



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES SOBRE
LA EXPRESIÓN DE CD73 EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. ÁVILA IBARRA LUIS ROBERTO

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

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES SOBRE
LA EXPRESIÓN DE CD73 EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. ÁVILA IBARRA LUIS ROBERTO

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

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. JUNIO, 2019

OFICIO CPCB/596/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 25 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ÁVILA IBARRA LUIS ROBERTO** con número de cuenta **304321225**, con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD73 EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**:

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
Secretario: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de mayo de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por enriquecer mi formación personal y académica, así como la realización de esta tesis. El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave del proyecto IN226516 y 240635. Y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS, con los apoyos financieros de los proyectos: Concesión n^o. 1161, 1314, 1383 y 1613.

Durante los estudios de maestría recibí los siguientes apoyos: Beca Conacyt con número de registro 280526 durante el periodo comprendido entre Enero del 2015 y Diciembre del 2018; apoyo financiero como becario de investigación con número de matrícula 99096723 proporcionado por el Instituto Mexicano del Seguro Social en el periodo de Enero del 2015 a Mayo del 2015.

A los miembros del Comité Tutor. El trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la tutoría principal del Dr. Alberto Monroy García y la dirección tutorial de la Dra. Marcela Lizano Soberón y la Dra. Patricia García López, por la guía y consejos en la realización y culminación de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

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

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

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

Al Dr. Jorge Hernández Montes de nueva cuenta por ser el tutor que no aparece en mi comité, enriqueciendo este trabajo con cada una de sus sugerencias y consejos, por sus grandes aportaciones e ideas que ayudaron a enriquecer este trabajo de investigación.

Al Dr. Benny Weiss Steider, Dr. Juan José Montesinos Montesinos, Dr. Alfonso Dueñas Gonzalez y Dra. Rebeca López Marure por la atinada revisión de éste trabajo, así como las observaciones y sugerencias realizadas que permitieron enriquecer al mismo.

A mis padres Saúl y Yola por apoyarme en cada una de mis decisiones y depositar en mi toda su confianza. A Yohaly, Gabriel y Diego que han contribuido para cumplir mis objetivos.

A mis amigos Carlos, Rodrigo, Ricardo y Robert que me apoyaron en esta etapa de formación.

A todos mis compañeros de los laboratorios Inmunobiología e inmunología del cáncer por el apoyo brindado y hacer del ambiente de trabajo mas agradable y ameno. Gracias nuevamente mis cuates.

DEDICATORIA

Fuerza a todos los pacientes y ánimo a los profesionales para seguir con su duro trabajo. “No son solo ustedes, somos todos. No están solos, vamos juntos”.

“He llegado a creer que todo mi pasado y frustración se basaban en la comprensión que ha creado el nivel de vida que ahora disfruto”. -**Anthony Robbins**.

“Tanto crees que si puedes como si no, estás en lo cierto”. – **Henry Ford**

ÍNDICE

Sección	Página
1. Abreviaturas	
2. Lista de figuras y cuadros	
3. Resumen	1
4. Abstract	2
5. Introducción	3-28
6. Justificación	29
7. Objetivos	30
8. Hipótesis	30
9. Metodología	31-38
10. Resultados	39-55
11. Discusión	56-60
12. Conclusiones	61
13. Literatura Citada	62-74
14. Apéndice (artículo requisito para la obtención del grado)	75-86

1. ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminasa
Ado	Adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
AR'S	Receptores de adenosina
A2AR	Receptor de adenosina A2A
APCP	Adenosina 5' α , β metileno monofosfato
CaCu	Cáncer cérvico uterino
CEMs	Células estromales mesenquimales
CD	Célula dendrítica
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CMNSP	Células mononucleares de sangre periférica
HIF-1α	Factor inductor de hipoxia 1 alfa
INF-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Célula asesina natural
TCR	Receptor de células T
TME	Microambiente tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLC	Cromatografía en capa fina
Treg	Linfocitos T reguladores
UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución
HPV	Virus del papiloma humano

2. LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura	Página
Figura 1. Mecanismo de infección del virus de papiloma humano en el cérvix	5
Figura 2. Representación de la inmunidad innata y adaptativa	9
Figura 3. Destrucción de células tumorales por linfocitos T citotóxicos	10
Figura 4. Estrategias inmunosupresoras explotadas por los tumores	13
Figura 5. Diferenciación de CEMs hacia diferentes linajes	14
Figura 6. Representación de generación de adenosina extracelular	18
Figura 7. Estructura y papel del CD73 en las vías metabólicas extracelulares	19
Figura 8. Receptores de adenosina	26
Figura 9. Vías de segundos mensajeros acopladas a los receptores de adenosina	27
Figura 10. Células de CaCu incrementan la expresión de CD73 en cocultivo con CEMs	40-41
Figura 11. Actividad hidrolítica de CD73 en células CaSki cocultivadas con CEMs	43-44
Figura 12. TGF- β 1 incrementa la expresión de CD73 en células CaSki	46-47
Figura 13. Actividad hidrolítica de CD73 en células CaSki cultivadas con TGF- β 1 e IL-10	48-49
Figura 14. Producción de TGF- β 1 e IL-10 en cocultivos de células CaCu y CEMs	51-52
Figura 15. Anti-TGF- β y anti-IL-10 revierten la expresión de CD73 en células de CaCu	53
Figura 16. Ado producida por CaSki cultivadas con CEMs inhibe la proliferación de células T	54
Figura 17. CEMs presentes en el TME promueven la actividad adenosinérgica e inmunosupresora de células tumorales de CaCu a través de la producción de TGF- β 1 e IL-10	60

3. RESUMEN

Las células estromales mesenquimales (CEMs) presentes en el microambiente tumoral (TME) participan junto con las células tumorales para suprimir la respuesta inmune antitumoral mediante la producción de factores inmunosupresores tales como TGF- β 1 e IL-10. Además, se sabe que estas citocinas pueden inducir la expresión de la enzima 5'-nucleotidasa (CD73) en diversos tipos de células, cuya actividad funcional está relacionada con la producción de adenosina (Ado), un nucleósido conocido por su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora.

En este estudio, proporcionamos evidencias de que el cocultivo de CEMs derivadas de tumores de cáncer cérvico-uterino (CEMs-CaCu) con células tumorales de CaCu, incrementó la expresión de CD73 en las células tumorales y su capacidad para generar Ado de una manera dependiente de la proporción de CEMs incorporadas en los cocultivos. El incremento en la expresión de CD73 en las células tumorales correspondió con el aumento en los niveles de TGF- β 1 e IL-10 en los sobrenadantes de los cocultivos. De manera interesante, la adición de anticuerpos neutralizantes anti-hTGF- β y anti-hIL-10 revirtió fuertemente la expresión de CD73 en las células tumorales. Este fenómeno no fue exclusivo de CEMs-CaCu ya que el cocultivo de CEMs derivadas de cérvix normal (CEMs-CN) o de una línea de fibroblastos humanos (H5-S) con células de CaCu, produjo resultados similares. Finalmente, las células tumorales de CaCu cocultivadas con las CEMs presentaron mayor capacidad inmunosupresora sobre células T, la cual fue asociada de manera importante con la mayor generación de Ado en relación a las células tumorales que no fueron cocultivadas con las CEMs.

Estos resultados sugieren que la interacción de las CEMs con las células tumorales de CaCu en el TME puede condicionar a una mayor producción de TGF- β 1 e IL-10 para mantener un estado inmunosupresor no solo a través de la actividad *per se* de estas citocinas, sino también por su capacidad para inducir la expresión de CD73 en células tumorales y generar un microambiente inmunosupresor rico en Ado.

4. ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (CEMs) present in the tumor microenvironment (TME) participate together with the tumor cells to suppress the antitumor immune response by producing immunosuppressive factors such as TGF- β 1 and IL-10. Furthermore, it is known that these cytokines can induce the expression of the enzyme 5'-nucleotidase (CD73) in various cell types, whose functional activity is related to the production of adenosine (Ado), a nucleoside known for its anti-inflammatory and immunosuppressive activity.

In this study, we provide evidence that CEMs derived from cervical cancer tumors (CEMs-CaCu), increased the expression of CD73 and the ability to generate Ado on cervical cancer cells, which was associated with the amount of CEMs added in the cocultures with the tumor cells. The increase in the expression of CD73 on the tumor cells corresponded with the increase in the levels of TGF- β 1 and IL-10 in the supernatants of the cocultures. Interestingly, the addition of the anti-hTGF- β and anti-hIL-10 neutralizing antibodies strongly reversed the expression of CD73 in the tumor cells. This phenomenon was not exclusive of CEMs-CaCu since the coculture of CEMs derived from normal cervix (CEMs-CN) or from a line of human fibroblasts (H5-S) with CaCu cells, produced similar results. Finally, tumor cells previously cocultured with the CEMs presented greater immunosuppressive capacity on T cells, than those cultured in the absence of CEMs, due mainly to the greater Ado generation.

These results suggest that the presence of CEMs in the TME may condition to a greater production of TGF- β 1 and IL-10 to maintain an immunosuppressive state not only through the activity *per se* of these cytokines, but also by its ability to induce the expression of CD73 on tumor cells to generate, in consequence, an immunosuppressive microenvironment rich in Ado.

5. INTRODUCCIÓN

Cáncer cérvico-uterino y HPV.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un problema importante de salud pública en el mundo y representa la segunda causa de mortalidad debida a padecimientos oncológicos en mujeres, con aproximadamente 500,000 muertes al año, siendo la mayor tasa de incidencia entre la población femenina de los países en vías de desarrollo (**Jemal et al, 2011**). En México, anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos, con una incidencia de 35.4 casos por cada 100,000 mujeres, y representa la segunda causa de muerte por tumores genitales, con una tasa de 11.3 muertes por cada 100,000 mujeres (**INEGI, 2018**). El factor etiológico central para el desarrollo de CaCu es la infección persistente por los tipos de virus del papiloma humano (HPV) oncogénico de alto riesgo (**Ibeanu, 2011**).

A nivel mundial, los tipos más comunes de HPV asociados con CaCu, denominados también como HPV 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 HPV 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 está 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**).

Se ha demostrado que los genomas de los HPV usualmente se integran al genoma de la célula hospedera. Esta integración se realiza en diversos sitios, algunos de ellos cercanos a oncogenes específicos o sitios frágiles, sugiriendo que este evento puede tener un papel importante en el desarrollo de los tumores cervicales (**Vázquez-Ortiz et al, 2005**). Los HPVs son virus de ADN de doble cadena, de la familia Papilomaviridae. El genoma puede variar ligeramente entre los diferentes tipos de HPV, contienen cerca de 8.000 pb y codifica en 8 o 9 marcos abiertos de lectura, los cuales son transcritos como ARNm policistrónicos. La cápside viral está formada por 2 proteínas: La proteína L1 (elemento estructural primario), con 360 copias organizada en 72

capsómeros en los viriones infectantes. La proteína L2 es un componente menor del virión y está presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virión; interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN y en la formación y estabilidad de la cápside. Ambas proteínas juegan un papel importante en la eficiencia de la infectividad del virus. La infección por HPV requiere que las partículas virales accedan a la capa basal epitelial y penetren a las células basales en división. Es bien conocido que previo a que los HPVs establezcan una infección, tienen que experimentar un complicado proceso para unirse y entrar a la célula huésped. Hay controversia sobre la naturaleza del receptor viral, pero se cree que son los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) los receptores iniciales. Se ha observado que la proteína L2, de todos los virus HPVs secuenciados, contiene en su extremo amino terminal una secuencia consenso que es escindido por furina, una pro-proteína convertasa, y se supone que la escisión por furina es necesaria para la unión y entrada del virus a la célula, ya que esto provoca un cambio conformacional de la cápside viral, seguido de la liberación de los HSPGs para la posterior asociación con un receptor putativo secundario, que se cree es una integrina. Otros estudios evidencian que el rompimiento de furina puede llevarse a cabo en la superficie celular o dentro de un compartimiento endosomal temprano y las cápsides se liberan en un compartimiento endosomal tardío, liberando el genoma asociado del endosoma hacia el citoplasma por un mecanismo que involucra el extremo C terminal de L2.

La replicación del HPV está íntimamente ligada al proceso de diferenciación de las células huésped. Las células escamosas del epitelio normal crecen como epitelio estratificado el cual presenta dos tipos de queratinocitos, las células madre y células de amplificación en tránsito. Las células madre se adjuntan a la de la membrana basal y mantienen una alta capacidad de autorrenovación. Después de la división de las células basales, las células hijas que se convertirán en células de amplificación en tránsito migran hacia la parte superior del epitelio estratificado y se someten a la diferenciación terminal. Poco después de salir de la membrana basal, esas células normales salen del ciclo celular y comienzan a sintetizar queratinas de alto peso molecular que se acumulan en el estrato granuloso y en los estratos más altos del epitelio. Estas

células eventualmente forman sacos llenos de queratina en la epidermis. La infección por HPV se considera que requiere de una ruptura en el epitelio estratificado, que puede ocurrir a través de microlesiones que exponen a la capa basal de la entrada del virus (**Sterlinko et al, 2009; Abdul et al, 2009**). El ciclo de vida del HPV, comienza con la infección de las células basales epiteliales que incluye la entrada a la célula huésped, manteniendo su genoma a un bajo número de copias por célula infectada y requiriendo la expresión de E1 y E2. La segunda fase, incluye ya el primer paso hacia la transformación celular, es decir, la integración del genoma del HPV a la célula. E1 y E2 se unen al origen de replicación viral y enganchan a las ADN polimerasas celulares y otras proteínas necesarias para la replicación del ADN. El genoma viral se cree que se mantiene en 10 a 200 copias por célula en la capa basal de toda la infección. Este número de copias aumenta dramáticamente cuando se mueven las células infectadas a las capas superiores del epitelio. Durante esta fase de amplificación, los genomas son empaquetados en viriones infecciosos antes de su liberación. Las células infectadas son diferentes y se denominan coilocitos en esta etapa, con un núcleo ampliado y a menudo múltiples núcleos por célula (**Fig. 1**).

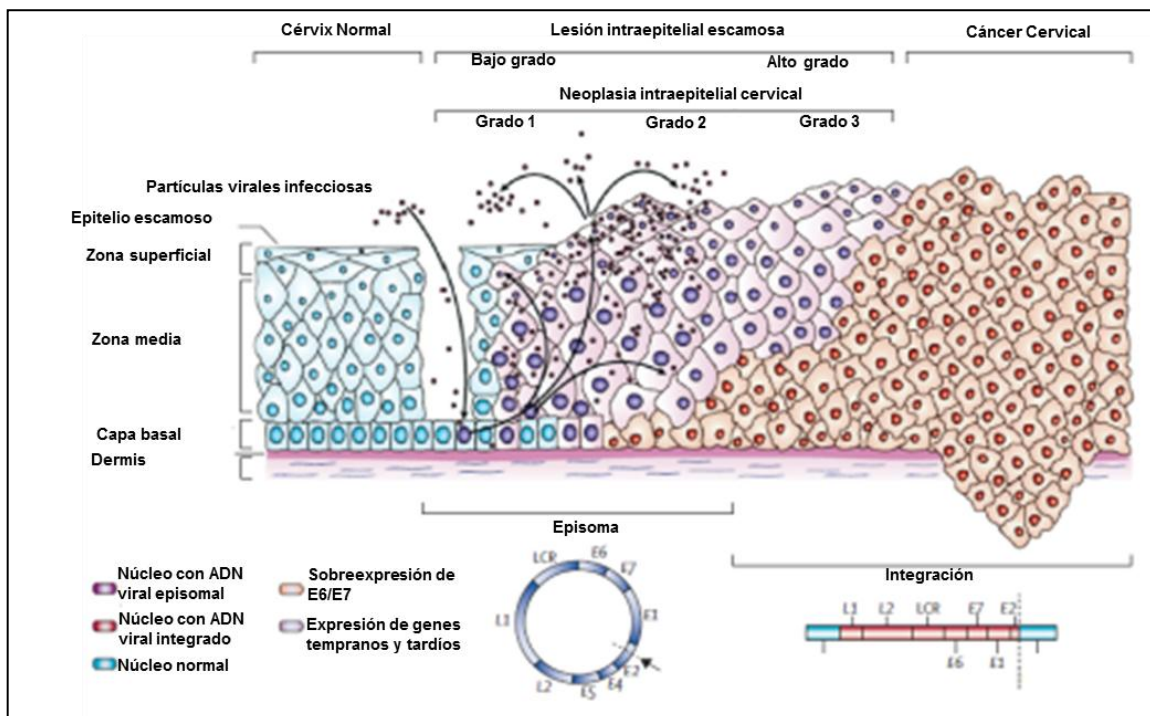


Figura 1. Mecanismo de infección del virus de papiloma humano en el cérvix. En la imagen se muestra el acceso del virus a la capa basal del epitelio, así como la integración aleatoria en el genoma de las células del hospedero y la posterior transformación celular. **Tomado de Crosbie et al, 2013.**

La activación del promotor dependiente de diferenciación conduce a una mayor expresión de las proteínas E1, E4 y E5, mientras que L1 y L2 se expresan en la capa superior del epitelio para facilitar su ensamblaje y la formación de viriones. Las cápsides se someten a un proceso de maduración provocada por el procesamiento proteolítico de los componentes del virión antes de la liberación de la célula. El virión que se libera puede infectar el epitelio basal o extenderse a nuevos huéspedes **(Stanley, 2005)**. Las oncoproteínas E6 y E7 del HPV actúan para aumentar la proliferación de las células infectadas en el epitelio. La actividad de estas proteínas subvierte el proceso normal de diferenciación terminal, provocando un aumento en el número de células infectadas que a la larga producen viriones infecciosos.

Las oncoproteínas E6 y E7 estimulan la progresión del ciclo celular y ambas proteínas se asocian con reguladores del ciclo celular. La principal función de la proteína E6 es la de unirse a la proteína supresora de tumores p53 en conjunción con la ligasa de ubiquitina celular E6AP y marcar a p53 para la degradación. Por otra parte, la asociación de E7 con los miembros de la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular también ha sido bien caracterizada. Se sabe que pRb es un regulador negativo del ciclo celular que controla la entrada en la fase S al asociarse con los miembros de la familia E2F de factores de transcripción de ADN; en este sentido, E7 interrumpe esta función mediante la unión a pRb y desplazando las proteínas E2F. Por lo tanto las células entran en la fase S y activan los factores de la replicación celular, necesarios para la replicación viral. E7 también marca pRb para la degradación proteolítica por la vía de proteosomas de ubiquitina a través del proteosoma 26S **(Abdul et al, 2009)**.

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

Modelo de origen celular del CaCu.

Sin embargo este modelo convencional de progresión del cáncer cervical que se muestra frecuentemente, presta poca atención a la vulnerabilidad de los diferentes sitios epiteliales donde se producen los cánceres asociados al HPV. Algunos autores indican que el cáncer cervical no debe considerarse como una enfermedad, sino que es un grupo heterogéneo de cánceres, con al menos tres vías de progresión que dependen de la naturaleza de la célula inicialmente infectada. La infección persistente por HPV y la desregulación de la expresión génica viral normal son factores de riesgo unificadores que afectan a los tres sitios de infección. Esto sugiere que la infección de HPV de alto riesgo en el ectocervix tiene un riesgo de progresión similar al de las infecciones vaginales con una progresión lenta en el tiempo de LSIL a HSIL y luego a cáncer. La infección del epitelio columnar donde puede ocurrir metaplasia, se asocia con un mayor riesgo de progresión del cáncer. Actualmente no está claro si las infecciones en este sitio siempre deben progresar desde la LSIL, o incluso si las lesiones de bajo grado realmente equivalen a infecciones productivas. Estas observaciones recientes sugieren, que la LSIL no productiva se encuentra entre la variedad de enfermedades de bajo grado que pueden desarrollarse tanto en el cuello uterino como en el ano, y que algunas de estas patologías de la enfermedad surgen de la infección de las células de reserva. Sin embargo, a pesar de su importancia, no todas las infecciones se limitan al ectocervix y la zona de transformación, y se está haciendo evidente que los tipos de HPV de alto riesgo también pueden infectar las células columnares del endocervix, un sitio que no tiene capacidad para brindar apoyo a LSIL **(Doorbar y Griffin, 2019)**.

Sistema inmune

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 **(Fig. 2) (Murphy et al, 2009)**.

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)**.

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).

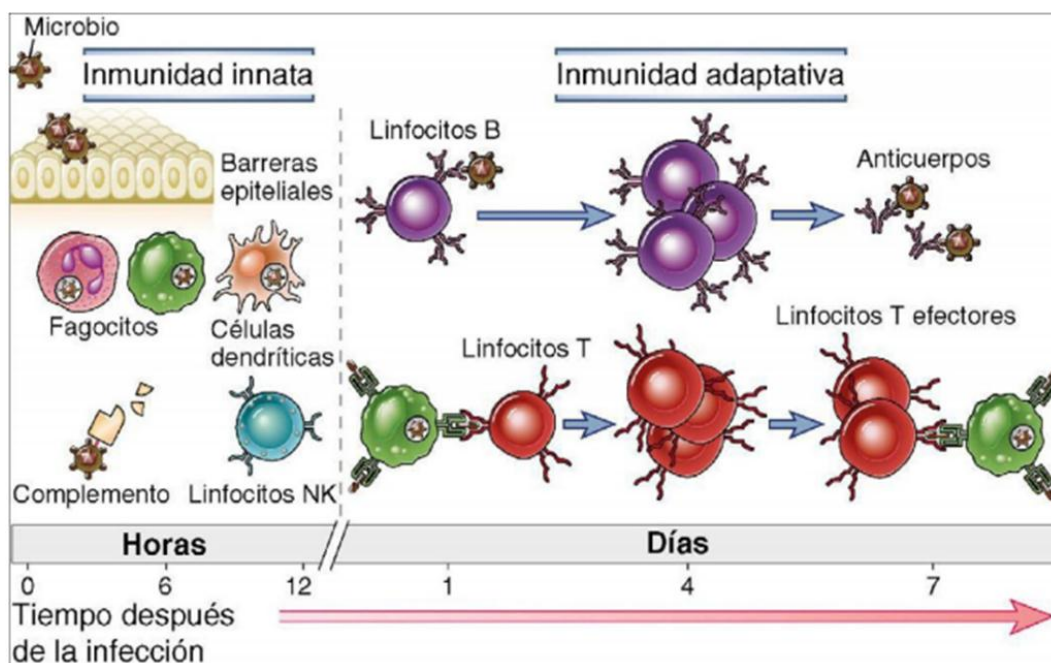


Figura 2.- Representación de la inmunidad innata y adaptativa. Se observa la cinética de infección en cada una. Tomada de Abbas, 2012.

Linfocitos T

Existen 2 subpoblaciones bien definidas de células T: colaboradoras (Th) y citotóxicas (CTL); recientemente se caracterizó una tercera subpoblación de células T, las T reguladoras (Treg). Las células Th y CTL pueden distinguirse entre sí por la presencia de glucoproteínas de membrana CD4 o CD8. Las células T que exhiben CD4 funcionan como linfocitos Th, mientras que las que exhiben CD8 funcionan como citotóxicos. Las diversas células T efectoras llevan a cabo funciones especializadas, como secreción de citocinas (células Th CD4 activadas) y actividad citotóxica destructora (CTL CD8). Las células T CD4 forman 2 subpoblaciones que se distinguen por los grupos distintos de

citocinas secretadas. Una población Th1 secreta IL-2, IFN- γ y TNF- α . El subconjunto Th1 tiene a su cargo las funciones habituales mediadas por células, como hipersensibilidad de tipo tardío y activación de CTL. El otro subconjunto, denominado Th2, secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Este subconjunto funciona con mayor eficacia como colaborador para la activación de células B (Kindt, 2007). Los CTL tienen la capacidad de destruir células extrañas y sólo reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I. Las células tumorales y células infectadas por virus pueden ser destruidas por estas células efectoras (Fig. 3) (Canaday et al, 2001). Por medio de este reconocimiento del antígeno de superficie la célula citotóxica entra en contacto íntimo con su célula blanco y administra el “beso de la muerte por apoptosis” (Murphy et al, 2008). Los CTL contienen altas concentraciones de gránulos citolíticos preformados en su citoplasma que contienen proteínas citosólicas como perforinas y granzimas designadas a inducir muerte en células blanco tras su liberación (Cooper et al, 2001; Burkhardt et al, 1989; Tschopp & Nabholz, 1990). Forrando la membrana de estos gránulos está la proteína 1 asociada a membrana de lisosoma (LAMP-1 o CD107 (Winchester, 2001; Peters et al, 1991), cuya expresión sobre la superficie celular ha sido descrita como un marcador de degranulación de estas células citotóxicas y se ha demostrado que actúa como un fuerte sobrerregulador en la superficie celular siguiendo la estimulación en concordancia con la pérdida de las perforinas (Betts et al, 2003).

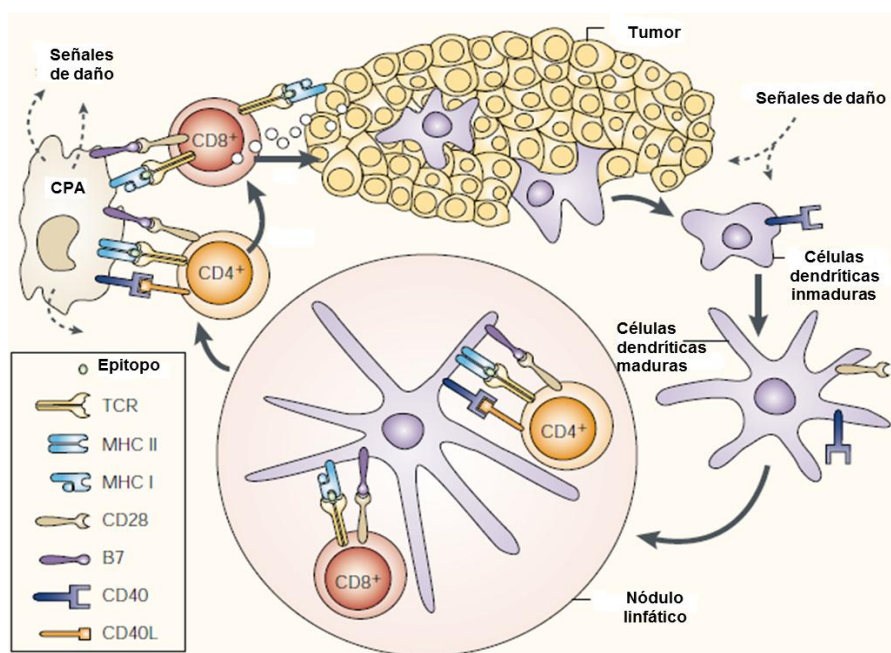


Figura 3. Destrucción de células tumorales por linfocitos T citotóxicos CD8+. Células Dendríticas Inmaduras son activadas en el microambiente tumoral mediante señales de daño (ATP, factores inflamatorios, etc) y migran como células dendríticas maduras al nódulo linfático en donde presentan péptidos a los linfocitos T auxiliares CD4+ o citotóxicos (CD8+). Los linfocitos T activados migran al sitio del tumor, en donde las células presentadoras de antígeno (CPA) reactivan a las poblaciones de CD4+ y CD8+ para llevar a cabo su función efectora. Algunas células T se convierten en células de memoria, que pueden reactivar el posterior encuentro con el antígeno. **Tomado y modificado de Tindle, 2002.**

Evasión de la inmunidad antitumoral

Aunque es claro que el sistema inmune puede reaccionar hacia las células tumorales, el hecho de que mueran tantas personas cada año por cáncer indica que la respuesta inmunitaria hacia las células tumorales a menudo es ineficaz. Las células cancerosas se someten a cambios genéticos y epigenéticos estocásticos que generan los cambios críticos necesarios para eludir las defensas inmunológicas innatas y adaptativas (**Smyth et al, 2001**). Por otra parte, el sistema inmunológico contribuye a la progresión del tumor mediante la selección de variantes tumorales más agresivas, la supresión de la respuesta inmune antitumoral, o la promoción de la proliferación de células tumorales. La interacción entre una población heterogénea de células con cáncer sometidas a modificaciones genéticas rápidas y la presión inmunológica constante ejercida por las células inmunitarias permite la selección darwiniana de las variantes tumorales más aptas para sobrevivir y formar cáncer en huéspedes inmunocompetentes (**Drake et al, 2006**). El escape tumoral puede ser resultado de los cambios que se producen a nivel del tumor, inhibiendo directamente el reconocimiento de células cancerosas o la citólisis por las células efectoras inmunes. En algunos casos, la evasión inmune por tumores es absoluta y el sistema inmune tiene poco impacto en la progresión del tumor, mientras que en otros casos el crecimiento del tumor se retrasa antes de que el sistema inmune este abrumado, que conduce a la progresión del tumor (**Dunn et al, 2004**). En su forma más simple de escape, las células tumorales pueden evadir la detección, ya sea debido a la falta de reconocimiento inmunológico o para la inducción de tolerancia central o periférica. La tolerancia central es un proceso por el cual las células T auto-reactivas se eliminan o se convierten en un fenotipo regulador en el timo. En este caso, y en ausencia de expresión de neoantígenos, los tumores pueden permanecer invisibles para el sistema

inmune adaptativo y son libres de crecer sin impedimentos. La tolerancia periférica es un proceso importante en las células T reactivas con antígenos propios que no se expresan en el timo se eliminan. En este caso, un cierto nivel de respuesta inmune antitumoral puede ser iniciada de forma transitoria antes de que se induzca la tolerancia, lo que lleva a la progresión del tumor **(Drake et al,2006)**. Además de la inducción de la tolerancia, las células tumorales pueden adquirir defectos en el procesamiento de antígenos y las vías de presentación que facilitan la evasión del reconocimiento inmune adaptativo. Las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T anti-tumorales. Estos mecanismos pueden cooperar en etapas avanzadas del cáncer para limitar la capacidad del sistema inmune para frenar el tumor y la eficacia de las estrategias de inmunoterapia para erradicar con éxito las células malignas **(Rabinovich et al, 2007)**. Por lo tanto, varios factores intrínsecos o extrínsecos confinados al microambiente tumoral pueden generar una condición tolerogénica, inmunosupresión y evasión de la respuesta inmune a través de diversos mecanismos que incluyen: **1.** Alteraciones en la señalización de receptores de muerte celular y activación de los puntos de control inmunológico (por ejemplo, CTLA4,PD-1, FasL, TRAIL, RCAS1R). **2.** Disminución en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I), mutación o pérdida de antígenos tumorales, deficiencia de moléculas del proteasoma LMP2 y LMP7. **3.** Deficiencia en la señalización de células T, por ejemplo la cadena ζ de CD3, p56lck, p59fyn, sho-1. **4.** Secreción de citocinas y factores solubles inmunosupresores como TGF- β e IL-10,CCL22, VEGF, gangliosidos, galectina-1, PGE2 por las células tumorales; y **5.** El reclutamiento de células inmunosupresoras tales como linfocitos T reguladores, células dendríticas plasmacitoides y células estromales mesenquimales (CEMs) en el microambiente tumoral **(Fig. 4) (Rabinovich et al, 2007)**.

