



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Carrera de Biología.

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental

Zaragoza

Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Inmunobiología

Determinación de la actividad funcional de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 soluble (sCD39 y sCD73) en líneas de cáncer cérvico uterino.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Bióloga

Presenta:

Molina Castillo Gabriela.

Director de tesis: Dr. Alberto Monroy García.

Asesor de Tesis: Dra. María de Lourdes Mora García.



México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein.

“Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama.”

Aristóteles.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de la comunidad universitaria y por haber enriquecido mi educación.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme dentro de mi carrera.

Al Dr. Alberto Monroy García y la Dra. María de Lourdes Mora García por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, agradezco el apoyo y la confianza recibida a lo largo de mi estancia en el laboratorio, así como todos los consejos y comentarios expresados para el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por hacer del laboratorio un ambiente de trabajo agradable, por su amistad y por todos los consejos y la ayuda proporcionada a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Inmunobiología: Azucena, Luis, Vianey, César, Eva, Fany, Víctor, Itzel, Oscar, Estrella, Daniel, Carlos, Janet, Ángeles, Alejandro, Erick y Ana gracias por su apoyo, amistad y por haber hecho el ambiente de trabajo agradable.

A mis sinodales Dr. Benny Weiss Steider, Biól Reynalda Roldan Perez y Dr. Jorge Flavio Mendoza por sus comentarios y observaciones.

Dedicatorias.

A Dios por haberme permitido llegar a cumplir esta meta.

A mis padres Eduardo y Violeta por haberme dado la vida, por su amor, cariño, apoyo incondicional y comprensión a lo largo de toda mi vida, ustedes me han enseñado tanto que no tengo las palabras para expresar todo lo que significan para mí, los quiero mucho. Gracias por ser los mejores padres. Este logro también es de ustedes por que creyeron en mí y me apoyaron en todo momento.

A mis hermanas Violeta y Carina por su amor, cariño, apoyo y por esos momentos de alegría que compartimos juntas, saben que cuentan con mi apoyo incondicional. Las quiero mucho, espero ser un modelo de inspiración para ustedes.

A mis abuelitos José, Lolita y María Luisa "Tita" por su amor, cariño y por todo el apoyo que me han brindado siempre. Los quiero mucho.

A mi tío Higinio por siempre estar presente, y por brindarme su apoyo incondicional.

A todos los integrantes de la Familia Molina y de la Familia Castillo por su apoyo y su cariño

A mis amigos Anita, César, Daniel, Margarita, Rafa por su amistad y momentos de alegría que compartimos a lo largo de la carrera nunca olvidare esos momentos.

Índice

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	3
3. Marco teórico.....	4
3.1 Cáncer.....	4
3.1.2 CaCU y VPH.....	5
3.1.3 VPH.....	6
3.2 Sistema inmune.....	9
3.2.1 Inmunidad Innata.....	10
3.2.2 Inmunidad Adaptativa.....	10
3.2.3 Linfocitos T.....	12
3.3 Respuesta inmune contra CaCU.....	14
3.4 VPH y evasión de la respuesta inmune.....	15
3.5 Vía adenosinérgica.....	17
3.5.1 sCD39 y sCD73.....	21
3.6 Células mesenquimales (MSC).....	22
3.7 Adenosina en la respuesta inmune.....	24
4.- Justificación y Planteamiento del Problema.....	27
5. Hipótesis.....	28
6. Objetivos.....	28
6.1 Objetivo general.....	28
6.2 Objetivos particulares.....	28
7. Metodología.....	29
7.1 Cultivo celular.....	29
7.2 Detección de sCD39 y sCD73 mediante la técnica de ELISA.....	29
7.3 Detección de sCD39 y sCD73 mediante Western-blot.....	30

7.4 Determinación de la actividad catalítica de sCD39 y sCD73 mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	31
7.5 Detección de la actividad catalítica de sCD39 y sCD73 mediante Cromatografía líquida de Ultra Resolución (UPLC).....	32
8. Resultados.....	33
8.1 Células tumorales de CaCu y MSC-CaCu producen sCD39 y sCD73.....	33
8.2 sCD39 y sCD73 producido por las células tumorales de CaCu y MSC CaCu generan adenosina a partir de nucleótidos de adenina.	36
8.3 Cuantificación de adenosina producida por la actividad catalítica de sCD73 contenida en sobrenadantes de células tumorales de CaCu y MSC CaCu.	37
9.- Análisis de resultados.....	41
10.- Conclusiones.....	45
11.- Perspectivas.....	46
12.- Bibliografía.	47

1. Abreviaturas.

ADA	Adenosina desaminasa
Ado	Adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina 5' difosfato
AMP	Adenosina 5' monofosfato
APCP	adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CD	Células Dendríticas del inglés Dendritic Cells
CPA	Célula Presentadora de Antígeno del inglés Antigen Present Cell
CTL	Linfocitos T Citotóxicos del inglés cytotoxic T lymphocyte
D.O	Densidad Óptica
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
GPI	Glicofosfatidilinositol del inglés glycosyl phosphatidylinositol
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
INF	Interferón
KDa	Kilo Daltones
LCR	Región Larga de Control
LIBG	Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado
LIAG	Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad del inglés Major Histocompatibility Complex
MSC	Células Estromales Mesenquimales del inglés Mesenchymal Stem Cell
NK	Células Asesinas Naturales del inglés Natural Killer
POM-1	Polyoxotungstato 1
T reg	Linfocitos T reguladores
TCR	Receptor de célula T, del inglés T-cell receptor
TGF	Factor de Crecimiento Transformante del inglés Transforming Growth Factor
TNF	Factor de Necrosis Tumoral del inglés Tumoral Necrosis Factor

VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular del inglés Vascular Endotelial Growth Factor
VLP	Partícula Tipo Virus del inglés Virus Like Particle
VPH	Virus de Papiloma Humano

2. Resumen

El cáncer cérvico uterino (CaCU) se asocia de manera etiológica con la infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) en casi el 100% de los casos. A pesar de que en la mayoría de las mujeres infectadas con VPH-AR la infección es eliminada por el sistema inmune, en algunas mujeres la infección persiste ya que escapa a la inmunovigilancia, dando lugar al desarrollo de CaCU. Varios mecanismos han sido identificados como participantes en la evasión e inmunosupresión de la respuesta inmune durante el desarrollo del CaCU, entre ellos: la baja producción de interferones, la producción de citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β , así como el reclutamiento de células inmunosupresoras (macrófagos, T reg, células estromales mesenquimales etc) en el sitio del tumor. Uno de los mecanismos recientemente propuestos en la evasión y supresión inmune es la producción de adenosina a través de la actividad catalítica de ATP extracelular mediante las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión y la actividad funcional de las formas solubles de ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 (sCD39 y sCD73) en líneas celulares derivadas de CaCU: HeLa (VPH-18), CaSki (VPH-16), C33A (VPH-) y en células estromales mesenquimales de CaCU (MSC-CaCU). La expresión de sCD39 y sCD73 se determinó mediante ELISA y Western-blot, y su actividad catalítica mediante la incubación de sobrenadantes de los cultivos celulares en presencia de ATP, ADP y AMP, la cual fue revelada mediante cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía líquida de ultraresolución (UPLC). Las formas sCD39 y sCD73 producidas y liberadas al medio de cultivo por las células tumorales de CaCU y MSC-CaCU mostraron actividad catalítica para hidrolizar ATP, ADP y AMP para generar adenosina, la cual fue inhibida por los inhibidores específicos para CD39 (POM-1) y CD73 (APCP). Las células tumorales CaSki (VPH-16) y las MSC-CaCU presentaron la mayor producción sCD73, la cual correlacionó con la mayor capacidad para generar adenosina a partir de AMP. Los hallazgos encontrados en nuestro sistema de cultivo nos permiten evidenciar, por primera vez en la literatura, que células tumorales de CaCU pueden liberar CD39 y CD73 en su forma soluble al medio extracelular, y por tanto pueden participar en la generación de un microambiente tumoral inmunosupresor.

3. Marco teórico.

3.1 Cáncer

Las células cancerosas rompen las reglas más básicas del comportamiento celular mediante el cual los organismos multicelulares se construyen y mantienen, explotando todo tipo de oportunidad (Alberts, 2008).

El cáncer es un crecimiento anormal de las células causado por múltiples cambios en la expresión de genes que conducen al desequilibrio de la proliferación y la muerte celular, finalmente en constante evolución en una población de células que puede invadir tejidos y metastatizar a sitios distantes, causando una morbilidad significativa y, si no se trata, la muerte del huésped (Ruddon, 2007).

Las mutaciones en dos grandes clases de genes han sido implicados en la aparición del cáncer: proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Los proto-oncogenes se activan para convertirse en oncogenes por mutaciones que hacen que el gen sea excesivamente activo en la promoción del crecimiento. Los genes supresores de tumores normalmente frenan el crecimiento, por lo que el daño a estos genes permite el crecimiento inadecuado (Lodish *et al*, 2006).

En 2012 había 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes. El 65% de las muertes se produjeron en las regiones menos desarrolladas (Globocan, 2015). En México el cáncer es la tercera causa de muerte en la población, precedida por enfermedades del corazón y diabetes (INEGI, 2014).

Los cánceres más comunes del tracto reproductor femenino son los carcinomas cervicales, de ovario y de endometrio. En 2015 se reportaron 12, 900 casos nuevos de CaCU (Frumovitz, 2016). El CaCU en la escala mundial, representa el segundo tipo de cáncer más frecuente en las mujeres, con un estimado de 528 mil nuevos casos anualmente (Globocan, 2015). El factor etiológico central para el desarrollo de CaCU es la infección persistente por los tipos de virus del papiloma humano (VPH) oncogénico de alto riesgo (Ibeanu, 2011). En

México el CaCU representa la tercera causa de muerte por tumores genitales en mujeres, abarcando 13.43 por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2014).

3.1.2 CaCU y VPH

En 1977 el doctor Harald Zur Hausen publicó la hipótesis de que la infección por VPH juega un papel importante como agente causal del CaCU, posteriormente en 1983 y 1984 Zur Hausen y colaboradores identificaron a los tipos VPH16 y VPH18 en CaCU (Morshed *et al*, 2014).

El VPH es uno de los más poderosos carcinógenos biológicos y se ha implicado en cáncer de varias partes anatómicas. A nivel mundial, los tipos más comunes de VPH asociados con CaCU, denominados también como VPH de alto riesgo, son los tipos 16 (57%), 18 (16%), 58 (5%), 33 (5%), 45 (5%), 31 (4%), 52 (3%), y 35 (2%), (Crosbie *et al*, 2013). Los tipos 16 y 18 de VPH son responsables de aproximadamente el 70% de todos los cánceres de cuello uterino (Xiang-Mei *et al*, 2014, Crosbie *et al*, 2013, Walboomers *et al* 1999). El tipo 16 es principalmente asociado con CaCU y el tipo 18 es frecuentemente asociado con carcinomas escamosos celulares (Hopenhayn, *et al* 2014, Morales-Sánchez y Fuentes-Pananá, 2014).

Mientras que la infección persistente por un VPH oncogénico es necesaria para la carcinogénesis, existen otros factores y eventos moleculares aún no definidos que conducen a la transformación de las células epiteliales cervicales a un estado maligno. El desarrollo de CaCU está precedido por una serie de anormalidades celulares que se caracterizan por variaciones citológicas e histológicas así como irregularidades en el citoplasma nuclear (Crosbie *et al*, 2013).

La progresión de la infección de VPH a CaCU es un proceso que puede ser dividido en 4 etapas. La primera etapa comprende la infección con VPH (en la mayoría de los individuos la infección es eliminada en 2 años), sin embargo en el 10% de las infecciones el virus puede persistir por varios años y es fuertemente asociado con el diagnóstico de lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIBG). La segunda etapa es caracterizada por una leve

displasia debido a la progresión persistente de las células infectadas hacia células precancerosas, esta lesión puede progresar en la tercera etapa hacia lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG) caracterizada por una displasia moderada. La lesión de alto grado consigue avanzar hacia la última etapa que corresponde al carcinoma invasivo. Durante las dos primeras etapas la regresión espontánea es común (Piersma, 2011).

3.1.3 VPH

Los virus del papiloma, pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, son un gran grupo de pequeños virus de ADN, que pueden inducir tumores epiteliales escamosos (verrugas y papilomas) en diferentes localizaciones anatómicas (Morshed *et al*, 2014).

Las infecciones por VPH mucosos representan la infección de transmisión sexual más común en todo el mundo, se estima que hasta el 80% de las mujeres han estado expuestas al VPH (McLaughlin-Drubin, & Münger, 2009).

El VPH tiene tropismo selectivo para epitelios cutáneos o mucosos y se dividen en dos grupos: de bajo riesgo, que causan lesiones benignas, llamados papilomas (pequeñas neoplasias como verrugas) que suelen disminuir por sí solos; y de alto riesgo, que causan la transformación maligna y se pueden convertir en tumores grandes (Rosales & Rosales, 2014). Los cuatro principales tipos de VPH que causan la enfermedad genital son 6, 11, 16 y 18 (Ibeanu, 2011).

La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro aproximado de 55 nm y que contiene al genoma viral (López y Lizano 2006) que consta de un ADN circular de doble hebra de aproximadamente 8.000 pares de bases de nucleótidos asociadas con histonas (Zandberg, 2013). Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2 (López y Lizano 2006). El ADN se divide en tres regiones: la región larga de control LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E7) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Figura 1, Cuadro 1).

La L1 es la región más conservada dentro del genoma y por lo tanto se ha utilizado para la identificación de nuevos tipos de papiloma virus (Morshed *et al*, 2014). A la fecha se han identificado más de 180 tipos de VPH a partir de diferentes lesiones, clasificados por secuencia de ADN y nombrados secuencialmente (Rosales & Rosales, 2014).

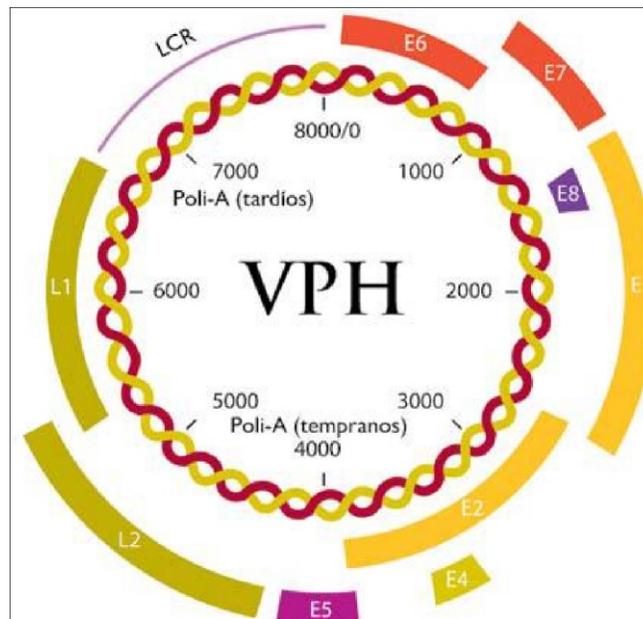


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VPH. Se observa la disposición de las proteínas tempranas y tardías así como la doble cadena de DNA. Tomado de López y Lizano 2006.

El VPH es un patógeno exclusivamente intraepitelial, se cree que el virus infecta a los queratinocitos basales primitivos, probablemente dañados. Un alto nivel de expresión génica con producción de proteína viral y el ensamblaje del virus se produce sólo en las capas diferenciadas superiores del estrato espinoso y granuloso del epitelio escamoso. El VPH entra en las células basales mitóticamente activas a través de micro abrasiones en el epitelio del cuello uterino. El virus puede permanecer latente hasta que se libera la regulación negativa de la transcripción viral en estas células por factores celulares (Stanley, 2012).

Modelos experimentales sugieren que la infección por VPH requiere el acceso de partículas virales (compuesto de DNA viral y dos proteínas de la cápside: L1 y L2) a la lámina basal, así como de la interacción con proteoglicanos heparan sulfato y posiblemente laminina. Los

cambios estructurales en la cápside facilitan la transferencia a un receptor secundario en el queratinocito basal el cual es necesario para la internalización del genoma viral al núcleo (Doorbar *et al*, 2012).

Después de la infección, los genes tempranos del VPH E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se expresan en las células infectadas, posteriormente hay una ronda de replicación del ADN viral independiente del ciclo celular y la amplificación del número de copias virales, de alrededor de 50 a 100 copias por célula (Doorbar *et al*, 2012, Stanley, 2012); asimismo, el genoma viral se mantiene de manera episomal con pocas copias (Stanley, 2012, Moody y Laimins, 2010).

