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clinical Cancer Research*. 14(19): 5947-52.

- Sojka D, Huang Y and Fowell D. (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 124: 13-22.
- Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer KM and Smyth MJ. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 107:1547-52.
- Stanley, MA. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 25: 215-22.
- Stanley MA, Pett MR and Coleman N. (2007). HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*. 35 (Pt 6):1456-60.
- Steinau M, Swan DC and Unger ER. (2008). Type-specific reproducibility of the Roche linear array HPV genotyping test. *Journal of Clinical Virology*. 42: 412-4.
- Strand A and Rylander E. (1998). Human papillomavirus. Subclinical and atypical manifestations. *Dermatologic Clinics*. 16: 817-22.
- Sträter, N. (2006). Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signalling*. 2(2):343-50.
- Stubenrauch F and Laimins LA. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology*. 9:379-86.
- Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S and D Le A. (2007). Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 α protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*. 13: 2568-76.
- Tavassoli FA and Devilee P. (2003). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. *IARC Press*. Lyon. pp. 269, 270.
- Tey HB, Khoo HE and Tan CH. (1992). Adenosine modulates cell growth in human epidermoid carcinoma (A431) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 187 (3): 1486-92.
- Titla Vilchis, IJ. (2012). Análisis de la expresión de la ectoenzima CD73 en células tumorales de cáncer cérvico uterino y su efecto en la proliferación celular mediante la vía adenosinérgica. *Tesis de Licenciatura*. UNAM. México, DF.
- Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-García JC and Colgan SP. (2004). Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *Journal of Experimental Medicine*. 200(11): 1395-405.
- Torres-Pineda, DB. (2015) Análisis de la expresión de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) en tumores de cáncer de cuello uterino. *Tesis de Maestría*. Programa de Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM.
- Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O and Madrid-Marina V. (2014). Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World Journal of Clinical Oncology*. 5(4):753-63.
- van Hamont D, van Ham MA, Bakkens JM, Massuger LF and Melchers WJ. (2006). Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test

and the roche linear array HPV genotyping test. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:3122-9.

- van der Ploeg I, Ahlberg S, Parkinson FE, Olsson RA and Fredholm BB. (1996). Functional characterization of adenosine A2 receptors in Jurkat cells and PC12 cells using adenosine receptor agonists. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 353 (3): 250-60.
- Visser J, Nijman H, Hoogenboom B, Jager P, Van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee A and Daemen T. (2007). Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clinical & Experimental Immunology*. 150: 199-209.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 189:12-19.
- Wang Y, Liu XH, Li YH and Li O. (2013). The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. *Biomedical Reports*. 1(3): 347-51.
- Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG and Jacobson KA. (2013). A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signalling*. 9: 271-80.
- Williams ME, Shea CM, Lichtman AH and Abbas AK. (1992). Antigen receptor-mediated anergy in resting T lymphocytes and T cell clones. Correlation with lymphokine secretion patterns. *Journal of Immunology*. 149(6):1921-6.
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T and Sakaguchi S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 322 (5899):271-5.
- Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, St Hilaire C, Seldin DC, Toselli P, Lamperti E, Schreiber BM, Gavras H, Wagner DD and Ravid K. (2006). The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *Journal of Clinical Investigation*. 116 (7):1913-23.
- Yuzlenko O and Kiec-Kononowicz K. (2006). Potent adenosine A1 and A2A receptors antagonists: Recent developments. *Current Medical Chemistry*. 13(30): 3609- 25.
- Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG and Powell JD. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T-cells. *Blood*. 111: 251-9.
- Zhang, B. (2012). CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology*. 1: 67-70.
- Zimmermann, H. (1999). Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends in Pharmacological Sciences*. 20 (6): 231–236.

- Zur Hausen, H. (1982). Human genital cancer; synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events?. *The Lancet*. 320 (8310): 1370–2.

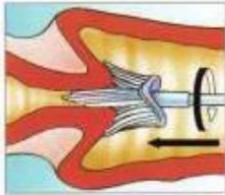
BIBLIOTECA ELECTRÓNICA

- 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].
- INEGI. *Estadísticas a propósito de... día mundial contra el cáncer (4 de Febrero)*. 2014. <http://www.inegi.org.mx/> , [Consulta: 12 de Marzo del 2014].
- WHO. *Cáncer*. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, [Consulta: 1° de Marzo del 2014].

13. APÉNDICE

I. Protocolo para la obtención de citologías exfoliativas con citocepillo.

ThinPrep® Pap Test™ Quick Reference Guide Protocolo

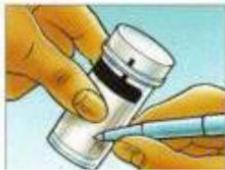


Obtención:

Un muestreo adecuado del cuello uterino se obtiene con un cepillo en forma de escoba. Insertar profundamente las cerdas centrales del cepillo en el canal endocervical, lo suficiente como para permitir que las cerdas más cortas entren en contacto plenamente con el exocervix. Empujar suavemente, y rotar el cepillo en dirección a las manecillas del reloj alrededor de 5-6 veces.



Rápidamente colocar el cepillo en el vial PreservCyt® y retirar el mango con ayuda de la tapa. Dejar el cepillo dentro del vial y cerrar la tapa perfectamente.



En la etiqueta del vial, poner datos de la paciente (nombre o sus iniciales) y fecha correspondiente a la toma de muestra.

II. Método de tinción Papanicolaou

Para realizar esta tinción a laminillas de vidrio con la muestra ya fijada se necesitan seguir los siguientes pasos:

1. Sumergir laminilla en Alcohol 96° durante 15 seg.
2. Agua corriente 10 pasajes.
3. Hematoxilina 40 Seg.
4. Virar en agua corriente hasta que esta quede transparente sin trazas de colorante.
5. Alcohol 96° 10 inmersiones.
6. O G 6 (orange) 40 Seg.
7. Alcohol 96° 10 inmersiones.
8. EA 50 (Eosina amarillenta) 40 Seg.
9. Alcohol 96° 10 inmersiones.
10. Alcohol 100° 10 inmersiones.
11. Alcohol 100°/xilol a/a 10 inmersiones.
12. Xilol 10 inmersiones.
13. Montar en resina.