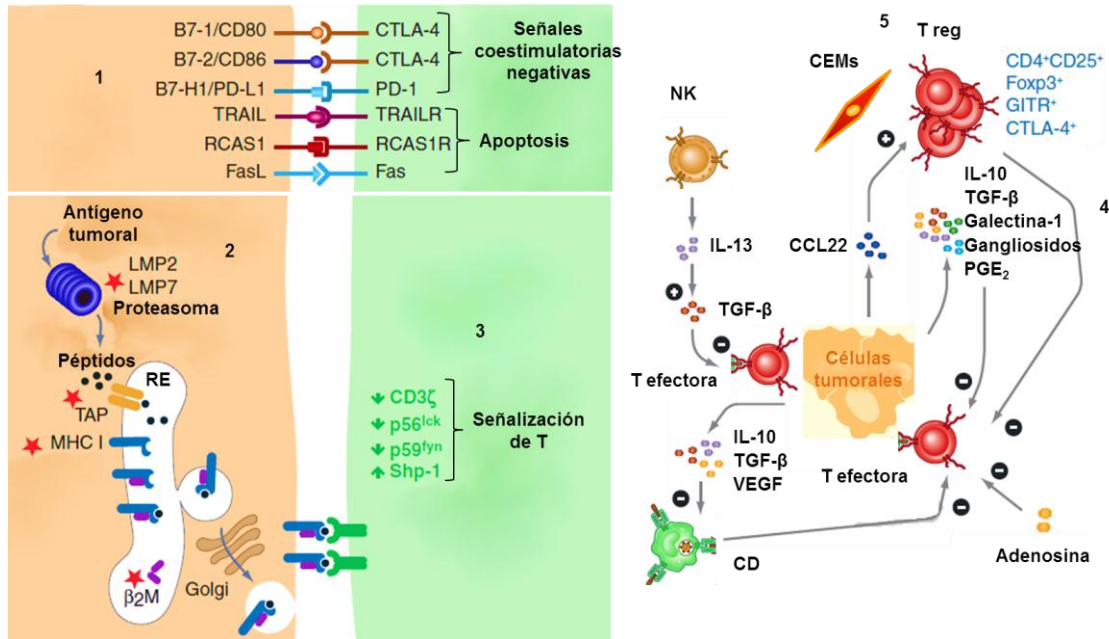


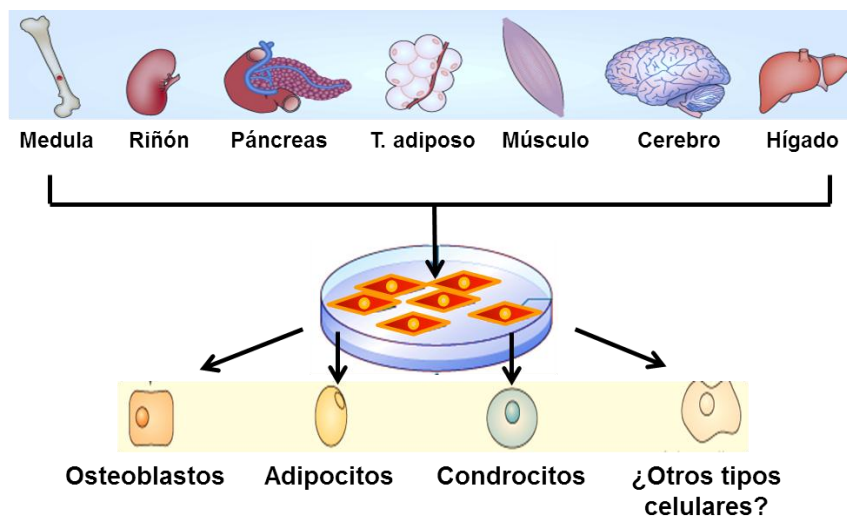
Figura 4. Estrategias inmunosupresoras explotadas por los tumores para evadir las respuestas inmunes. Los tumores emplean una gran cantidad de mecanismos inmunosupresores que pueden actuar conjuntamente para contrarrestar las respuestas inmunitarias efectivas. Estos incluyen: 1) alteraciones en la señalización de receptores de muerte celular y activación de los puntos de control inmunológico (CTLA4, PD-1, FasL, TRAIL, RCAS1R); 2) disminución en la expresión MHC I, mutación o pérdida de antígenos tumorales, deficiencia de moléculas proteasoma LMP2 y LMP7; 3) deficiencia en la señalización de células T, por ejemplo la cadena ζ de CD3, p56lck, p59fyn, shp-1; 4) secreción de citocinas y factores solubles inmunosupresores como TGF- β e IL-10, CCL22, VEGF, gangliosidos, galectina-1, PGE₂; y 5) el reclutamiento de células inmunosupresoras como linfocitos T regs, células dendríticas plasmacitoides y CEMs. **Tomado y modificado de Rabinovich *et al*, 2007.**

Células Estromales Mesenquimales (CEMs)

El inicio y progresión del tumor requiere de la generación de un nicho de soporte que constituya un microambiente favorable para promover la viabilidad, proliferación e invasión de las células tumorales. Las células estromales, endoteliales y células del sistema inmune presentes en el tumor, forman parte de este nicho. De hecho, las células estromales mesenquimales (CEMs), derivadas de células multipotentes de origen mesodérmico, representan el componente celular principal de este nicho y tienen funciones de soporte e inmunoregulación, y proveen de factores necesarios para inducir angiogénesis, proliferación y migración de las células tumorales, entre otras (**Spees *et al*, 2016**).

Las CEMs son un subtipo heterogéneo de células troncales, fueron inicialmente caracterizadas en la década de 1960 con los trabajos realizados por

Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes al plástico de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico: osteocitos, condrocitos y adipocitos. Las CEMs se caracterizan fenotípicamente por la expresión de los marcadores CD105, CD73 y CD90 y por expresar bajos niveles de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) Clase-I y ser negativas para las moléculas MHC Clase-II, CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31 (**Horwitz et al, 2005**) (**Fig. 5**) (**Beyer Nardi & da Silva Meirelles, 2006; Gregory et al, 2005**).



Expresan **CD73, CD90, CD105**

Ausencia de Marcadores Hematopoyéticos **CD11b, CD14, CD45, CD34, CD31.**

Adherencia al plástico

Figura 5. Las CEMs de diferentes tipos de tejidos se diferencian hacia diferentes linajes. Descritas como células adherentes al plástico de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico, expresión de marcadores CD73, CD90 y CD105 principalmente y ausencia de marcadores hematopoyéticos. **Tomado y modificado de James, 2013.**

Recientemente esta idea ha cambiado, ya que las CEMs pueden ser obtenidas de diferentes tejidos maduros y tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, condroblastos, fibroblastos, mioblastos, ovocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, tenocitos, diferentes células epiteliales (pulmón, intestino, riñón y bazo) e incluso neuronas, y secretan factores de crecimiento con efectos paracrinos que favorecen la regeneración de los tejidos dañados (**Gregory et al, 2005; Baksh et al, 2004; Kidd et al, 2012**). Algunos científicos proponen que la generación de células de origen diferente al mesodérmico es debido a un proceso de reprogramación en la expresión de genes denominado plasticidad celular (**Sato et al, 2005; Bobis et al, 2006**).

Cuando ocurre un daño a tejidos las CEMs migran al tejido dañado y liberan factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de insulina-1(IGF-1), factor derivado de células estromales-1 (SDF-1), muchos de los cuales son generados por estímulo inflamatorio tales como el de TNF- α (**Shi et al, 2012**).

Por lo tanto, CEMs tienen la capacidad de migrar y establecerse en sitios de inflamación y se ha encontrado que forman parte del microambiente tumoral (CEMs-T) (**McAllister et al, 2014; Bussard et al, 2016; Ma et al, 2014; Sun et al, 2014**). El tropismo intrínseco de las CEMs por los sitios de daño también es observado en lesiones tumorales por que se producen citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento que reclutan a las CEMs en el microambiente tumoral e impactan en el desarrollo del tumor a través de vías autocrinas y paracrinas que tienen un efecto directo sobre las células tumorales o un efecto indirecto en la modificación del microambiente en la cual su integridad es una parte esencial en tejidos tumorales (**Gomes, 2013; Shi et al, 2012**).

Las CEMs que se reclutan en tejidos tumorales pueden seguir existiendo como CEMs-T, las cuales son similares a CEMs derivadas de tejidos normales (MSC-N) con respecto a la morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación multilinaje. Las CEMs-T pueden constituir aproximadamente el 0,01-1% del número total de células en los tejidos tumorales sólidos (**Ren et al, 2015**) y se han aislado y caracterizado a partir de cáncer de ovario (**McLean et al, 2011**), tumores de células gigantes (**Wulling et al, 2003**), neuroblastoma (**Johann et al, 2010**), osteosarcoma, lipoma (**Gibb et al, 2005**), cáncer gástrico (**Cao et al, 2009**) y CaCu (**Montesinos et al, 2013**), entre otros, en donde son capaces de regular el crecimiento y progresión tumoral a través de interacciones parácrinas aun no completamente dilucidadas.

Se ha estipulado que las CEMs-T pueden dar soporte y favorecer la proliferación de células troncales cancerosas (**Luo et al, 2013**), además de promover la transición epitelio mesénquima (**Karnoub et al, 2007**) y la

metástasis de las células tumorales (**McLean et al, 2011; Liu et al, 2011**). Uno de los efectos de las CEMs en la progresión del tumor, es atribuido a su capacidad de inducir angiogénesis, el cual es el principal factor en el desarrollo de tumores. Los efectos pro-angiogénicos pueden ser mediados indirectamente por la secreción de factores pro-angiogénicos por las células tumorales tales como el VEGF, PDGF, o directamente a través de la transdiferenciación de las CEMs en pericitos, fibroblastos o células endoteliales, promoviendo la formación de vasos sanguíneos (**Gómez, 2013**).

Por otro lado, se ha reportado que las CEMs-T pueden favorecer la evasión del reconocimiento inmune mediada por linfocitos T citotóxicos al desregular la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I en las células tumorales (**Montesinos et al, 2013**) y la supresión de la respuesta inmune antitumoral, ya sea mediante el reclutamiento de células inmunosupresoras tales como las células supresoras derivadas del linaje mielóide (MDSCs) y células T reguladoras (T regs) (**Prevosto et al, 2007**), la producción de citocinas inmunosupresoras como IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- β (**Sun et al, 2014; Johann et al, 2015; Poggi et al, 2014**) o la producción de metabolitos inmunosupresores como PGE₂, IDO, NO (**Dipatrini et al, 2013**). Recientemente nuestro grupo de investigación ha reportado que CEMs derivadas de cáncer cervical (CEMs-CaCu) suprimen la respuesta de linfocitos T a través de la vía purinérgica mediada principalmente por la generación de adenosina a través de la ectoenzima CD73 (**Mora-García et al, 2016**). La adenosina está presente en concentraciones inmunosupresoras dentro del microambiente tumoral y puede ser un factor importante en la evasión inmune por las células tumorales (**Blay et al, 1997**).

Vía adenosinergica

En esta vía, los nucleótidos ATP/ADP que se encuentran en altas concentraciones (50-100 μ M) en respuesta a señales de estrés tales como hipoxia, daño e inflamación en el MAT (**Vaupel et al, 2016**), son hidrolizados conjuntamente por diferentes ectoenzimas para generar los respectivos nucleótidos. En ausencia de enzimas catalíticas capaces de hidrolizar estos nucleótidos extracelulares serían relativamente estables. Sin embargo, la mayoría de los tipos celulares expresan enzimas en su superficie celular que

catalizan la fosfohidrólisis de nucleótidos **(Eltzschig Holger K, 2010)**. Este evento es controlado por la acción de ectonucleotidasas, incluidos los miembros de las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas, ecto-ATPasas, ectoapirrasas, EC 3.6.1.5), ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasas (E-NPP, EC 3.1.4.1), ectoalcalina fosfatasa (ALP, EC 3.1.3.1), que de manera eficiente hidrolizan ATP y ADP a AMP **(Scussel et al, 2012)**. Posteriormente los nucleótidos son hidrolizados por la acción de la 5'-ectonucleotidasa o CD73 (EC 3.1.3.5) convirtiendo AMP en adenosina (Ado) **(Robson et al, 2006; Zimmermann et al, 2012) (Fig. 6)** La conversión de ATP hacia AMP por CD39 es reversible por la acción de Ado por CD73 es reversible solamente después del transporte de adenosina hacia células donde ésta puede ser convertida hacia AMP por adenosina cinasa **(Ghiringhelli et al, 2012; Beavis et al, 2012; Allard et al, 2012)**.

Los niveles de adenosina son controlados por la enzima Adenosina Deaminasa (ADA) la cual convierte Ado en inosina. ADA se puede unir a CD26, la cual reduce la concentración local de adenosina sobre la superficie celular y evita la unión de adenosina con sus receptores **(Saldanha-Araujo et al, 2011)**.

La Ado está implicada en una amplia variedad de funciones biológicas básicas, incluyendo la biosíntesis de nucleótidos o el metabolismo de la energía celular **(Eltzschig Holger K, 2010)**. En el exterior de la célula, la Ado sirve principalmente como una molécula de señalización y sus funciones biológicas ocurren a través de la activación de los receptores de adenosina (ARS) localizados en la superficie extracelular de las membranas celulares, los cuales están acoplados a proteínas G y se dividen en cuatro subtipos: A1R, A2AR, A2BR y A3R **(Bours et al, 2006; Fredholm et al, 2001; Linden et al, 2001)**.

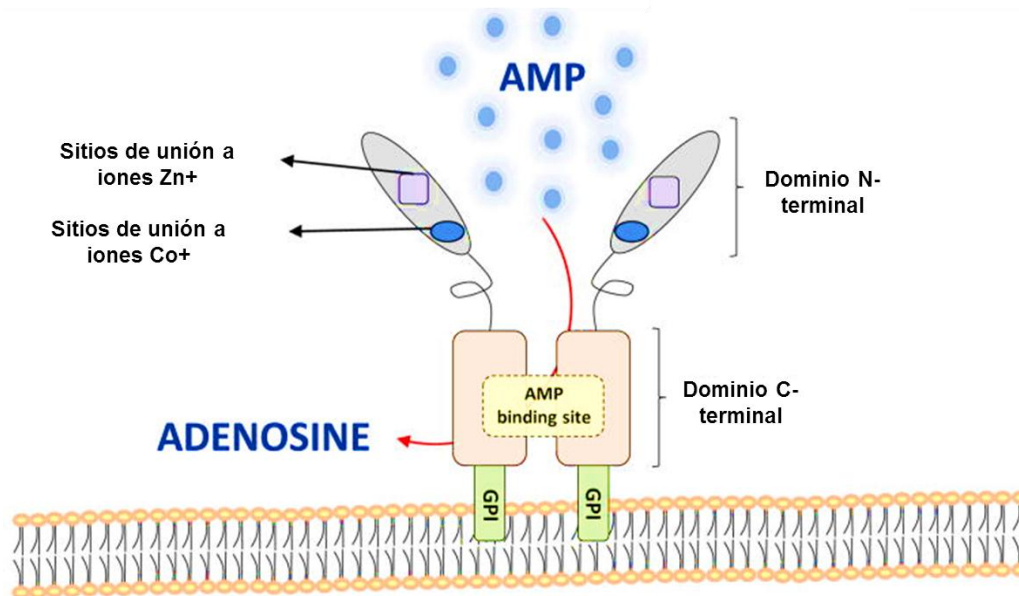


Figura 7. Estructura y papel del CD73 en las vías metabólicas extracelulares. CD73 se caracteriza por un dominio N terminal que contiene sitios de unión para los iones de zinc y cobalto y un dominio C terminal que contiene el sitio de unión AMP. El dominio C-terminal está vinculado a la membrana plasmática a través de un anclaje GPI. Estos dos dominios están conectados por una hélice α corta. **Tomado y modificado de Antonioli et al, 2013.**

Esta molécula fue definida inicialmente como antígeno de diferenciación de linfocitos, y se ha reportado que actúa como una molécula de señalización de cooperación en los linfocitos T (Resta and Thompson, 1997; Dianzani et al, 1993; Massaia et al, 1990) y como una molécula de adhesión que se requiere para la unión de linfocitos al endotelio. Está vinculada con el control de una variedad de respuestas fisiológicas, incluyendo transporte de fluidos e iones epiteliales, el preconditionamiento isquémico, lesión de los tejidos, la función plaquetaria, fuga vascular, función de barrera vascular, restricción de la migración de linfocitos a los ganglios linfáticos y estimulación de la hidratación de la mucosa (Colgan et al, 2006). También se ha demostrado que participa en interacciones célula-célula y célula-matriz; está implicada en la resistencia a las drogas, la promoción de tumores (Airas et al, 1995) y suprime las respuestas pro-inflamatorias en células endoteliales humanas (Grünwald y Ridley, 2010). Se expresa en algunas células del sistema inmune, tales como células B activadas, células T CD4+, CD8+, T reguladoras, pero no en células T vírgenes, células NK, células dendríticas foliculares, macrófagos, monocitos, células endoteliales, células epiteliales, y fibroblastos (Ghiringhelli et al, 2012; Allard et al, 2012; Scussel et al, 2012; Deaglio et al, 2007; Colgan et al, 2006).

Expresión de CD73 en cáncer

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

Sin embargo el papel de CD73 en cáncer aún no es claro. Previos estudios reportaron que CD73 participa en interacciones célula-célula y célula-matriz y está implicada en la resistencia a las drogas y promoción del tumor (**Airas et al, 1995; Spychala, 2000**). Mediante citometría de flujo **Jin et al, 2010**, demostraron que CD73 está ampliamente expresada sobre muchas líneas celulares tumorales y está sobrerregulada en tejidos cancerosos. Además la expresión de CD73 ha sido reportada en varios tipos de cáncer, incluyendo: cáncer de vejiga (**Stella et al, 2009**), leucemia (**Mikhailov et al, 2008**), glioma (**Bavaresco et al, 2008**), glioblastoma (**Ludwing et al, 1999**), melanoma (**Sadej et al, 2006**), cáncer de ovario (**Cho et al, 2006**), tiroides (**Kondo et al, 2006**), esófago (**Fukuda et al, 2004**), próstata (**Hastie et al, 2005**) y mama (**Spychala et al, 2004; Wang et al, 2008**). Recientemente nuestro grupo de investigación ha reportado que líneas de cáncer cervical también expresan CD73 (**Mora-García et al, 2017**). Así mismo CD73 ha sido asociada fuertemente con un fenotipo prometastásico en melanoma y cáncer de mama y se ha reportado que la terapia con anti-CD73 inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis en cáncer de mama, sugiriendo entonces que la expresión de estas moléculas en tumores tiene un papel relevante en la progresión e invasión tumoral (**Stagg et al, 2010; Jin et al, 2010**).

Regulación de CD73

La expresión de la molécula CD73 sobre tumores puede ser regulada por la presión selectiva ejercida por el sistema inmune, debido a que los tumores positivos a CD73 están mejor equipados para suprimir las respuestas inmunes antitumorales (**Beavis et al, 2012**), ya que se ha reportado que la sobreexpresión de CD73 en diferentes tumores se asocia con un pobre pronóstico y con una mayor capacidad para suprimir las respuestas inmunes antitumorales

(**Bavaresco et al, 2008; Hausler et al, 2011; Wang et al, 2008**). De manera importante CD73 es significativamente sobrerregulada en tejidos cancerosos acompañado por una alta actividad enzimática, la cual puede mediar la producción de Ado extracelular (**Zhang, 2010**). Diferentes trabajos apoyan claramente la idea de que las células tumorales contribuyen a los elevados niveles de Ado en el microambiente tumoral a través de la actividad enzimática de CD73 de superficie (**Jin et al, 2010; Stagg et al, 2010**), aunado a que existen factores extrínsecos y factores intrínsecos propios del microambiente tumoral que regulan la expresión de CD73. Por lo tanto los altos niveles de expresión de CD73 en el tumor pueden ser inducidos en el microambiente tumoral local por una amplia gama de factores.

Se ha demostrado que algunos fármacos empleados en la quimioterapia tienen la función de modificar la expresión de CD73 y CD39 y por lo tanto cambiar la cascada enzimática que convierte ATP al inmunosupresor Ado. **Bernardi et al, 2007** demostraron que la indometacina sobre-regula la expresión de ARNm y proteína de CD73 en células de glioma mejorando la cascada de degradación de nucleótidos extracelulares junto con CD39. Por lo tanto, el efecto de la indometacina sobre las células de glioma puede ser mediado al menos en parte, aumentando el catabolismo de las purinas extracelulares. Dado que la indometacina tiene la capacidad de cruzar la barrera de la sangre (**Courade et al, 2001**) y es suficientemente segura para permitir una administración a gran escala, este compuesto puede representar un agente potencialmente útil para la quimioprevención o la terapia adyuvante de glioma.

De manera similar en células de glioma observaron que la dexametasona incrementa la hidrólisis de AMP y la expresión de ARNm de CD73. Además, un inhibidor de PKC bloqueó los efectos de dexametasona, lo cual sugiere que esta droga podría ejercer su acción mediante esta vía (**Bavaresco et al, 2007**). **Loi et al, 2013** demostró que la alta expresión de CD73 estuvo asociado con resistencia a la terapia con doxorubicina en pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) y fue correlacionado con alto riesgo de metástasis distante. Además, la doxorubicina sobre-reguló la expresión de CD73 en líneas celulares de melanoma, leucemia y cáncer de mama humano. En contraste en

otro estudio, la doxorubicina no alteró la expresión de CD73 en líneas celulares de cáncer de mama (**Freitas-Santos et al, 2016**).

Se ha demostrado que la expresión de CD73 también puede ser regulada por hormonas en tumores de distinto tipo histológico. Spsychala y colaboradores en el año 2004 reportaron que el receptor de estrógeno (ER) regula de manera negativa los niveles de expresión de ARNm y proteína en la ectoenzima CD73 en células de cáncer de mama, ya que la pérdida de expresión de ER, la cual es característica de la enfermedad más avanzada y agresiva, conduce a la sobre-regulación de CD73 y el incremento en la generación de Ado extracelular, convirtiéndolo en un blanco prometedor para el tratamiento clínico de pacientes con cáncer de mama (ER-). En contraste a estas pacientes, se ha demostrado que las hormonas tiroideas pueden incrementar la expresión de CD73 y por tanto, la capacidad de generar adenosina en diferentes tipos de células. Células de glioma tratadas con la hormona tiroidea T3 incrementaron de manera significativa la expresión de ARNm comparado con el grupo control, correlacionando con un incremento en su actividad nucleotidasa (**Wink et al, 2003**). El efecto observado sobre la expresión es debido probablemente a la unión de T3 a sus receptores nucleares (**Anderson, 2001**). Un efecto similar de hormonas tiroideas sobre la expresión de CD73 fue observado en células de músculo vascular liso y miocitos ventriculares (**Tamajusuku et al, 2006; Carneiro-Ramos et al, 2004**). Por tanto, el hipertiroidismo puede incrementar la expresión de CD73 y generación de adenosina en algunos tumores.

Por otro lado, es bien sabido que los cambios epigenéticos pueden modificar de manera importante la expresión de diversos genes en cáncer (**López et al, 2009**). La expresión de CD73 es también regulada por modificación epigenética. **Wang et al, 2012** mostraron que el ARNm de CD73 es desregulado por silenciamiento transcripcional dependiente de metilación en líneas celulares de melanoma. En los casos clínicos de melanoma, la metilación en la isla CpG de CD73 se produce tanto en melanomas primarios y metastásicos y se correlaciona con la desregulación en la transcripción de ARNm de CD73 y fue asociado con sitios específicos metastásicos. Por otro lado se ha reportado, que la expresión de CD73 es regulada en líneas celulares y tejidos de cáncer de mama por el estado de metilación de las islas CpG y que

la metilación es un indicador pronóstico de resultado clínico favorable (**Lo Nigro et al, 2012**).

En otros estudios se ha reportado que la vía de señalización a través de la proteína B-catenina, incrementó la actividad del promotor de CD73. Además la expresión de Wnt-1 correlacionó con un incremento de niveles de proteína y actividad enzimática de CD73 con una concomitante disminución de ADA (**Spychala y Kitajewski, 2004**). Thom et al, 2013 mostraron que el ácido decoxahesanoico (DHA) incrementa los niveles de proteína de CD73 mejorando el incremento de nucleótidos de adenina en células endoteliales. Por otro lado, el empalme alternativo de pre-ARNm es un mecanismo por el cual múltiples isoformas de ARNm y proteína son generadas desde un limitado conjunto de genes, los cuales promueven complejidad funcional de organismos (**Matera y Wang, 2014**). **Snider et al, 2014** demostraron que el empalme alternativo es un nuevo mecanismo de regulación de CD73.

Por otra parte, la hipoxia tumoral puede contribuir a la propagación de señales oncogénicas en el microambiente tumoral (**Sitovsky et al, 2008**). Se ha demostrado que el microambiente hipóxico puede conducir a la expresión de CD73. El grupo de **Synnestvedt en 2002**, reveló que la hipoxia ambiental regula transcripcionalmente a CD73. Otro reporte también indica que la exposición crónica a hipoxia mejora los niveles de ARNm y proteína de CD73, así como su actividad catalítica in vitro de manera dependiente del tiempo (**Kobayashi et al, 2000**). El mecanismo de dicha inducción implica el sitio de unión HIF-1 α (Factor inducible a hipoxia 1 α) llamado elemento de respuesta hipoxia (HRE) en el gen promotor de CD73 (**Hansen et al, 1995**). De manera interesante, se ha descubierto que la supresión de HIF-1 α por oligonucleótidos antisentido o mutaciones puntuales en el HRE del gen CD73 inhibe la expresión de CD73 inducida por hipoxia (**Li et al, 2006; Semenza et al, 2011**).

Distintos factores solubles también han sido implicados en la sobre-regulación de CD73. En un estudio se demostró que el AMP exógeno o la adenosina regulan transcripcionalmente la expresión de CD73 a través de la elevación de AMPc intracelular, mostrando un ejemplo de inducción transcripcional de la enzima por su producto enzimático (adenosina) y definiendo una vía paracrina (**Narravula et al, 2000**).

Un estudio demostró que diferentes factores pro-inflamatorios probados afectan la actividad y expresión de CD73. LPS, IFN- γ , glutamato y H₂O₂ disminuyen la actividad de CD73, mientras que TNF- α induce una sobre-regulación de la actividad enzimática. La disminución en la actividad de CD73 fue ligada a la alteración en la eficiencia catalítica de la enzima y al cambio en su expresión de membrana. TNF- α , el único agente probado que estimula la actividad de CD73, incrementa su abundancia en membrana sin cambios a nivel de ARNm, sugiriendo que actúa a nivel postranscripcional y/o traduccional probablemente por la movilización de péptidos de CD73 (**Brisevac et al, 2012**). De manera similar se demostró que IL-4 e IFN- γ disminuyen la expresión y el nivel de la actividad de CD73, mientras que la prostaglandina E₂ (PGE₂) incrementa su expresión y su actividad (**Christensen et al, 1992**). La IL-1 β y TNF- α también inducen la expresión de CD73, siendo este efecto más marcado en presencia de IL-13. La acción de estas citocinas resultó ser compleja ya que estaba mediada por producción de PGE₂ y AMP cíclico (**Savic et al, 1990**). Por otro lado Niemela y colaboradores en el año 2004 demostraron que IFN- α produce una clara sobre-regulación de CD73 en endotelio vascular en tejido normal y canceroso de vejiga cuando fueron comparados con niveles de expresión basal. Además IFN- β también ha sido reportada por tener un efecto regulatorio sobre la expresión de CD73 en células endoteliales (**Airas et al, 2007; Kiss et al, 2007**).