Cuadro 1. Función de genes de VPH. Tomado de Bravo & Féliz-Sánchez, 2015

Locus	Funcion.
LCR	<ul style="list-style-type: none"> • Controla la expresión de genes. • Alberga factor de transcripción sitios de unión
E1	<ul style="list-style-type: none"> • Replicación viral del DNA • Actividad helicasa del DNA dependiente de ATP
E2	<ul style="list-style-type: none"> • Coactivador de la replicación viral del DNA • Represor de transcripción para las proteínas E6 y E7. • Regula el ciclo celular y apoptosis • Interactua con la cromatina para la segregacion del genoma viral.
E4	<ul style="list-style-type: none"> • Se une a proteínas del citoesqueleto y altera la estructura del citoesqueleto de la celula detenida en G2.
E5	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la proliferación celular • Contribuye a la evasión de la apoptosis • Regula a la baja la expresión del MHC.
E6	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la inmortalización celular a través de la degradación de p53 • Modifica la adhesión celular y diferenciación por la degradación de TAp63 y p73
E7	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la degradación de pRb, permitiendo la progresión a la fase S del ciclo celular. • Induce inestabilidad cromosómica.
L1	<ul style="list-style-type: none"> • Proteina mayor de la capsida • Se puede auto ensamblar en VLPs
L2	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína menor de la capsida • Recluta a la proteína L1 para el ensamblaje del virus.

La síntesis de nuevos viriones se produce sólo después de que la célula infectada ha experimentado la mitosis y una de las células hijas infectadas se ha diferenciado y migrado

de la capa basal. La diferenciación de células positivas para VPH induce la fase productiva del ciclo de vida de la célula. La expresión de E6 y E7 desregula el control del ciclo celular llevando a las células diferenciadas a la fase S del ciclo celular, permitiendo la amplificación del genoma viral en células que normalmente saldrían del ciclo celular (Figura 2) (Moody y Laimins, 2010).

La integración del DNA viral se asocia con la transición hacia un carcinoma invasivo. La inserción del DNA en el huésped puede ser completa o puede sufrir una pérdida parcial de genes virales. La pérdida de E1, E2, E4, E5 y L2 ocurre con frecuencia, incrementando el potencial de inmortalización de las proteínas E6 y E7 (Piersma, 2011).

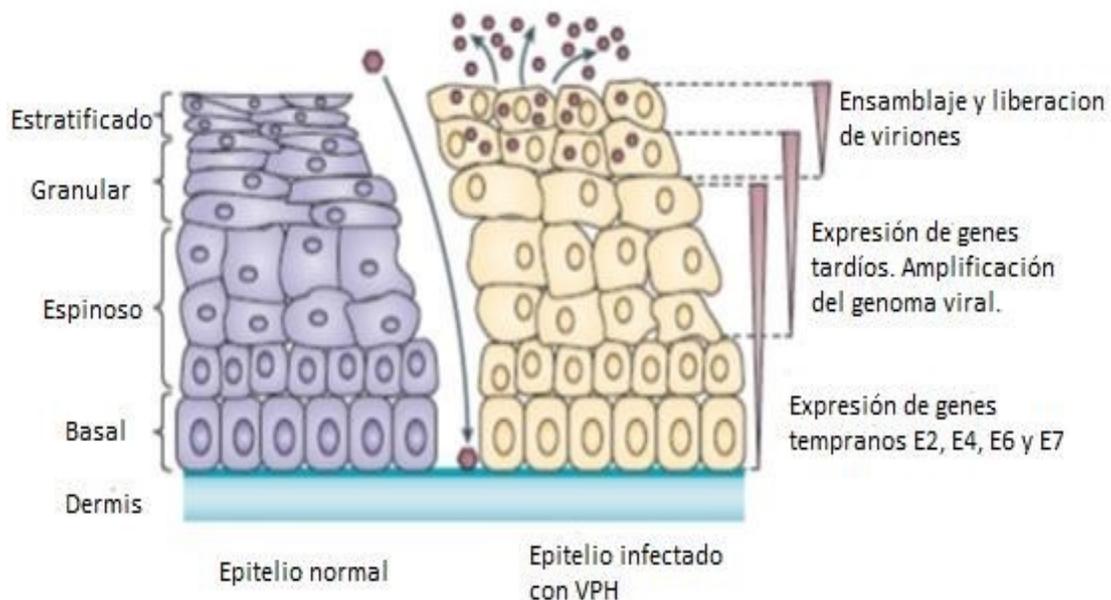


Figura 2. Proceso de infección por VPH en epitelio. Tomado y modificado de Moody y Laimins 2010. Los papilomavirus infectan queratinocitos en la capa basal del epitelio que se encuentra expuesta debido a microlesiones. El epitelio sin infección (izquierda) y epitelio con infección (derecha). Los viriones son liberados de las capas superficiales del epitelio (hexágonos rojos).

3.2 Sistema inmune

El sistema inmune surgió por evolución para proteger a los organismos multicelulares de los agentes patógenos, genera una variedad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar de manera específica a agentes extraños. La inmunidad es el estado de

protección contra una enfermedad infecciosa (Kindt *et al*, 2007). Las respuestas del ser humano contra infecciones provocadas por agentes patógenos potenciales son conocidas como respuestas inmunitarias. La respuesta inmunitaria específica, como la producción de anticuerpos contra un agente patógeno particular o sus productos es conocida como respuesta inmune adaptativa, mientras que la respuesta inmune innata no es específica para algún patógeno (Figura 3) (Murphy *et al*, 2009).

3.2.1 Inmunidad Innata.

La inmunidad innata, también llamada natural, se encuentra constituida por mecanismos de defensas celulares y bioquímicos. Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas, células fagocíticas, células NK y proteínas sanguíneas. Representa la primera línea de defensa contra las infecciones. Varios componentes de la inmunidad innata funcionan en todo momento, entre ellos se encuentran barreras que impiden la entrada de los microbios por medio de superficies epiteliales como la piel y revestimiento del tubo digestivo, así como de las vías respiratorias (Abbas, 2012). La inmunidad innata es activada por muerte o daño celular (Boraschi y Duschl 2014, Stanley 2006).

Parte de las células encargadas de la inmunidad innata (macrófagos y células NK) segregan citocinas que activan fagocitos y estimulan la reacción celular conocida como inflamación (Abbas, 2012).

La estrategia de la inmunidad innata no consiste en reconocer cada patógeno en particular, sino en reconocer un grupo de patrones moleculares altamente conservados y que son comunes a un grupo o familia entera de patógenos (Boraschi y Duschl 2014, Regueiro 2002).

3.2.2 Inmunidad Adaptativa.

La inmunidad adaptativa se encuentra en vertebrados, genera respuestas inmunes a antígenos extraños, así como células de memoria (Boraschi y Duschl 2014, Stanley 2006). Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular en las cuales intervienen diferentes componentes del sistema inmunitario.

En la inmunidad adaptativa, específica o adquirida las principales células del sistema inmunitario son los linfocitos, las células presentadoras de antígenos (CPAs) y las células efectoras (Abbas, 2012).

Los principales responsables de la inmunidad adaptativa son un tipo de leucocitos denominados linfocitos T y B. Los linfocitos son capaces de reconocer a los patógenos tanto fuera (linfocitos B) como dentro de las células del organismo (linfocitos T). La inmunidad adaptativa es la base de la memoria inmunológica (Díaz Martín *et al*/2013, Regueiro 2002).

La inmunidad humoral cuenta con moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos, producidos por los linfocitos B. Los anticuerpos reconocen a antígenos microbianos, neutralizan la infección y los marcan para su eliminación por diversos mecanismos. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares (Abbas 2012).

La inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T. Los microbios intracelulares como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección (Abbas 2012).

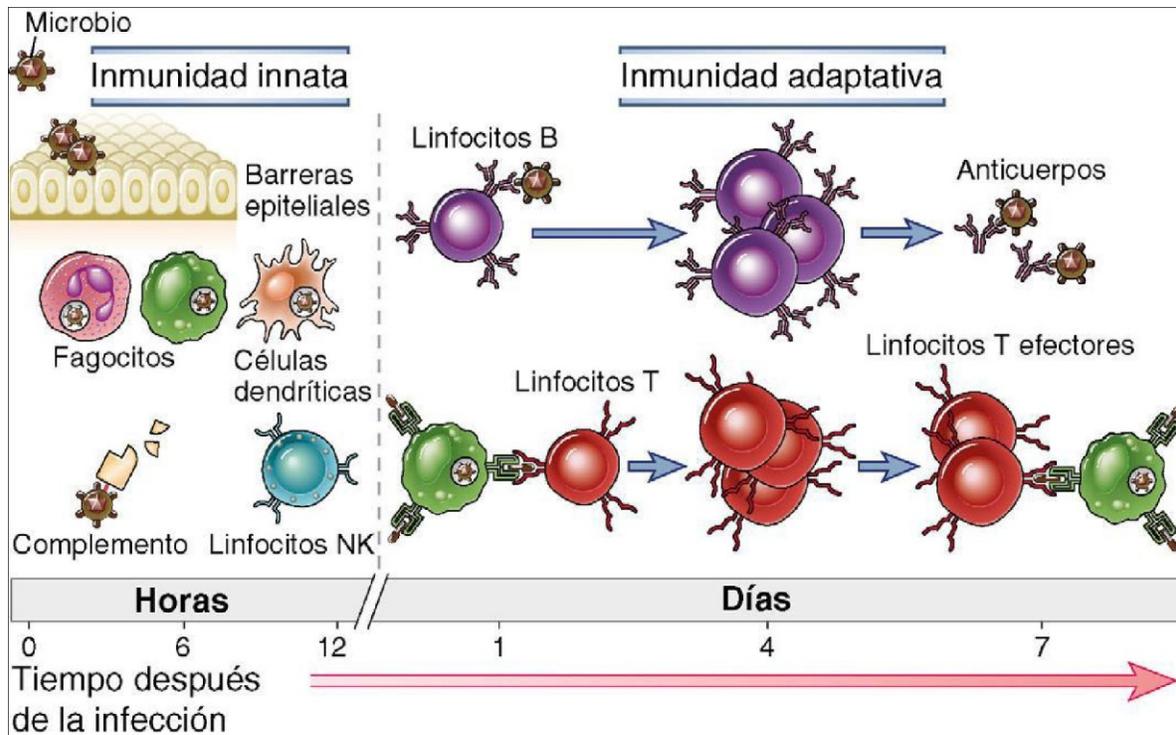


Figura 3.- Representación de la inmunidad innata y adaptativa, se observa la cinética de infección en cada una. Tomada de Abbas 2012

3.2.3 Linfocitos T

Los linfocitos constituyen del 20 al 40% de los glóbulos blancos en la sangre. En términos generales los linfocitos pueden subdividirse en tres poblaciones principales: linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (NK) con base en la función y los componentes de la membrana celular (Kindt *et al*, 2007).

Los linfocitos T provienen de precursores que se originan en la médula ósea y de allí pasan al timo, donde maduran (Regueiro, 2002). Los linfocitos T en maduración expresan en su membrana una molécula de unión a antígeno única denominada receptor de la célula T (TCR) (Kindt *et al*, 2007) mediante el cual los linfocitos T son capaces de identificar al antígeno de forma específica (Regueiro, 2002).

La mayoría de los receptores de linfocitos T únicamente pueden identificar antígenos unidos a proteínas de membrana celular llamadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Cuando un linfocito T virgen encuentra un antígeno asociado

con una molécula MHC en una célula, prolifera y se diferencia en linfocitos T de memoria y varios linfocitos T efectores (Kindt *et al*, 2007).

Existen dos tipos fundamentales de linfocitos T: los linfocitos T citotóxicos (Tc) que son portadores de la molécula CD8 en su membrana plasmática y los linfocitos T cooperadores (Th; helper) que expresan la molécula CD4. La función de los linfocitos Tc es lisar a las células que presentan péptidos extraños al organismo (Regueiro 2002).

Los linfocitos Th (CD4+) representan una población específica en la respuesta inmune, proveen ayuda principalmente a través de la secreción de IL-2, también contribuyen a la eliminación del virus en ausencia de las células T CD8+. En la regresión de las lesiones cervicales precursoras denominadas NIC1, se percibe una mayor tendencia a incrementar la proporción de CD4 respecto a los linfocitos CD8 en el estroma (Patel, 2009). No obstante, en las lesiones de VPH de alto riesgo existe una tendencia general de disminuir la proporción de las células T CD4+. Por otro lado, la respuesta de las células T cooperadoras hacia la proteína E2 de VPH se correlaciona con regresión en individuos con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (Hibma, 2012).

Una vez estimuladas por las CPA, las Th vírgenes o Th0 pueden diferenciarse hacia células efectoras con un fenotipo Th1, Th2, Th17 o T reguladoras (T reg). El fenotipo Th1 exhibe una acción pro-inflamatoria, activan la inmunidad celular e inducen una respuesta pro-inflamatoria contra patógenos intracelulares por medio de la liberación de IFN- γ , secretan IL-2, IL-12 y TNF- α . El fenotipo Th2 que presenta una acción anti-inflamatoria son importantes para la inmunidad humoral activando la proliferación de linfocitos B y producen citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. El fenotipo Th17 se involucra con la autoinmunidad y las respuestas inflamatorias mientras que las T reg son importantes para suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras de varias células inmunes incluyendo linfocitos T, células NK, linfocitos B y CPA (Fernandes *et al*, 2015).

Los linfocitos T CD8+ secretan IFN- γ , proliferan en presencia de IL-2 y muestran efectos citolíticos mediados por moléculas como granzimas y perforinas. Las células CD8+ responden a antígenos presentados en el contexto del MHC clase I después de la infección de CPA profesionales, sin embargo no existe evidencia para apoyar la infección productiva

de estas células por el HPV (Hibma, 2012, Broere *et al*, 2011). La función de las células T CD8+ es matar células infectadas (Murphy *et al*, 2009).

Los linfocitos T reguladores (T reg) representan cerca del 5% de linfocitos T CD4+ circulantes en la sangre periférica. Los T reg son responsables de mantener la respuesta inmune en equilibrio. En individuos sanos, los T reg naturales (nTreg) derivados del timo son responsables de la tolerancia periférica y la homeostasis inmune. En situaciones patológicas, los nTreg son sustituidos en gran parte por T reg inducidos (iTreg), los cuales se desarrollan y funcionan en respuesta a estímulos microambientales únicos y regulan diversos tipos de respuestas de linfocitos T cooperadores (Th) durante la inflamación. En el cáncer, los T reg participan en la evasión inmune del tumor, se acumulan en los tejidos tumorales y la circulación periférica (Whiteside & Jackson, 2013).

3.3 Respuesta inmune contra CaCU

La infección es generalmente controlada por el sistema inmune y solamente en pocas personas el VPH persiste incrementando el riesgo de desarrollar lesiones intraepiteliales (Morales-Sánchez y Fuentes-Pananá, 2014). Las respuestas inmunes del huésped hacia el VPH son generalmente de bajo nivel, ya que el virus está protegido de las células inmunes circulantes durante las etapas iniciales de la infección (Torres-Poveda, 2014).

La primera defensa contra la infección por VPH y otros patógenos es la barrera mecánica de un epitelio pluriestratificado. Las células de la inmunidad innata juegan un papel importante en este proceso incluyendo: macrófagos, células dendríticas (CD) y células NK. Se ha demostrado *in vitro* que tanto los macrófagos como las CD son capaces de matar células transformadas. Como segunda línea de defensa se encuentra la inmunidad adaptativa inducida por CPA a través de una respuesta Th1 y pueden eliminar células infectadas con VPH vía linfocitos citotóxicos. (Langers *et al*, 2014). Se pueden detectar respuestas sistémicas de células T en baja frecuencia hacia las proteínas tempranas E2 y E6 así como a péptidos en baja frecuencia en distintos puntos durante el ciclo de vida del virus. Los niveles de anticuerpos neutralizantes son bajos, éstos tienen su pico en las regresiones del virus (Stanley, 2006).

La infección con VPH se asocia con daño tisular, el papel de la inflamación en la infección inicial por VPH no es bien entendido, sin embargo hay evidencia de factores inflamatorios

y células que pueden influir en la regresión o en la persistencia de la infección. En lesiones intraepiteliales de bajo grado y en neoplasias cervicales de alto grado la inflamación es caracterizada por elevados números de macrófagos en el sitio de la lesión, lo cual es asociado con progresión o persistencia (Hibma, 2012).

Estudios serológicos basados en el uso de partículas tipo virales (VLP's) indican que en el 50% de los casos la infección por VPH causa una respuesta humoral contra epítopes conformacionales específicos de la cápside mayor de la proteína, L1. En el 50% restante la infección desaparece dejando atrás una respuesta de anticuerpos no detectable (Cid-Arregui, 2009).

3.4 VPH y evasión de la respuesta inmune.

Durante la transformación maligna existe una lucha continua de las células tumorales con el sistema inmune. El período entre la infección y la aparición de lesiones es muy variable y puede oscilar de semanas a meses, lo que sugiere que el virus evade las defensas del huésped con eficacia. Esto se debe a que el virus no es citolítico, es decir, no genera la muerte de la célula huésped por replicación, por tanto no hay inflamación y existe poca o ninguna liberación de citocinas pro-inflamatorias, importantes para la activación y migración de las células CPA hacia el medio local (Stanley, 2012).

El tumor desarrolla varios mecanismos para escapar a la inmunovigilancia, estos mecanismos incluyen:

- La regulación a la baja del MHC clase I (MHC-I) y una alteración en el procesamiento antigénico.
- Resistencia a la inmunidad mediada por apoptosis
- Expresión de factores inmunosupresivos
- Atracción de células inmunes capaces de inhibir la respuesta inmune.

La proteína E6 de los virus de alto riesgo reduce la expresión en superficie de MHC-I por parte de células epiteliales reduciendo su habilidad para presentar antígenos del virus de papiloma. Los receptores tipo Toll activan a las CPAs como parte de la respuesta inmune innata a la infección por el virus, sin embargo la transcripción del receptor tipo Toll-9 es

inhibida por la expresión de E6 y E7 de alto riesgo. E7 reduce la expresión de TAP1, un componente clave en el procesamiento y presentación antigénica, previniendo la activación de linfocitos T citotóxicos específicos (Crosbie *et al*, 2013).

Los factores inmunosupresivos producidos por las células tumorales pueden contribuir a la formación de un microambiente supresor. Entre estos factores se incluye a la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), VEGF, TGF- β e IL-10 (Piersma, 2011, Albini A *et al* 2007).

La atracción de células inmunes con propiedades inmunosupresivas incluye miembros de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa. Estudios recientes en T reg de pacientes con NIC y CaCU mostraron frecuencias elevadas de T reg en sangre periférica asociados con respuestas inmunes pobres hacia antígenos tumorales, contribuyendo así a la evasión inmune (Patel, 2009).

Las proteínas del VPH regulan negativamente las vías de señalización en la inmunidad innata en los queratinocitos infectados. La liberación de citocinas pro-inflamatorias (IFN- α , IFN- β) es reducida por consiguiente hay menos activación y migración de las células de Langerhans (CL) y menos reclutamiento de CD estromales y macrófagos (Langers *et al*, 2014).

Algunos descubrimientos han sugerido que los mecanismos de evasión inmune por la infección con VPH pueden actuar en las etapas tempranas de la infección como un mecanismo necesario para el éxito de la infección viral. El microambiente de lesiones de bajo grado es predominantemente anti-inflamatorio y es modificado en una forma que favorece la infección por VPH, también se encuentran altos niveles de IL-10 y una sobreexpresión de TGF- β (Figura 4) (Amador-Molina *et al*, 2013).

La vía de señalización purinérgica, en donde el ATP extracelular, ADP y Ado actúan como las principales moléculas de señalización, ha surgido como un importante jugador en la progresión del cáncer (Gao *et al*, 2014).

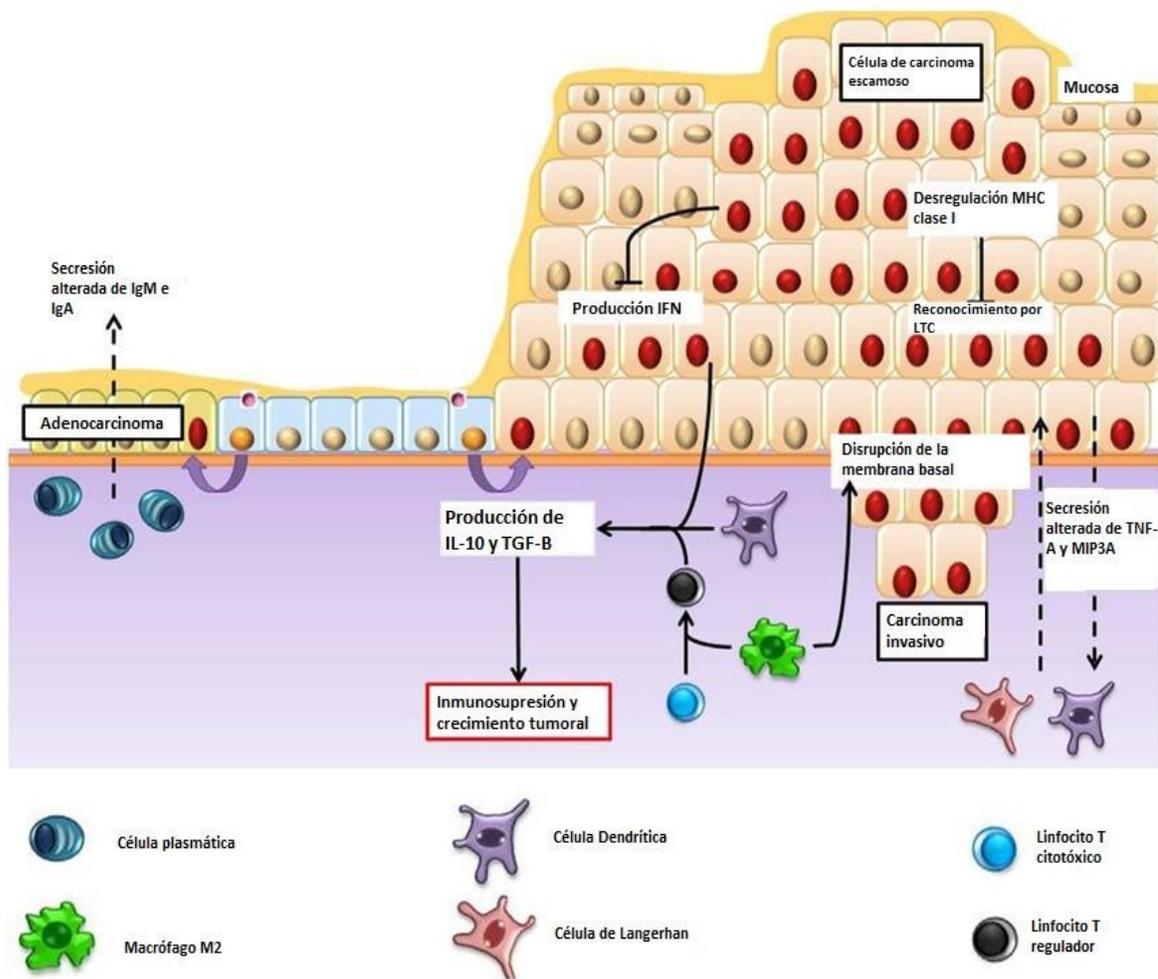


Figura 4.- VPH y evasión de la respuesta inmune. Después de la integración del genoma viral en el genoma del huésped las oncoproteínas virales son sobreexpresadas y se induce el desarrollo de las células tumorales. Las oncoproteínas muestran varias actividades inmunosupresivas. La migración de las células de Langerhan y células dendríticas en sitios dañados es alterado. Tomado y modificado de Langers *et al* 2014.

3.5 Vía adenosinérgica.

El ATP es una molécula que participa en varios procesos fisiológicos incluyendo la respuesta inmune, proliferación celular, diferenciación y muerte celular (Andrade *et al*, 2014). El ATP extracelular es liberado al microambiente en respuesta al daño tisular o al estrés celular (Stagg & Smyth, 2010). El microambiente tumoral es rico en ATP extracelular y adenosina, el efecto de estas moléculas depende tanto de la concentración de ATP extracelular y de la velocidad de degradación del ATP hacia adenosina por las ectonucleotidasas presentes en la membrana extracelular (Andrade *et al*, 2014).

La exposición prolongada a ATP extracelular puede inhibir las funciones de las CDs. Las CDs estimuladas con ATP producen menos citocinas pro-inflamatorias, pero más IL-10 e IFN- γ (Stagg & Smyth, 2010).

Muchos tipos celulares expresan enzimas en su superficie celular que catalizan la hidrólisis de fosfonucleótidos. Normalmente este proceso ocurre en una serie de 3 pasos. Primero, múltiples tipos celulares liberan nucleótidos intracelulares particularmente en la forma de ATP y ADP; segundo, estos nucleótidos extracelulares son rápidamente convertidos a AMP por CD39; y finalmente, el AMP es convertido a Ado extracelular por CD73 (Figura 5) (Eltzschig, 2009, Regateiro *et al* 2013, Bynoe *et al*, 2015).

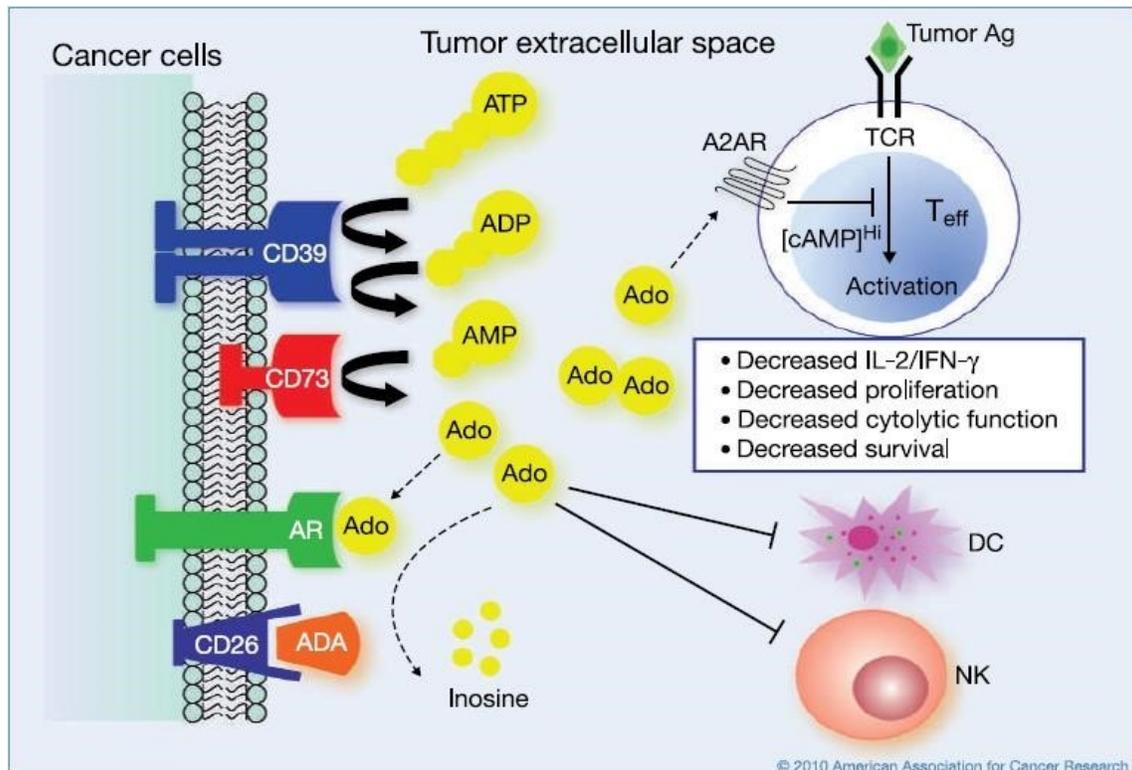


Figura 5.- Esquema de la vía adenosinérgica. La acción secuencial de CD39 y CD73 en la cual el ATP extracelular es degradado representa la principal vía de generación de adenosina dentro del microambiente tumoral. Altas concentraciones de adenosina inhiben la activación de células dendríticas, células NK y linfocitos T. Tomado de Zhang, 2010.

CD39 (NTPDasa 1, E.C. 3.6.1.5) es una proteína integral de membrana que fosfohidroliza ATP en una manera dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , fue descrita como un marcador de

activación en linfocitos B, es también la más expresada por monocitos-macrófagos. Estructuralmente es caracterizada por dos regiones transmembranales, las cuales son importantes para el mantenimiento de la actividad catalítica y especificidad de sustrato. Se vuelve activa enzimáticamente sobre su localización en la superficie celular y su glicosilación es crucial para el correcto desdoble de proteínas y actividad enzimática (Antonioli *et al*, 2013, Dwyer *et al* 2007, Robson *et al*, 2006). CD39 se encuentra expresada en las células endoteliales y en muchos tipos de células hematopoyéticas activadas como células B, células NK, subconjuntos de células T activadas, macrófagos y CDs (Ghiringhelli *et al*, 2012, Dwyer *et al* 2007).

CD39 ha sido reconocido como un punto de control crítico en la regulación de acumulación de leucocitos dentro de tejidos hipóxicos, se considera que desempeña un papel inmunoregulatorio celular por hidrólisis de ATP o ADP liberado por las células T durante la presentación de antígenos, generando con ello adenosina. En mamíferos se han identificado 8 formas análogas, cuatro de estos (NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3 y NTPDasa8) se encuentran localizadas en la membrana celular, mientras que las NTPDasas 4-7 comparten una localización intracelular. Han sido reportados formas solubles de NTPDasa 5 y 6 (Zimmermann *et al*, 2012).

CD73 (ecto 5'nucleotidasa, ecto 5'-NT EC 3.1.3.5) es un glicofosfatidilinositol (GPI) compuesto de 523 aminoácidos, con un peso molecular de 70 kDa anclado a la superficie celular (Allard, 2014, Zhang, 2010). Funciona como una molécula de co-señalización en linfocitos T y como una molécula de adhesión importante para la unión del linfocito al endotelio. Estudios previos reportan que CD73 participa en las interacciones célula-célula, célula- matriz extracelular, en la resistencia a fármacos y en la promoción del tumor (Zhang, 2010). Se expresa en subconjuntos de células T, células mieloides, células estromales de la médula ósea, células epiteliales del timo y células B humanas (Regateiro, *et al*, 2013).

En mamíferos han sido clonados 7 isoformas de 5' nucleotidasas de las cuales 4 son ubicuos (eN, CN-II, CdN, mdN), mientras que las tres restantes muestran expresión específica de tejido (CN-IA, CN-IB, CN-III). Cinco isoformas se localizan en el citosol, una en la matriz mitocondrial y otra se encuentra unida a la cara externa de la membrana plasmática. CN-I nombrada 5'nucleotidasa AMP-específica por su alta actividad específica con AMP a concentraciones milimolares, se encuentra localizada en el citoplasma, es

fuertemente activada por ADP, su actividad es influenciada por el pH así como por diversos cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (Borowieck *et al*, 2006, Bianchi & Spychala 2003).

CN-II tiene actividad fototransferasa y la formación de una unión covalente fosfoenzimática. Bajo condiciones fisiológicas el fosfato puede ser transferido hacia inosina, guanosina y hacia otros análogos nucleósidos. CN-III también conocida como PN-I, P5'N1 o UMPH-I se inhibe con la exposición a metales pesados cataliza la desfosforilación de nucleósido monofosfato de pirimidina a sus correspondientes nucleósidos. Es menos activa con nucleótidos de purina (Borowiec *et al* 2006).

CD39 y CD73 se han encontrado sobre-expresados en muchos tipos de líneas celulares cancerígenas: leucemia, glioblastoma, melanoma, cáncer de ovario, vejiga, tiroides, esofágico, gástrico, de colon, de próstata y cáncer de mama (Gao *et al*, 2014, Yegutkin G *et al*, 2012, Clayton *et al*, 2011, Aliagas *et al*, 2014).

La expresión de estas ecto-nucleotidasas ha sido sugerido como un marcador pronóstico en ciertos tipos de cáncer, debido a que han sido asociados con un mayor crecimiento e invasión tumoral (Yegutkin G, *et al* 2011, Jin *et al*, 2010, Yegutkin G, *et al*, 2012).

En el ambiente neoplásico, las células cancerígenas y las células inmunes interactúan estrechamente para generar un ambiente inmunosupresivo. Varios estudios han señalado la tarea que llevan a cabo CD39 y CD73 en la generación de este ambiente inmunosupresor caracterizado por los altos niveles de adenosina. El complejo CD39/CD73 participa en el inmunoescape tumoral inhibiendo la activación, la expansión clonal y migración de los linfocitos T (CD4+ y CD8+) hacia el sitio del tumor (Antonioli *et al*, 2013).

Dentro de los microambientes cancerígenos, CD73 juega un papel crítico en la promoción del crecimiento tumoral. La adenosina producida por CD73 derivado de tumor ha demostrado provocar la liberación autócrina de VEGF, promoviendo así la formación de nuevos vasos en el microambiente tumoral (Antonioli *et al*, 2014).