Recientemente, se ha demostrado que las células T reguladoras naturales CD4⁺Foxp3⁺ (nTregs) expresan altos niveles de CD39 y CD73 capaces de administrar adenosina antiinflamatoria al medio circundante. La expresión de CD73 en células T CD4, CD8, células dendríticas y macrófagos es inducida por TGF- β independientemente de la expresión de Foxp3, operando a nivel transcripcional y traduccional proporcionando así un mecanismo de amplificación para la generación de Ado en microambientes tisulares. Estos efectos fueron antagonizados por citocinas Th1 y Th2. En presencia de AMP, CD73 inducida por TGF- β genera adenosina capaz de suprimir la proliferación de células T CD4 activadas *in vitro* (**Regateiro et al, 2011**). En otro estudio, demostraron que las vías IL-6-Stat3 y TGF- β -Gfi-1 fueron necesarias para inducir las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en células Th17, conduciendo al incremento de Ado y la subsecuente supresión de CD4 y CD8. Las células

Th17 infiltradas en el tumor expresaron estas ectonucleotidasas y su transferencia adoptiva promovió el crecimiento tumoral, demostrando así que la expresión de ectonucleotidasas apoya funciones inmunosupresoras de células Th17 en cáncer (**Chalmin et al, 2012**). En contraste **Chatterjee et al, 2014** demostraron que la supresión de IFN- γ en células Th17 puede ser bloqueada por eliminación genética de CD73 o utilizando IL1b en lugar de TGF- β para programar células Th17 ex vivo. Las células Th17 cultivadas con IL1b fueron altamente polifuncionales, expresando altos niveles de moléculas efectoras y exhibiendo un control a corto plazo superior en melanoma. De manera interesante la generación de Ado por células B deficientes de IL-10 es alterada debido a una marcada disminución en la expresión de CD73 creando una conexión entre IL-10 y adenosina (**Kaku et al, 2014**).

Efecto inmunosupresor Ado

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

de la vía de transducción de señales del receptor de las células T (**Mustelin and Taskén, 2003**).

La Ado extracelular induce sus potentes efectos inmunosupresores vía cuatro receptores (ARs, por sus siglas en inglés), específicos bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3 (**Fredholm et al, 2001; Linden et al, 2001**). Los ARs tienen siete dominios transmembrana que abarcan y se acoplan a proteínas de unión GTP intracelulares (Proteínas G), utilizando AMP cíclico intracelular (AMPc) como segundo mensajero (**Fig 8**) (**Haskó et al, 2008**).

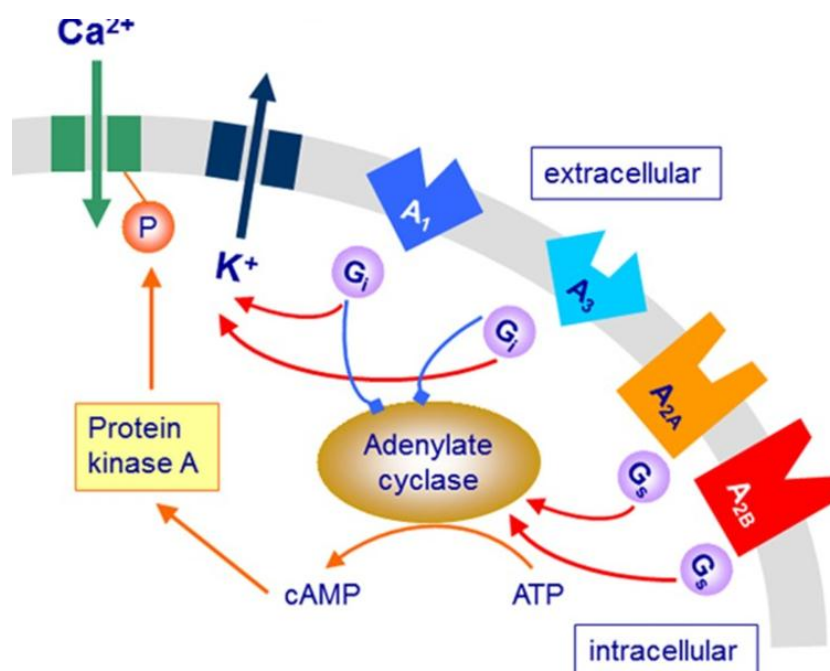


Figura 8. Receptores de Ado. La Ado extracelular se une a cuatro receptores (ARs, por sus siglas en inglés) específicos bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3. Los ARs tienen siete dominios transmembrana que abarcan y se acoplan a proteínas de unión GTP intracelulares (Proteínas G), utilizando AMP cíclico intracelular (AMPc) como segundo mensajero a través de adenilato ciclasa.

El receptor A1 de alta afinidad y el receptor A3 de baja afinidad están acoplados a proteínas G_i. Los receptores A2 se subdividen en A2A de alta afinidad y A2B de baja afinidad, los cuales están acoplados a proteínas G_s (**Linden, 2001; Thiel et al, 2003; Sitkovsky, 2003, 2008**). Los receptores A1 y A3 inducen disminución de AMPc intracelular, mientras que los receptores A2A y A2B inducen la activación de la adenilato ciclasa que resulta en aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Los receptores A1 y A3 también inducen la activación de fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) y la proteína cinasa C (PKC) (**Ghiringhelli et al, 2012**). Los cuatro receptores de Ado se han asociado con

la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y las vías de la proteína cinasa C (PKC) (**Fig. 9**) (**Allard et al, 2012**). A bajas concentraciones de adenosina, A1, A2A y A3 están involucrados en la señalización, mientras que a concentraciones altas, como los observados en el microambiente tumoral, el receptor A2B está implicado en la señalización. Debido a que los receptores de adenosina se expresan en diversos tipos celulares, por lo que la adenosina puede influir en células del sistema inmune, células endoteliales, e incluso células tumorales (**Ghiringhelli et al, 2012**).

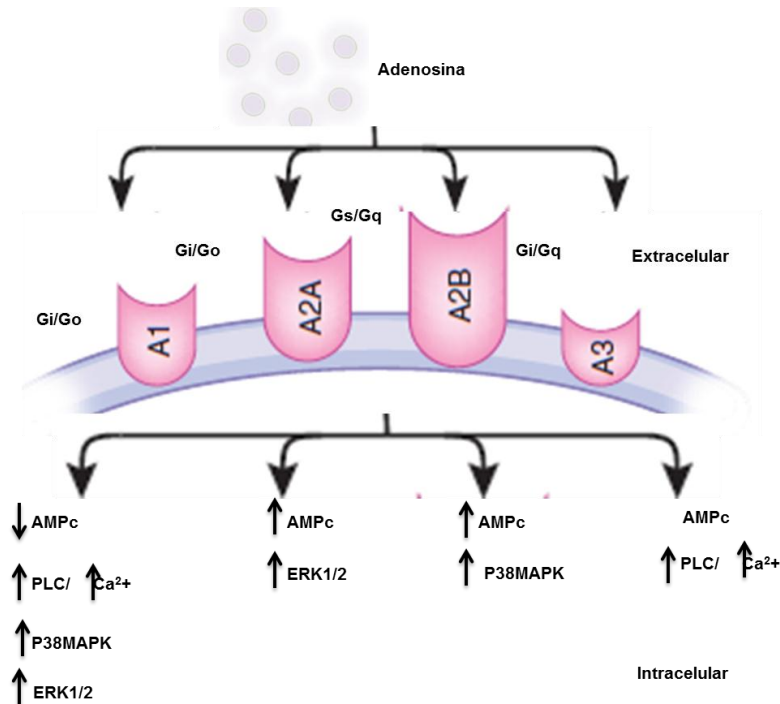


Figura 9. Vías de segundos mensajeros acopladas a los subtipos de receptores de Ado. La adenosina extracelular se puede unir a cuatro diferentes receptores acoplados a proteínas G, estructuras que estimulan (A2AR y A2BR) o inhiben (A1R y A3R) la actividad de la adenilato ciclasa. La estimulación de A1R y A3R puede también activar la fosfolipasa C (PLC) con el lanzamiento consecutivo de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Además, todos los receptores de adenosina se acoplan a las vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo señales de vías extracelulares reguladas por cinasa (ERK) 1/2 y p38 MAPK). **Tomado de Hoskin et al, 2008.**

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

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

La Ado también puede afectar el crecimiento de las células cancerosas a través de la unión directa con los ARs específicos expresados en la superficie celular de las células tumorales, ya que también se ha reportado que la Ado también podría inducir la muerte de células cancerosas o inhibir su proliferación celular **(Gessi *et al*, 2004)**. AR1 está involucrado principalmente en la proliferación celular tumoral e induce la activación del ciclo celular, ya que podría inhibir p27, una molécula que promueve la senescencia y la proliferación. A3R se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer en comparación con células normales. El principal efecto de la activación del receptor A3R es promover la angiogénesis. La adenosina, al activar A3R, aumenta (HIF-1 α) en respuesta a la hipoxia en el melanoma humano, glioblastoma y las células de cáncer de colon. La Ado también media la producción de VEGF y angiopoyetina por las células tumorales de una manera dependiente de A3R. Algunos trabajos también han demostrado que en leucemia linfocítica crónica humana (CLL), mieloma y las células de melanoma expresan AR2A. La activación de estos receptores podría modular la respuesta a la quimioterapia. El receptor A2A también aumenta la producción de eritropoyetina (EPO) en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

6. JUSTIFICACIÓN

Las células estromales mesenquimales (CEMs) en el microambiente tumoral (TME) participan junto con las células tumorales para suprimir a las células efectoras antitumorales a través de la producción de factores inmunosupresores tales como TGF- β 1 e IL-10. En el caso particular de los tumores de cáncer cervical (CaCu), la infección persistente causada por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HPV-AR) juega un papel importante en la carcinogénesis cervical y está fuertemente asociada con la producción de estas citocinas inmunosupresoras, cuya expresión se correlaciona directamente con el grado de progresión del CaCu y la supresión de la respuesta inmune antitumoral (**Torres-Poveda *et al*, 2014**). Estas citocinas han sido detectadas en suero y tejidos de pacientes con infección por HPV-AR, lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) de bajo y alto grado y CaCu; además, sus niveles correlacionan directamente con el grado de progresión de la lesión (**Bermudez-Morales *et al*, 2008**; **Wrzesinski *et al*, 2007**) e inhibición de la respuesta inmune en pacientes con SIL (**Lin *et al*, 2012**). Además, el TGF- β 1 e IL-10 pueden inducir la expresión de CD73 en varios tipos de células; esta actividad funcional está asociada con la producción de adenosina (Ado), que es un nucleósido inmunosupresor. Nosotros recientemente reportamos que las CEMs de CaCu inducen la expresión y secreción de IL-10 a través TGF- β en células tumorales de CaCu (**García-Rocha *et al*, 2015**). Con base en estos resultados, resulta de gran relevancia analizar la capacidad de CEMs para inducir la expresión de CD73 en células tumorales de CaCu y dilucidar los mecanismos por los cuales las CEMs favorecen la supresión de la respuesta inmune en el CaCu, lo que ayudará a proponer estrategias inmunoterapéuticas contra este tipo tumoral.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la participación de CEMs-CaCu sobre la expresión de la ectoenzima CD73 en células tumorales de cáncer cervical (C33A, HeLa y CaSki) y su actividad inmunosupresora a través de la vía CD73/adenosina.

Objetivos Particulares

- 1.- Analizar la participación de CEMs sobre la expresión de CD73 y la generación de adenosina en células tumorales de CaCu.
- 2.- Analizar la participación de TGF- β e IL-10 en co-cultivos de CEMs y células tumorales de CaCu sobre la expresión de CD73 y la generación de adenosina en células tumorales de CaCu.
- 3.-Determinar *in vitro* la capacidad inmunosupresora de células tumorales de CaCu a través de la vía CD73/adenosina.

8 HIPÓTESIS

Se espera que células tumorales de CaCu cultivadas con CEMs-CaCu sean inducidas a incrementar la expresión de CD73 y la generación de adenosina mediante la producción de TGF- β e IL-10, y tengan un efecto inmunosupresor sobre la función efectora de linfocitos T citotóxicos.

9. METODOLOGÍA

Cultivos celulares

Las siguientes líneas celulares humanas de CaCu fueron utilizadas en este estudio: C33A (HPV-), CaSki (HPV16+) y HeLa (HPV18+), además de HaCaT (queratinocitos humanos) obtenidas desde la American Type Culture Collection (ATCC). Para obtener las CEMs muestras de cervix normal (CN) fueron obtenidas de 3 personas a las cuales se les realizó histerectomía no relacionada con cáncer. Las muestras de CaCu fueron obtenidas de biopsias de 3 pacientes en etapa IIIB. El Comité de Ética local aprobó estos procedimientos. Las muestras de CaCu destinadas para cultivo de tejidos fueron colectadas de biopsias que fueron enviadas al departamento de patología para el diagnóstico de rutina. Células estromales mesenquimales (CEMs) derivadas de CN y CaCu fueron obtenidas por digestión enzimática y caracterizadas como previamente se ha descrito (**Montesinos *et al*, 2013**). Con fines de comparación se utilizaron fibroblastos humanos (HS-5) derivados de estroma de médula ósea. Las líneas celulares de CaCu, HaCaT y HS-5 fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) y las MSCs en DMEM bajo en glucosa (Lg-DMEM, Gibco, USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, CA, USA), penicilina (100 IU/mL), 100 µg/ml estreptomina (Gibco, CA, USA) y 5 mM de L-glutamina (Gibco, CA, USA) a 37°C bajo 5% de CO₂.

Co-cultivos de células de CaCu y MSCs-CaCu

Los co-cultivos de células de CaCu y MSCs (CaCu/MSCs) se realizaron en presencia de 50% de medio RPMI-1640 y 50% de DMEM bajo en glucosa suplementado con 15% de suero fetal bovino. Los cocultivos se realizaron durante 96 horas en cámaras transwell (Millicell Chamber, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) a las proporciones de 1:1, 1:2.5 y 1:5 de células CaCu:MSCs.

Expresión de CD73 sobre células de CaCu

La expresión de la ectonucleotidasa de CD73 en membranas celulares se detectó mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD73-PE (mAbs)

(BD Biosciences, San Diego, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó con base en la adquisición de 25,000 eventos en un citómetro de flujo CyAN (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA).

Extracción de RNA

El análisis de la expresión de las moléculas CD73 en las células CaSki co-cultivadas con las diferentes CEMS, se llevó a cabo mediante RT-PCR en tiempo real; por tal motivo, después de llevar a cabo los co-cultivos celulares, las células tumorales fueron lavadas con PBS y posteriormente se adicionó 1 ml de trizol (Invitrogen, CA, USA.), después de homogeneizar perfectamente el lisado celular, éste se colocó en un tubo para microcentrifuga de 2 ml (Eppendorf, NY, USA) y se guardó a -70 °C hasta ser procesado. Para realizar la extracción de RNA, primero se incubó el homogeneizado de células con el trizol por 5 minutos a temperatura de 15-30 °C, después se agregaron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e inmediatamente se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 840 g durante 15 minutos a 2-8 °C, terminado el centrifugado se colectó en un tubo nuevo la fase acuosa que contiene el RNA y posteriormente se adicionaron 500 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich,CA,USA) para precipitar el RNA, después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 10 minutos a 2000rpm. Después de desechar el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 75% (Sigma-Aldrich,CA,USA), se agitó y se centrifugó por 5 min a temperatura de 2-8 °C. Por último, después de eliminar el sobrenadante, el RNA precipitado se dejó secar a temperatura ambiente de 5-10 min sin permitir que el RNA se secara completamente, y se disolvió en 15 µl de agua DEPC (Invitrogen,CA,USA).

RT-PCR

Para la reacción de la retrotranscripción (RT) se utilizaron 500 ng de RNA por cada 20 µl de reacción, para ello se utilizó el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, CA, USA). La reacción se preparó en un microtubo para PCR, al cual se adicionaron 10 µl de 2X RT buffer, 1 µl de 20X RT Enzyme Mix, 7 µl de agua libre de nucleasas y por último se adicionaron 2 µl de la muestra problema, todo el procedimiento se mantuvo a una temperatura de 4°C. Una

vez hecha la mezcla se centrifugó el tubo para eliminar burbujas. Las condiciones de amplificación para esta reacción fueron: primero a 37°C durante 60 minutos, después 95°C durante 5 minutos y por último se enfrió la reacción a 4°C y se almacenó hasta su uso.

PCR en tiempo real

Los productos obtenidos de la reacción de RT-PCR de células se analizaron para la expresión del gen CD73 por PCR en tiempo real. Para ello se utilizó el gen de H6PD como control interno en todos los ensayos. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Los cebadores específicos para CD73 y G6PDH fueron los siguientes: CD73 (sentido: 5ACTACT ACGCCAAGGAGGTCAC03, antisentido: 50TGCTTGAACCTTGTCATAGATTTCG 03) y G6PDH (sentido: 50GCTACGCTCGGATCTTGTTTC03, antisentido: 50CCCAGTGCTTTTCGCTCT03). El termociclado de cada reacción se elaboró en un volumen final de 10 µl siguiendo el protocolo de LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostic, CA, USA) la reacción se hizo en una placa de 96 pozos con 5 µl de Probe Master, 0.4 µl Hydrolysis Probe, 0.2 µl de cada uno de los iniciadores a una concentración de 10 pmol, 1.9 µl de agua grado PCR y al final se agregaron 2.5 µl de cDNA diluido 1:500 minutos; los ciclos consistieron en desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineamiento por 10 segundos y elongación 72°C por 1 segundo, con un total de 35 ciclos, al final de los ciclos se adicionó un ciclo de enfriamiento a 4°C por 30 segundos. El ciclo umbral, Threshold cycle CT o Cp, es el primer ciclo al cual se detecta un incremento significativo de la fluorescencia por encima del nivel basal y se utilizó como base para calcular la expresión relativa de cada molécula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \text{Anti In} - (+\text{DCTT})$$

$$\text{DCTT} = (+\text{DCT problema}) - (+\text{DCT basal})$$

$$\text{DCT basal} = \text{Cp basal (gen en estudio)} - \text{Cp basal (gen constitutivo)}$$

Actividad hidrolítica de CD73

Las células CaSki se cocultivaron con MSCs empleando cámaras transwell (Millicell Chamber, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) o en presencia de TGF- β o IL-10 en las condiciones anteriormente mencionadas durante 96 horas. Al final de este tiempo, las células se separaron y lavaron. Las muestras se cultivaron en presencia de AMP (5 mM) en 100 μ l de RPMI con bajo contenido en glucosa suplementado con 10% de FBS para determinar la actividad enzimática de la ectonucleotidasa CD73. El FBS se dializó previamente con una membrana (corte de peso molecular de 12 kDa). Para inhibir la actividad enzimática de CD73, las células CaSki se incubaron en presencia de 5 mM del inhibidor específico, adenosina 5'- α,β -metileno difosfato (APCP, Sigma-Aldrich, CA, USA). Después de 30 minutos de incubación con el inhibidor, se añadió AMP a una concentración final de 5 mM. Los volúmenes totales de cultivo fueron de 100 μ l. Se recogieron muestras de sobrenadante después de 300 min, y se analizó la presencia de Ado por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC) (UPLC Aquity, Waters, Milford MA, USA).

Cromatografía en capa fina (TLC)

Para analizar las muestras mediante TLC, se cargó 1 μ l de cada sobrenadante en placas fluorescentes recubiertas previamente con gel (Whatman, GE Healthcare, Freiburg, Alemania). Las muestras se eluyeron durante 1 h usando una fase móvil, una mezcla compuesta de isobutanol: alcohol isoamílico: etoxietanol: agua amonio en una relación 9: 6: 18: 9: 15 (**Stagg et al, 2010; Grunewald and Ridley, 2010**). AMP, Ado e inosina (Sigma-Aldrich, CA, USA) a 5 mM se usaron como estándares. Finalmente, los compuestos se visualizaron y fotografiaron bajo un transiluminador UV (UVP Bido-H System, Upland, CA, USA).

Cromatografía líquida de ultra-resolución (UPLC)

Para determinar la cantidad de adenosina generada en los cultivos de células CaSki 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 8 puntos empleando adenosina pura. Por otro lado los sobrenadantes de las células de CaCu cultivadas con los diferentes sustratos fueron adicionados a tubos con 200 µl de fase móvil, se agitaron en vortex durante 1 minuto y se centrifugaron 3 minutos a 12000 rpm para extraer las proteínas y estabilizar la adenosina; posteriormente las muestras fueron introducidas al equipo para su determinación. Las condiciones de corrida de cada muestra fueron las siguientes: velocidad de flujo 1.0mL/min; detector UV 254-260 nm; tiempo de retención 1.787 minutos; T ambiente; columna de fase reversa LiChrosferRP de 18e 5 µm, 100 RP-18 (tamaño 125mm x 4mm, 5µm 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.

Citocinas y anticuerpos anti-TGF-β e IL10

TGF-β1 e IL-10 recombinante humano (rh) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) fueron utilizados para evaluar su participación en la expresión de moléculas CD73 en las células tumorales de CaCu. Después de 96 horas de cultivo, la expresión de CD73 sobre las células fue determinado por citometría de flujo. Para neutralizar la actividad biológica de TGF-β1 e IL-10 en los diferentes cultivos se utilizó el anticuerpo neutralizante conejo anti-humano TGF-β1, -β2 y -β3 (anti-TGF-β, R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA), o el anticuerpo neutralizante conejo anti-humano IL-10 (PeproTech,CA,USA) los cuales fueron añadidos de acuerdo a las recomendaciones proporcionadas por los distribuidores.

ELISA

Para determinar la concentración de TGF-β1 en sobrenadantes de los cocultivos entre las células tumorales CaSki, HeLa, C33A y HaCaT y las diferentes CEMS, se utilizó Kit para ensayo de ELISA (R&D,CA,USA) para TGF-β1 y (PeproTech Rocky Hill, NJ, USA) para IL-10 de acuerdo con el procedimiento establecido por cada proveedor. Brevemente, se fijó el

anticuerpo de captura en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning, NY, USA) durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavó la placa 3 veces con 300 μ l de buffer de lavado compuesto de 0.05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, CA, USA) en PBS. Posteriormente se bloqueó con 300 μ l de una solución de bloqueo compuesto de 1% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, CA, USA), y se incubó por 1 h, se lavó la placa y se adicionó el anticuerpo estándar y los sobrenadantes de los co-cultivos, incubando por 2 h. Al término de este tiempo nuevamente se lavó la placa, se adicionó el anticuerpo de detección y se incubó por 2 h. Después de lavar la placa, se adicionó Avidina-HRP conjugada y se incubó durante 30 min. La placa fue lavada 3 veces y se adicionó el sustrato. Para la determinación de TGF- β 1 e IL-10 se incubó la placa por 30 min, y al término de este tiempo se leyó en un lector para placas EPOCH (BioTek Instruments, Inc. Winooski, USA) a 450 nm para TGF- β 1 y 405 nm con corrección de 605 nm para IL-10

Extracción de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP)

Para evaluar el efecto inmunosupresor de las células tumorales de CaCu sobre la proliferación de linfocitos T a través de la vía adenosinérgica se requirió de sangre periférica de donadores normales. Para ello, se tomaron 15-20 mL de sangre periférica mediante punción en la vena de un brazo empleando tubos vacutainer de 6 mL con anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa) (Becton Dickinson, CA, USA). En condiciones de esterilidad la muestra de sangre fue procesada y centrifugada a 2000 (rpm) durante 10 min para separar el plasma sanguíneo (fase superior) del paquete celular (fase inferior). Con ayuda de una pipeta serológica fue retirado el plasma y colocado en otro tubo para eliminar las proteínas de complemento mediante inactivación a temperatura de 56°C durante 30 min. La fase inferior conteniendo el paquete celular, fue resuspendido con solución buffer salina de fosfatos (PBS). Después de dos lavados, el paquete celular se llevó a un volumen 1:1. La mezcla de sangre y PBS fue depositada sobre 10 mL de Ficoll (Histopaque, Sigma-Aldrich, USA) y centrifugada durante 30 min a 1000 rpm. A continuación, las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP), colectadas en la interfase fueron resuspendidas con medio IMDM-12440 (Life Technologies, USA) suplementado con 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 50

μM de β -Mercaptoetanol y $100 \mu\text{M}$ de una mezcla de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, USA), además de antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomycin $100 \mu\text{g/mL}$).

Ensayo de proliferación de células T por marcaje con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE)

Para evaluar el efecto inhibitorio de la Ado, generada por las células de CaCu, sobre la proliferación de células T, 1×10^5 células CMNSP marcadas previamente con $2 \mu\text{M}$ de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Sigma, CA, USA) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, fueron cultivadas en presencia de perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD2 / CD3 / CD28 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) en proporción 2:1 (CMNSP:perlas) (control negativo), y en presencia de $20 \mu\text{L}$ de sobrenadante de células CaSki que habían sido incubadas en presencia de 5mM de AMP durante 5 hr, o de células CaSki previamente cultivadas con CEMs-CaCu, CEMs-CN y fibroblastos H5-S en proporción 1:5 durante 96 hr y posteriormente incubadas durante 5 hr en presencia de 5mM de AMP. CMNSP cultivadas en presencia de $500 \mu\text{M}$ de Ado fueron incluidas como control positivo de inhibición. También se incluyó un cultivo de CMNSP en presencia de 5mM de AMP para descartar que la Ado generada por las CMNSP tuviera *per se* un efecto inhibitorio. En algunos cultivos se adicionó $1 \mu\text{M}$ ZM241385 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), antagonista competitivo y selectivo de A2AR y A2BR. Todos los cultivos de CMNSP se realizaron por triplicado y fueron llevados a un volumen total de $200 \mu\text{L}$ con medio IMDM más suero autólogo humano en una placa de 96 pozos de fondo U (Corning costar, USA) e incubadas a 37°C , 5% de CO_2 por 96 hr. Al finalizar el tiempo de cultivo se analizaron los niveles de CFSE en las CMNSP a través de un citómetro de flujo FACS ARIA II contando un mínimo de 25,000 eventos. El tiempo inicial (T_0) de marcaje con CFSE se determinó en el momento de la cosecha al marcar las células y determinar los niveles iniciales de la incorporación de CFSE. La respuesta de proliferación total (T_1) de CMNSP se determinó sobre las células marcadas y cultivadas en ausencia de adenosina.

Análisis estadístico

Todos los datos numéricos se presentan como el valor medio \pm SEM de tres experimentos independientes. Las comparaciones se evaluaron mediante análisis estadístico multivariante utilizando GraphPad Prism versión 7 (software GraphPad Prism, USA). La diferencia se consideró estadísticamente significativa a $P < 0.05$.

10. RESULTADOS

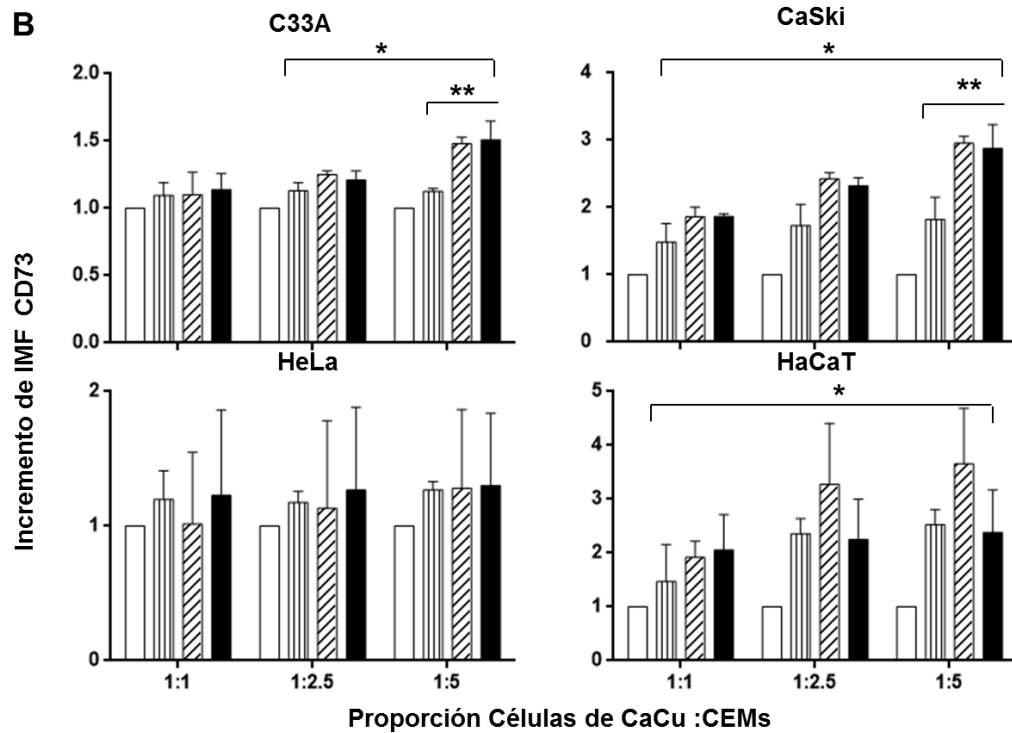
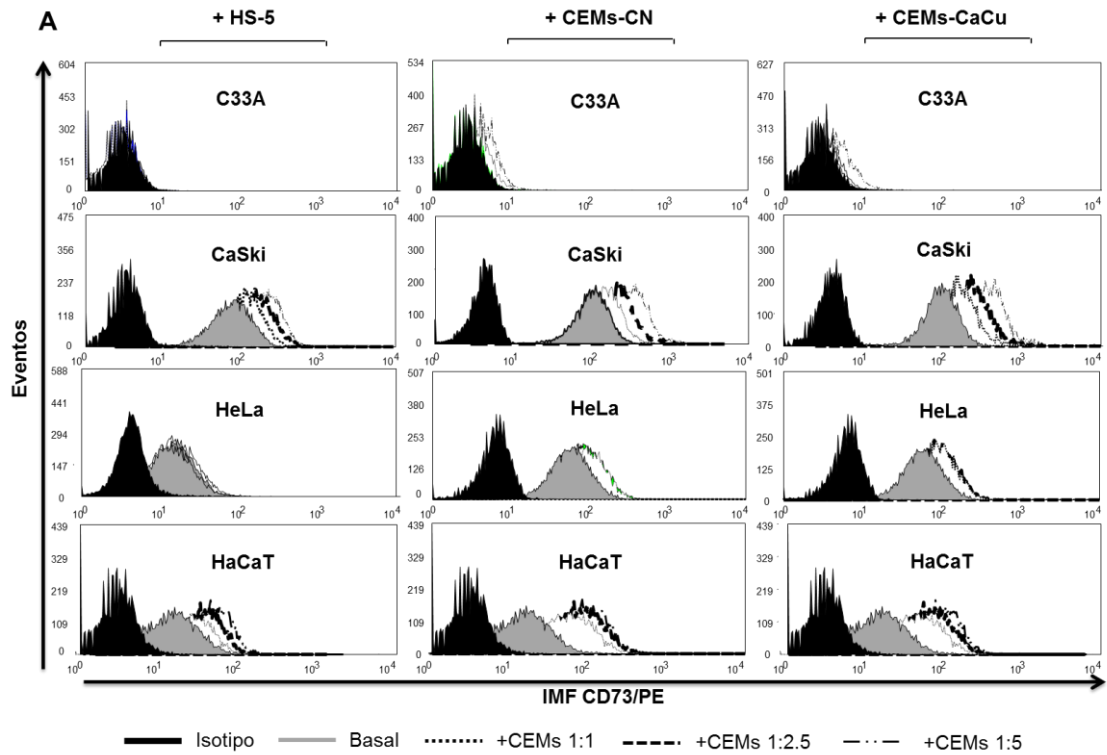
El co-cultivo de células de CaCu con CEMs-CaCu o CEMs-CN incrementa la expresión de CD73 y su capacidad para generar ADO

En el microambiente tumoral las CEMs desempeñan un papel crucial en la promoción de la progresión tumoral, ya que proporcionan un entorno propicio para anclar células tumorales al estroma tumoral; además, pueden inducir cambios funcionales en células tumorales mediante la secreción de factores solubles o el intercambio de proteínas de membrana durante sus interacciones con células tumorales (Yang *et al*, 2015; Ridge *et al*, 2017).