CD73 y la producción de adenosina han sido implicados directamente en la evasión tumoral (Regateiro *et al*, 2013). La adenosina inhibe potentemente una serie de respuestas celulares incluyendo: proliferación antígeno inducida, supresión de IL-2 y citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF- α , sobre-regulación de CD25, inducción de moléculas efectoras citolíticas como perforinas y Fas-L, adhesión de linfocitos a células tumorales y exocitosis granular por CTL (Zhang, 2010). Por otro lado, la adenosina desaminasa (ADA; EC 3.5.4.4) regula estrechamente las concentraciones extracelulares y en plasmáticas de adenosina, ésta es activada a altas concentraciones de adenosina ($>10 \mu\text{M}$) para convertirla en inosina (Borowieck *et al*, 2006; Robson *et al*, 2006).

3.5.1 sCD39 y sCD73

Recientemente se ha demostrado que una forma soluble y catalíticamente activa de CD39 se encuentra en la circulación sanguínea (Antonioli *et al*, 2013, Zimmermann *et al*, 2012); asimismo, se probó que la forma soluble de CD39 (sCD39) aislada de células de insecto tiene actividad catalítica (Chen & Guidotti, 2001).

Las 5' nucleotidasas solubles han sido ligadas a la resistencia de fármacos empleados en el tratamiento contra el cáncer, debido a su habilidad para metabolizar varios monofosfatos análogos (Borowieck *et al*, 2006).

Estudios realizados por Klemens y colaboradores en 1990 detectaron por primera vez que cerca del 25% de las células provenientes de placenta producen formas solubles de CD73 (sCD73). Las formas solubles de CD73 son el resultado de la hidrólisis de las formas unidas a membrana, ya sea por la fosfolipasa específica a fosfatidilinositol, o por un corte proteolítico en la región de la proteína GPI que une a la ectonucleotidasa CD73. Sin embargo, las formas solubles de CD73, pueden presentar diferente actividad enzimática que los formas ancladas en membrana, tal como ha sido reportado para sCD73 obtenida del plasma seminal de toro, cuya actividad enzimática fue diferente de la presentada por la enzima anclada a membrana, ya que el AMP no fue el sustrato preferido (Allard, 2014, Zimmermann *et al*, 2012). Por otro lado, también se han reportado formas solubles para CN-I y CNII, en donde se ha encontrado que la que presenta mayor actividad enzimática es sCN-II (Borowieck *et al*, 2006, Zimmermann, 1992).

Recientemente se ha reportado que las formas solubles de las ectonucleotidasas también pueden encontrarse ancladas en membranas de microvesículas o exosomas, las cuales son liberadas por diferentes tipos celulares (Zimmermann *et al*, 2012). Estudios realizados en estas formas solubles obtenidas de cultivos celulares de diferentes tejidos, así como de suero, fluido seminal y fluidos sinoviales, han mostrado que estas ectonucleotidasas conservan gran parte de su actividad catalítica, de hecho incrementan su expresión en enfermedades inflamatorias y tienen la capacidad de difundir entre las células y conferir actividad enzimática a sitios distantes (Allard, 2014; Maksimow *et al* 2014).

3.6 Células mesenquimales (MSC).

Las células estromales mesenquimales (MSC) son una población celular heterogénea con la capacidad de diferenciarse en diversos linajes (Figura 6). Fueron descritas por Friedentstein y colaboradores en los años 70's como células adherentes con apariencia tipo fibroblastos capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico, como osteocitos, adipocitos, y condrocitos (James 2013, Rastegar *et al*, 2010, Romero *et al*, 2007).

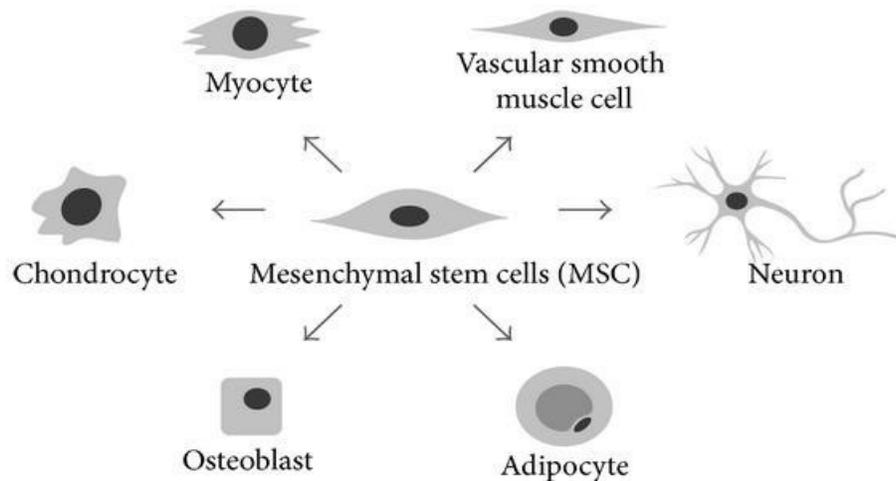


Figura 6.- Diferenciación de MSC hacia diferentes linajes. Tomado de James 2013.

Las MSC frecuentemente son aisladas de la médula ósea, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical, aunque también se pueden aislar de la mayoría de los tejidos postnatales (Gazdic

et al, 2015). La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha propuesto los siguientes criterios para la caracterización de BM-MSc humanas: (a) la adherencia al plástico en condiciones normales de cultivo; (b) la expresión de moléculas de superficie tales como CD73, CD90, CD105 y ausencia de CD34, CD45, HLA-DR, CD14 o CD11b, CD79a, CD19 y (c) la capacidad de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos, y condroblastos (Dominici M *et al*, 2006).

Uno de los mecanismos por los que las MSc modulan la respuesta inmune es a través de la generación de células T reg. En un estudio realizado por Saldanha-Araujo y colaboradores en 2011 se reportó que bajo estímulos inflamatorios como los proporcionados por los linfocitos T activados un alto porcentaje de MSc expresa CD39 resultando dando como resultado una elevada producción de adenosina (Saldanha-Araujo *et al*, 2011).

Las MSc poseen receptores purinérgicos y ecto-nucleotidasas en la membrana plasmática; se ha reportado que estas células liberan nucleótidos activos como ATP dependiendo del estímulo (Scarfì, 2014). Las MSc pueden inhibir la proliferación tumoral y promover la apoptosis, promover la transición epitelio mesenquimal e incrementar la proporción de células madre presentes en el tumor. Nuestro grupo de investigación ha encontrado que las MSc derivadas de tumores de CaCU (MSc-CaCU), reducen significativamente la expresión de moléculas de clase I del MHC en la superficie de líneas celulares de CaCU cuando son co-cultivadas *in vitro*, favoreciendo en consecuencia la evasión al reconocimiento inmune por células T antígeno específicas (Montesinos JJ *et al*, 2013). Asimismo, se ha encontrado que las MSc-CaCU al igual que las MSc obtenidas de médula ósea (MSc-MO) y de tejidos cervicales normales (MSCCN) presentan una mayor expresión de CD73 con respecto a CD39. No obstante, las MSc-CaCU muestran una mayor expresión de ambas ectonucleotidasas en relación a las MSc-Mo y MSc-CN, siendo capaces de generar adenosina a partir de la adición de los nucleótidos ATP, ADP y AMP la cual es capaz de inhibir de manera significativa la proliferación de linfocitos T citotóxicos (T CD8+) (Morales-Ramírez, 2014).

3.7 Adenosina en la respuesta inmune

La adenosina es reconocida como un agente bioactivo en estados inflamatorios vasculares, con efectos mediados en leucocitos como en células vasculares; modula la expresión de genes anti-apoptóticos e inmunosupresivos. (Dwyer *et al*, 2007). La adenosina esta constitutivamente presente en el sistema biológico extracelularmente a muy baja concentración ($<1 \mu\text{M}$) (Kumar, 2013); sin embargo, durante condiciones de hipoxia, infección, isquemia, inflamación, estrés metabólico y transformación tumoral del tejido, los niveles de adenosina incrementan rápidamente (Longhi *et al*, 2013).

La adenosina se une a cuatro receptores (A_1 , A_2A , A_2B y A_3) acoplados a proteínas G, los cuales se expresan ampliamente por varias células, incluyendo células T, células B y CD8 (Figura 7) (Smyth *et al*, 2013, Kumar 2013). La interacción de adenosina con los receptores A_1 y A_3 induce una disminución en los niveles intracelulares de AMPc; mientras su interacción con los receptores A_2A y A_2B , los incrementa, debido a la activación de adenilil ciclasa (Stagg & Smyth, 2010, Hoskin *et al* 2008).

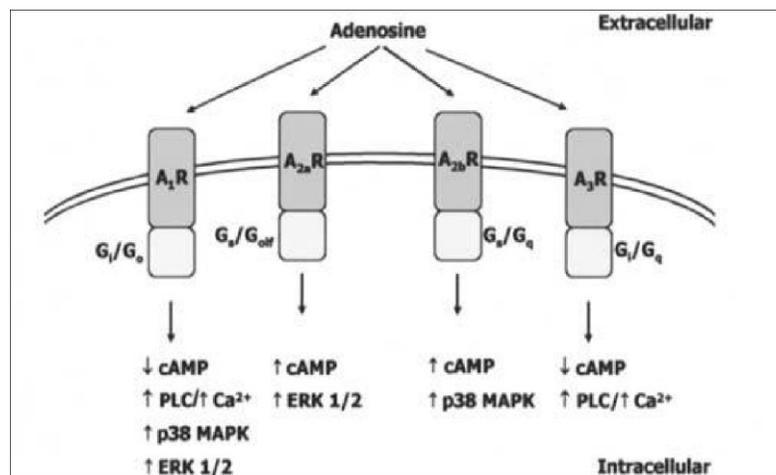


Figura 7.- Unión de adenosina a receptores en la célula. Imagen tomada Hoskin *et al* 2008.

La adenosina extracelular se encuentra elevada dentro de tejidos neoplásicos como consecuencia de una elevada expresión y actividad de las ecto-nucleotidasas que la producen. Varios tipos de tumores sólidos expresan la maquinaria enzimática necesaria para convertir ATP a adenosina en su superficie celular. La adenosina promueve el crecimiento de las células tumorales, incrementa la angiogénesis, inhibe la producción de citosinas Th1, promueve la adhesión de las células inmunes al endotelio y contribuye a la supresión de las células T efectoras (Figura 8) (Longhi *et al*, 2013). Descubrimientos anteriores realizados por Blay y colaboradores han demostrado que la concentración extracelular de adenosina en el fluido extracelular de los carcinomas sólidos puede llegar a 10^{-4} M (10-20 veces mayor que la concentración normal), lo cual puede ejercer un efecto promotor del crecimiento del tumor, y un potente efecto inmunosupresor (Blay *et al*, 1997).

La adenosina presente en el ambiente extracelular es un factor regulador inmune de potente protección en las células y tejidos del daño inmune, reprime también las respuestas inmunes en el microambiente tumoral, asistiendo la evasión inmune del tumor y se acumula en el microambiente tumoral (Clayton *et al*, 2011).

La adenosina inhabilita el efecto citotóxico de las células T CD8+ y NK, predominantemente vía el receptor A2A permitiendo la evasión inmune del tumor. La transducción de señales a través del receptor A2A de adenosina inhibe la respuesta Th1 por parte de las células T CD4+ limitando el ambiente necesario de citocinas necesarias para el desarrollo de este tipo de respuestas. Por otra parte la adenosina polariza las células mieloides para convertirlas con un fenotipo inmunosupresor en macrófagos M2 y CD tolerogénicas, debido a la señalización dada por los receptores A2A y A2B (Young *et al*, 2014).

En células T la adenosina media el bloqueo de la vía NF- κ B resultando en una potente supresión de la proliferación celular, supresión síntesis de citocinas IL-2, IFN- γ y TNF- α , expresión de perforinas y del ligando CD95. Se ha demostrado claramente que la inhibición de la producción de adenosina y señalización reduce significativamente la progresión del tumor mejorando la respuesta inmune antitumoral. Ha sido bien documentado que los T reg co-expresan CD39 y CD73 y que pueden producir adenosina contribuyendo fuertemente a su actividad inmunosupresora. La adenosina producida por T reg ha demostrado que inhibe no sólo la proliferación de las células efectoras, sino también sus actividades (Umansky *et al*, 2014).

Es concebible que las diferentes fuentes de producción de adenosina, además de las MSC, contribuyen a la composición del medio inmunosupresor presente en el microambiente tumoral (Poggi et al, 2014).

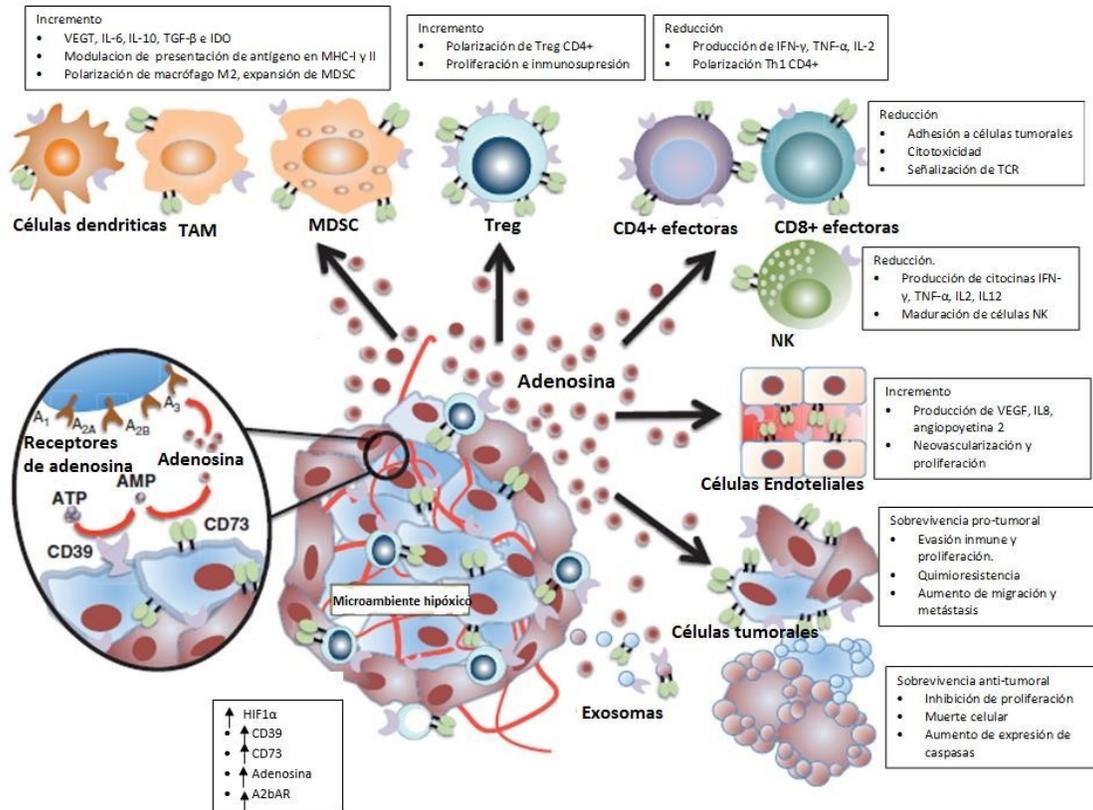


Figura 8.- Efecto de la adenosina en diversos tipos celulares. Imagen tomada y modificada de Young *et al* 2014.

4.- Justificación y Planteamiento del Problema.

En nuestro país, el CaCU es la tercera causa de muertes por neoplasias en mujeres (INEGI, 2014). Casi todos (99,8%) los casos de CaCU se deben a tipos específicos de VPH de alto riesgo (Santos-López *et al* 2015), los subtipos de VPH 16 y 18 son los más frecuentes en los tumores (Hernández-Hernández *et al*, 2015). Durante la carcinogénesis, las células tumorales desarrollan varios mecanismos para escapar de la inmunovigilancia. Recientemente se ha propuesto que la vía adenosinérgica juega un papel importante en la evasión y supresión de la respuesta inmune, la producción de adenosina a través de la fosfohidrólisis de ATP mediada por las ectonucleotidasas CD39 (ENTPDasa) y CD73 (5'-nucleotidasa), inhiben la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos (Piersma, 2011). Nuestro grupo de investigación ha detectado mediante análisis de citometría de flujo, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, la expresión de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 en membrana de varias líneas celulares de CaCu (Titla-Vilchis JI 2012; Ávila-Ibarra 2011; López-Cisneros 2015) y tejidos derivados de tumores de CaCU de diferentes estadios clínicos (Torres-Pineda 2015). Asimismo, mediante cultivo celular con los nucleótidos ATP, ADP y AMP, se ha determinado su actividad funcional para generar adenosina e inhibir la proliferación de linfocitos T CD8+ (Ávila-Ibarra 2011, 2014). Tomando en consideración que recientemente se ha propuesto que las formas solubles de dichas ecto-nucleotidasas pueden tener un papel en la evasión de la respuesta inmune, el presente trabajo se llevó a cabo para determinar si líneas celulares derivadas de tumores de CaCU producen las ectonucleotidasas CD39/CD73 de manera soluble (sCD39/sCD73), y si éstas tienen capacidad de generar adenosina a partir de nucleótidos de adenina ATP, ADP y AMP, lo cual será de gran relevancia para establecer estrategias inmunoterapéuticas que favorezcan la respuesta inmune antitumoral.