Para determinar si las CEMs-CaCu incrementan la expresión de CD73 en células de CaCu, células tumorales derivadas de las líneas C33A (HPV-), CaSki (HPV-16+) y HeLa (HPV-18+) fueron co-cultivadas en proporciones 1:1, 1:2.5 y 1:5, con CEMs-CaCu. Para fines de comparación, también se realizaron co-cultivos con CEMs-CN en las mismas proporciones. Células HaCaT de queratinocitos humanos y fibroblastos humanos de la línea HS-5 fueron incluidos como controles negativos. Después de realizar los co-cultivos en cámaras de transwell durante 96 hrs, se determinó la expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales y queratinocitos mediante citometría de flujo.

Se encontró que la expresión de CD73 en las células de CaCu incrementó de manera dependiente de la proporción de CEMs adicionadas en los co-cultivos (Figs 10A-B). Después de cocultivarse en proporción 1:5 con HS-5, CEMs-CN y CEMs-CaCu, la expresión de CD73 en las células C33A, CaSki y HeLa en relación a la expresión basal en cada línea celular, la cual fue normalizada con un valor de 1, fue: 1.12 ± 0.02 , 1.48 ± 0.05 y 1.51 ± 0.12 en C33A; 1.82 ± 0.33 , 2.95 ± 0.10 y 2.87 ± 0.35 en CaSki; y 1.27 ± 0.06 , 1.28 ± 0.58 y 1.30 ± 0.53 en HeLa, respectivamente. Mientras que el incremento de CD73 en HaCaT fue de 2.52 ± 0.28 , 3.65 ± 1.03 y 2.38 ± 0.79 , respectivamente (Fig. 10B). Por otra parte, la expresión relativa del ARNm de CD73 en las células tumorales co-cultivadas con HS-5, CEMs-CN y CEMs-CaCu se asoció de manera importante con los niveles de CD73 detectados en la membrana celular de las mismas. En el caso particular de las células CaSki, se encontró un

incremento de 3.40 ± 0.38 , 4.78 ± 1.69 y 4.87 ± 1.16 veces, respectivamente, en relación al nivel basal de expresión, que fue normalizado con un valor de 1, (Fig. 10C).



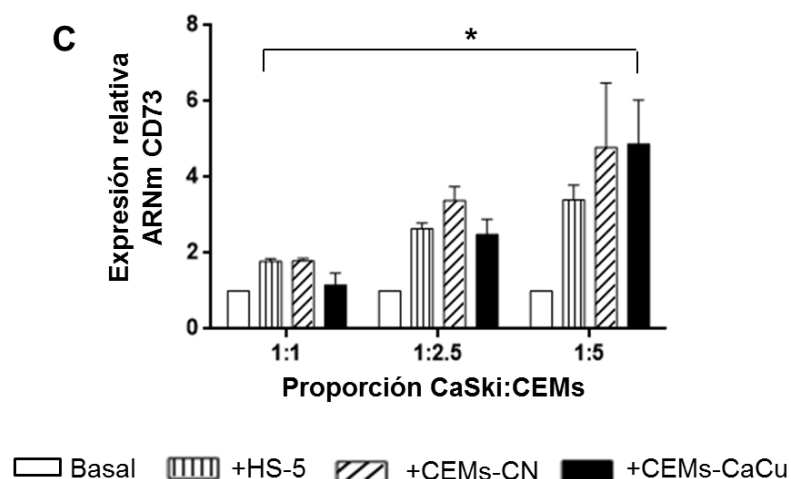


Figura 10. Células de CaCu incrementan la expresión de CD73 en co-cultivo con CEMs. Células tumorales C33A, CaSki, HeLa y queratinocitos HaCaT fueron co-cultivadas con CEMs-CaCu (n = 3), CEMs-CN (n = 3) o fibroblastos humanos HS-5 en proporciones 1: 1, 1: 2.5 y 1: 5 (células de CaCu: CEMs) utilizando cámaras de transwell. Después de 96 h, la expresión de CD73 en las células de CaCu se determinó mediante citometría de flujo (A, B) considerando 25,000 eventos, o por RT-PCR en células CaSki (C) como se indica en los Materiales y Métodos. (A) Se muestra el valor de autofluorescencia (histogramas en negro), la expresión basal de CD73 (histogramas en gris), y los niveles de expresión de CD73 en las células de CaCu y HaCaT después del cocultivo con diferentes proporciones de CEMs (histogramas con diferentes guiones) (B, C). Se muestran los niveles de expresión de ARNm de CD73 en las células CaSki cultivadas con diferentes proporciones de CEMs, en relación con el nivel basal de expresión (barras blancas), que se normalizó a 1. * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con el nivel basal de expresión de CD73 en las células de CaCu. ** indica diferencia significativa respecto a HS-5. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, y se muestran los promedios \pm SEM.

Por otra parte, para analizar si el aumento en la expresión de CD73 en células de CaCu co-cultivadas con CEMs correspondió con una mayor capacidad para generar Ado, las células CaSki co-cultivadas previamente con diferentes proporciones de CEMs o HS-5 durante 96 hr, fueron cultivadas en presencia de 5 mM de AMP y en presencia o ausencia de 5 mM de APCP (un inhibidor específico de CD73). Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes al inicio y después de 5 h de cultivo, y la generación de Ado se detectó mediante TLC y se cuantificó mediante UPLC.

La capacidad de las células de CaCu para generar Ado se relacionó directamente con el aumento en la expresión de CD73. Aparentemente, las células CaSki obtenidas del co-cultivo con CEMs-CaCu mostraron la mayor capacidad para generar Ado en relación con aquellas co-cultivadas con CEMs-CN o HS5 (**Fig. 11 A**). La cantidad de Ado producida por las células CaSki se

determinó mediante UPLC empleando estándares de ATP, ADP, AMP, Ado e Inosina, los cuales fueron eluidos de manera simultánea y analizadas mediante un detector de UV a 260 nm (**Fig. 11B**). La curva de calibración de Ado fue obtenida a partir de un análisis de regresión lineal de primer orden, partiendo de una concentración de 1 mg/mL y realizando diluciones seriadas 1:100. Los parámetros de regresión incluyeron la ordenada al origen de - 2.24, la pendiente de 3.27 y un coeficiente de correlación r^2 de 0.999 para Ado (**Fig.11 C**). El estándar se analizó por triplicado, el porcentaje de RSD (Desviación estándar de correlación) fue de 101.63 indicando una precisión satisfactoria en el análisis (**Fig. 11D**).

La producción basal de Ado por las células CaSki cultivadas en presencia de AMP fue de $278.11 \pm 46.43 \mu\text{M}$. Las concentraciones de Ado producidas por las células CaSki cocultivadas en las proporciones 1:1, 1:2.5 y 1:5 con los fibroblastos HS-5, CEMs-CN y CEMs-CaCu por 96 hr fueron: 400.02 ± 60.67 , 550.08 ± 21.50 y $681.67 \pm 80.23 \mu\text{M}$; 494.185 ± 3.34 , 548.055 ± 37.62 y $729.500 \pm 107.99 \mu\text{M}$; y 515.150 ± 4.90 , 681.790 ± 16.83 y $952.950 \pm 26.1 \mu\text{M}$, respectivamente. La adición de APCP, inhibidor específico de CD73, disminuyó en más del 95% la capacidad de las células CaSki para hidrolizar AMP en todos los casos (**Fig. 11 E-F**), apuntando a que la principal actividad hidrolítica de AMP en las células tumorales fue debida a CD73. Por otro lado, las células CaSki cultivadas en ausencia de AMP no produjeron niveles detectables de Ado. Estos resultados proporcionan una evidencia importante de la participación de CEMs-CaCu en la inducción de niveles aumentados de CD73 en células tumorales de CaCu y en consecuencia, una mayor capacidad para generar Ado.

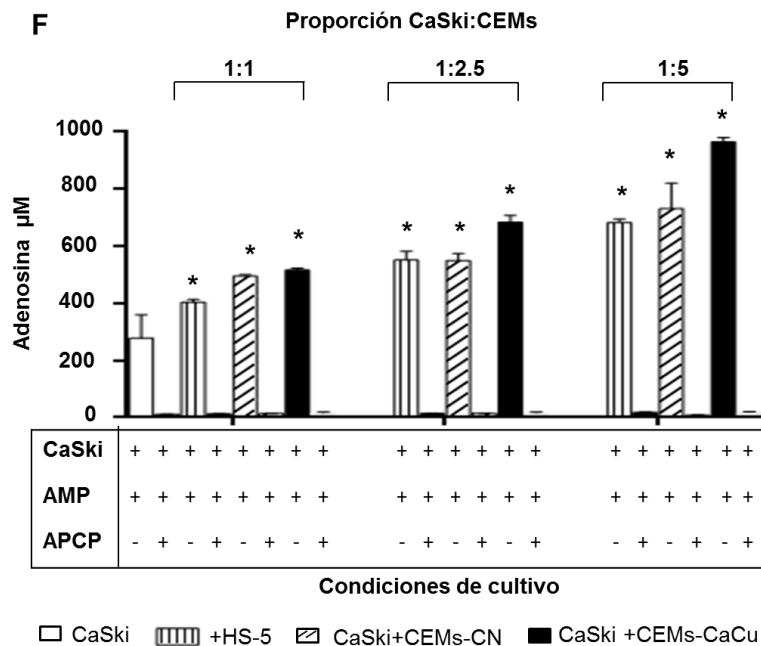
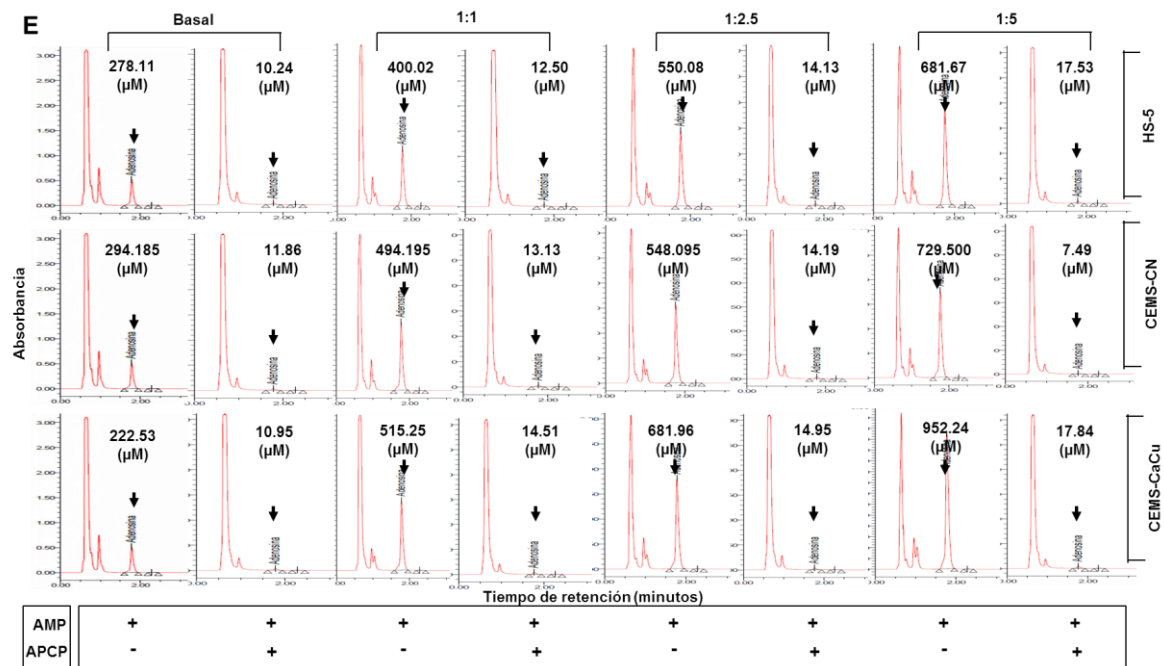
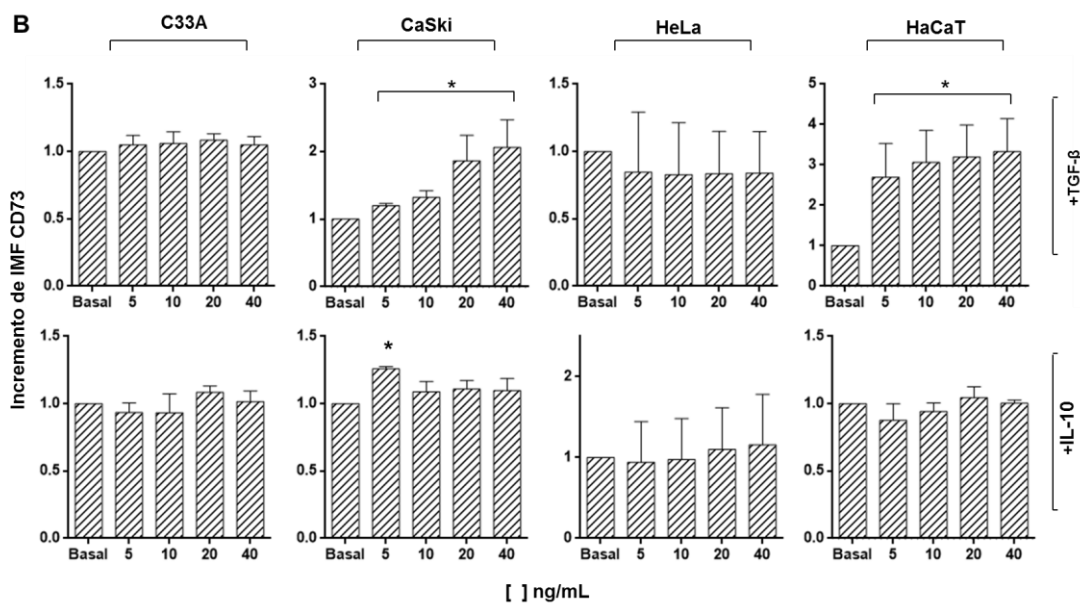
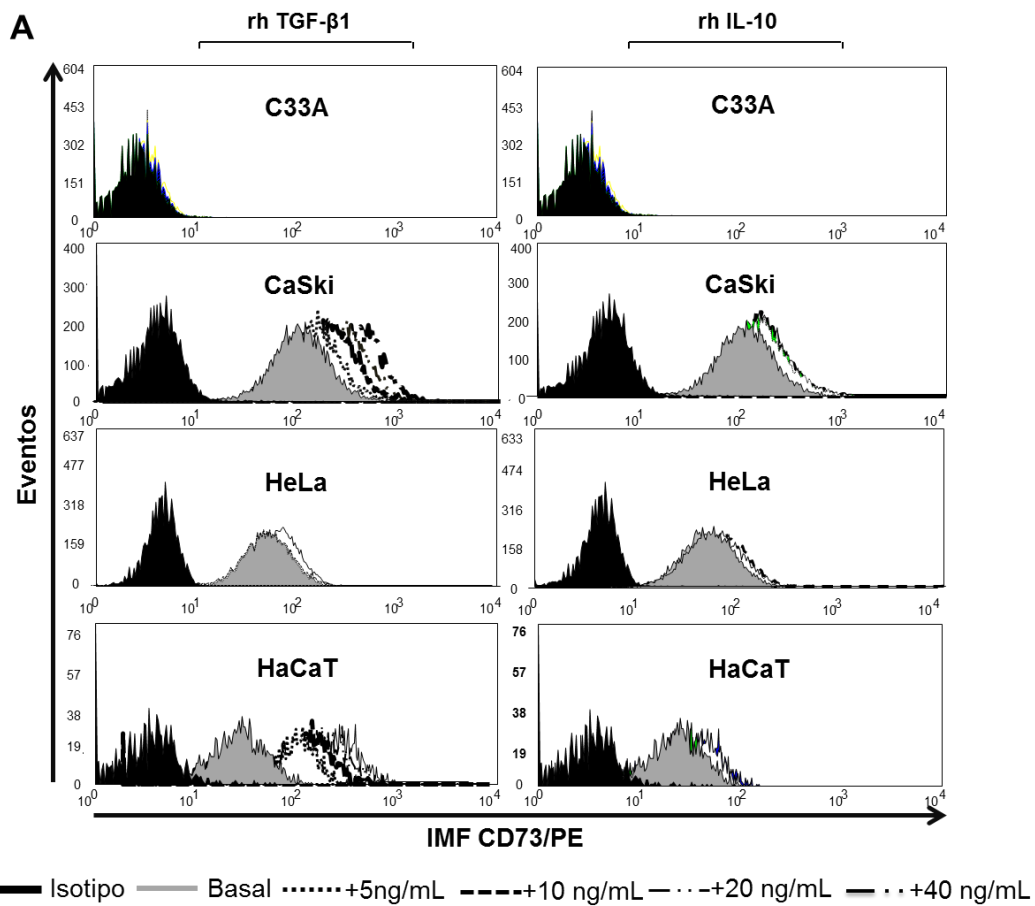


Figura 11. Actividad hidrolítica de CD73 en células CaSki cocultivadas con CEMs. Las células CaSki se co-cultivaron durante 96 h con CEMs-CaCu (n = 3) CEMs-CN (n=3) o HS-5 en proporciones 1:1, 1:2.5 y 1:5 utilizando cámaras transwell. Posteriormente, las células se separaron del co-cultivo, se lavaron y se cultivaron por 5 h en presencia de AMP 5 mM y en presencia o ausencia de APCP, inhibidor específico de CD73. (A) La presencia de Ado (flechas negras) se detectó mediante TLC. (B-C) para cuantificar el contenido de Ado generado por las células CaSki se emplearon estándares de ATP, ADP, AMP, Ado e Inosina y una curva estándar de Ado sintético. Se muestran los picos (D) y cantidades (μM) (E-F) de Ado producida por las células CaSki co-cultivadas con diferentes proporciones de CEMs y fibroblastos, en presencia y ausencia de APCP. * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con la concentración de Ado generada por las células CaSki cultivadas en ausencia de CEMs. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes, y se muestran los promedios \pm SEM.

TGF-β1 incrementa la expresión de CD73 en células CaSki

TGF-β1 e IL10 inducen la expresión de CD73 en diferentes tipos de células y aumenta su capacidad para generar Ado extracelular (**Regateiro et al, 2011; Ryzhov et al, 2014; Kaku et al, 2014**). Además, hemos demostrado que CEMs-CaCu son capaces de aumentar significativamente la expresión y secreción de TGF-β en células de CaCu (**Garcia-Rocha et al, 2015**). En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se analizó el efecto de rh-TGF-β1 en la proliferación de células Mv1Lu (sensibles a TGF-β1) y encontramos que a concentraciones superiores a 10 ng/ml estas células son inhibidas (**García-Rocha et al, 2018**). Para corroborar dicha actividad, utilizamos las líneas celulares de CaCu C33A, CaSki y HeLa en presencia de diferentes concentraciones de rh-TGF-β1 y rh-IL-10 (5-40 ng/ mL). Con fines de comparación también cultivamos células HaCaT. Después de 96 h de cultivo encontramos que células CaSki incrementaron significativamente ($P < 0.05$) los niveles de expresión de CD73 de manera dosis dependiente de la concentración de TGF-β1, no obstante IL-10 incrementó la expresión de CD73 de manera marginal en las células CaSki, HeLa y HaCaT (**Fig. 12A-B**). El aumento de los niveles de expresión de CD73 en CaSki cultivadas con TGF-β1 con las concentraciones de 5, 10, 20 y 40 ng/mL fue de 1.19 ± 0.03 , 1.32 ± 0.05 , 1.86 ± 0.18 y 2.06 ± 0.20 veces respectivamente; mientras que en presencia de IL-10 fue de 1.25 ± 0.01 , 1.08 ± 0.09 , 1.10 ± 0.08 y 1.09 ± 0.09 en relación con la expresión basal de CD73 en CaSki que se normalizó a un valor de 1. Resultados similares fueron observados al evaluar la expresión de ARNm de CD73 por RT-PCR. El aumento de los niveles de ARNm de CD73 en las células CaSki cultivadas con 5, 10, 20 y 40 ng/mL de TGF-β1, fue de 1.18 ± 0.38 , 1.92 ± 1.69 , 3.12 ± 1.16 y 9.33 , respectivamente, en relación con el nivel de expresión basal en las células tumorales, el cual fue normalizado con un valor de 1. Por otro lado, no se observaron cambios en la expresión de ARNm de CD73 cuando las células fueron cultivadas con las diferentes concentraciones de IL-10 (**Fig. 12C**).



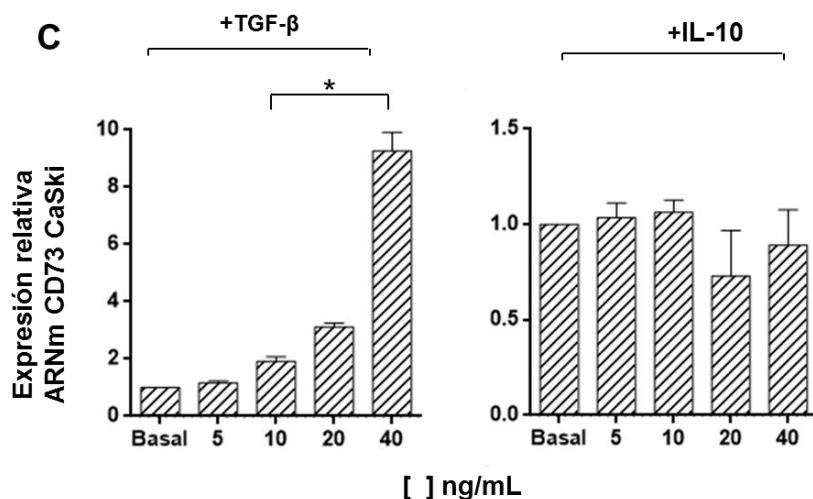
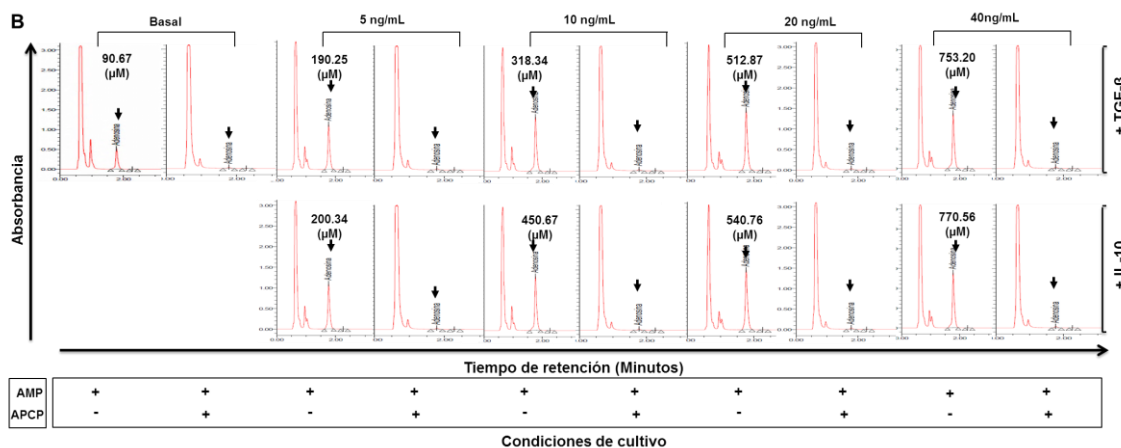
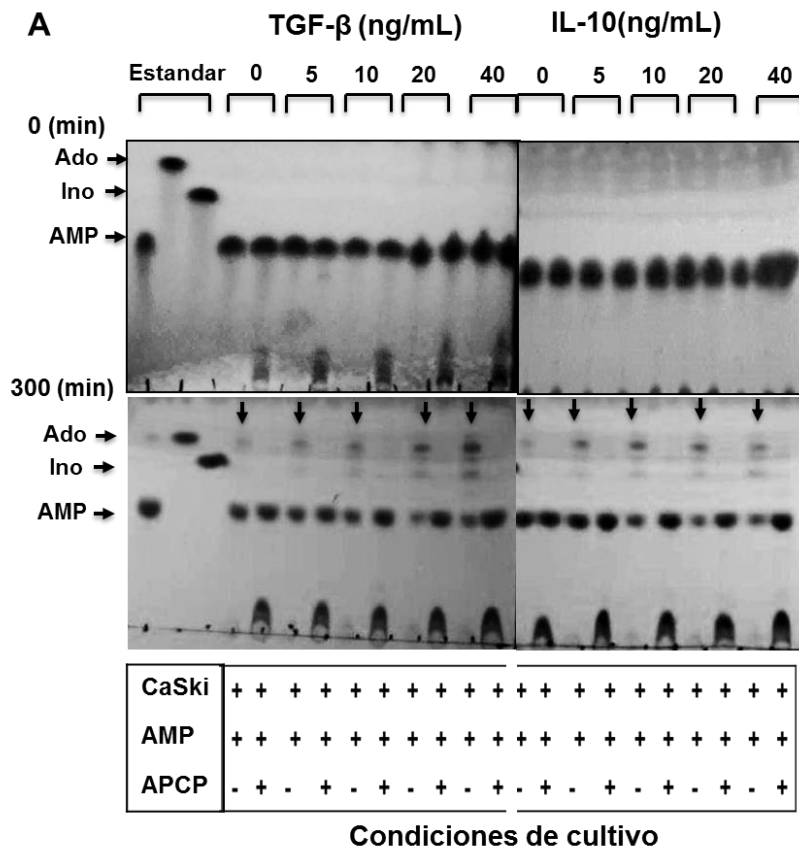


Figura 12. TGF-β1 incrementó la expresión de CD73 en células CaSki de una manera dependiente de la dosis. Las células C33A, CaSki, HeLa y HaCaT se cultivaron durante 96 h en presencia de diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 40 ng / ml) de rh-TGF-β1 y rh-IL-10. Después de 96 h, el nivel de expresión de CD73 en las células de CaCu (25,000 eventos) se determinó mediante citometría de flujo (A, B) o RT-PCR en CaSki (C) como se indica en los Materiales y Métodos. A) Se muestran el valor de autofluorescencia (histogramas en negro) y el nivel basal de expresión de CD73 en las células de CaCu (histogramas en gris), al igual que los niveles de expresión de CD73 en células de CaCu después del cocultivo con diferentes concentraciones de rh-TGF-β1 y rh-IL-10 (histogramas con diferentes guiones). La expresión de CD73 como proteína (B) o como ARNm (C) en células de CaCu cultivadas en presencia de rh-TGF-β1 y rh-IL-10, fue comparado con la expresión basal encontrada en las células tumorales, la cual fue normalizada con un valor de 1. * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con las células de CaCu cultivadas en ausencia de rh-TGF-β1 y rh-IL-10. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y se muestran los promedios \pm SEM.