5. Hipótesis.

Se ha demostrado que células tumorales derivadas de diferentes tipos de cáncer sobreexpresan a las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73, y que algunas de ellas producen isoformas solubles que poseen actividad funcional para generar adenosina a partir de nucleótidos de adenina: ATP, ADP y AMP. Nuestro grupo de trabajo ha determinado, en líneas celulares de CaCU, la expresión y actividad funcional de ambas ecto-nucleotidasas para generar adenosina a partir de ATP, ADP y AMP. En consecuencia, se espera que líneas celulares de CaCU produzcan las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 en su forma soluble (sCD39 y sCD73) y que éstas sean capaces de fosfohidrolizar nucleótidos de adenina para producir adenosina.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

- Analizar la expresión y actividad funcional de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 en forma soluble (sCD39 y sCD73) en líneas de CaCU.

6.2 Objetivos particulares.

- Analizar la producción de CD39 y CD73 en forma soluble (sCD39 y sCD73) en líneas celulares de CaCu y MSC-CaCU.
- Analizar la actividad funcional de sCD39 y sCD73 de líneas celulares de CaCu y MSC-CaCU para generar adenosina a partir de los nucleótidos e adenina ATP, ADP y AMP.

7. Metodología.

7.1 Cultivo celular

Se utilizaron tres líneas celulares de CaCU, Hela (VPH-18), CaSki (VPH16) y C33A (VPH-) las cuales se mantuvieron en cultivo empleando el medio RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies), suplementado al 10% con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies), antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomycinina 100ug/mL), y mantenidas bajo condiciones de esterilidad a temperatura constante de 37 °C en una incubadora (Forma Scientific), con 5% de CO₂ y un ambiente de humedad saturante. Como controles celulares, se utilizaron MSCs derivadas de tumores de CaCu (MSC-CaCu), las cuales fueron generadas y caracterizadas previamente por nuestro grupo de investigación con base en los parámetros morfológicos, fenotípicos y de diferenciación establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (García-Rocha, 2011; Montesinos-M et al, 2013).

Cuando las cajas de cultivo estuvieron al 60-80% de confluencia se les retiró el medio de cultivo y las células fueron desprendidas, lavadas con PBS y contadas con un hemocitómetro. Posteriormente 1×10^7 células tumorales o 1×10^6 MSC-CaCu fueron cultivadas durante 72 horas en placas de 24 pozos con 2mL de medio Opti-MEM® (Life Technologies) libre de suero y se dejaron en incubación por 72 horas. Posteriormente se colectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 2000xg por 10 minutos, para eliminar restos celulares.

7.2 Detección de sCD39 y sCD73 mediante la técnica de ELISA.

Para determinar la presencia de CD39 y CD73 en los concentrados de los sobrenadantes de las líneas celulares, se empleó un Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). Para ello, se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano para ELISA en donde se colocaron por triplicado 100 µl de los sobrenadantes concentrados y se incubaron a 37 °C en una incubadora (Forma Scientific, USA) con 5% de CO₂ y un ambiente de humedad saturante durante 24 horas. También, en otros pozos se cultivaron por triplicado cada una de las líneas celulares a una densidad de 20 000 células por pozo en un volumen de 100µl con medio Opti-MEM®. Después de 24 horas, las células fueron lavadas con PBS y

posteriormente se adicionó una solución de paraformaldehído al 2% en PBS (100 μ l) durante 1 hora a 4°C. Después de ese tiempo, las células se lavaron 4 veces con una solución de PBS-SFB al 2% (300 μ l por pozo) para posteriormente hacer el bloqueo de la placa.

Los concentrados de los sobrenadantes fueron retirados de la placa y se procedió a hacer dos lavados con PBS, previo al bloqueo. El bloqueo de cada placa, consistió en la adición de 200 μ l de solución compuesta por PBS-SFB al 2% y 2% de albumina sérica bovina (BSA), y se incubó la placa durante 1 hora a 37° C. Posteriormente los pozos fueron lavados 4 veces con 300 μ l de PBS-SFB al 2% enseguida se adicionaron 100 μ l de anticuerpo primario (anti-CD39 eBioscience USA y anti-CD73 Novus-Biological) a una dilución 1:1000 en PBS-SFB al 2% y se incubó por una hora a 37° C. Después se lavó la placa 4 veces con 300 μ l/pozo de PBS-SFB al 2% y se agregó el anticuerpo secundario. Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase Conjugated Millipore diluido 1:500 en PBS-SFB al 2% y se incubó 1 hora. Los pozos fueron lavados seis veces con PBS-SFB al 2%. A continuación se adicionaron 100 μ l a cada pozo del sustrato para la fosfatasa alcalina disolviendo 0.03g de sustrato (Sigma) a 5 ml de Dietanolamina. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora. Y fue leída en un lector para placas de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Pozos que contenían células tumorales adheridas fueron considerados como positivos, mientras que pozos que contenían medio Opti-MEM® fueron considerados como negativos.

7.3 Detección de sCD39 y sCD73 mediante Western-blot.

Con la finalidad de determinar la presencia de sCD39 y sCD73 en los sobrenadantes de las líneas celulares se utilizó la técnica de Western-blot, para ello se prepararon geles de poliacrilamida en donde se colocaron muestras de los sobrenadantes con buffer de carga (Compuesto de Tris 1M con un pH de 6.8, SDS, Azul de bromofenol, Glicerol y agua miliQ) y muestras de lisado (L) de las células (10ug de proteína), así como de 20uL de los sobrenadantes (S) de las líneas celulares.

El gel se enjuagó con buffer de corrida 1x (Glicina, Tris y SDS) y se colocó en una cámara de electroforesis a 80 volts y 30 amperes, hasta que las proteínas llegaron al final del gel. Después se retiró el buffer de corrida, se separó el gel de la placa metálica y de vidrio, y fue transferido a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 100 amperes empleando una

cámara de electrotransferencia (Hoefer, USA). Una vez separada la membrana de nitrocelulosa, ésta se dejó incubando toda la noche en una solución de bloqueo conteniendo TBS-Tween 20- BSA 3%. La solución de bloqueo fue retirada y la membrana fue lavada con TBS-Tween 20. Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario (5' Nucleotidase/CD73 Antibody Novusbio®) a una dilución de 1:500 en una solución de TBS-Tween 20- BSA 1% y se dejó incubar durante 2 horas en agitación suave. Después de retirar la solución con anticuerpo, la membrana fue lavada con TBSTween. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario (Goat anti-rabbit IgG (H+L) Peroxidase Conjugated Thermo Scientific®) a una dilución de 1:10000 en TBS-Tween 20- BSA 1% y se dejó en agitación suave por 1 hora. Posteriormente el anticuerpo secundario se retiró y la membrana fue lavada 5 veces con TBS Tween. Para revelar la presencia de sCD73 en la membrana, se añadió 1 ml de luminol/ enhancer solution (Thermo Scientific, USA) y 1 ml de Stable peroxide solution (Thermo Scientific, USA). Se incubó por 4 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente la membrana fue revelada con ayuda del equipo Li-Cor® y del software Image Studio Lite versión 5.2.

7.4 Determinación de la actividad catalítica de sCD39 y sCD73 mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).

La conversión de ADP y AMP a Adenosina se analizó mediante un ensayo de cromatografía en capa fina, para esto los sobrenadantes concentrados de las líneas celulares fueron incubados con ATP, ADP o AMP y en presencia y ausencia de polioxotungstato de sodio (POM-1, Sigma USA), inhibidor específico de CD39; o de adenosina 5'-(α,β -metilen) diphosphato (APCP, Sigma USA), inhibidor específico de CD73, a una concentración de 2.5mg/mL durante 24, 48 y 72 horas. Durante el tiempo de incubación, se colectaron muestras de 2 μ l de los sobrenadantes y se colocaron sobre laminillas de CCF fluorescentes de poliéster conteniendo silica gel (Sigma USA) (3x8cm). Para evidenciar la hidrólisis de los nucleótidos de adenina y la generación de adenosina, las laminillas fueron colocadas verticalmente en una cámara de elución conteniendo 4mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol: alcohol isoamílico:etoxietanol:amoniaco:agua (9:6:18:9:15), la cual se dejó correr durante 45 min en la cámara de elución, posteriormente se retiraron para su secado a temperatura ambiente. Como controles se emplearon muestras de 1 μ L de soluciones de Adenosina 5'-monofosfato, Adenosina (Ado) e Inosina (Sigma, Life science) a una concentración de

5mg/mL. Los compuestos AMP y Adenosina se visualizaron y fotografiaron a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV).

7.5 Detección de la actividad catalítica de sCD39 y sCD73 mediante Cromatografía líquida de Ultra Resolución (UPLC).

Para determinar la cantidad de adenosina producida por sCD39 y sCD73 contenidas en los sobrenadantes de los cultivos de células CaSki y MSC CaCu, se utilizó un equipo de UPLC aquity (Waters, USA) y el análisis se realizó empleando el software Empower 3 (Waters, USA). Previo a la lectura de las muestras, se prepararon estándares de adenosina a una concentración de 1mg/mL disueltas en fase móvil (0.5% acetonitrilo: 5% metanol: 94.5% acetato de sodio 0.25 M, pH 6.3) y se realizaron diluciones seriadas apropiadas (1:100) para establecer los límites de detección. Se realizó una curva estándar de 10 puntos empleando adenosina pura. Por otro lado, los sobrenadantes de las células que fueron cultivadas con los diferentes sustratos se adicionaron a tubos con 200 µl de fase móvil, se agitaron en durante 1 minuto y se centrifugaron 3 minutos a 12000 rpm para extraer las proteínas y estabilizar la adenosina; posteriormente las muestras fueron ultrafiltradas con filtros de amicón de 3000 daltones (Millipore, USA) e introducidas al equipo para su determinación. Las condiciones de corrida de cada muestra fueron las siguientes: velocidad de flujo 1.0mL/min; detector UV 254-260 nm; tiempo de retención 2.0 minutos; T ambiente; columna de fase reversa LiChrosferRP de 18e 5 µm, 100 RP-18 (tamaño 125mm x 4mm, 5mm de tamaño de partícula). La adenosina se cuantificó comparando el tiempo de retención de la muestra con el de la adenosina pura empleada como control.

8. Resultados.

8.1 Células tumorales de CaCu y MSC-CaCu producen sCD39 y sCD73.

En los últimos años se ha reportado que las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 juegan un papel importante en la supresión de la respuesta inmune antitumoral, debido a su capacidad conjunta para fosfohidrolizar ATP y generar adenosina inmunosupresora en el microambiente tumoral (Horenstein *et al*, 2013). La expresión de estas ecto-nucleotidasas ha sido encontrada en membrana de células tumorales y en el estroma de algunos tipos de tumores sólidos, entre ellos: cáncer colorectal (Liu *et al*, 2012), cáncer gástrico (Lu *et al*, 2013), cáncer de próstata (Yang *et al*, 2013) y cáncer de mama (Supernat *et al*, 2012); además de células leucémicas (Zhao *et al*, 2011). Por otro lado, se ha revelado que la forma soluble de estas ectoenzimas también puede tener un papel relevante en la supresión de la respuesta inmune, así como en la angiogénesis, invasión y migración de las células malignas (Zimmermann *et al*, 2012).

En estudios previos, nuestro grupo de trabajo ha determinado la expresión en membrana de ambas ectonucleotidasas en líneas celulares de CaCu, así como su actividad funcional para generar adenosina al cultivar las células tumorales en presencia de los nucleótidos de adenina ADP y AMP (Titla Vilchis IJ 2012; Ávila Ibarra LR, 2011, 2014). Asimismo, también hemos encontrado que la expresión de CD39 y CD73 se ve incrementada cuando las células son cultivadas en presencia de TGF- β . Por tanto, el presente estudio se llevó a cabo con la finalidad de analizar si células tumorales de CaCu producen las formas activas de sCD39 y sCD73. Para ello, 1×10^7 células de las líneas celulares de CaCu Hela (VPH18), CaSki (VPH-16), C33A (VPH-), o 1×10^6 células estromales mesenquimales de CaCu (MSC-CaCu) fueron cultivadas en medio libre de suero durante 72 horas y posteriormente los sobrenadantes fueron obtenidos mediante centrifugación.

Para determinar la presencia de las moléculas sCD39 y sCD73 en los sobrenadantes de las líneas celulares se realizaron ensayos de ELISA empleando anticuerpos específicos para cada ectoenzima. Como testigos positivos de estos experimentos, en las mismas placas de ELISA se determinó la expresión de CD39 y CD73 en células tumorales (20, 000) sembradas 24 horas antes, con la finalidad de cubrir la superficie de cada uno de los pozos de cultivo.

De acuerdo a lo esperado, se encontró que los ensayos de ELISA permitieron revelar la expresión de CD39 y CD73 en la membrana de las líneas celulares de CaCu y en las MSC-CaCu. No obstante, en las líneas celulares de CaCu se encontró mayor expresión de CD39 que en las células MSC-CaCu (Figura 9). De manera interesante, también se logró detectar sCD39 y sCD73 en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares de CaCu y de las MSC-CaCu. Cabe señalar que la detección de sCD39 y sCD73 fue significativamente menor que la detectada sobre la membrana de las células tumorales (Figura 9). Asimismo, es importante destacar que las líneas CaSki y C33 mostraron los niveles más altos de sCD39 (Figura 9A); mientras que el nivel de sCD73 detectado en los sobrenadantes de las líneas celulares de CaCu y MSC-CaCu fue muy similar (Figura 9B).

Para corroborar la presencia de las ectoenzimas CD39 y CD73 en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares se realizaron ensayos de Western-blot empleando los mismos anticuerpos que se utilizaron en los ensayos de ELISA, no obstante, sólo el anticuerpo anti-CD73 permitió detectar la proteína desnaturalizada en la membrana de nitrocelulosa donde se transfirieron las proteínas separadas por electroforesis. Para cada línea celular se corrieron en electroforesis 10ug de proteína de lisados (L) celulares y, 20uL de los sobrenadantes (S) de cada línea celular. Como se observa en la figura 10A, tanto los lisados celulares como los sobrenadantes que mostraron mayor señal en el Western-blot fueron los obtenidos de las células CaSki y las MSC-CaCu, lo cual también fue corroborado mediante un análisis densitométrico de las bandas de proteínas reveladas en el Western-blot, en donde se observa que el sobrenadante de las MSCCaCu fue quien mostró mayor señal (Figura 10B). Cabe mencionar que el peso molecular de las bandas detectadas fue cercano a los 70 KDa, similar al reportado por Vogel y colaboradores en 1992, quienes encontraron que la forma soluble de CD73 aislada del *Torpedo marmorata* posee un peso molecular de 62 kDa.