TGF-β1 e IL-10 promueven la capacidad de generar Ado en células tumorales de CaCu mediante el incremento en la expresión de CD73

Para analizar si el incremento en la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCu cultivadas con rh-TGF-β1 y rh-IL-10 correspondía con la actividad funcional de esta enzima, células CaSki fueron cultivadas durante 96 h en presencia diferentes concentraciones (5-40 ng/mL) de estas citocinas y posteriormente fueron incubadas durante 5 h en presencia de 5 mM de AMP, y en presencia o ausencia de APCP. La cantidad de Ado generada por las células correspondió al aumento en CD73 inducido por TGF-β1 en los cultivos celulares (**Fig. 13A**). La concentración de adenosina en el sobrenadante de células CaSki cultivadas solo con medio de cultivo y posteriormente incubadas con AMP por 5 h fue de $90 \pm 46.67 \mu\text{M}$. Mientras que en los sobrenadantes de

las células cultivadas por 96 hr en presencia de 5, 10, 20 y 40 ng/mL de TGF- β e IL-10 fueron 190.215 ± 9.76 , 318.34 ± 15.11 , 512.87 ± 8.44 y 753.20 ± 32.77 μM ; y 200.34 ± 3.89 , 450.67 ± 17.89 , 540.76 ± 6.18 y 770.56 ± 23.78 μM , respectivamente. Es importante destacar que la adición de APCP inhibió completamente la capacidad de las células CaSki para generar Ado (**Fig. 13B-C**). Estos resultados sugieren que TGF- β 1 e IL-10 son dos citocinas que pueden promover la capacidad de las células tumorales de CaCu para generar Ado a través de la inducción de la expresión de CD73.



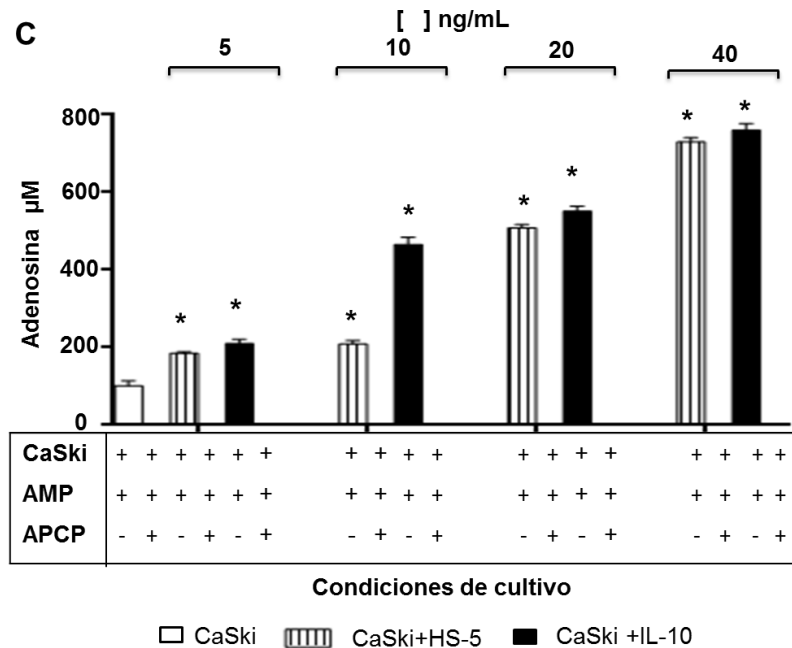


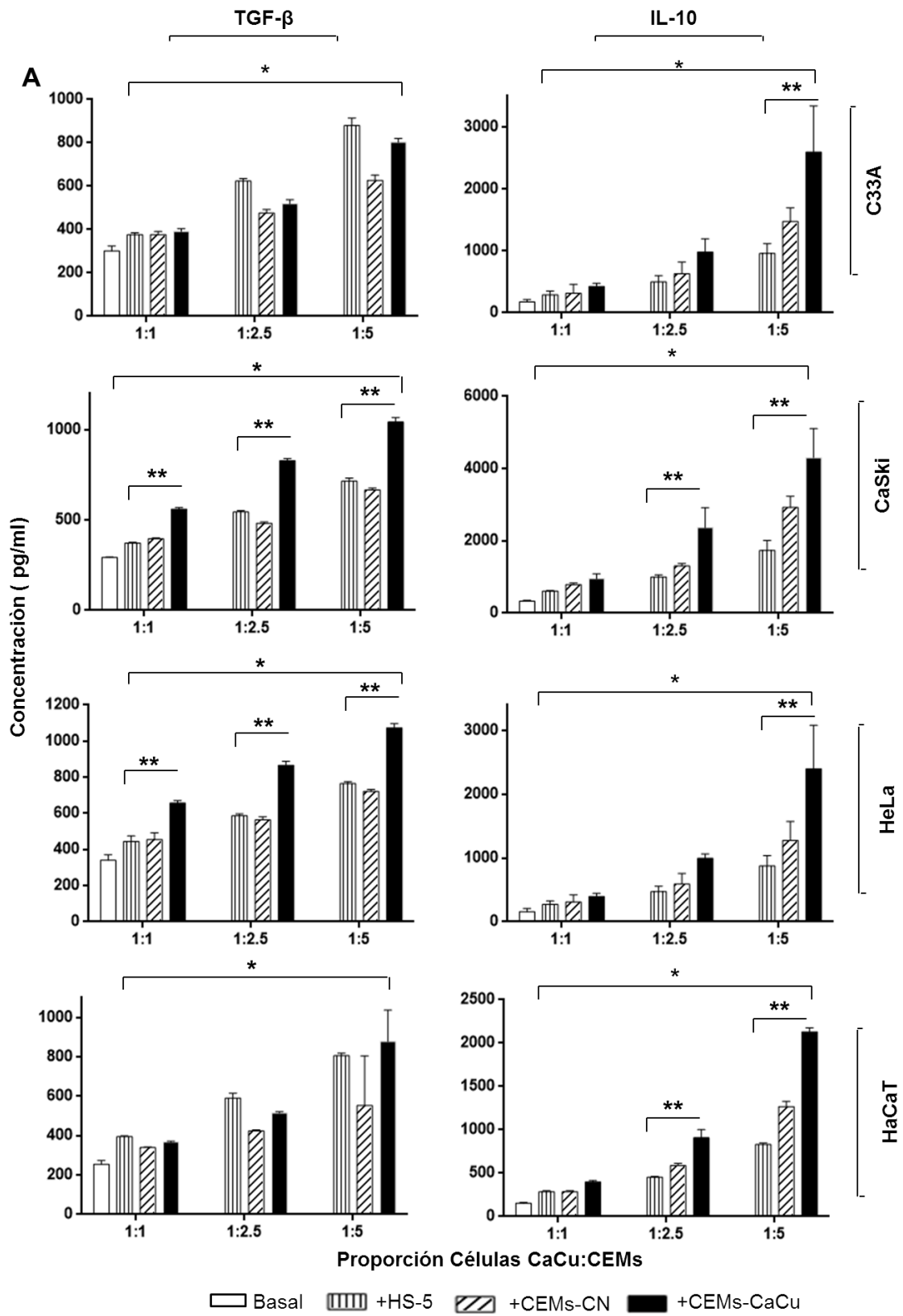
Figura 13. Actividad hidrolítica de CD73 en células CaSki cultivadas en presencia de TGF-β1 e IL-10. Las células CaSki fueron cultivadas durante 96 h en presencia de diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 40 ng / ml) de rh-TGF-β1 y rh-IL10. Posteriormente, las células se separaron del cocultivo, se lavaron y se cultivaron durante 5 h en presencia de 5 mM de AMP en la presencia o ausencia de APCP, inhibidor específico de CD73. La presencia de Ado se evidenció mediante TLC (A) y se cuantificó mediante UPLC (B-C) utilizando concentraciones estándar de Ado sintético. (A) Se muestran los productos de hidrólisis de AMP (marcados con flechas) y las concentraciones de Ado producidas por las células de CaSki en presencia o ausencia de APCP (B-C). Se usaron AMP, inosina (Ino) y Ado sintético (5 mM) como controles. * indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación con la concentración de ado generada por las células CaSki cultivadas en ausencia de rh-TGF-β1 y rh-IL-10. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, y se muestran los promedios \pm SEM.

CEMs-CaCu inducen mayor producción de TGF-β1 e IL-10 en los cocultivos con células tumorales de CaCu en relación a CEMs-CN

En estudios previos nuestro grupo de investigación reportó que el sobrenadante del co-cultivo de CEMs-CaCu con células tumorales de CaCu contiene grandes cantidades de IL-10 (Montesinos *et al*, 2013); y que TGF-β1 induce la producción de IL-10 en las células tumorales de CaCu (García-Rocha *et al*, 2015). Para analizar la participación de las CEMs en la producción de TGF-β1 e IL-10 en los co-cultivos con células C33A, CaSki, HeLa y HaCat, diferentes proporciones de CEMs:células tumorales (1:1, 2.5:1 y 5:1) fueron co-cultivadas en cámaras transwell por 96 hr y posteriormente se determinó la concentración de estos factores en los sobrenadantes. Se

encontró que el contenido de TGF- β 1 e IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos de CEMs con las diferentes líneas celulares incrementó de manera significativa ($P < 0.05$) en relación al contenido de estos factores en los sobrenadantes de las células tumorales cultivadas de manera independiente (**Fig. 14A**). El contenido de TGF- β en el sobrenadante de las células C33A, HeLa, CaSki y HaCaT fue de 228.679 ± 25.88 , 245.659 ± 23.68 , 243.476 ± 34.87 y 273.299 ± 10.88 ; mientras que en los sobrenadantes de los co-cultivos con HS-5, CEMs-CaCu o CEMs-CN, en proporción 1:5 (células tumorales:CEMs), fueron de: 776.803 ± 636.24 , 519.29 ± 49.45 y; 842.27 ± 144.49 pg/mL, 738.64 ± 59.13 660.355 ± 48.29 , 596.171 ± 28.81 ; 828.803 ± 69.57 , 582.621 ± 39.16 ; 876.803 ± 439.44 , 529.89 ± 39.16 y; 1042.09 ± 144.49 pg/mL, 666.34 ± 59.13 , respectivamente. Por otro lado, los contenidos de IL-10 en los sobrenadantes de las células C33A, HeLa, CaSki y HaCaT fueron: 218.56 ± 21.31 , 236.679 ± 43.78 , 233.257 ± 39.07 , 213.6549 ± 60.38 pg/mL, respectivamente, y el de los sobrenadantes de los co-cultivos con HS-5, CEMs-CaCu o CEMs-CN, en proporción 1:5 (células tumorales:CEMs), fueron de: 1936.83 ± 45.57 , 1252.81 ± 56.13 ; 1974.76 ± 72.57 , 1138.76 ± 69.13 2520.767 ± 40.13 , 1256.45 ± 18.73 ; 4102.81 ± 38.5 , 2996.75 ± 20.18 ; 2286.83 ± 72.57 , 1452.66 ± 49.13 ; 2054.83 ± 72.57 , 1228.66 ± 49.13 pg/mL respectivamente (**Fig. 14A**).

Es importante mencionar que las CEMs-CaCu produjeron, *per se*, mayores concentraciones de TGF- β o IL-10, en relación a CEMs-CN o HS-5. Las concentraciones de TGF- β detectadas en cultivos de 50,000, 125,000 y 250,000 CEMs-CaCu, CEMs-CN y H5-S fueron de 218.56 ± 91.83 , 416.549 ± 26.88 , 633.648 ± 28.91 respectivamente, mientras que para IL-10 fueron de 1209.56 ± 81.92 , 1346.179 ± 26.88 , 1573.657 ± 98.31 en la misma cantidad de células (**Fig. 14B**). Estos resultados sugieren que la presencia de CEMs en el microambiente tumoral podría condicionar a las células tumorales a producir niveles más altos de TGF- β 1 e IL-10.



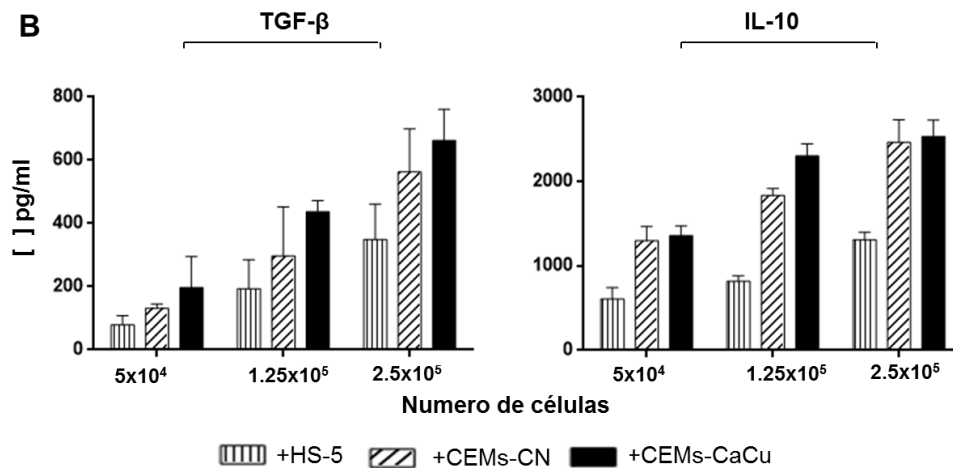


Figura 14. Producción de TGF-β1 e IL-10 en cocultivos de líneas celulares de CaCu y CEMs. A) Un total de 5×10^4 células C33A, CaSki, HeLa y HaCaT se sembraron en los pozos inferiores de las cámaras de transwell y se co-cultivaron con CEMS-CaCu ($n = 3$), CEMS-CN ($n = 3$) o HS-5 en las proporciones 1:1, 1: 2.5 y 1 : 5. Después de 96 h del cocultivo, se determinó mediante ELISA el contenido de TGF-β1 e IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos. B) de sobrenadantes de cultivos de diferentes cantidades de CEMS o HS-5. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, y se muestran los promedios \pm SEM. * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$), ** indica diferencia significativa respecto a HS-5.

La adición de anticuerpos neutralizantes anti-TGF-β y anti-IL-10 revirtió parcialmente la expresión de CD73 inducida en células tumorales de CaCu en co-cultivo con CEMs

En este trabajo observamos que las CEMs inducen incremento en la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCu, y que TGF-β y IL-10 se encuentran presentes en altas concentraciones en los sobrenadantes de dichos co-cultivos. Con la finalidad de analizar si estas citocinas participan en la inducción de CD73 en las células tumorales de CaCu co-cultivadas con CEMs, células CaSki se co-cultivaron en una proporción de 1: 5 con CEMs-CaCu, CEMs-CN y fibroblastos HS-5 en presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes anti-TGF-β (α -TGF-β) y/o anti-IL-10 (α -IL-10). De manera interesante, la adición de los anticuerpos neutralizantes α -TGF-β, α -IL-10 o ambos a los co-cultivos, revirtió la expresión de CD73 en más del 40% en las células tumorales (**Fig. 15**). Estos resultados sugieren que estas citocinas producidas en los co-cultivos de CEMs con células tumorales, participan, al menos en parte, en la inducción de CD73, además de otros factores producidos en estos co-cultivos.

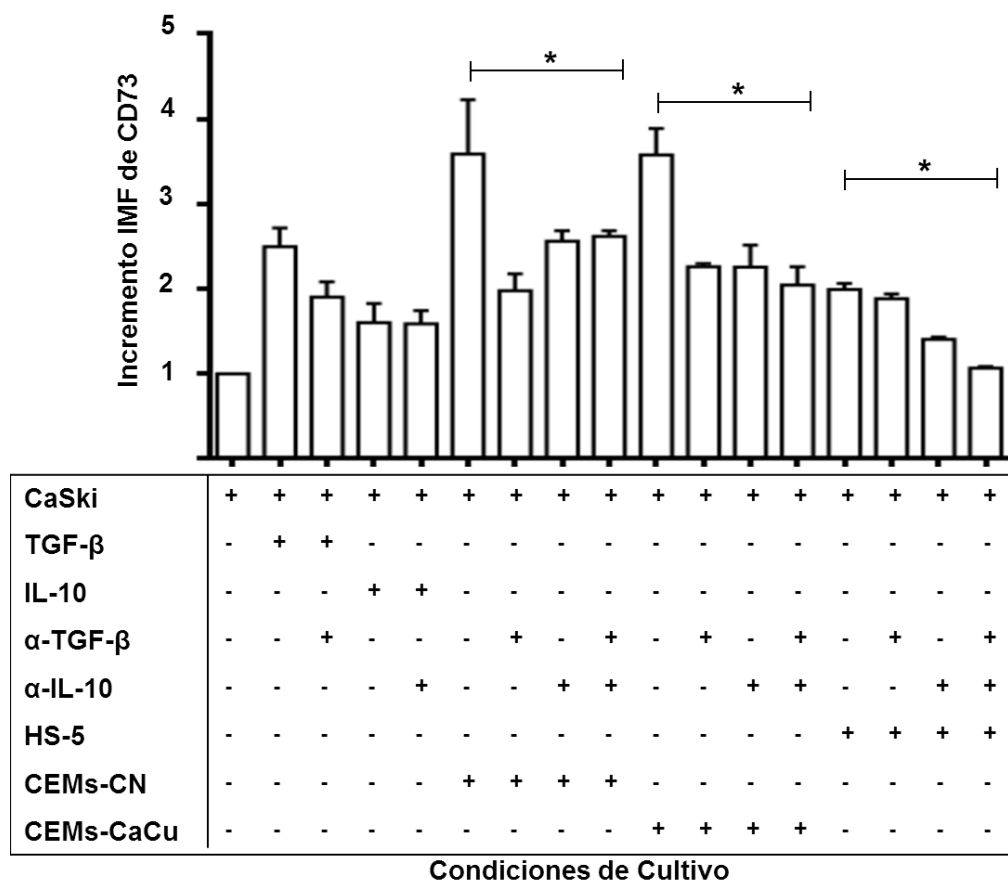


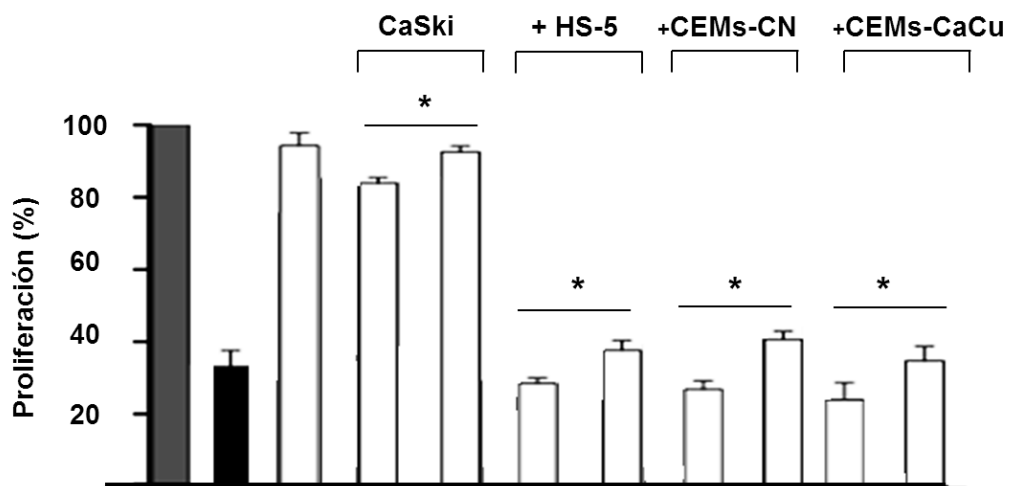
Figura 15. La adición de anti-TGF-β y anti-IL-10 revirtió la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCu co-cultivadas con CEMs. 5×10^4 células CaSki fueron co-cultivadas con CEMs-CaCu ($n = 3$) CEMs-CN ($n = 3$) o HS-5 en proporciones de 1: 5 utilizando cámaras Transwell y en presencia o ausencia de 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos neutralizantes anti-TGF-β ($\alpha\text{-TGF-}\beta$) o anti-IL-10 ($\alpha\text{-IL-10}$). Después de 96 h, se analizó la expresión de CD73 por citometría de flujo. A). Se muestra el valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión basal de CD73 en las células CaSki, el cual fue normalizado a 1 y la expresión de CD73 en las células CaSki co-cultivadas con las CEMs y fibroblastos H5-S en presencia y ausencia de $\alpha\text{-TGF-}\beta$ o $\alpha\text{-IL-10}$ o ambos anticuerpos. * indica disminución significativa de la expresión de CD73 ($P < 0.05$) respecto a los cocultivos en ausencia de anticuerpos neutralizantes. Datos representativos de 3 experimentos diferentes.

CEMs incrementaron la capacidad de células tumorales de CaCu para inhibir la proliferación de células T a través de la generación de Ado

Se sabe que adenosina es capaz de inhibir la activación y las funciones efectoras citotóxicas de las células asesinas naturales (NK) y CD8 (**Bruzzese et al, 2012**). Para evaluar la capacidad de las células CaSki co-cultivadas con CEMs para inhibir la proliferación de células T a través de la generación de adenosina, 1×10^5 células CMNSP marcadas con CFSE, fueron cultivadas en presencia de perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD2 / CD3 / CD28 para estimular a las células T (control negativo), y en presencia de 20 μl de sobrenadante de células CaSki incubadas ya sea en presencia de 5mM de AMP durante 5 hr, o de células CaSki previamente cultivadas con CEMs-CaCu, CEMs-CN y fibroblastos H5-S en proporción 1:5 durante 96hrs y

posteriormente incubadas durante 5hrs en presencia de 5mM de AMP. Asimismo las CMNSP fueron cultivadas en presencia de 500uM de Ado como control positivo de inhibición. También se incluyó un cultivo de CMNSP en presencia de 5mM de AMP para descartar que la Ado generada por las CMNSP tuviera, *per se*, un efecto inhibitorio. Tomando en cuenta que la inhibición de Ado sobre las células T es mediada principalmente a través de A2AR (Svtovsky et al, 2008) en algunos cultivos se adicionó 1 μ M ZM241385, antagonista competitivo y selectivo de A2AR y A2BR. Las concentraciones de Ado en cultivos de células T CD8 + en presencia de sobrenadantes de CaSki cultivadas con AMP eran aproximadamente de 69.5, mientras que los sobrenadantes de CaSki precultivadas con HS-5, MSCs-CN y MSCs-CaCu eran de 170, 182 y 192 respectivamente

El sobrenadante de células CaSki incubadas en presencia de AMP inhibieron la proliferación de células T en más del 20% en relación al control negativo, mientras que aquellos obtenidos de células CaSki previamente co-cultivadas con HS-5, CEMS-CN y CEMS-CaCu y posteriormente incubadas con AMP, inhibieron la proliferación de las células T en 71, 75, y 78 %, respectivamente, de manera comparable al control positivo de inhibición (500 μ M de Ado), el cual inhibió cerca del 70% la proliferación de las células (Fig. 16). Es importante mencionar que, la adición de ZM241385 (1 μ M) a cultivos de células T con los sobrenadantes de las células CaSki previamente co-cultivadas con las CEMs y fibroblastos H5-S, bloqueó parcialmente la inhibición de la proliferación de estas células, lo cual sugiere que otros factores contenidos en dichos sobrenadantes, presenten un efecto inhibitorio independiente de Ado.



Linfocitos T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ado	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMP	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ZM241385	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Figura 16. Ado producida por las Células de CaCu cultivadas con CEMs y fibroblastos H5-S inhibe fuertemente la proliferación de células T. 1×10^5 células CMNSP marcadas con CFSE, fueron cultivadas en presencia de perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD2 / CD3 / CD28 (proporción 2:1) (control negativo de inhibición, barra gris), y en presencia de 20 μ l de sobrenadante de células CaSki incubadas ya sea en presencia de 5mM de AMP durante 5 h, o de células CaSki previamente cultivadas con CEMs-CaCu, CEMs-CN y fibroblastos H5-S en proporción 1:5 durante 96 h y posteriormente incubadas durante 5h en presencia de 5mM de AMP. Asimismo las CMNSP fueron cultivadas en presencia de 500uM de Ado como control positivo de inhibición (barra negra). En algunos cultivos se adicionó 1 μ M ZM241385, antagonista competitivo y selectivo de A2AR y A2BR para bloquear el efecto inhibitorio de Ado. Después de 96 h de cultivo, se evaluó la proliferación de células T mediante citometría de flujo. Los datos representan 3 experimentos independientes. Se muestran las medias \pm SEM.* indican diferencias significativas $P < 0.05$.

11. DISCUSIÓN

Las CEMs son un componente importante del TME y desempeñan un papel clave en la promoción de la progresión tumoral a través de la diferenciación en fibroblastos asociados con carcinoma, pericitos y pre-fibroblastos asociados a tumores, al proporcionar a las células tumorales una ventaja de supervivencia promoviendo su proliferación **(Spaeth et al, 2009; Bergfeld et al, 2010)** o creación de un microambiente inmunosupresor **(Norozi et al, 2016)**. También proporcionan soporte y un marco para anclar células tumorales en forma de estroma tumoral **(Ridge et al, 2017)**. Sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales las CEMs ejercen sus funciones supresoras no se han aclarado completamente. En este contexto, varios estudios han demostrado que las CEMs ejercen actividad paracrina en las células vecinas al secretar varios factores bioactivos que pueden cambiar radicalmente sus funciones celulares, incluida la supervivencia, la apoptosis, la maduración y la diferenciación **(Lazennec et al, 2016; Ye et al, 2012)**. Por ejemplo, las CEMs promueven la transición epitelio-mesenquima (EMT) en células tumorales y pueden promover la colonización metastásica a través de la producción de TGF- β 1 en el TME **(Jing et al, 2012; Regateiro et al, 2013)**. De manera similar, se ha reportado que el TGF- β 1 contribuye a la creación de un TME inmunosupresor rico en Ado mediante la inducción de la expresión de CD73 en Tregs y MDSCs **(Li et al, 2017; Sun et al, 2010)**. Con base en estos reportes y en hallazgos recientes de nuestro grupo de investigación en los cuales se observó que las CEMs-CaCu incrementaron significativamente la expresión y la secreción de TGF- β en células tumorales de CaCu **(Garcia-Rocha et al, 2015)**, el cual se sabe induce la expresión de CD73 en varios tipos celulares **(Chalmin et al, 2012; Schuler et al, 2012; Martin et al, 2012; Ridge et al, 2017)**, en este estudio analizamos la capacidad de CEMs-CaCu para modificar la expresión de CD73 en células tumorales de CaCu y por tanto, su capacidad para generar Ado. Al cultivar células tumorales de CaCu con CEMs-CaCu, encontramos que las células tumorales aumentaron la expresión de CD73 y la capacidad de generar Ado de una manera que dependía de la proporción de CEMs-CaCu agregada a los cocultivos. Este fenómeno no solo fue exclusivo de la presencia de CEMs-CaCu en los cocultivos, sino que también se produjo cuando las células de CaCu se cocultivaron con CEMs-CN o con fibroblastos humanos HS-5 lo cual

puede ser el resultado de la comunicación entre las células tumorales y las CEMs o los fibroblastos en los co-cultivos celulares, tal como ocurre en el TME para promover el desarrollo de la enfermedad, ya que las CEMs pueden ser reclutadas en altas cantidades microambiente tumoral. Por ejemplo en un estudio de cáncer de cabeza y cuello se encontró que la frecuencia de CEMs se correlacionó directa y significativamente con el volumen del tumor (**Liotta et al, 2015**). Además, la correlación entre CEMs y el tamaño tumoral es consistente con los hallazgos de **Kansy et al, 2014**, donde los autores demostraron que las CEMs *in vitro* pueden establecer una diafonía directa con células tumorales dando como resultado la activación de CEMs, la producción de citocinas y el posterior crecimiento de células tumorales. Por otro lado, nuestros resultados son consistentes con los hallazgos de que CEMs derivadas de cordón umbilical humano (CEMs-CU), las cuales fueron capaces de inducir la expresión de CD73 tanto a nivel de ARNm y proteína de membrana, en células NK y células tumorales de mama y ovario (**Yang et al, 2015; Chartejee et al, 2017**). Por lo tanto, la presencia de CEMs en el microambiente tumoral podría ayudar a generar un microambiente rico en adenosina, la cual se sabe es una de las más importantes moléculas inmunosupresoras en el microambiente tumoral (**Antonioli et al, 2013**).

Tomando en consideración que TGF- β 1 e IL-10 son citocinas que inducen la expresión de CD39 y CD73 en células inmunorreguladoras, como las células T reguladoras (**Chalmin et al, 2012; Schuler et al, 2012**) las células dendríticas (**Martin et al, 2012**) y las células supresoras mieloides en tumores de ratón (**Ryzhov et al, 2014**) e incluso capaz para inducir la expresión de estas ectonucleotidasas en células con el fenotipo Th17 (**Martin et al, 2012**) se procedió a analizar la capacidad de las CEMs-CaCu para incrementar la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCu a través de la producción de TGF- β 1 e IL-10. Inicialmente, confirmamos las funciones de estas citocinas para inducir la expresión de CD73 en células tumorales de CaCu a través de cultivo de células CaCu en presencia de estas citocinas.

Es importante mencionar que el aumento de CD73 en la membrana celular de las células de CaCu se relacionó significativamente con el contenido de TGF- β 1 en los sobrenadantes de cocultivo celular; ya que se detectó una mayor

concentración de TGF- β 1 e IL-10 en cocultivos con una mayor proporción de CEMs. Diferentes trabajos también apoyan la idea que CEMs de distintas fuentes incrementan las concentraciones de citocinas anti-inflamatorias, ya que las CEMs pueden regular el fenotipo de células de cáncer de mama humano por inducción paracrina y autocrina de TGF- β (**Cao et al, 2009**).

Estudios recientes han demostrado que las CEMs pueden inducir cambios funcionales, como un aumento en la actividad de CD73 en células tumorales y células NK, ya sea a través del intercambio de material biológico a través de vesículas extracelulares que incluyen exosomas, o a través de la actividad paracrina (**Yang et al, 2015; Chatterjee et al, 2017**). Además, se ha evidenciado el papel que juega TGF- β e IL-10 en la estimulación de CD73 en el TME al utilizar anticuerpos neutralizantes. Por ejemplo, **Li et al, 2017** demostraron recientemente que la adición de anticuerpos neutralizantes contra TGF- β bloqueó significativamente la expresión de CD39/CD73 en MDSC que era mediada por medios condicionados de células tumorales de pulmón. De manera interesante en nuestro trabajo, la adición de anticuerpos neutralizantes anti-hTGF- β y anti-hIL-10 revertió fuertemente el nivel de CD73 en las células tumorales CaSki (en más del 50%). Sin embargo, el hecho de que se detectara una mayor concentración de TGF- β 1 e IL-10 en los cocultivos CaCu/CEMs-CaCu que en los cocultivos de CaCu-CEMs-CN y CaCu/HS-5 sugiere que al menos en CEMs-CN y HS-5 otros factores producidos bajo estas condiciones de cultivo podrían participar en la inducción de CD73. En consecuencia, será interesante evaluar esta posibilidad en futuros estudios.

Los efectos inhibitorios de Ado en las células efectoras del sistema inmunitario están mediados principalmente por los receptores A2A, que se acoplan a las proteínas G y aumentan los niveles de AMPc, disminuyendo la producción de citocinas proinflamatorias y aumentan la síntesis de citocinas inmunosupresoras tales como IL-10 y TGF- β (**Apasov et al, 1995; Ohta et al, 2001**). En el presente trabajo, encontramos que los sobrenadantes de células tumorales de CaCu CaSki cultivadas en presencia de AMP inhibieron la proliferación de células T CD8 + en más del 20%, mientras que el obtenido de células CaSki precultivadas con HS-5, CEMs-CN y CEMs-CaCu inhibieron la proliferación de las células T CD8+ en 71, 75, y 78 % respectivamente. Las

concentraciones de Ado en estos cultivos estaban por encima de 100 μ M, lo cual sugiere a la Ado como principal fuente de inhibición.

Además, el uso del antagonista, (ZM241385), bloqueó la capacidad inmunosupresora del Ado derivado de células CaSki en un 20%, lo que demostró que la inhibición de las células T efectoras en nuestros experimentos estaba mediada en parte por el receptor A2A. Estos resultados son consistentes con estudios recientes que han demostrado que el bloqueo de la señalización de adenosina a través de los receptores A2A dio como resultado un efecto antitumoral mediado por las células T efectoras a través de un mecanismo dependiente de perforina (**Koshiba et al, 1997**). Asimismo, se observó que al bloquear A2AR, también se inhibió la progresión metastásica, mediante una adecuada activación de células T CD8+, lo que sugiere que la señalización de Ado desempeña un papel importante en la inhibición de la activación de las células T efectoras a través de este receptor (**Cekic et al, 2012**). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que CEMs-CaCu que son parte del microambiente tumoral en CaCu en asociación con células tumorales cervicales, pueden contribuir significativamente a la generación de Ado en presencia de altos niveles de ATP.

En el presente estudio, proporcionamos evidencia de que el TGF- β 1 e IL-10 contenidos en el sobrenadante de cocultivos de células tumorales de CaCu con CEMs induce una mayor expresión de CD73 en las células tumorales. Esta propiedad se ha observado en células T esplénicas, células dendríticas derivadas de la médula ósea y macrófagos peritoneales, mediante estimulación *in vitro* con TGF- β 1 (**Ridge et al, 2017**). Las MSC que residen en la TME y constituyen el 0,1-1% del número total de células en tejidos tumorales sólidos pueden ser factores determinantes en la inducción de cambios funcionales en las células tumorales o exacerbar su capacidad inmunosupresora a través de la vía adenosinérgica. En el caso particular del CaCu, varios estudios han demostrado que la presencia de TGF- β 1 e IL-10 en los sueros y tejidos tumorales de los pacientes se correlaciona directamente con el grado de progresión de la enfermedad (**Torres-Poveda et al, 2014; Bermudez-Morales et al, 2008; Torres-Poveda et al, 2012; Alcocer-Gonzalez et al, 2006**). Por tanto, dado que nuestros resultados muestran que la comunicación entre las

células de CaCu y las CEMs genera altas cantidades de TGF- β 1 e IL-10 y que la inducción de CD73 en las células de CaCu depende en gran medida de la presencia de TGF β 1, sugiere que la presencia de CEMs en el TME promueve las células de CaCu a expresar altos niveles de CD73 a través de la secreción de estos factores y contribuye a la supresión de la respuesta inmune a través de la producción de grandes cantidades de Ado (**Fig. 17**), lo que implica que esta ruta puede tener importancia clínica como objetivo terapéutico.

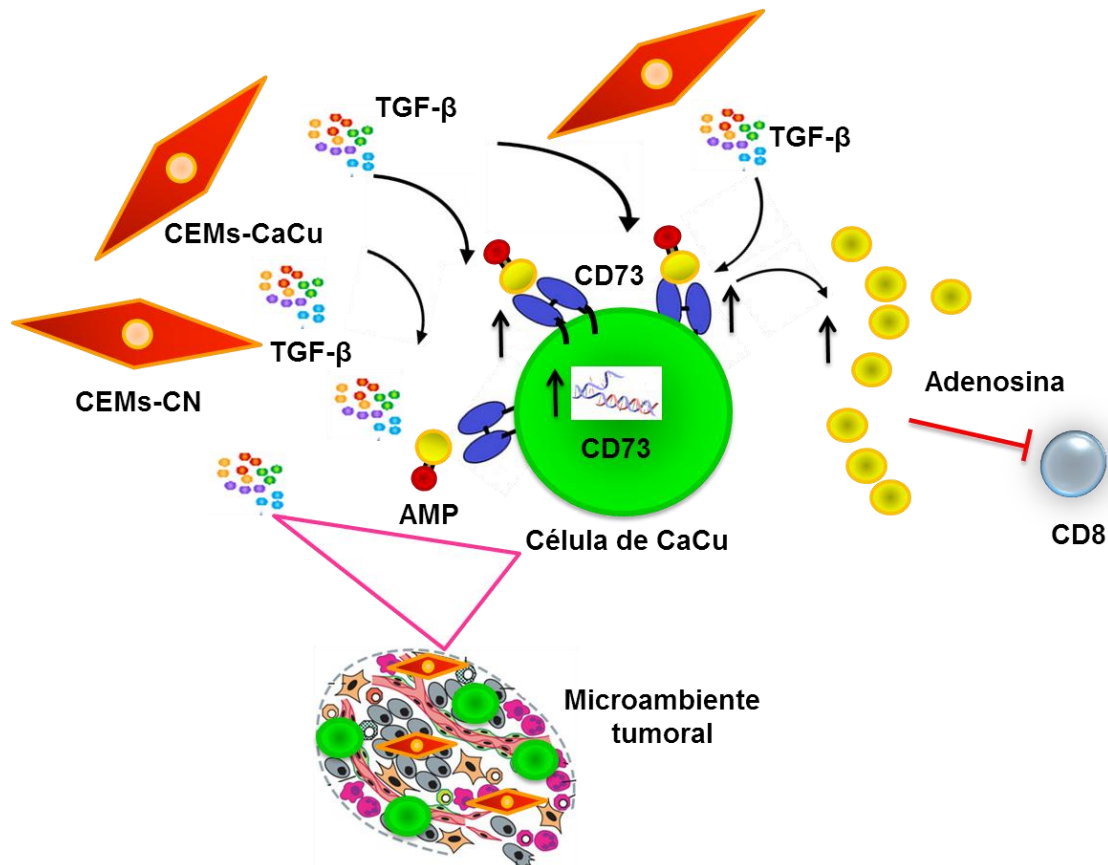


Figura 17. CEMs presentes en el TME promueven la actividad adenosinérgica e inmunosupresora de células tumorales de CaCu a través de la producción de TGF- β 1 e IL-10. La producción de altas cantidades de TGF- β 1 e IL-10, generadas durante la comunicación entre las CEMs y células tumorales de CaCu en el TME, promueve el incremento en la expresión de CD73 en las células tumorales, y por tanto, su capacidad para generar grandes cantidades de Ado, contribuyendo de esta manera en la supresión de células efectoras de la respuesta inmune, tal como los linfocitos T CD8+.

12. CONCLUSIONES

CEMs-CaCu y CEMs-CN inducen un incremento en la expresión de CD73 de membrana y de ARNm en células de CaCu, así como un incremento en la generación de adenosina mediada por CD73.

El TGF- β 1 induce incremento en la expresión de CD73 de membrana y de ARNm en células CaSki así como en la generación de adenosina mediada por CD73.

Células tumorales de CaCu cocultivadas con CEMs incrementaron la secreción de TGF- β e IL-10.

Anticuerpos neutralizantes para TGF- β e IL-10 disminuyeron considerablemente la expresión de CD73 inducida por las CEMs.

La adenosina generada por células CaSki precultivadas con CEMs y posteriormente cultivadas con AMP, inhibieron fuertemente la proliferación de células T CD8+.

13. LITERATURA CITADA

Abbas, Lichtman A. (2012). *Inmunología Celular y Molecular*. 7ª edición. Editorial Elsevier. Madrid. pp. 189-193.

Abdul N, Brown C y Gaston K. (2009). The regulation of cell proliferation by the Adv. *Immunol.* 90:51–81

Airas J, Niemela Yegutkin, y Jalkanen S. (2007). Mechanism of action of IFN- β in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1110 641–648.

Airas L, Hellman J y Salmi M. (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* 182:1603–1608.

Alcocer-Gonzalez JM, Berumen J, Tamez-Guerra R, Bermudez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernandez-Pando R, Moreno J, Gariglio P, y Madrid- Marina V. (2006). In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol* 19:481–491.

Allard B, Turcotte M, Stagg J. (2012). CD73-Generated Adenosine: Orchestrating the TumorStroma Interplay to Promote Cancer Growth. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 1-8.

Anderson, G, Courade J, Besse D, Delchambre, C., Hanoun N, Hamon M, Eschalier A, Caussade F y Cloared A. (2001). Thyroid hormones and the brain. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. *Front. Neuroendocrinol.* 69: 1455–1464. *Annu. Rev. Immunol.* 22:329–60

Antonioli L, Pacher P, Vizi ES y Haskó G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine.*19:355– 67.

Apasov, M. Koshiba, F. Redegeld y M.V. Sitkovsky. (1995). Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions, *Immunol. Rev.* 146: 5–19.

Baksh D, Song L y Tuan RS. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8:301–16.

Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A y Battastini AM. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 319:61–68.

Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Wink M y Battastini A. (2007). Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5 ϵ -nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. *J Neurooncol.* 84:1–8.

- Beavis P, Stagg J, Darcy P, y Smyth M. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*. 936: 1-7.
- Bergfeld S y DeClerck YA. (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 29: 241-261.
- Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, Burguete A y Madrid-Marina A. (2008). Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest*. 26: 1037–1043.
- Bernardi A , Bavaresco L, Wink M, Jacques-Silva M , Delgado-Cañedo A , Lenz G y Battastini A. (2007). Indomethacin stimulates activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/ CD73 in glioma cell lines. *European Journal of Pharmacology* 569 8–15.
- Blay J, White T y Hoskin D. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*. 57:2602–2605.
- Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B y Dagnelie P. (2006). Adenosine 5-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology and Therapeutics*. 112 (2): 358– 404.
- Brisevac D , Bjelobaba I, Bajic A, Clarner T , Stojiljkovic M , Beyer C , Andjus P , Kipp M y Nedeljkovic N. (2012). Regulation of ecto-50-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. *Neurochemistry International*. 61: 681–688.
- Burnstock G y Di Virgilio F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*. 9 (4): 491–324.
- Cao H, Xu W, Qian H, Zhu W, Yan Y y Zhou H. (2009). Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett.*;274:61–71.
- Carneiro-Ramos M Da Silva M, Coutinho Jr, Oliveira Battastini A, Freitas Sarkis J, y Barreto- Chaves M. (2004). Thyroid hormone stimulates 5-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 265 (1-2): 195–201.
- Cekic, D. Sag, Y. Li, D. Theodorescu, R.M. Strieter, J. Linden. (2012). Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors, *J. Immunol*. 188: 198–205.
- Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, Ladoire S, Derangere V, Vincent J y Masson D. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36:362–373
- Chatterjee D, Tufa D , Baehre H, Hass R, Schmidt RE y Jacobs R. (2017). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood*. 123: 594-595.

Cho S, Polster J, Engles JM, Hilton J, Abraham EH y Wahl RL. (2006). In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism. *J Nucl Med.* 47:837–845.

Christensen L. (1992). Effects of immunomodulators on ecto-5'-nucleotidase activity on blood mononuclear cells in vitro. *Scand. J. Immunol.* 35: 407–413

Colgan S, Eltzschig H, Eckle T y Thompson L. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling.* 2: 351–360.

Crosbie E J, Einstein M H, Franceschi S y Kitchener H C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet.* 382(9895): 889-899.

D. G. Phinney y D. J. Prockop (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* 25 (11): 2896–2902.

Deak E, Seifried E, Henschler R. (2010). Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. *Int Rev Immunol.* 29(5):514-529.

Dianzani U, Redoglia V y Bragardo M. (1993). Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 151:3961–3970.

Díaz Martín D, Prieto M A, Úbeda Cantera M y Álvarez-Monsoto M. (2013). Enfermedades del Sistema Inmune. *Medicine.* 11:1699-709.

Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. 2006. Mechanisms of immune evasion by tumors.

E.L. Spaeth, J.L. Dembinski, A.K. Sasser, K. Watson, A. Klopp, B. Hall. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE.* 4 :e4992.

Eltzschig H. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. (2010). *Anesthesiology.* 111 (4): 904–915.

F.S. Regateiro, D. Howie, K.F. Nolan, E.I. Agorogiannis, D.R. Greaves, S.P. Cobbold, H. Waldmann.(2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta, *Eur. J. Immunol.* 41 2955–2965.

Fredholm B, Ijzerman A, Jacobson K, Klotz K and Linden J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527–5522.

Freitas-Santos K, Martins-Gutierrez J, Mainardi M, Rissi V, Santos-Araújo M, Bertol G, Dias-Gonçalves P, Chitolina Schetinger M, Morsch M. (2016). Uncaria tomentosa extract alters the catabolismo of adenine nucleotides and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and P2X7 and A1 receptors in the MDA-MB-231cell line. *Journal of Ethnopharmacology*. 194: 108–116.

Fukuda K. (2004). Differential gene expression profiles of radioresistantoesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer*. 91:1543–1550.

García-Rocha R, Monroy-García A, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Gutiérrez-Serrano V, Del Carmen Fuentes-Castañeda M, Ávila-Ibarra LR, Don-López CA, Torres-Pineda DB, de Lourdes Mora-García M. (2018). Cervical cancer cells produce TGF β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine* doi: 10.1016/j.cyto.2018.09.018

Garcia-Rocha R, Moreno-Lafont M, Mora-Garcia ML, Weiss-Steider B, Montesinos JJ, Pina-Sanchez P. (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*.76:382–90.

Ghiringhell F. (2012). Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity*. 36: 362–373.

Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. (2012). Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *J Biomed Biotechnol*. 2012:473712.

Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW. (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 7:967–76.

Gomes CMF. The dual role of mesenchymal stem cells in tumor progression.(2013). *Stem Cell Res Ther*. Apr 29;4(2):42.

Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res*. 306:330–5.

Grunewald JK, Ridley AJ. (2010). CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *J Inflamm*. 7:10.

Guzman-Rojas L, Alcocer-Gonzalez J, Madrid-Marina V.(1998). Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cancer. Review Spanish. *Salud Publica Mex*. 40(1):38-46.

Hansen K, Resta R, Webb C and Thompson, L. (1995). Isolation and characterization of the promoter of the human 5'-nucleotidase (CD73)-encoding gene. *Gene*. 167:307–312.

Hastie C, Saxton M, Akpan A, Cramer R, Masters JR, Naaby-Hansen S. (2005). Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells. *Oncogene*. 24:5905–5913.

Hilders C, Ras L, Van Eendenburg J, Nooyen Y, Fleuren G.(1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer*. 15:57(6):805-813.

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.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 7:393e395.

Inegi. 2015. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: <http://www.inegi.gob.mx>

J. Linden, C. Cekic. (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine, *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol*. 32: 2097–2103.

J.L. Spees, R.H. Lee, C.A. Gregory. (2016). Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cellfunction, *Stem Cell Res Ther* 7 .125

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61 (2): 69-90.

Jin D, Fan J, Wang L, Thompson L, Liu A, Daniel B, Shin T, Curiel T and Zhang B. (2010). CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *American Association for Cancer Research*. 6: 2245–2255.

Jing y, Zhang S, Jiang G, Li R, Gao L, Zhao X, Wu D, Cai X, Wu M, Wei L. (2012). Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 7:e43272

Johann PD, Vaegler M, Gieseke F, Mang P, Armeanu-Ebinger S, Kluba T. (2010). Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer*. 10:501.

K. Synnestvedt, G.T. Furuta, K.M. Comerford, N. Louis, J. Karhausen, H.K. Eltzschig, K.R. Hansen, L.F. Thompson, S.P. Colgan. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73)

regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia, *J. Clin. Invest.* 110 :993–1002

K. Torres-Poveda, M. Bahena-Roman, C. Madrid-Gonzalez, A.I. Burguete-Garcia, V.H. Bermudez-Morales, O. Peralta-Zaragoza, V. Madrid-Marina. (2014). Role of IL-10 and TGF-beta1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia, *World J. Clin. Oncol.* 5: 753–763.

Kaku H, Fan Cheng K, Al-Abed Y and Rothstein T. (2014). A Novel Mechanism of B Cell-Mediated Immune Suppression through CD73 Expression and Adenosine Production. *The Journal of Immunology.* 193: 5904–5913.

Kansy AB , Philip A Dißmann, Hatim Hemed, Kirsten Bruderek, Anna M Westerkamp, Vivien Jagalski, Patrick Schuler, Katinka Kansy, Stephan Lang, Claudia A Dumitru and Sven. (2014). The bidirectional tumor - mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer. *Stem Cell Research & Therapy.* 20145:95.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 449(7162):557–563.

Karp JM, Leng Teo GS. (2009) Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 4(3):206-216.

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A. (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One.* 7:e30563.

Kindt T, Goldsby, R, Osborne B. (2007). *Inmunología de Kuby.* 6ª edición. Editorial McGraw-Hill. Mexico. pp 15-20.

Kiss J, Yegutkin G, Koskinen K, Savunen T, Jalkanen S, and Salmi M. (2007). IFN-β protects from vascular leakage via upregulation of CD73. *European Journal of Immunology.* 37(12): 3334–3338.

Kobayashi S, Zimmermann H, and Millhorn D. (2000). Chronic Hypoxia Enhances Adenosine Release in Rat PC12 Cells by Altering Adenosine Metabolism and Membrane Transport. *J. Neurochem.* 74: 621–632.

Kondo T, Nakazawa T, Murata S and Katoh R. (2006). Expression of CD73 and its ecto-5'- nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. *Histopathology.* 48:612–614.

Koshiba, H. Kojima, S. Huang, S. Apasov, M.V. Sitkovsky.(1997). Memory of extracellular adenosine A_{2A} purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells, *J. Biol. Chem.* 272:25881–25889.

L. Bruzzese, J. Fromonot, Y. By, J.M. Durand-Gorde, J. Condo, N. Kipson, R. Guieu, E. Fenouillet, J. Ruf. (2014). NF-kappaB enhances hypoxia-driven T-cell immunosuppression via upregulation of adenosine A_{2A} receptors, *Cell. Signalling* 26: 1060–1067.

Lazennec G, Lam PY. (2016). Recent discoveries concerning the tumor-mesenchymal stem cell interactions. *Biochim Biophys Acta* 1866:290-299 .

Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, Huang L, Yue D, Zhang Z, Wang F, Li F, Yang L, Huang J, Yang S, Li H, Zhao X, Dong W, Yan Y, Zhao S, Huang B, Zhang B, Zhang Y. (2017). CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF581 β -mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 6:e1320011.

Li X, Zhou T, Zhi X, Zhao F, Yin L and Zhou O. (2006). Effect of hypoxia/reoxygenation on CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines. *Microvascular Research.* 72 (1-2) 48–53.

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

Liotta F, V Querci, G Mannelli, V Santarlasci, L Maggi, M Capone, M C Rossi, A Mazzoni, L Cosmi, S Romagnani, E Maggi, O Gallo & F Annunziato. (2015). Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T-cell proliferation. *British Journal of Cancer* .112: 745–754

Liu Y, Han ZP, Zhang SS, Jing YY, Bu XX, Wang CY. (2011). Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem.* 286(28):25007–25015.

Lo Nigro, M. Monteverde, S. Lee. (2012). NT5E CpG island methylation is a favourable breast cancer biomarker,” *British Journal of Cancer.* 107 (1): 75–83.

Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. (2009). The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer.* 100: 571–577

Luo J, Ok Lee S, Liang L, Huang CK, Li L, Wen S, et al: Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* 2013. Epub ahead of print. doi:10.1038/onc.2013.233.

M. de Lourdes Mora-Garcia, R. Garcia-Rocha, O. Morales-Ramirez, J.J. Montesinos, B. Weiss-Steider, J. Hernandez-Montes, L.R. Avila-Ibarra, C.A. Don-Lopez, M.A. Velasco-Velazquez, V. Gutierrez-Serrano, A. Monroy-Garcia. (2016). Mesenchymal stromal cells

derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *Journal of translational medicine*. 14: 302.

Maldonado PA, Pimentel VC, Negrini LA, Morsch VM, Schetinger MR. (2012). Role of the purinergic system in patients with cervical intraepithelial neoplasia and uterine cancer. *Biomed Pharmacother* 66:6–11.

Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity?. *Trends Mol Med* 18:742–749.

Massaia M, Perrin L, Bianchi A. (1990). Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J Immunol*.145:1664–1674.

Matera AG, Wang Z (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15: 108–121.

McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Investig*. 121:3206–19.

Mello Pde A, Filippi-Chiela EC, Nascimento J, Beckenkamp A, Santana DB, Kipper F. (2014). Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. *Mol Biol Cell*.25:2905–18.

Mikhailov A, et al. (2008). CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol*. 181:464–475.

Montesinos JJ, Mora-Garcia Mde L, Mayani H, Flores-Figueroa E, Garcia- Rocha R, Fajardo Orduna GR. (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*. 22:2508–19.

Morales-Sánchez A. Fuentes-Pananá E M. 2014. Human Viruses and Cancer. *Viruses*, 6, 4047-4079.

Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. *Inmunologia de Janeway*. 7° edición, Editorial McGraw Hill. México. 888 p.

Narravula S, Lennon P, Mueller B, y Colgan S. (2000). Regulation of Endothelial CD73 by Adenosine: Paracrine Pathway for Enhanced Endothelial Barrier Function. *J Immunol*. 165:5262-5268.

Niemela J, Henttinen T, Yegutkin G. (2004). IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: A mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol.* 172:1646Y53.

Norozi F, Ahmadzadeh A, Shahrabi S, Vosoughi T, Saki N. (2016). Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in suppression or progression of solid tumor cells. *Tumour Biol.* 37:11679

Ohta, A. (2016). metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment, *Front. Immunol.* 7: 109.

Ohta, M. Sitkovsky. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage, *Nature* 414 :916–920.

Rabinovich G, Gabrilovich D and Sotomayor E. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 25:267–296.

Regateiro F, Howie D, Nolan K, Agorogiannis E , Greaves D, Cobbold S, Waldmann H (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur J Immunol* 41: 2955–2965.

Regateiro FS1, Cobbold SP, Waldmann H. (2013). CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* 171:1-7

Regueiro González J R, López Larrea C, Rodríguez González S, Martínez Naves E. (2002). *Inmunología. Biología y Patología del sistema inmune.* 3º Edición. Editorial Médica Panamericana. ISBN 847903707.

Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C. (2012). CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFalpha. *Cell Stem Cell.* 11(6):812–824.

Resta R and Thompson L. (1997). T cell signalling through CD73. *Cell Signal.* 9:131 139.

Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer.* 16:31

Robson S, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K and Enjyoji K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost.* 31: 217–233.

Ryzhov SV, Pickup MW, Chytil A, Gorska AE, Zhang Q, Owens P. (2014). Role of TGF-beta signaling in generation of CD39+ CD73+ myeloid cells in tumors. *J Immunol* 193:3155–3164

- S. Apasov, M. Koshiba, F. Redegeld, M.V. Sitkovsky. (1995). Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions, *Immunol. Rev.* 146: 5–19.
- S. McMahon, M. Charbonneau, S. Grandmont, D.E. Richard, C.M. Dubois. (2006). Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression, *J. Biol. Chem.* 281: 24171–24181.
- S.A. Bergfeld, Y.A. DeClerck.(2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment, *Cancer Metastasis Rev.* 29: 249–261.
- S.Ma,N. Xie,W. Li, B. Yuan, Y. Shi, and Y.Wang. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21 (2): 216–225.
- Sadej R, Spychala J, Skladanowski A. (2006). Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25:1119–1123.
- Saldanha F, Ferreira F, Palma P, Araujo A, Queiroz R, Covas D, Zago M, Panepucci R. (2011). Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res.* 7: 66–74.
- Sancho D, Gómez M, Sánchez F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26 (3): 136-140.
- Savic V. (1990). Induction of ecto-5'-nucleotidase of rat cultured mesangial cells by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Immunology* 70. 321–326.
- Schuler PJ, Schilling B, Harasymczuk M, Hoffmann TK, Johnson J, Lang S, Whiteside TL. (2012). Phenotypic and functional characteristics of CD4+ CD39+ FOXP3 and CD4+ CD39+ FOXP3neg T-cell subsets in cancer patients. *Eur J Immunol* 42:1876–1888
- Scussel L, Braganhol E, Fernandes R, Albano M and Oliveira A. (2012). Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012: 1-10.
- Semenza G. (2011). Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research.* 1813 (7)1263–1268.

- Shi M, Liu Z-W, Wang F-S. (2011). Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 164(1):1–8.
- Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 33(3):136–43.
- Sitkovsky M, Kjaergaard J, Lukashev D and Ohta A.(2008). Hypoxia adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res.* 14:5947–52.
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2:293–99
- Spaeth E, Dembinski J, Sasser A, Watson K, Klopp A, Hall B. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 4:e4992.
- Spychala J and Kitajewski J. (2004). “Wnt and β -catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation,” *Experimental Cell Research.* 296 (2) 99–108.
- Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue L, Jin A and Mitchell B. (2004). Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:708–717.
- Spychala J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.* 87:161–173.
- Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 2010;29:5346–58.
- Stanley M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* 24S1:S1/16-S1/21
- Sterlinko H, Bergant M and Banks L. (2009). Human papillomavirus infection, cancer and
- Stewart, T.J. and Smyth, M.J. (2011). Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 125–140.
- Sun X, Wu Y, Gao W, Enjoji K, Csizmadia E, Muller CE, Murakami T, Robson SC. (2010). CD39/ENTPD1 expression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* 139: 1030-1040

Sun Z, Wang S, Zhao RC.(2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol.* 7:14.

Synnestvedt K, Furuta G, Comerford K, Louis N, Karhausen J, Eltzschig H, Hansen K, Thompson L and Colgan S. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxiainducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 110: 993–1002.

Tamajusuku A, Carrillo-Sepulveda M, Braganhol E. (2006). Activity and expression of ecto-5-nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 289,1-2. 65–72.

Thom M, Wendel, and Deussen A. (2013). Regulation of ecto- 5'-nucleotidase by docosahexaenoic acid in human endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 32 (2) 355–366.

Torres-Poveda K, Bahena-Roman M, Madrid-Gonzalez C, Burguete-Garcia A, Bermudez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. (2014). Role of IL-10 and TGF-beta1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia, *World J. Clin. Oncol.* 5 :753–763.

Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Cruz M, Martínez-Nava GA, Bahena604 Román M, Ortiz-Flores E, Ramírez-González A, López-Estrada G, Delgado-Romero K, Madrid-Marina V. (2012). The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Infect Agent Cancer* 7:32.

Uccelli A, L Moretta and V Pistoia. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36:2566–2573.

V.H. Bermudez-Morales, L.X. Gutierrez, J.M. Alcocer-Gonzalez, A. Burguete, V. Madrid-Marina. (2008). Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape, *Cancer Invest.* 26:1037–1043.

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.

Wang H, Lee S, Lo Nigro C. (2012). NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *British Journal of Cancer.* 106 (8)1446–1452.

Wang L, Zhou X, Zhou T. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion,migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.*134:365–372.

Wink M , Tamajusuku A, Braganhol E, Casali E , Barreto- Chaves M, Sarkis J, Battastini A. (2003). Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells *Molecular and Cellular Endocrinology* 205. 107-114.

Wulling M, Delling G, Kaiser E. (2003). The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol.* 34:983–93.

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 Cáncer Prevention.* 15: 2247

Yang Y, Otte A and Ralf Hass¹Human. (2015). Mesenchymal Stroma/Stem Cells Exchange Membrane Proteins and Alter Functionality During Interaction with Different Tumor Cell Lines. *Stem Cells Dev* 24:1205-1222.

Ye H, Cheng J, Tang Y, Liu Z, Xu C, Liu Y, Sun Y. (2012). Human bone marrow⁵⁷⁰ derived mesenchymal stem cells produced TGFbeta contributes to progression and metastasis of prostate cancer. *Cancer Invest* 30:513–518.

Zhang B. (2010). CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70:6407–6411.