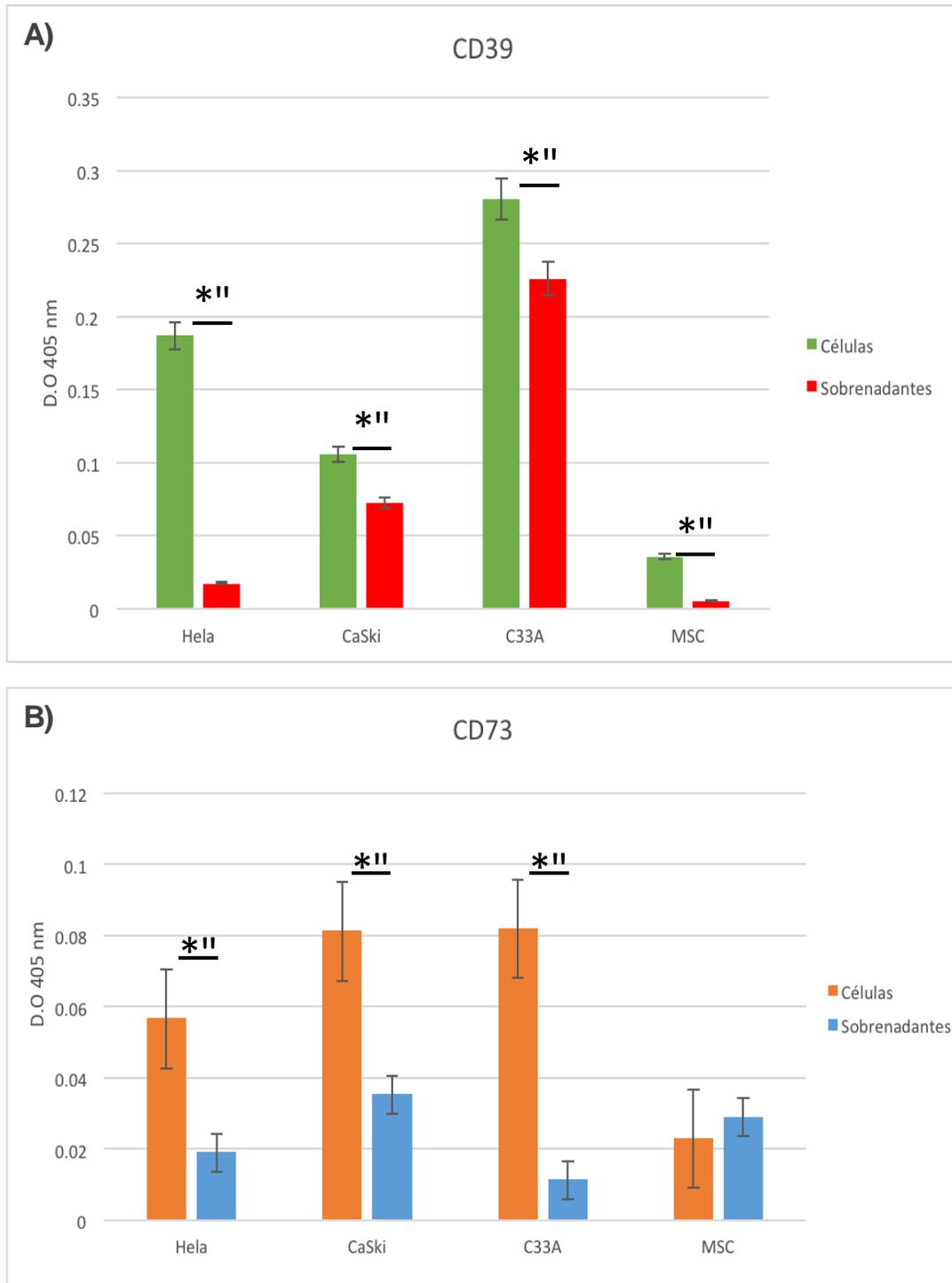


Figura 9. Detección de sCD39 y sCD73 en sobrenadantes de líneas celulares de CaCU y MSC-CaCU. 1×10^6 células provenientes de cada una de las líneas celulares de CaCU: Hela, CaSki y C33A, así como de MSC obtenidas de un tumor de CaCU, fueron cultivadas en placas de 24 pozos durante 72 horas con 2mL de medio libre de suero. La detección de CD39 (A) y CD73 (B) se realizó mediante la técnica de ELISA, empleando 100uL de cada sobrenadante por triplicado, o células (20,000) de cada línea celular previamente adheridas en la placa de ELISA. Las barras muestran el promedio y la desviación estándar. *, diferencias significativas $p < 0.05$.

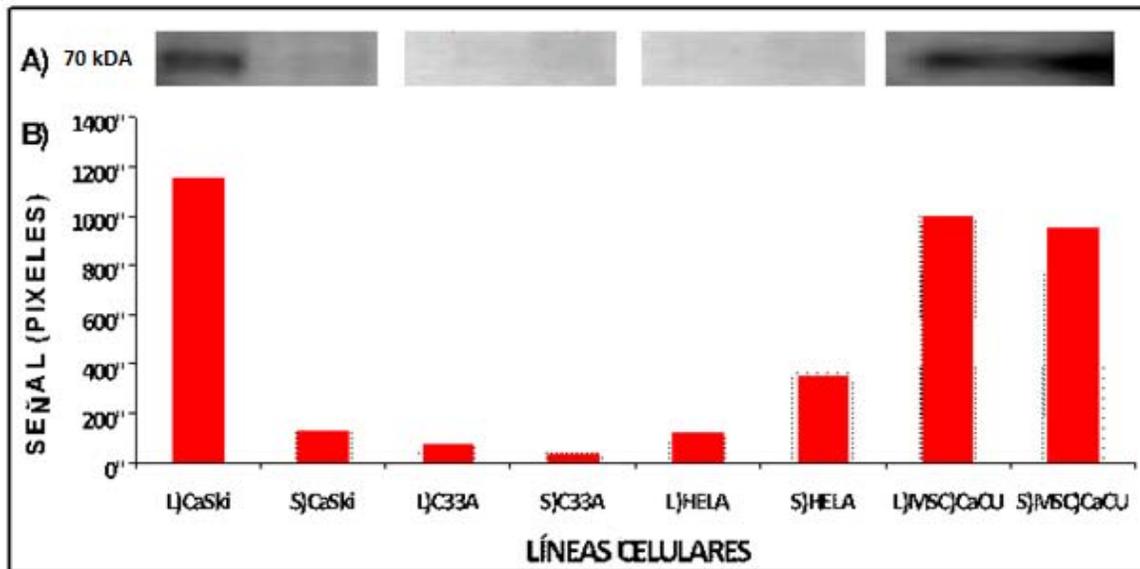


Figura 10.- Detección de sCD73 en sobrenadantes de líneas celulares de CaCu. 1×10^6 células provenientes de cada una de las líneas celulares de CaCu: Hela, CaSki y C33A, así como de MSC obtenidas de un tumor de CaCu, fueron cultivadas en placas de 24 pozos durante 72 horas con 2mL de medio libre de suero. **A)** Las bandas de proteína detectada por el anticuerpo monoclonal anti-CD73 mostraron un Peso Molecular cercano a 70Kd. **B)** Muestra los valores del análisis densitométrico de la proteína CD73 detectada para cada línea celular. (L) lisados celulares, (S) sobrenadantes de cada línea celular.

8.2 sCD39 y sCD73 producido por las células tumorales de CaCu y MSC CaCu generan adenosina a partir de nucleótidos de adenina.

El ATP extracelular es considerado como una poderosa molécula de señalización, éste es liberado de células dañadas o estresadas, y guía a los fagocitos hacia los sitios donde ocurre el daño para inducir en ellos respuestas pro-inflamatorias. La concentración extracelular de adenosina depende de: el equilibrio en su liberación por parte de las células, su toma bi-direccional por procesos transportadores de adenosina y por su generación dada por las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 en la superficie celular (Bono *et al*, 2015). De acuerdo a la evidencia bioquímica, las formas solubles pertenecientes a la familia de las NTPDasas perderían la mayor parte de su actividad catalítica (Zimmermann *et al* 2012), sin embargo se ha reportado que se liberan al torrente sanguíneo poca cantidad de sCD39 catalíticamente activa (Yegutkin G *et al*, 2007, Antonioli *et al*, 2013). Tanto las formas solubles así como las formas ancladas a la membrana celular de CD73 tienen características similares en la conversión de AMP y son capaces de producir adenosina (Zimmermann *et al*, 2012).

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la actividad enzimática de las formas sCD39 y sCD73 producidas por las líneas celulares de CaCu y MSC-CaCu. Para ello, sobrenadantes de cada una de las líneas celulares fueron incubados en presencia de 2.5 mg/mL de ATP, ADP o AMP, y en presencia o ausencia de polioxotungstato de sodio (POM-1, Sigma USA), inhibidor específico de CD39; o de adenosina 5'-(α,β -metileno) diphosphato (APCP, Sigma USA), inhibidor específico de CD73, a una concentración de 2.5mg/mL en una cinética de 72 horas. Al analizar los productos de la fosfohidrólisis mediante cromatografía de capa fina, se observó que los sobrenadantes de todas las líneas celulares de CaCu tuvieron la propiedad de fosfohidrolizar cada uno de los nucleótidos adicionados y generar adenosina (señalada por flechas blancas) después de 72 horas de incubación, como se muestra en la Figura 11A-D. De manera interesante, al agregar los inhibidores POM-1 para CD39, o APCP para CD73, se observó una fuerte inhibición de la capacidad fosfohidrolítica de CD39 para hidrolizar ATP y ADP, y de CD73 para hidrolizar AMP en los sobrenadantes de cada una de las líneas celulares de CaCu y de MSC-CaCu (Figura 11 A-D). Estos resultados nos permiten evidenciar que las nucleotidasas sCD39 y sCD73 producidas por las líneas celulares de CaCu y por las MSC-CaCu son catalíticamente activas.

8.3 Cuantificación de adenosina producida por la actividad catalítica de sCD73 contenida en sobrenadantes de células tumorales de CaCu y MSC CaCu.

Con la finalidad de cuantificar la adenosina producida por los sobrenadantes de células tumorales de CaCu y por MSC-CaCu, sobrenadantes de la línea celular CaSki y de MSC-CaCu incubados durante 72 horas en presencia de AMP y en presencia o ausencia del inhibidor específico de CD73 (APCP), fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultraresolución (UPLC) con la finalidad de cuantificar la cantidad de adenosina producida. Para ello, inicialmente se realizó una curva de calibración de adenosina empleando diluciones seriadas de adenosina a partir de una solución patrón de 1 ug/mL.

En la Figura 12, se observan los histogramas obtenidos de las diluciones seriadas de adenosina (Figura 12A) y la curva tipo (Figura 12B) de las concentraciones de adenosina mostrando los valores de -2.38 para la ordenada al origen, 4.11 para la pendiente, y un coeficiente de correlación r^2 de 0.999. El estándar se analizó por triplicado, el porcentaje desviación estándar de correlación fue de 117.42 lo cual indica una precisión favorable en el análisis.

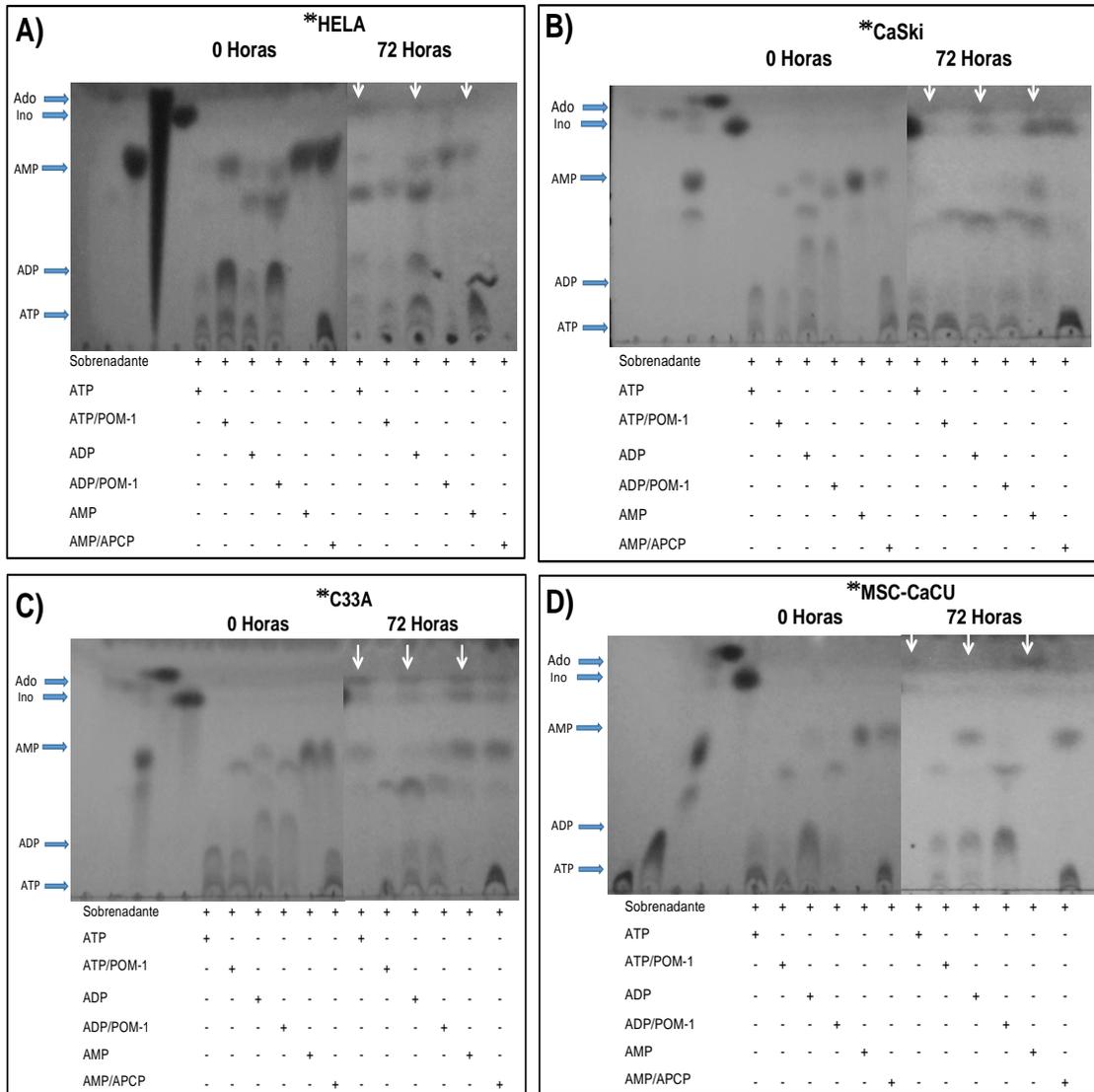


Figura 11.- Actividad catalítica de sCD39 y sCD73 contenida en sobrenadantes de líneas celulares de CaCU y MSC-CaCU. Sobrenadantes de las líneas celulares de CaCU: Hela (A), CaSki (B) y C33A (C), así como de MSC-CaCU (D), fueron incubados en presencia de los nucleótidos ATP, ADP y AMP a una concentración de 2.5mg/mL durante 72 horas. Se muestran los productos de la fosfohidrólisis de los nucleótidos en presencia y ausencia de polioxotungstato de sodio (POM-1, Sigma USA), inhibidor específico de CD39; o de adenosina 5'-(α,β -metilen) diphosphato (APCP, Sigma USA), inhibidor específico de CD73, a una concentración de 2.5mg/mL.

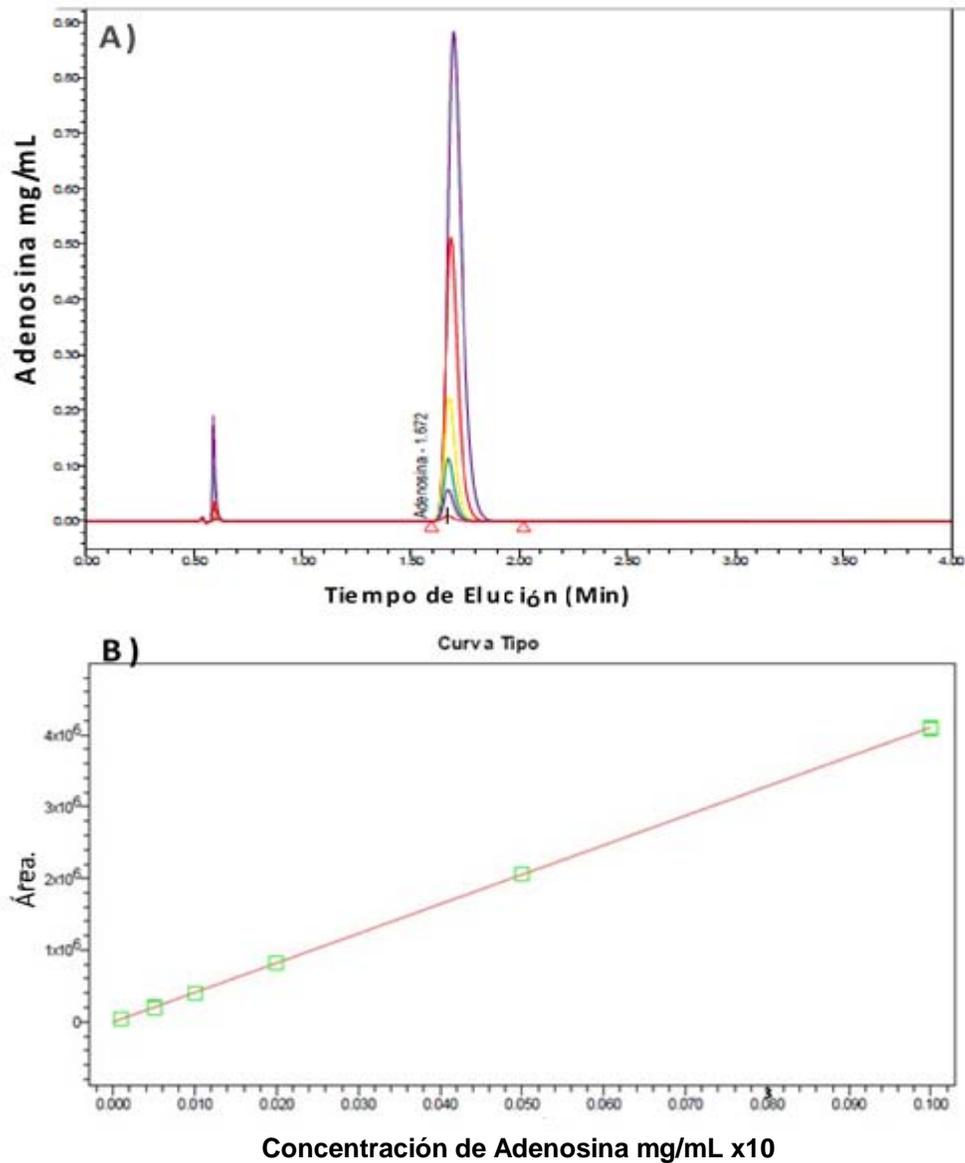


Figura 12.- Análisis cuantitativo de la producción de adenosina en sobrenadantes de células tumorales de CaCU y MSC-CaCU. **A)** Cromatograma representativo de varias concentraciones de adenosina obtenidas a partir de diluciones seriadas de una solución patrón de 1ug/mL de adenosina. **B)** Curva tipo que representa las concentraciones de adenosina en relación con el área bajo la curva de cada histograma.

Tomando como referencia los valores de la curva tipo de adenosina y con base en los datos obtenidos del área bajo la curva de los histogramas analizados mediante UPLC de los sobrenadantes de la línea celular CaSki y de MSC-CaCU, se encontró que después de 72 hrs de incubación la actividad catalítica del sobrenadante de CaSki produjo una concentración de 222ng/mL de adenosina. La adición de APCP inhibió de manera

importante la actividad de CD73 para producir adenosina, ya que durante ese tiempo de incubación se obtuvo una concentración de 38ng/mL de adenosina (Figura 13A). Por otro lado, los sobrenadantes de MSC-CaCU tuvieron mayor actividad catalítica, ya que después de 72hrs de incubación en presencia de AMP, se produjo una cantidad de 3377ng/mL de adenosina, y la adición de APCP inhibió fuertemente dicha actividad, obteniéndose una concentración de 366ng/mL durante el mismo tiempo de incubación (Figura 13B).

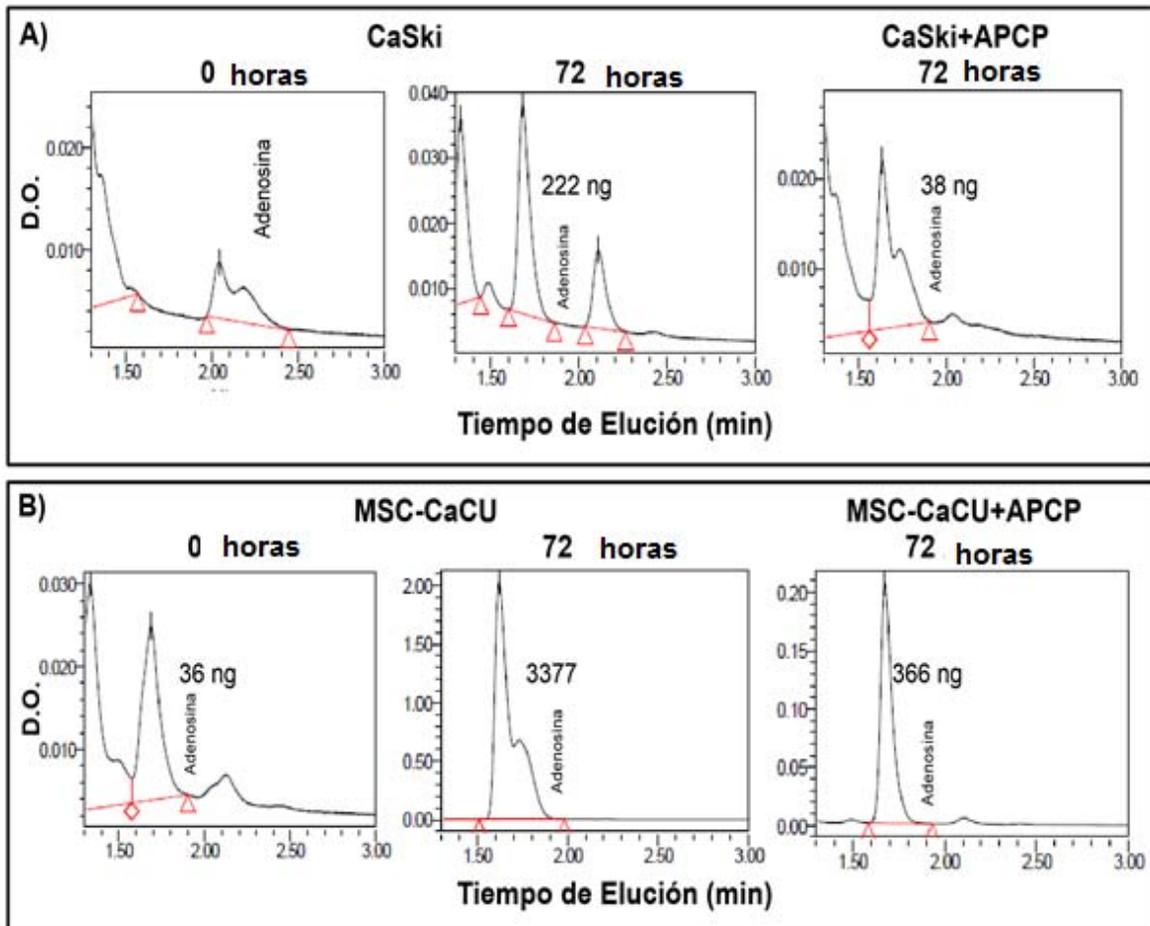


Figura 13.- Cantidad de adenosina producida por sobrenadantes de células tumorales de CaCU y MSCCaCU. Para determinar la actividad catalítica de sCD73 contenida en sobrenadantes de células tumorales de CaCU CaSki (A) y MSC-CaCU (B), 100uL de cada sobrenadante fueron incubados en presencia de 2.5mg/mL de AMP en presencia y ausencia de 2.5mg/mL del inhibidor de CD73 (APCP) durante 72hrs de incubación a 37° C. Se muestran los histogramas de adenosina obtenidos al inicio de la incubación (0 hrs) y después de 72 hrs en ausencia y presencia de APCP.

9.- Análisis de resultados.

El concepto de la inmunoeedición del cáncer postula que el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar la mayoría de los tumores en etapas tempranas (Rothschild *et al*, 2015), sin embargo el tumor desarrolla mecanismos para evadir y suprimir al sistema inmune. Entre estos mecanismos se encuentra la producción de factores inmunosupresores como prostaglandina E2 (Whiteside & Jackson, 2013) citocinas como TGF- β (Papageorgis & Stylianopoulos, 2015) y adenosina a partir de la fosfohidrólisis de nucleótidos como ATP mediante la acción catalítica de las ectonucleotidasasa CD39 y CD73 (Whiteside *et al*, 2011; Vinay *et al*, 2015). Las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 son expresadas en varios tipos celulares que participan en la respuesta inmune, así como en células tumorales y células del estroma tumoral; y se ha reportado que juegan un papel importante en la acumulación de adenosina extracelular para regular la acción proinflamatoria del ATP y mantener la homeóstasis fisiológica del organismo (Umansky *et al*, 2014). No obstante, la adenosina también juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune al ejercer su efecto supresivo sobre linfocitos T CD4+ y CD8+ a través de su interacción con receptores específicos A2A de alta afinidad (Filipello *et al*, 2016; Beavis *et al*, 2012).

En los últimos años ha llamado la atención el papel que juegan las ecto-nucleotidasas solubles en enfermedades inflamatorias como pancreatitis aguda (Maksimow *et al*, 2014), diabetes (Tak *et al*, 2014), así como también en cáncer en donde se han encontrado las formas solubles de CD73 en suero (Sunderman 1990) y líquido sinovial (Johnson *et al*, 1999); mientras que la forma soluble de CD39 también ha sido descrita en el plasma sanguíneo de pacientes con diferentes tipos de cáncer, sugiriendo una fuerte asociación con la supresión de la respuesta inmune y un pronóstico desfavorable (Antonioli *et al*, 2013).

En el presente trabajo se analizó la presencia y actividad funcional de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 solubles (sCD39 y sCD73) en sobrenadantes de cultivos de líneas de CaCU: Hela (VPH 18), CaSki (VPH 16), C33A (VPH-) y de MSC derivadas de un tumor de CaCU (MSC-CaCU). De manera interesante, mediante análisis de ELISA, Western-Blot, cromatografía de capa fina y UPLC se pudo evidenciar la presencia de sCD39 y sCD73 y la actividad catalítica de estas ectonucleotidasas en los sobrenadantes de todas las líneas celulares analizadas, especialmente en las células tumorales CaSki y en las MSC-CaCU,

quienes produjeron mayor cantidad de estas enzimas y mostraron mayor actividad catalítica sobre nucleótidos de adenina. Es de notar que al utilizar inhibidores específicos de CD39 (POM-I) o de CD73 (APCP), la actividad catalítica de estas ectonucleotidasas presentes en los sobrenadantes fue inhibida de manera importante, lo cual nos permite evidenciar que no solo las formas sCD39 y sCD73 son liberadas hacia el medio extracelular, sino que también mantienen su actividad catalítica. Estos resultados se encuentran acorde con lo reportado por Zimmermann y colaboradores en 1992, quien demostró que una de las formas solubles de CD73 tiene preferencia por AMP y su actividad catalítica es inhibida por APCP, además de poseer un peso molecular similar al de la forma anclada a la membrana. La presencia de las ecto-nucleotidasas solubles ha sido evaluada en especímenes como: toro (Fini *et al*, 2003), torpedo (Vogel *et al*, 1992), rata (Piec & Le Hir, 1991), así como también en células de placenta (Klemens *et al*, 1990) y células transfectadas con la parte externa de la proteína (Heuts *et al*, 2012). También se ha reportado que la actividad funcional de sCD73 ha sido evaluada en sangre de recién nacidos (Pettengill *et al*, 2013), en donde se encontró una alta actividad de dicha ecto-nucleotidasa en comparación con muestras provenientes de adulto, lo que sugiere que el incremento en la actividad de sCD73 en los recién nacidos les proporciona un estado inmunológico anti-inflamatorio. De manera interesante, estos estudios reportaron que las formas solubles de CD73, mostraron un peso molecular cercano a 70 kDa. En el caso específico de nuestro trabajo mediante la técnica de Western-blot logramos detectar, especialmente en los sobrenadantes derivados de las células CaSki y MSC CaCu, una proteína de 70kDa de peso molecular, al utilizar el anticuerpo anti-CD73. Cabe mencionar que la ectonucleotidasa CD39 no pudo ser detectada por el anticuerpo anti-CD39 utilizado en el ensayo de ELISA, debido probablemente a que el anticuerpo correspondiente solo puede detectar a la forma conformacional y no lineal de esta proteína.

Por otro lado, en nuestro estudio también encontramos que MSC-CaCu también liberaron cantidades detectables de las formas sCD39 y sCD73 al medio de cultivo, además de que mostraron una fuerte actividad catalítica sobre los nucleótidos de adenina. Particularmente encontramos que la actividad catalítica para fosfohidrolizar AMP y producir adenosina fue mayor que la producida por las células CaSki. En estudios previos hemos encontrado que las MSC-CaCu a diferencia de MSC obtenidas de tejidos cervicales normales pueden ejercer una actividad inmunosupresora sobre linfocitos T citotóxicos, y de evasión de la respuesta inmune por las células tumorales cuando son cocultivadas ya que disminuyen la

expresión de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad clase I vía la producción de las citocinas TGF- β e IL-10 (Montesinos *et al*, 2013; García-Rocha *et al*, 2015). Asimismo, en estudios recientes encontramos que MSC-CaCU muestran una mayor expresión de CD39 y CD73 en membrana, además de que también son capaces de producir grandes cantidades de adenosina, cuando se les incubaba con ATP, ADP y AMP (Manuscrito sometido a publicación). Por tanto, los hallazgos encontrados en este estudio, nos permiten sugerir que tanto las células tumorales de CaCU como las MSC que se encuentran en el microambiente tumoral, pueden co-participar en la generación de adenosina inmunosupresora, debido a la fuerte actividad catalítica de las ectoenzimas CD39 y CD73 que se encuentran ancladas en la membrana celular y aquellas formas solubles que son liberadas hacia el microambiente extracelular. En consecuencia, en un microambiente tumoral hipóxico, en donde predomina la producción de ATP, las células tumorales de CaCU y las MSC-CaCU pueden participar fuertemente en la producción de adenosina inmunosupresora.

Por otro lado, en estudios recientes se ha reportado que factores supresores intrínsecos en el microambiente tumoral, tal como TGF- β , puede jugar un papel importante en la sobre-expresión de CD39 y CD73 en la membrana celular. En algunos estudios se ha encontrado que al tratar células T CD4+ de ratones con TGF- β , se incrementa la expresión de CD73 y su capacidad de producir adenosina a partir de AMP (Regateiro *et al* 2011, Fernández *et al*, 2013). En otro estudio realizado por Ryzhov y colaboradores demostraron que el TGF- β conduce a la diferenciación de células supresoras derivadas mieloides hacia células mieloides mononucleares diferenciadas terminales protumorigénicas caracterizadas por un incremento en la expresión de CD39 y CD73 en la membrana celular (Ryzhov *et al* 2014). Por tanto, tomando en consideración que durante la progresión del CaCU el aumento en la expresión de las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β se correlaciona directamente con el grado de progresión de la enfermedad (Alcocer-González *et al*, 2006; Bermudez-Morales *et al*, 2008; Torres-Poveda *et al*, 2014). Entonces será importante evaluar si la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 tanto ancladas en membrana como en su forma soluble son modificadas en presencia de estos factores inmunosupresores.

Si bien, las formas solubles de CD73 y CD39 pueden tener efectos benéficos como los mostrados por la forma soluble de CD73 del veneno de *Crotalus atrox*, al utilizarse como un posible agente terapéutico en isquemia intestinal, renal, o en lesiones pulmonares

agudas al prevenir la formación de coágulos en dichas enfermedades (Hart *et al*, 2008); o de sCD39 que también ha sido propuesta como un novedoso agente anti-trombótico (Gayle *et al*, 1997), resulta contrastante saber que las formas solubles de CD39 y CD73 producidas por las células tumorales y células del estroma tumoral son utilizadas para evadir, suprimir y favorecer el crecimiento tumoral. Por lo cual se hace necesario el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas que conduzcan a regular y/o inhibir la actividad de estas ectoenzimas y favorecer la respuesta inmune antitumoral.

10.- Conclusiones.

- Las células tumorales de CaCU Hela, (VPH-18), CaSki (VPH-16), C33A (VPH-), así como MSC-CaCU son capaces de liberar al medio extracelular las formas solubles de CD39 (sCD39) y CD73 (sCD73).
- Las formas sCD39 y sCD73 producidas y liberadas al medio de cultivo por las células tumorales de CaCU y MSC-CaCU mostraron actividad catalítica para hidrolizar ATP, ADP y AMP para generar adenosina, la cual fue inhibida por los inhibidores específicos para CD39 (POM-1) y CD73 (APCP).
- Las células tumorales CaSki (VPH-16) y las MSC-CaCU presentaron la mayor producción sCD73, la cual correlacionó con la mayor capacidad para generar adenosina a partir de AMP.
- Los hallazgos encontrados en nuestro sistema de cultivo nos permiten evidenciar, por primera vez en la literatura, que células tumorales de CaCU pueden liberar CD39 y CD73 en su forma soluble al medio extracelular, y por tanto pueden participar en la generación de un microambiente tumoral inmunosupresor.

11.- Perspectivas.

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo y con los obtenidos en el presente trabajo, las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 expresadas en las líneas celulares derivadas de CaCu son capaces de liberar formas solubles al medio extracelular y producir adenosina, por lo que se recomienda:

- Evaluar si la adenosina producida por sCD39 y sCD73 tiene un efecto inmunosupresor en los linfocitos T.
- Examinar el papel de sCD39 y sCD73 en un modelo *in vivo*.
- Determinar los factores que regulan la expresión y liberación de sCD39 y sCD73 en líneas celulares de CaCu.
- Determinar el mecanismo por el cual se da la liberación de estas formas solubles.
- Analizar el papel de la microvesículas, exosomas y formas solubles en la progresión del CaCu.