14. APÈNDICE (artículo requisito para la obtención del grado)

STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 00, Number 00, 2019
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2018.0183

ORIGINAL RESEARCH REPORT

Mesenchymal Stromal Cells Derived from Normal Cervix and Cervical Cancer Tumors Increase CD73 Expression in Cervical Cancer Cells Through Transforming Growth Factor-Beta 1 Production

Luis Roberto Ávila-Ibarra,¹⁻³ María de Lourdes Mora-García,² Rosario García-Rocha,² Jorge Hernández-Montes,² Benny Weiss-Steider,² Juan José Montesinos,⁴ Marcela Lizano Soberon,⁵ Patricia García-López,⁶ Christian Azucena Don López,² Daniela Berenice Torres-Pineda,^{1,3} Rommel Chacón-Salinas,^{7,8} Luis Vallejo-Castillo,^{7,9} Sonia Mayra Pérez-Tapia,^{7,8} and Alberto Monroy-García^{1,2}

Mesenchymal stromal cells (MSCs) in the tumor microenvironment (TME) participate together with tumor cells to suppress antitumor effector cells through the production of immunosuppressive factors, such as transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). Furthermore, TGF- β 1 can induce 5'-nucleotidase (CD73) expression in various cell types; this functional activity is associated with the production of adenosine (Ado), which is an immunosuppressive nucleoside. In this study, we provide evidence that coculture of MSCs derived from cervical tumors (CeCa-MSC) with CeCa tumor cells increases CD73 expression in tumor cells and the capacity of these cells to generate Ado in a MSC ratio-dependent manner. Interestingly, the increase in CD73 in the CeCa cell membrane corresponded to an increase in the TGF- β 1 expression level in the tumor cells and the TGF- β 1 content in the supernatants of the CeCa/CeCa-MSC cocultures. The addition of anti-hTGF- β neutralizing antibodies strongly reversed CD73 expression in the tumor cells. This phenomenon was not exclusive to CeCa-MSCs; coculture of MSCs derived from the normal cervix with CeCa cells produced similar results. These results suggest that the interaction of MSCs with CeCa tumor cells in the TME may condition higher TGF- β 1 production to maintain an immunosuppressive status not only through the activity of this cytokine per se but also through its ability to induce CD73 expression in tumor cells and generate an immunosuppressive microenvironment rich in Ado.

Keywords: mesenchymal stromal cells, CD73, adenosine, TGF- β , cervical cancer

Introduction

MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS (MSCs) are a heterogeneous subtype of stem cells that can be obtained from different mature tissues. These cells have the ability to differentiate into pericytes, osteoblasts, adipocytes,

chondroblasts, fibroblasts, myoblasts, oocytes, cardiomyocytes, hepatocytes, tenocytes, different epithelial cells (lung, intestine, kidney, and spleen), and even neurons and secrete growth factors with paracrine effects that promote the regeneration of damaged tissues [1–3]. MSCs have the ability to migrate and settle in sites of inflammation and have been

¹Laboratorio de Inmunología y Cáncer, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México.

²Laboratorio de Inmunobiología, UIDCC-UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM, Ciudad de México, México.

³Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Ciudad de México, México.

⁴Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México.

⁵Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad de México, México.

⁶Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México.

⁷Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

⁸Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, ENCB-IPN, Ciudad de México, México.

⁹Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN), Ciudad de México, México.

found to be part of the tumor microenvironment (TME). In the latter site they are able to regulate tumor growth and progression through paracrine interactions that have not been fully elucidated [4,5]. MSCs were obtained for the first time from bone marrow (BM) and were characterized phenotypically as presenting the markers, CD105, CD73, CD90, and CD248, expressing low levels of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and not expressing the MHC class II, CD11b, CD14, CD34, CD45, and CD31 molecules [6,7].

MSCs in the TME (T-MSCs) can constitute ~0.01%–1% of the total number of cells in solid tumor tissues [8]. These cells have been isolated and characterized from ovarian cancer cells [9], giant cell tumors [10], neuroblastoma [11], osteosarcoma, [12], gastric cancer [13], and cervical cancer (CeCa) [14], among others. T-MSCs can support and promote the proliferation of cancer stem cells in addition to promoting the epithelial–mesenchymal transition (EMT) and tumor cell metastasis [9,15]. Likewise, these cells can favor the evasion of immune recognition mediated by cytotoxic T lymphocytes by deregulating MHC class I molecule expression in tumor cells [14] and suppressing the antitumor immune response through either recruitment of immunosuppressive cells, such as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs) [16], the production of immunosuppressive cytokines, such as interleukin (IL)-4, IL-5, IL-10, and TGF- β [17,18], or the production of immunosuppressive metabolites, such as PGE2, kynurenine, and NO [19].

Recently, our research group reported that MSCs derived from CeCa (CeCa-MSCs) suppressed T lymphocyte responses through the purinergic pathway [20]. In this pathway, the γ -ATP nucleotides found in high concentrations (50–100 μ M) in response to stress signals, such as hypoxia, damage, and inflammation in the TME [21], are hydrolyzed jointly by the CD39 ectoenzymes (ENTPD1, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, EC 3.6.1.5) to generate the respective nucleotides. Subsequently, the nucleotides are hydrolyzed by the action of ectonucleotidase or CD73 (EC 3.1.3.5), which converts γ -P into adenosine (Ado) [22,23]. Most of the extracellular signaling activities of Ado are mediated by adenosine receptors (ARs) on the cell surface, which are coupled to G proteins and divided into four subtypes (A1R, A2AR, A2BR, and A3R) [24–26].

Transcriptional activation of CD73 within the TME seems to be regulated by the hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) [27] and the presence of immunosuppressive factors, such as transforming growth factor beta (TGF- β), which can stabilize HIF-1 α [28]. Overexpression of CD73 in different tumors has been reported to be associated with a poor prognosis and a greater ability to suppress antitumor immune responses [29–31].

In the particular case of CeCa, persistent infection caused by high-risk human papilloma viruses (HPV-ARs) plays an important role in cervical carcinogenesis and is strongly associated with the production of immunosuppressive cytokines, such as TGF- β ; TGF- β expression correlates directly with the degree of CeCa progression and suppression of the antitumor immune response [32]. TGF- β has been detected in sera and tissues from patients infected with HPV-ARs, in low- and high-grade squamous intraepithelial lesions (SILs) and in CeCa; in addition, the levels correlate

directly with the degree of progression of the lesion [33,34] and inhibition of the immune response in patients with SILs [35]. TGF- β is an immunoregulatory cytokine that participates in tumor progression and immunosuppression, and the sources of this factor in the TME include several types of stromal cells in addition to cancer cells [36–38]. Recently, we reported that CeCa-MSCs induced the expression and secretion of TGF- β in CeCa tumor cells [39]. Based on this background, in this work, we analyze the ability of CeCa-MSCs to induce CD73 expression in CeCa tumor cells through TGF- β production. To determine whether these properties are unique to CeCa-MSCs, we also use MSCs obtained from normal cervical tissues (NCx-MSCs). Finally, to evaluate whether the induction of CD73 in tumor cells is attributable to TGF- β , we employ anti-TGF- β neutralizing antibodies.

Materials and Methods

Cell culture

CaSki (HPV16+) and MS751 (HPV-18+) human cervical carcinoma cell lines used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). MSCs derived from NCx-MSCs were obtained from tissue samples from three people who underwent a noncancer hysterectomy. The CeCa-MSCs were obtained from biopsies of three patients with stage IIIB CeCa whose histopathological diagnosis was confirmed by the Pathology Department. The local Ethics Committee approved these procedures. The MSCs were obtained by enzymatic digestion and subsequently characterized by their phenotype and ability to differentiate into adipocytes, chondrocytes, and osteocytes as previously described [14]. CaSki and MS751 CeCa cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), and the MSCs were maintained in low-glucose DMEM (Lg-DMEM; Gibco) supplemented with 15% FBS, 100 IU/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin (Gibco), and 5 mM L-glutamine (Gibco) at 37°C under 5% CO₂.

Cell cocultures

Cocultures of tumor cells and MSCs were performed in 50% RPMI-1640 medium and 50% low-glucose DMEM supplemented with 15% FBS. The cells were cocultured for 96 h in transwell chambers (Millicell Chamber; Millipore Corporation, Billerica, MA) at 1:1, 1:2.5, and 1:5 CeCa:MSC cell ratios.

CD73 expression in CeCa cells

CD73 ectonucleotidase expression in the membranes of CeCa tumor cells cocultured for 96 h with MSCs and in the presence or absence of different concentrations (0.5, 10, 20, and 40 ng/mL) of recombinant human-TGF- β 1 (rh-TGF- β 1) (PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ) was determined by flow cytometry using an anti-CD73-PE monoclonal antibody (BD Biosciences, San Diego, CA). Functional activity of rh-TGF- β 1 was determined by using TGF- β -sensitive Mv1Lu cells, as previously described [40]. The analysis was performed based on the acquisition of 25,000 events in a FACS

ARIA flow cytometer (BD Biosciences). The results were analyzed and reported as the mean fluorescence intensity \pm standard deviation compared with basal CD73 expression in CeCa cells, which was normalized to a value of 1. All experiments were performed in triplicate. Staining with a control isotype antibody was used as a negative control.

CD73 mRNA expression in CeCa cells

To determine the CD73 mRNA expression level in CeCa cells either alone or after cocultivation with the different MSC ratios, RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 500 ng/ μ L of RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The polymerase chain reaction (PCR) for CD73 was performed in a real-time LightCycler 480 PCR system (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) using ProbeLibrary Universal Probes. To control variations in the RNA amounts, H6PDH was used as an internal control gene. The primers specific for CD73 and G6PDH were as follows: CD73 (forward: 5'ACTACTACGCCAAGGAGGTCAC3', reverse: 5'TGCTTGAACCTTGT CATAGATTTTCG3') and G6PDH (forward: 5'GCTACGCTCGGATCTTGTTC3', reverse: 5'CCCAGTGCTTTTCGCTCT3'). The data analysis was performed using the Δ CT method for relative quantification. The thermocycling conditions for each reaction were performed in a final volume of 10 μ L according to the protocol provided with the LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostic).

Hydrolytic activity of CD73 in CeCa cells

To determine the enzymatic activity of the ectonucleotidase CD73 in CeCa cells previously cocultured for 96 h with MSCs or in the presence or absence of TGF- β , the cells were washed twice with PBS and then cultured in the presence of 5 mM AMP in a total volume of 100 μ L of RPMI with low glucose supplemented with 10% FBS. The FBS was dialyzed previously with a membrane (molecular weight cutoff of 12 kDa). To inhibit the enzymatic activity of CD73, the tumor cells were incubated in the presence of 5 mM adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate (APCP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), which is a specific CD73 inhibitor. After 30 min of incubation with the inhibitor, AMP was added to a final concentration of 5 mM. To analyze the generation of Ado in the cell cultures, supernatant samples were collected at the beginning and after 5 h of incubation. Ado was detected by thin-layer chromatography (TLC) using fluorescent plates previously coated with gel (Whatman; GE Healthcare, Freiburg, Germany). For this purpose, 1- μ L samples of each supernatant were loaded onto the plates and subsequently eluted for 1 h using a mobile phase composed of a mixture of isobutanol:isoamyl alcohol:ethoxyethanol:water:ammonium in a 9:6:18:9:15 ratio [41,42]. As standards, 1- μ L samples of AMP, Ado, and inosine (Sigma-Aldrich) were used at a 5 mM concentration. Finally, the compounds were visualized and photographed under a UV transilluminator (UVP Biодо-H System, Upland, CA).

To quantify the amount of Ado, ultraperformance liquid chromatography equipment (Acquity UPLC; Waters, Milford, MA) was used as a synthetic Ado standard. The

quantitative analysis of samples was conducted with the Empower 3 software as previously described [20].

Cytokines and antibodies to TGF- β

rh-TGF- β 1 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) was used to induce CD73 expression in CeCa tumor cells. After 96 h of culture, CD73 expression in the tumor cells was determined by flow cytometry and PCR. To neutralize the biological activity of TGF- β 1 in the different cultures, a rabbit anti-human neutralizing antibody targeting TGF- β 1, - β 2, and - β 3 was used (anti-TGF- β ; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN); the antibody was added according to the recommendations provided by the distributor.

The TGF- β 1 levels in the supernatants of the CeCa cell cultures were analyzed with the Human TGF- β 1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.) according to the instructions provided by the manufacturer.

Statistical analysis

All numerical data are presented as the mean value \pm standard error of the mean of three independent experiments. Comparisons were evaluated by Kruskal-Wallis analysis using the statistical software version 7 (GraphPad, Software, La Jolla, CA). The differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Coculture of CeCa cells with CeCa-MSCs increases CD73 expression and its ability to generate Ado

In cancer, MSCs play a crucial role in the promotion of tumor progression, since they provide an environment conducive to anchoring tumor cells in the tumor stroma; in addition, they can induce functional changes in tumor cells through secretion of soluble factors or exchange of membrane proteins during their interactions with tumor cells [43,44]. To analyze whether CeCa-MSCs induced changes in CD73 expression in CeCa tumor cell membranes, CeCa cells were cocultured for 96 h in the presence of different CeCa-MSC ratios using transwell chambers. To determine whether these properties were unique to CeCa-MSCs, we also used NCx-MSCs. Upon analyzing CD73 expression, we found that CaSki and MS751 cells exhibited increased CD73 expression in direct relation to the ratio of MSCs present in the coculture (Fig. 1A). CaSki and MS751 cells cocultured with CeCa-MSCs at a 1:5 ratio (CeCa:CeCa-MSCs) increased CD73 expression 2.87 \pm 0.70- and 3.04 \pm 0.2-fold, respectively, in relation to the basal expression of this enzyme present in the tumor cells. Interestingly, CaSki and MS751 cells cocultured with NCx-MSCs at the same ratio exhibited similar increasing in CD73 expression, 2.95 \pm 0.35- and 2.8 \pm 0.18-fold, respectively (Fig. 1B). When evaluating relative CD73 mRNA expression after coculture in a 1:5 ratio with NCx-MSCs and CeCa-MSCs, the CD73 mRNA levels in the CaSki cells were increased by 4.78 \pm 1.69- and 4.87 \pm 1.16-fold, respectively; while, those in the MS751 cells were increased by 13.2 \pm 0.8- and 16.8 \pm 1.85-fold, respectively (Fig. 1C).

To analyze whether the increase in CD73 expression in CeCa cells cocultured with MSCs corresponded to an

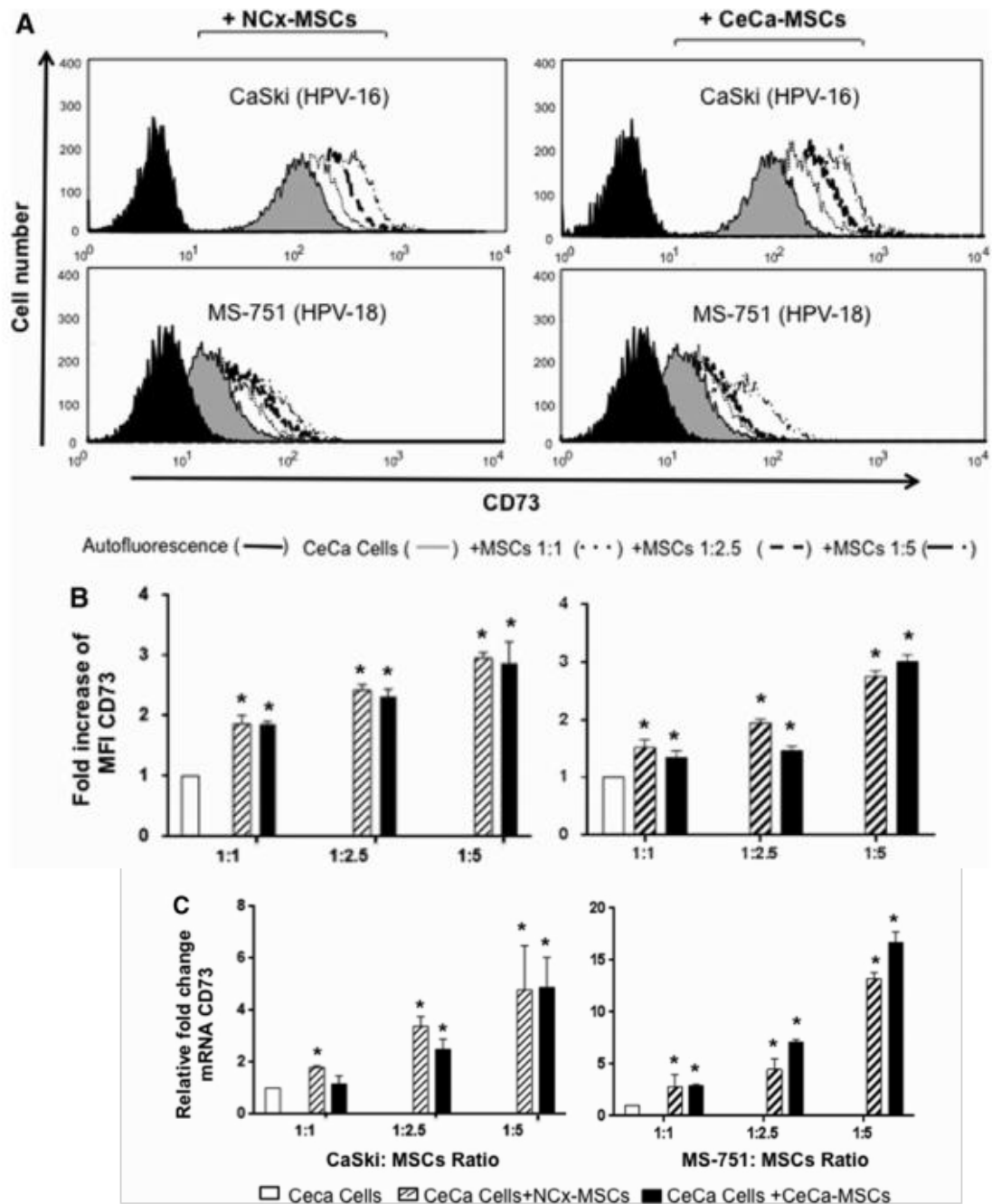


FIG. 1. CD73 expression in CeCa cells cocultured with MSCs. CaSki and MS751 cells were cocultured with CeCa-MSCs ($n=3$) or NCx-MSCs ($n=3$) in 1:1, 1:2.5, and 1:5 CeCa:MSC ratios using transwell chambers. After 96 h, the CD73 expression level in the CeCa cells (25,000 events) was determined by flow cytometry (A, B) or RT-PCR (C) as indicated in the Materials and Methods section. (A) The autofluorescence value (shown in the histograms in black) and the basal CD73 expression level in the CeCa cells (shown in the histograms in gray) are shown, as are the CD73 expression levels in the CaSki and MS751 cells after coculture with different proportions of MSCs (shown in the histograms with different dashes). (B, C) The CD73 expression levels in CaSki and MS751 cells cocultured with MSCs in relation to the respective basal CD73 expression level (white bars), which was normalized to 1. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with the basal CD73 expression level in the CeCa cells. The data are representative of three independent experiments, and SEM, standard error of the mean.

increase in the capacity to generate Ado, CaSki cells previously cocultured with MSCs were cultured in the presence of 5 mM AMP and the presence or absence of 5 mM APCP (a CD73-specific inhibitor). Aliquots of the supernatants were taken at the start and after 5 h of culture, and the presence of Ado was detected by TLC and quantified through UPLC. The capacity of the tumor cells to hydrolyze AMP and generate Ado increased directly with the increase in CD73 expression induced by the MSCs added to the cocultures with the CaSki cells. Apparently, the CaSki cells obtained from the coculture with CeCa-MSCs showed a greater capacity to generate Ado than those cocultured with the NCx-MSCs (Fig. 2A, B). The basal production of Ado by CaSki cells cultured in the presence of AMP was $278.11 \pm 46.43 \mu\text{M}$, whereas that of the CaSki cells cocultured previously with NCx-MSCs in 1:1, 1:2.5, and 1:5 ratios was 494.185 ± 3.34 , 548.055 ± 37.62 , and $729.500 \pm 107.99 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively, and that of CaSki cells cocultured with CeCa-MSCs in the same ratios was 515.150 ± 4.90 , 681.790 ± 16.83 , and $952.950 \pm 26.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. However, the addition of the specific CD73 inhibitor APCP decreased the capacity of CaSki cells to hydrolyze AMP by more than 95% in all cases (Fig. 2B), whereas CaSki cells cultured in the absence of AMP did not produce detectable Ado levels (data not shown). These results provide important evidence of the involvement of CeCa-MSCs in the induction of increased CD73 levels in CeCa tumor cells and an increased capacity to generate Ado.

TGF-β1 produced in the CeCa/CeCa-MSC coculture strongly participates in the induction of CD73 expression in CeCa cells

TGF-β1 induces CD73 expression in different cell types and increases their capacity to generate extracellular Ado [45,46]. In addition, we previously demonstrated that CeCa-MSCs were capable of significantly increasing TGF-β1 expression and secretion in CeCa cells [39]. In a previous work we assayed the effect of rh-TGF-β1 on Mv1Lu cell proliferation and found that at concentrations higher than 10 ng/mL it was inhibited [40]. To corroborate this activity, in this work we used the CeCa cell lines CaSki and MS751 in the presence of different rh-TGF-β1 concentrations (5–40 ng/mL). After 96 h of culture, CaSki and MS751 cells cultured in the presence of 5, 10, 20, and 40 ng/mL of rh-TGF-β1 had increased CD73 expression in a dose-dependent manner (Fig. 3A), with increases of 1.19 ± 0.03 -, 1.32 ± 0.05 -, 1.86 ± 0.18 -, and 2.06 ± 0.20 -fold; and 1.28 ± 0.04 -, 1.76 ± 0.15 -, 2.86 ± 0.09 -, and 3.68 ± 0.2 -fold in relation to the basal CD73 expression in the CaSki and MS751 cells, respectively, which were normalized to a value of 1 (Fig. 3B, C). Similar results were observed when evaluating relative CD73 mRNA expression. Using the same rh-TGF-β1 concentrations, the increases in the CD73 mRNA levels in the CaSki cells were 1.18 ± 0.38 , 1.92 ± 1.69 , 3.12 ± 1.16 , and 9.33 ± 3.8 ; and in the MS751 cells were 1.31 ± 0.28 , 2.36 ± 0.79 , 5.02 ± 0.62 , and 8.73 ± 1.36 , relative to the basal CD73 mRNA expression

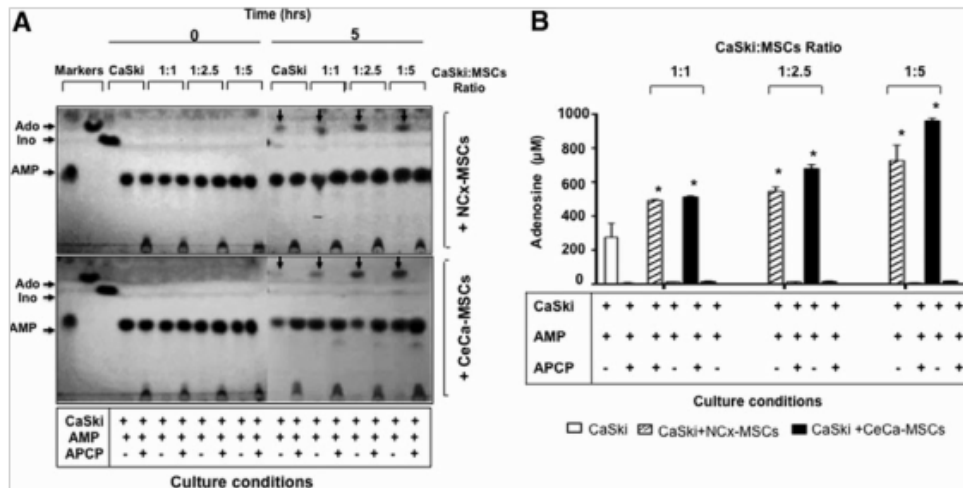
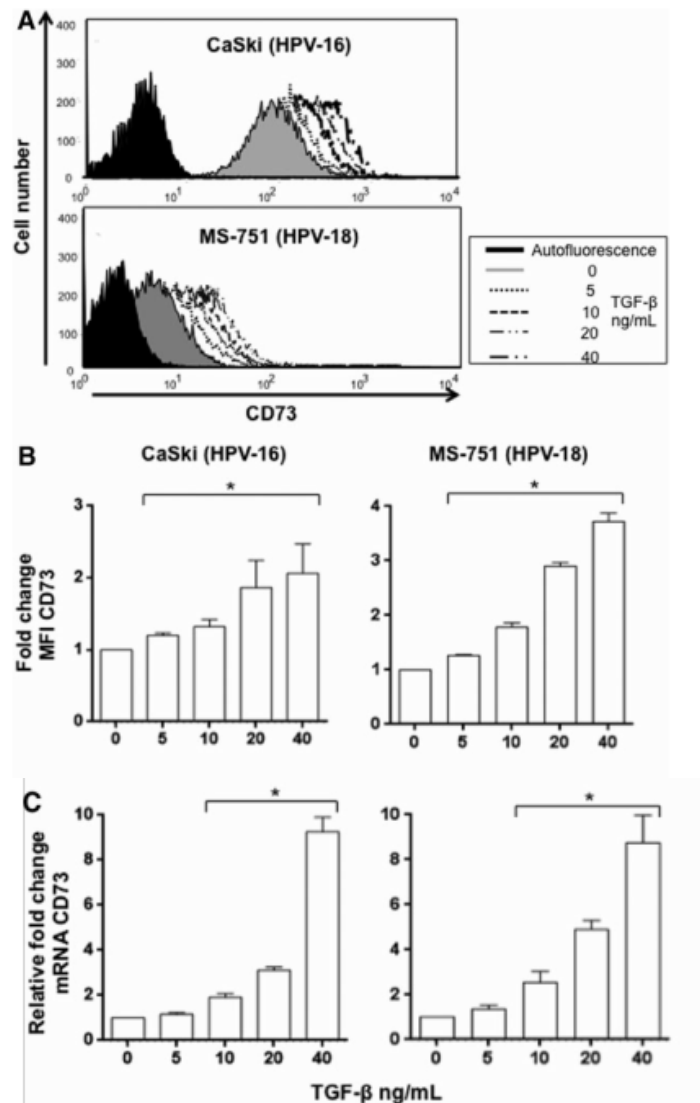


FIG. 2. Hydrolytic activity of CD73 in CeCa cells cocultured with CeCa-MSCs. CaSki cells were cocultured for 96 h with CeCa-MSCs ($n=3$) or NCx-MSCs ($n=3$) in 1:1, 1:2.5, and 1:5 CeCa:MSC ratios using transwell chambers. Subsequently, the cells were separated from the coculture, washed, and cultured for 5 h in the presence of 5 mM AMP and the presence or absence of APCP, which is a specific CD73 inhibitor. The presence of Ado was detected by TLC (A) and quantified by UPLC (B) using standard concentrations of synthetic Ado. The products of AMP hydrolysis (marked with *arrows*) at the end of the CaSki culture with AMP (A) and the Ado concentrations produced by the CaSki cells in the presence or absence of APCP (B) are shown. AMP, Ino and synthetic Ado at 5 mM were used as markers. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with the adenosine concentration generated by CaSki cells cultured in the absence of MSCs. Data are representative of three independent experiments, and the averages \pm SEMs are shown. Ado, adenosine; AMP, adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate; Ino, inosine; TLC, thin-layer chromatography; UPLC, ultra-performance liquid chromatography.

FIG. 3. TGF- β 1 increased CD73 expression in CeCa cells in a dose-dependent manner. CaSki and MS751 cells were cultured for 96 h in the presence of different concentrations (5, 10, 20, and 40 ng/mL) of rh-TGF- β 1. After 96 h, the CD73 expression level in the CeCa cells (25,000 events) was determined by flow cytometry (A, B) or RT-PCR (C) as indicated in the Materials and Methods section. (A) The autofluorescence value (shown in the histograms in *black*) and the basal CD73 expression level in the CeCa cells (shown in the histograms in *gray*) are shown, as are the CD73 expression levels in CeCa cells after coculture with different concentrations of rh-TGF- β 1 (shown in the histograms with *different dashes*). The CD73 expression level in CeCa cells cultured in the presence of rh-TGF- β 1 relative to the basal CD73 expression level, which was normalized to 1, are also represented (B, C). *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with CeCa cells cultured in the absence of rh-TGF- β 1. The data are representative of three independent experiments, and the averages \pm SEMs are shown. TGF- β 1, transforming growth factor-beta 1; rhTGF- β 1, recombinant human TGF- β 1.



level in the CaSki and MS751 cells, respectively, which were normalized to a value of 1 (Fig. 3C).

To analyze the hydrolytic activity of CD73 expressed in the CeCa cells, 1×10^6 CaSki cells previously cultured for 96 h with different rh-TGF- β 1 concentrations (5–40 ng/mL) were washed and cultured for 5 h in the presence of 5 mM AMP. The amount of Ado generated by the tumor cells corresponded to the increase in CD73 induced by TGF- β 1 in the cell cultures (Fig. 4). The Ado concentrations in the supernatants of CaSki cells cultured with 5, 10, 20, and 40 ng/mL of rh-TGF- β 1 were 290.215 ± 9.76 , 318.34 ± 15.11 , 512.87 ± 8.44 , and 753.20 ± 32.77 μ M, respectively, whereas the Ado concentration in the cells cultured in the absence of rh-TGF- β 1 was 199.00 ± 9.00 μ M. Importantly,

the addition of APCP completely inhibited the ability of CaSki cells to generate Ado (Fig. 4B), suggesting that TGF- β 1 increased the ability of CeCa tumor cells to generate Ado through induction of CD73 expression.