12.- Bibliografía.

- Abbas, Lichtman A. 2012. Inmunología Celular y Molecular. 7ª edición. Editorial Elsevier. Madrid. pp. 189-193.
- Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología molecular de la célula. 5ª edición. Ediciones Omega. Barcelona.pp.1313-1316.
- Albini A, Noonan D M, Ferrari N. 2007. Molecular pathways for cancer angioprevention. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4320-4325.
- Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M. 2014. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators of inflammation*, 2014. 2014:509027
- Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. 2006. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol.* 9:481-491.
- Allard B, Turcotte M, Stagg J. 2014. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert Opin Ther Targets* 18(8), 863-881.
- Amador-Molina A, Hernández-Valencia J F, Lamoyi E, Contreras-Paredes A, Lizano M. 2013. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses*, 5(11), 2624-2642.
- de Andrade Mello P, Filippi-Chiela E C, Nascimentoa J, Beckenkampa A, Bertodo Santanaa D, Kipperb F, Casalic E A, Nejar Brunod A, Domiraci Pacceze J, Zerbinie L F, Winkf M R, Lenzb G, Buffon A. 2014. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25(19), 2905-2918.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi E S, Haskó, G. 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 19(6), 355-367.
- Antonioli L, Haskó G, Fornai M, Colucci R, Blandizzi C. 2014. Adenosine pathway and cancer: where do we go from here? *Expert Opin Ther Targets*, 18(9), 973-977.
- Ávila Ibarra L R. 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 L R. 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.
- Beavis P A, Stagg J, Darcy P K, Smyth M J. 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology*. 33(5), 231237.
- Bermúdez-Morales V H, Gutiérrez L X, Alcocer-González J M, Burguete A, Madrid-Marina V. 2008. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest*, 26: 1037-1043.
- Bianchi V, Spychala J. 2003. Mammalian 5'-nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46195-46198.
- Blay J, White T D, Hoskin D W. 1997. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 57:2602–2605.
- Bono M R, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D. 2015. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters*. 589(22), 3454-3460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>
- Boraschi, D, Duschl A. Eds. 2014. *Nanoparticles and the immune system: safety and effects*. Academic Press.
- Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski A C. 2006. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*, 53(2), 269.
- Bravo I G, Félez-Sánchez M. 2015. Papillomaviruses Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution medicine and public health*, 2015(1), 32-51.
- Broere S G, Apasov M V, Sitkovsky, Eden W V. 2011., T cell subsets and T cell-mediated immunity, *Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition*.
- Bynoe M S, Viret C, Yan A, Kim D G. 2015. Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood–brain door. *Fluids and Barriers of the CNS*, 12(1), 1-12.
- Cid-Arregui A. 2009. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *The open virology journal*, 3: 67-83.

- Chen W, Guidotti G. 2001. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(1), 90-95.
- Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason M D, Tabi Z. 2011. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J. Immunol.* 187: 676–683.
- Crosbie E J, Einstein M H, Franceschi S, Kitchener H C. 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382(9895), 889-899.
- Díaz Martín D, Prieto M A, Úbeda Cantera M, Álvarez-Monsoto M. 2013. Enfermedades del Sistema Inmune. *Medicine.*;11:1699-709
- Dominici M L B K, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F C, Krause D S, Horwitz, E M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo I G, Stoler M, Broker T R, Stanley M A. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.
- Dwyer K M, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom T B, Robson S C. 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling*, 3(12), 171-180.
- Eltzschig H K. 2009. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology*, 111(4), 904.
- Fernandes J V, Fernandes T A A D M, de Azevedo J C V, Cobucci R N O, de Carvalho M G F, Andrade V S, de Araújo J M G. 2015. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncology Letters*, 9(3), 1015-1026.
- Fernández P, Perez-Aso M, Smith G, Wilder T, Trzaska S, Chiriboga L, Franks, Jr A, Robson S C, Cronstein B N, Chan E S L. 2013. Extracellular generation of adenosine by the ectonucleotidases CD39 and CD73 promotes dermal fibrosis. *Am J Pathol*; 183:1740–6
- Filipello F, Pozzi D, Proietti M, Romagnani A, Mazzitelli S, Matteoli M, Grassi F 2016. Ectonucleotidase activity and immunosuppression in astrocyte CD4 T cell bidirectional signaling. *Oncotarget*.7 (5), 5143-5156.
- Fini C, Talamo F, Cherri S, Marcello C, Floridi A, Ferrara L, Scaloni A. 2003. Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'nucleotidase from bull seminal plasma. *Biochemical Journal*, 372(2), 443-451.

- Frumovitz M. 2016. Small-and Large-Cell Neuroendocrine Cervical Cancer. *Oncology*, 30(1).
- Gao, Z. W., Dong, K., & Zhang, H. Z. 2014. The Roles of CD73 in Cancer. *BioMed research international*. 2014
- García-Rocha R. 2011. Análisis de la capacidad de las células estromales mesenquimales (MSC) derivadas de neoplasias cervicales (NIC y CaCu) para inducir linfocitos T reguladores. Tesis de Maestría, IPN
- García-Rocha R. Moreno-Lafont M, Mora-García M L, Weiss-Steider B, J J Montesinos, Piña-Sánchez P, Monroy-García A. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF- β 1 expression and IL- 10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity, *Cytokine*. 76(2), 382-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.09.001>
- Gayle 3rd R B, Maliszewski C R, Gimpel S D, Schoenborn M A, Caspary R G, Richards C, Alyonycheva T N. 1997. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *Journal of Clinical Investigation*, 101(9), 1851.
- Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. 2015. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in Immune-mediated diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(2), 280-287.
- Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. 2012. Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *BioMed Research International*, 2012.
- Globocan. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Consultado el 12 de abril de 2015.
- Hart M L, Köhler D, Eckle T, Kloor D, Stahl G L, Eltzschig H K. 2008. Direct treatment of mouse or human blood with soluble 5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(8), 1477-1483.
- Hernández-Hernández D M, Apresa-García T, Patlán-Pérez R M. 2015. Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 53 (2), 5154-5161
- Heuts D P, Weissenborn M J, Olkhov R V, Shaw A M, Gummadova J, Levy C, Scrutton N S. 2012. Crystal Structure of a Soluble Form of Human CD73 with Ecto 5'Nucleotidase Activity. *Chembiochem*, 13(16), 2384-2391.

- Hibma M H. 2012. The immune response to papilloma virus during infection persistence and regression. *Open Virology Journal* 6(1): 241–248. doi: 10.2174/1874357901206010241
- Hopenhayn C, Christian A, Christian W J, Watson M, Unger E R, Lynch C F Cozen W. 2014. Prevalence of human papillomavirus types in invasive cervical cancers from seven US cancer registries prior to vaccine introduction. *Journal of lower genital tract disease*, 18(2), 182.
- Horenstein A L, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, Serra S, Malavasi F. 2013. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncolmmunology*; 2(9):e26246; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.26246>
- Hoskin, D W, Mader J S, Furlong S J, Conrad D M, Blay J. 2008. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *International journal of oncology*, 32(3), 527-535.
- Ibeanu O A. 2011. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cáncer biology & therapy*, 11(3), 295-306.
- INEGI 2014. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx
- James A W. 2013. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica*, 2013.
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson L F, Liu A, Daniel B J, Zhang B. 2010. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cáncer research*, 70(6), 2245-2255.
- Johnson S M, Patel S, Bruckner F E, Collins D A. 1999. 5'- Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 38:391– 396
- Kindt T, Goldsby R, Osborne B. 2007. *Inmunología de Kuby*. 6ª edición. Editorial McGraw-Hill. Mexico. pp 15-20.
- Klemens M R, Sherman W R, Holmberg N J, Ruedi J M, Low M G, Thompson, L. F. 1990. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 172(3), 1371-1377.
- Kumar V 2013. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic signalling*, 9(2), 145-165.

- Langers I, Delvenne P, Jacobs N. 2014. Origin and immunoescape of uterine cervical cancer. *La Presse Médicale*, 43(12), e413-e421.
- Liu N, Fang X D, Vadis Q. 2012. CD73 as a novel prognostic biomarker for human colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, vol. 106, no. 7, pp. 918–919.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser K, Krieger M, Scott M, Zipursky L, Darnell J. 2006. *Biología celular y molecular*. 5° edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1088 p.
- Longhi M S, Robson S C, Bernstein S H, Serra S, Deaglio S. 2013. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *Journal of Molecular Medicine*, 91(2), 165-172.
- López A, Lizano M. 2006. Cáncer cervico uterino y virus de papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*. 31-55
- López-Cisneros. D S. 2015 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). Tesis de licenciatura. UNAM. México, D.F.
- Lu X X, Chen Y T, Feng B, Mao X Y, Yu B, Chu X. 2013. Expression and clinical significance of CD73 and hypoxiainducible factor-1 in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 12, pp. 1912–1918.
- Maksimow M, Kyhälä L, Nieminen A, Kylänpää L, Aalto K, Elima K, Salmi M. 2014. Early Prediction of Persistent Organ Failure by Soluble CD73 in Patients With Acute Pancreatitis. *Critical care medicine*, 42(12), 2556-2564.
- McLaughlin-Drubin, M E, Münger K. 2009. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus research*, 143(2), 195-208.
- Moody, C A, Laimins L A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cáncer*, 10(8), 550-560.
- Montesinos J J, Mora-García M, Mayani H, Flores-Figueroa E, García-Rocha R, Fajardo-Orduña G R, Castro-Manreza M E, Weiss-Steider B, Osorio-Flores A T, Monroy-García A. 2013. In Vitro Evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells Dev*. 15: 2508-2519.
- Morales-Ramírez O. 2014. Análisis funcional de la vía adenosinérgica a través de la expresión de las ectoenzimas CD39/CD73 en células estromales mesenquimales

derivadas de cérvix y su efecto inmunosupresor. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

- Morales-Sánchez A, Fuentes-Pananá E M. 2014. Human Viruses and Cancer. *Viruses*, 6, 4047-4079.
- Morshed K, Polz-Gruszka D, Szymański M, Polz-Dacewicz M. 2014. Human Papillomavirus (HPV)–Structure, epidemiology and pathogenesis. *Otolaryngologia Polska*, 68(5), 213-219.
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. Inmunología de Janeway. 7° edición, Editorial McGraw Hill. México. 888 p.
- Papageorgis P, Stylianopoulos T. 2015. Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (Review). *International journal of oncology*, 46(3), 933-943.
- Patel S, Chiplunkar S. 2009. Host immune responses to cervical cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 21(1), 54-59.
- Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán J L, Usheva A, Bingham T, Gelinas L. 2013. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27315-27326.
- Piec G, Le Hir M. 1991. The soluble 'low-Km'5'-nucleotidase of rat kidney represents solubilized ecto-5'-nucleotidase. *Biochemical journal*, 273(2), 409-413.
- Piersma S J. 2011. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cáncer Microenvironment*, 4(3), 361-375.
- Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi M R. 2014. Mechanisms of tumor escape from immune system: Role of mesenchymal stromal cells. *Immunology letters*, 159(1), 55-72.
- Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang B Q, He B C, He T C. 2010. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World journal of stem cells*, 2(4), 67.
- Regateiro F S, Howie D, Nolan K F, Agorogiannis E I, Greaves D R, Cobbold S P, Waldmann H. 2011. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *Eur J Immunol*; 41:2955–65

- Regateiro, F S, Cobbold S P, Waldmann H. 2013. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clinical & Experimental Immunology*, 171(1), 1-7.
- Regueiro González J R, López Larrea C, Rodríguez González S, Martínez Naves E 2002. Inmunología. Biología y Patología del sistema inmune. 3° Edición. Editorial Médica Panamericana. ISBN 847903707.
- Robson, S C, Sévigny J, Zimmermann H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling*, 2(2), 409-430.
- Romero J A A, Guerrero D M P, Pardo V M R. 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova*, 5(8).
- Rosales R, Rosales C. 2014. Immune therapy for human papillomaviruses related cancers. *World journal of clinical oncology*, 5(5), 1002.
- Rothschild S I, Thommen D S, Moersig W, Müller P, Zippelius A. 2015. Cancer immunology—development of novel anti-cancer therapies. *Swiss medical weekly*, 145.
- Ruddon R W. 2007. Cáncer Biology, 4th Ed (N.Y) Oxford University Press. pp 402-427.
- Ryzhov S V, Pickup M W, Chytil A, Gorska A E, Zhang Q, Owens P, Novitskiy S V. 2014. Role of TGF- β Signaling in Generation of CD39+ CD73+ Myeloid Cells in Tumors. *The Journal of Immunology*, 193(6), 3155-3164.
- Saldanha-Araujo F, Ferreira F I, Palma P V, Araujo A G, Queiroz R H, Covas D T, Panepucci R A. 2011. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Research*, 7(1), 66-74.
- Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiza V. 2015. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 53 (2), 5166-5171
- Scarfi S. 2014. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J Stem Cells*, 6(2), 153-162.

- Smyth L A, Ratnasothy K., Tsang J, Boardman D, Warley A, Lechler R, Lombardi G. 2013. CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *European journal of immunology*, 43(9), 2430-2440.
- Stagg J, Smyth M J. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29(39), 5346-5358.
- Stanley M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24, S16S22.
- Stanley M A. 2012. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 215-222.
- Sunderman F W Jr. 1990. The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Annu Clin Lab Sci* 20:123–139
- Supernat A., Welnicka-Jaśkiewicz M, Markiewicz A. 2012. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 20(2). 103–107.
- Tak E, Ridyard D, Kim J H, Zimmerman M, Werner T, Wang X., Moldovan, R. 2014. CD73-dependent generation of adenosine and endothelial Adora2b signaling attenuate diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(3), 547-563.
- Titla Vilchis, J I. 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. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Torres-Pineda, D B. 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 A I, Bermúdez-Morales V H, Peralta-Zaragoza O, 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.
- Umansky V, Shevchenko I, Bazhin A V, Utikal J. 2014. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(10), 1073-1080.

- Vinay D S, Ryan E P, Pawelec G, Talib W H, Stagg J, Elkord E, Signori E. 2015. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in cancer biology*. Academic Press. 35: S185–S198.
- Vogel M, Kowalewski H, Zimmermann H, Hooper N M, Turner A J. 1992. Soluble low-K_m 5'-nucleotidase from electric-ray (*Torpedo marmorata*) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage. *Biochemical Journal*, 284(3), 621-624.
- Walboomers J M, Jacobs M V, Manos M M, Bosch F X, Kummer J A, Shah K V, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*, 189(1), 12-19.
- Whiteside T L, Mandapathil M, Schuler P. 2011. The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Current medicinal chemistry*, 18(34): 5217–5223.
- Whiteside T L, Jackson E K. 2013. Adenosine and prostaglandin E₂ production by human inducible regulatory T cells in health and disease. *Frontiers in immunology*, 4:212
- Xiang-Mei W, Xing Liu, Qing-Fang J, Shao-Yue Fu, You-Quan Bu, Fang-Zhou Song, Fa-Ping Yi, 2014. Cytotoxic T Lymphocytes Elicited by Dendritic Cell Targeted Delivery of Human Papillomavirus Type-16 E6/E7 Fusion Gene Exert Lethal Effects on CaSki Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Vol 15, 2247
- Yang Q, Du J, Zu L. 2013. Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis, *Pathology Oncology Research*, 19(4) 811–814.
- Yegutkin G G., Samburski S S, Mortensen S P, Jalkanen S, Gonzalez-Alonso J. 2007. Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol* 579:553–564
- Yegutkin G G, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila J P, Elimä K, Salmi M. 2011. Altered purinergic signaling in CD73 deficient mice inhibits tumor progression. *European journal of immunology*, 41(5), 1231-1241.
- Yegutkin, G G, Wieringa B, Robson S C, Jalkanen S. 2012. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *The FASEB Journal*, 26(9), 3875-3883.
- Young A, Mittal D, Stagg J, Smyth M J. 2014. Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches. *Cancer discovery*, 4(8), 879-888.

- Zandberg, D P, Bhargava R, Badin S, Cullen K J. 2013. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(1), 57-81.
- Zhang B. 2010. CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cáncer research*, 70(16), 6407-6411.
- Zhao S X, Zhang H M, Dong S X. 2011. Characteristics and clinical significance of CD73 expression in subtypes of leukemia. *Journal of experimental hematology*. Chinese Association of Pathophysiology. 19(5) 1141– 1144.
- Zimmermann H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*, 285(Pt 2), 345.
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signalling*, 8(3), 437-502.