On the other hand, when analyzing the TGF- β 1 content in the supernatants from the CaSki and MS751 cells and MSC cocultures, we observed that the concentrations of this cytokine increased in direct relation to the proportion of MSCs added to the cocultures (Fig. 5A). The TGF- β 1 concentrations in the supernatants of the CeCa cells and CeCa-MSC cocultures were significantly higher ($P < 0.05$) than those in the cultures to which the NCx-MSCs were added. The TGF- β 1 contents in the CaSki cells and CeCa-MSC cocultures in 1:1, 1:2.5, and 1:5 ratios were 560.355 ± 48.29 , 828.803 ± 69.57 ,

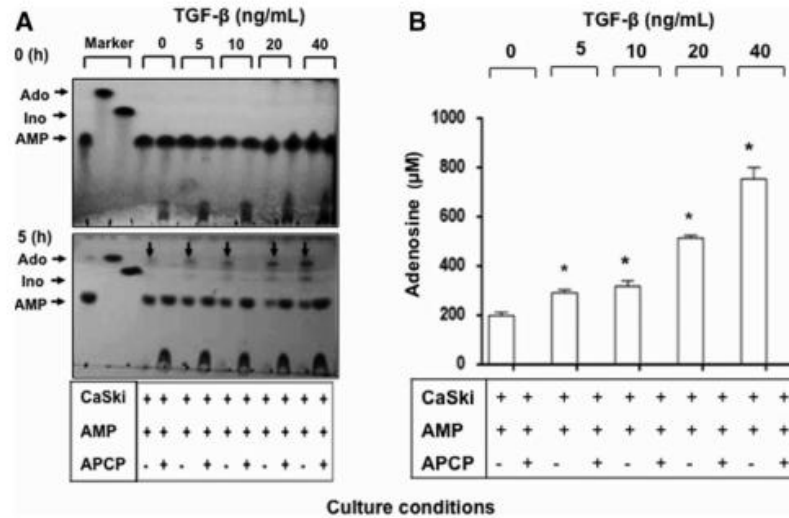


FIG. 4. Hydrolytic activity of CD73 in CeCa cells cultured in the presence of TGF- β 1. CaSki cells were cultured for 96 h in the presence of different concentrations (5, 10, 20, and 40 ng/mL) of rh-TGF- β 1. Subsequently, the cells were separated from the coculture, washed, and cultured for 5 h in the presence of 5 mM AMP and the presence or absence of APCP, which is a specific CD73 inhibitor. The presence of Ado was evidenced by TLC (A) and quantified by UPLC (B) using standard concentrations of synthetic Ado. The products of AMP hydrolysis (marked with *arrows*) at the end of the CaSki culture with AMP (A) and the Ado concentrations produced by the CaSki cells in the presence or absence of APCP (B) are shown. AMP, Ino and synthetic Ado (5 mM) were used as markers. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with the adenosine concentration generated by CaSki cells cultured in the absence of rh-TGF- β 1. The data are representative of three independent experiments, and the averages \pm SEMs are shown.

and 1042.09 ± 144.49 pg/mL respectively; in the presence of NCx-MSCs, the TGF- β 1 contents were 396.171 ± 28.81 , 482.621 ± 39.16 , and 666.34 ± 59.13 respectively, whereas the TGF- β 1 concentration in the supernatant of CaSki cells cultured in the absence of MSCs was 273.299 ± 10.88 . While, the TGF- β 1 contents in the MS751 cells and CeCa-MSC cocultures in 1:1, 1:2.5, and 1:5 ratios were 520.7 ± 40.13 , 702.81 ± 38.5 , and 854.83 ± 72.57 pg/mL respectively; in the presence of NCx-MSCs, the TGF- β 1 contents were 256.45 ± 18.73 , 496.75 ± 20.18 , and 652.66 ± 49.13 pg/mL, respectively. Whereas, the TGF- β 1 concentration in the supernatant of MS751 cells cultured in the absence of MSCs was 218.56 ± 21.31 pg/mL. On the other hand, the TGF- β 1 mRNA expression level also increased in the tumor cells mainly when the proportion of CeCa-MSCs was increased (Fig. 5B). These results suggested that the presence of CeCa-MSCs in the TME could condition the tumor cells to produce higher TGF- β 1 levels.

To corroborate that the TGF- β 1 contained in the supernatants of the CeCa cells and MSC cocultures participated in the induction of CD73 in the CeCa tumor cells, CaSki and MS751 cells were cultured in a 1:5 ratio with MSCs in the presence or absence of anti-TGF- β neutralizing antibodies. Interestingly, the addition of human anti-TGF- β neutralizing antibodies to the CeCa cells and CeCa-MSC or NCx-MSC cocultures reversed CD73 expression by more than 50% in the CaSki cells and between 30% and 40% in the MS751 cells (Fig. 6A). Notably, CD73 expression in CeCa cells

cultured in the presence of rh-TGF- β 1 was partially reversed when anti-TGF- β neutralizing antibodies were added, which suggested that other factors produced in these cultures autocrinally by CeCa cells cultured in the presence of rh-TGF- β 1 or paracrinely (generated in the coculture with MSCs) participated in the induction of CD73 in the tumor cells.

To determine whether inhibiting the induction of CD73 in CeCa cells through the addition of anti-TGF- β neutralizing antibodies reduced the capacity of the CaSki cells to hydrolyze AMP, CaSki cells previously cultured in a 1:5 ratio with MSCs in the presence or absence of anti-TGF- β neutralizing antibodies were washed and cultured for 5 h in the presence of 5 mM AMP, and in the presence or absence of APCP. Interestingly, the addition of anti-TGF- β neutralizing antibodies significantly reduced the capacity of the CaSki cells to generate Ado (Fig. 6B). The Ado concentration in the supernatant of CaSki cells cultured in the absence of MSCs was 256 ± 45.6 , whereas the Ado concentrations in the supernatants of CaSki cells previously cultured in the presence of NCx-MSCs and CeCa-MSCs were 761.65 ± 107.4 and 964.48 ± 28 μ M, respectively; and those when anti-TGF- β neutralizing antibodies were added, were 505.10 ± 8.4 and 542.18 ± 28.5 μ M, respectively (Fig. 6C). Importantly, the addition of APCP strongly inhibited the ability of CaSki cells to generate Ado (Figs. 6B, C).

These results suggest that during the intercommunication of tumor cells with MSCs in the TME, TGF- β 1 production

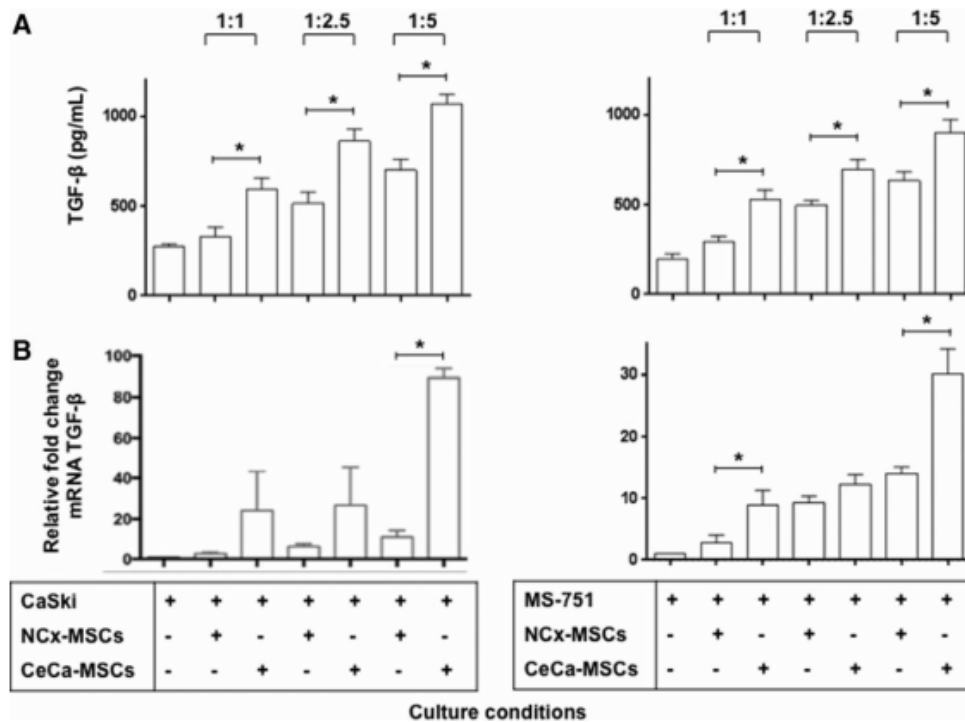


FIG. 5. CeCa cells were induced to increase the expression of TGF- β 1 in coculture with CeCa-MSCs. **(A)** A total of 5×10^4 CaSki and MS751 cells were seeded into the bottom wells of transwell chambers and cocultured with CeCa-MSCs ($n=3$) or NCx-MSCs ($n=3$) in 1:1, 1:2.5, and 1:5 ratios. After 96 h of the coculture, the TGF- β 1 content in the supernatants of CeCa cells or of cells cultured with different ratios of MSCs, was determined by ELISA. **(B)** CaSki and MS751 cells were withdrawn from all of the transwell chambers to determine the TGF- β 1 mRNA levels. The mRNA level obtained from CaSki and MS751 cells in each coculture was compared with the mRNA level obtained from each cell line cultured alone. The data are representative of three independent experiments, and the averages \pm SEMs are shown. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$). ELISA

is an important factor in maintaining an immunosuppressive status not only for the activity of this cytokine but also for its capacity to induce CD73 expression in the tumor cells and generate an immunosuppressive microenvironment rich in Ado.

Discussion

MSCs are a major component of the TME and play a key role in the promotion of tumor progression through differentiation into carcinoma-associated fibroblasts and/or tumor-associated fibroblasts, pericytes, and pre-fibroblasts by providing tumor cells with a survival advantage either by promoting their proliferation [47,48] or creating an immunosuppressive microenvironment [49]. They also provide support and a framework for anchoring tumor cells in the form of a tumor stroma [44]. However, the precise mechanisms by which MSCs exert their effector functions have not been fully elucidated. In this context, several studies have shown that MSCs exert paracrine activity on neighboring cells by secreting various bioactive factors that can radically change their cellular functions, including survival, apoptosis, maturation, and differentiation [50,51]. For example, MSCs promote the EMT in tumor cells and can promote

metastatic colonization through TGF- β 1 production in the TME [52,53]. Similarly, TGF- β 1 has been reported to contribute to the creation of an immunosuppressive TME rich in Ado by inducing CD73 expression in Tregs and MDSCs [54,55]. Based on these findings and our recent report that CeCa-MSCs were able to significantly increase TGF- β 1 expression and secretion in CeCa tumor cells [39], in this study, we analyzed the capacity of CeCa-MSCs to modify CD73 expression in CeCa tumor cells and therefore their ability to generate Ado. By coculturing CeCa tumor cells with CeCa-MSCs, we found that the tumor cells increased CD73 expression and the ability to generate Ado in a manner that was dependent on the proportion of CeCa-MSCs added to the cocultures. This phenomenon was not only exclusive of the presence of CeCa-MSCs in the cocultures but also occurred when the CeCa cells were cocultured with NCx-MSCs. Taking into consideration that TGF- β 1 is a cytokine that induces CD39 and CD73 expression in immunoregulatory cells, such as Tregs [56,57], dendritic cells [58], and myeloid suppressor cells in mouse tumors [46] and is even able to induce the expression of these ectonucleotidases in cells with the Th17 phenotype [58], we proceeded to analyze whether the ability of CeCa-MSCs to induce increased CD73 expression in CeCa tumor

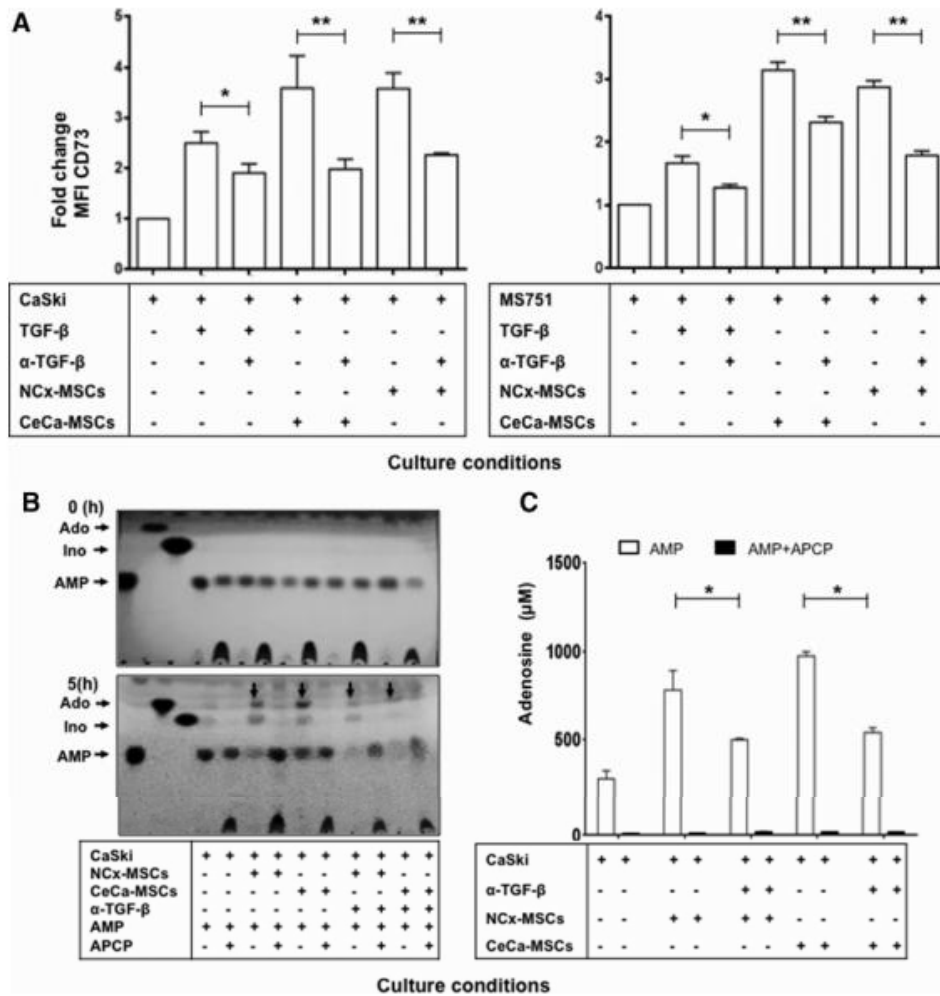


FIG. 6. Anti-TGF-β strongly reverses CD73 expression in CeCa cells cocultured with CeCa-MSCs and diminishes their capability to generate Ado. A total of 5×10^4 CaSki and MS751 cells were cocultured with CeCa-MSCs ($n=3$) or NCx-MSCs ($n=3$) in 1:5 ratios using transwell chambers and in the presence or absence of $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-TGF-β neutralizing antibodies. After 96 h, CD73 expression was analyzed by flow cytometry. (A) The CD73 expression levels in the CaSki and MS751 cells are shown relative to basal CD73 expression normalized to 1. Subsequently, to determine the hydrolytic activity of CD73 in CeCa cells cocultured with MSCs in the presence of anti-TGF-β neutralizing antibodies, the cells were separated from the coculture, washed, and cultured for 5 h in the presence of 5 mM AMP and the presence or absence of APCP, which is a specific CD73 inhibitor. The presence of Ado was evidenced by TLC (B) and quantified by UPLC (C) using standard concentrations of synthetic Ado. The products of AMP hydrolysis (marked with arrows) at the end of the CaSki culture with AMP (B) and the Ado concentrations produced by the CaSki cells in the presence or absence of APCP (C) are shown. AMP, Ino and synthetic Ado (5 mM) were used as markers. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$); **Indicates a significant difference ($P < 0.01$) between the different treatments. The data are representative of three independent experiments, and the averages \pm SEMs are shown. TGF-β, transforming growth factor-beta.

cells functioned through TGF-β1 production. We initially confirmed TGF-β1 functions to induce CD73 expression in CeCa tumor cells through CeCa cell culture in the presence of rh-TGF-β1. Furthermore, the increase in CD73 in the CeCa cell membrane was significantly related to the TGF-β1 content in the cell coculture supernatants; a higher TGF-β1 concentration was detected in cocultures with a higher

proportion of MSCs, and increased TGF-β1 mRNA expression also detected in tumor cells. The addition of anti-TGF-β neutralizing antibodies strongly reversed the CD73 level in the tumor cells (by more than 50%). However, the fact that a higher TGF-β1 concentration was detected in CeCa/CeCa-MSCs than in CeCa/NCx-MSCs cocultures suggests that at least in NCx-MSCs other factors produced

under these culture conditions could participate in the induction of CD73. It will be interesting to evaluate this possibility in future studies.

Recent studies have shown that MSCs can induce functional changes, such as an increase in CD73 activity in tumor cells and NK cells, either through the exchange of biological material through extracellular vesicles, including exosomes, or through paracrine activity [43,59]. In the present study, we provide evidence that the TGF- β 1 contained in the supernatant of cocultures of CeCa tumor cells with MSCs induces increased CD73 expression in the tumor cells. This property has been observed in splenic T cells, BM-derived dendritic cells, and peritoneal macrophages, upon in vitro stimulation with TGF- β 1 [45]. In fact, Fausther et al. already showed that SMAD proteins may control CD73 transcription [60]. Then, the MSCs that reside in the TME and constitute 0.1%–1% of the total number of cells in solid tumor tissues [8] can be determining factors in the induction of functional changes in the tumor cells or exacerbate their immunosuppressive capacity through the adenosinergic pathway. In the particular case of CeCa, several studies have shown that the presence of TGF- β 1 in the sera and tumor tissues of patients correlates directly with the degree of disease progression [32,33,61,62]. Therefore, because our results show that communication between CeCa cells and MSCs generates high amounts of TGF- β 1 and that induction of CD73 in CeCa cells depends heavily on the presence of TGF- β 1, suggest that the presence of MSCs into the TME promote CeCa cells to express high levels of CD73 through the secretion of TGF- β 1 and contribute to suppression of the immune response through the production of large amounts of Ado, implying that this route may have clinical importance as a therapeutic target.

Conclusions

In this study, we found that CeCa tumor cells cocultured with CeCa-MSCs or NCx-MSCs were induced to significantly increase CD73 expression by the production of TGF- β 1, since addition of anti-hTGF- β neutralizing antibodies strongly reversed CD73 expression in the tumor cells. These results suggest that the interaction of MSCs with CeCa tumor cells in the TME can trigger the production of TGF- β 1 to maintain an immunosuppressive status not only through the activity of this cytokine per se, but also through its ability to induce CD73 expression in the tumor cells and generate an immunosuppressive microenvironment rich in Ado.

Acknowledgments

The authors are indebted for CONACYT support to AMG (grant no. 240635) and DGAPA-PAPIIT support to M.L.M.G. (grant no. IN226516); and Mexican Institute of Social Security, IMSS, support to A.M.-G. (grant nos. 1161, 1314, 1383, and 1613) are gratefully acknowledged. They also thank the support provided to LRAI and DBTP by the Postdoctoral Scholarship Program of the UNAM. Finally, the authors thank the "Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDI-FarBiotec-CONACYT)" for facilitating the use of the UPLC system.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Gregory CA, DJ Prockop and JL Spees. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306:330–335.
2. Baksh D, L Song and RS Tuan. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8:301–316.
3. Kidd S, E Spaeth, K Watson, J Burks, H Lu and A Klopp. (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One* 7:e30563.
4. Bussard KM, L Mutkus, K Stumpf, C Gomez-Manzano and FC Marini. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 18:84.
5. Sun Z, S Wang and RC Zhao. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol* 7:14.
6. Horwitz EM, K Le Blanc and M Dominici. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 7:393e–395e.
7. Lax S, EA Ross, A White, JL Marshall, WE Jenkinson, CM Isacke, DL Huso, AF Cunningham, G Anderson and CD Buckley. (2012). CD248 expression on mesenchymal stromal cells is required for post-natal and infection-dependent thymus remodelling and regeneration. *FEBS Open Bio* 2:187–190.
8. Ren G, X Zhao, Y Wang, X Zhang, X Chen and C Xu. (2012). CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFalpha. *Cell Stem Cell* 11:812–824.
9. McLean K, Y Gong, Y Choi, N Deng, K Yang and S Bai. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* 121:3206–3219.
10. Wulling M, G Delling and E Kaiser. (2003). The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol* 34:983–993.
11. Johann PD, M Vaegler, F Gieseke, P Mang, S Armeanu-Ebinger and T Kluba. (2010). Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer* 10:501.
12. Gibbs CP, VG Kukekov, JD Reith, O Tchigrinova, ON Suslov and EW Scott. (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7:967–976.
13. Cao H, W Xu, H Qian, W Zhu, Y Yan and H Zhou. (2009). Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett* 274:61–71.
14. Montesinos JJ, L Mora-Garcia Mde, Mayani H, E Flores-Figueroa, R Garcia-Rocha and GR Fajardo Orduna. (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* 22:2508–2519.
15. Takigawa H, Y Kitadai, K Shinagawa, R Yuge, Y Higashi, S Tanaka, W Yasui, and K Chayama. (2017). Mesenchymal

- stem cells induce epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells through direct cell-to-cell contact. *Neoplasia* 19:429–438.
16. Prevosto C, M Zancolli, P Canevali, MR Zocchi and A Poggi. (2007). Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 92:881–888.
 17. Johann PD and I Muller. (2015). Multipotent mesenchymal stromal cells: possible culprits in solid tumors? *Stem Cells Int* 2015:914632.
 18. Poggi A, A Musso, I Dapino and MR Zocchi. (2014). Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunol Lett* 159:55–72.
 19. Di Trapani M, G Bassi, M Ricciardi, E Fontana, F Bifari and L Pacelli. (2013). Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells Dev* 22:2990–3002.
 20. Mora-Garcia ML, R Garcia-Rocha, O Morales-Ramirez, JJ Montesinos, B Weiss-Steider, J Hernandez-Montes, LR Avila-Ibarra, CA Don-Lopez, MA Velasco-Velazquez, V Gutierrez-Serrano and A Monroy-Garcia. (2016). Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *J Transl Med* 14:302.
 21. Vaupel P and A Mayer. (2016). Hypoxia-driven adenosine accumulation: a crucial microenvironmental factor promoting tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 876:177–183.
 22. Robson SC, J Sévigny and H Zimmermann. (2006). The ENTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430.
 23. Zimmermann H, M Zebisch and N Sträter. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502.
 24. Bours M, E Swennen, F Di Virgilio, Cronstein B and P Dagnelie. (2006). Adenosine 5-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112:358–404.
 25. Fredholm B, A Ijzerman, K Jacobson, Klotz K and J Linden. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–552.
 26. Linden J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:775–787.
 27. Synnestvedt K, G Furuta, K Comerford, N Louis, J Karhausen, HK Eltzschig, K Hansen, L Thompson and S Colgan. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 110:993–1002.
 28. McMahon S, M Charbonneau, S Grandmont, D Richard and CM Dubois. (2006). Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem* 281:24171–24181.
 29. Bavaresco L, A Bernardi, E Braganhol, AR Cappellari, L Rockenbach, PF Farias, MR Wink, A Delgado-Canedo and AM Battastini. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* 319:61–68.
 30. Hausler I, J Montalban del Barrio, Strohschein PA, Chandran JB, A Engel, M Honig, E Ossadnik, B Horn, M Fischer, et al. (2011). Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 60:1405–1418.
 31. Wang L, X Zhou, T Zhou, D Ma, S Chen, X Zhi, L Yin, Z Shao, Z Ou and P Zhou. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:365–372.
 32. Torres-Poveda K, M Bahena-Roman, C Madrid-Gonzalez, A Burguete-Garcia, V Bermudez-Morales, O Peralta-Zaragoza and V Madrid-Marina. (2014). Role of IL-10 and TGF-beta1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol* 5:753–763.
 33. Bermudez-Morales VH, LX Gutierrez, JM Alcocer-Gonzalez, A Burguete and A Madrid-Marina. (2008). Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest* 26:1037–1043.
 34. Wrzesinski SH, YY Wan and RA Flavell. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13:5262–5270.
 35. Lin H, CC Huang, YC Ou, EY Huang, CC Changchien and CW Tseng. (2012). High immunohistochemical expression of TGF-beta1 predicts a poor prognosis in cervical cancer patients who harbor enriched endoglin microvessel density. *Int J Gynecol Pathol* 31:482–489.
 36. Akhurst RJ and R Derynck. (2001). TGF-beta signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11:S44–S51.
 37. Siegel PM and J Massague. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3:807–821.
 38. Massague J and Q Xi. (2012). TGF-beta control of stem cell differentiation genes. *FEBS Lett* 586:1953–1958.
 39. García-Rocha R, M Moreno-Lafont, ML Mora-García, B Weiss-Steider, JJ Montesinos, P Piña-Sanchez and A Monroy-García. (2015). Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF-β1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity. *Cytokine* 76:382–390.
 40. García-Rocha R, A Monroy-García, J Hernández-Montes, B Weiss-Steider, V Gutiérrez-Serrano, M Del Carmen Fuentes-Castañeda, LR Ávila-Ibarra, CA Don-López, DB Torres-Pineda and M de Lourdes Mora-García. (2018). Cervical cancer cells produce TGF-β1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-β1. *Cytokine*. DOI:10.1016/j.cyto.2018.09.018
 41. Stagg J, U Divisekeraa, N McLaughlina, J Sharkeya, S Pommey, D Denoyerd, K Dwyer and M Smytha. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1547–1552.
 42. Grunewald JK and AJ Ridley. (2010). CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *J Inflamm* 7:10.
 43. Yang Y, Otte A and Ralf Hass1Human. (2015). Mesenchymal stroma/stem cells exchange membrane proteins and alter functionality during interaction with different tumor cell lines. *Stem Cells Dev* 24:1205–1222.
 44. Ridge SM, FJ Sullivan and SA Glynn. (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer* 16:31.

45. Regateiro F, D Howie, K Nolan, E Agorogiannis, D Greaves, S Cobbold and H Waldmann. (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur J Immunol* 41:2955–2965.
46. Ryzhov SV, MW Pickup, A Chytil, AE Gorska, Q Zhang and P Owens. (2014). Role of TGF-beta signaling in generation of CD39+ CD73+ myeloid cells in tumors. *J Immunol* 193:3155–3164.
47. Spaeth E, J Dembinski, A Sasser, K Watson, A Klopp and B Hall. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 4:e4992.
48. Bergfeld S and YA DeClerck. (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29:249–261.
49. Norozi F, A Ahmadzadeh, S Shahrabi, T Vosoughi and N Saki. (2016). Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in suppression or progression of solid tumor cells. *Tumour Biol* 37:11679.
50. Lazennec G and PY Lam. (2016). Recent discoveries concerning the tumor-mesenchymal stem cell interactions. *Biochim Biophys Acta* 1866:290–299.
51. Ye H, J Cheng, Y Tang, Z Liu, C Xu, Y Liu and Y Sun. (2012). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced TGFbeta contributes to progression and metastasis of prostate cancer. *Cancer Invest* 30:513–518.
52. Jing Y, Z Han, Y Liu, K Sun, S Zhang, G Jiang, R Li, L Gao, X Zhao, et al. (2012). Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 7:e43272.
53. Regateiro FS1, SP Cobbold and H Waldmann. (2013). CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* 171:1–7.
54. Li J, L Wang, X Chen, L Li, Y Li, Y Ping, L Huang, D Yue, Z Zhang, et al. (2017). CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-β-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 6:e1320011.
55. Sun X, Y Wu, W Gao, K Enjyoji, E Cszimadia, CE Muller, T Murakami and SC Robson. (2010). CD39/ENTPD1 expression by CD4CFoxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* 139:1030–1040.
56. Chalmin F, G Mignot, M Bruchard, A Chevriaux, F Vegran, A Hichami, S Ladoire, V Derangere, J Vincent and D Masson. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36:362–373.
57. Schuler PJ, B Schilling, M Harasymczuk, TK Hoffmann, J Johnson, S Lang and TL Whiteside. (2012). Phenotypic and functional characteristics of CD4+ CD39+ FOXP3+ and CD4+ CD39+ FOXP3neg T-cell subsets in cancer patients. *Eur J Immunol* 42:1876–1885.
58. Martín F, L Apetoh and F Ghiringhelli. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-β-dependent immunosuppressive activity?. *Trends Mol Med* 18:742–749.
59. Chatterjee D, D Tufa, H Bachre, R Hass, Schmidt RE and R Jacobs. (2017). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood* 123:594–595.
60. Fausther M, N Sheung, Y Saiman, MB Bansal and JA Dranoff. (2012). Activated hepatic stellate cells upregulate transcription of ecto-5'-nucleotidase/CD73 via specific SP1 and SMAD promoter elements. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303:G904–G914.
61. Torres-Poveda K, AI Burguete-García, GA M Cruz, Martínez-Nava, M Bahena-Román, E Ortiz-Flores, A Ramírez-González, G López-Estrada, K Delgado-Romero and V Madrid-Marina. (2012). The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Infect Agent Cancer* 7:32.
62. Alcocer-Gonzalez JM, J Berumen, R Tamez-Guerra, V Bermudez-Morales, O Peralta-Zaragoza, R Hernandez-Pando, J Moreno, P Gariglio and V Madrid-Marina. (2006). In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol* 19:481–491.

Address correspondence to:

Dr. Alberto Monroy-García

Neumología 2a Sección

Delegación Venustiano Carranza C.P. 15530

UNAM

Oriente 170 No. 160 Colonia

Ciudad de México

México

E-mail: albertomon@yahoo.com

Received for publication September 1, 2018

Accepted after revision January 29, 2019

Republished on Liebert Instant Online XXXX XX, XXXX