



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación

Experimental Zaragoza

Diferenciación Celular y Cáncer

Laboratorio de Inmunobiología

“Efecto del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) sobre la expresión de CD73 y su participación en la proliferación y capacidad migratoria de células tumorales de Cáncer Cervicouterino”

TESIS

Que para Obtener el Título de:  
Biólogo

Presenta:

Gamboa Meraz Uriel Alejandro

Director de Tesis: Dr. Alberto Monroy García.

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



Ciudad de México, 2019

---

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en la UMIEZ de la FES Zaragoza UNAM. Investigación realizada gracias al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave IN225519: Estudio funcional de la vía CD73-Adenosina en la tumorigenicidad de células iniciadoras del cáncer en un modelo de células tumorales de cáncer cérvico-uterino similares a células troncales y al Fondo de Investigación en Salud-IMSS (Proyectos 1314, 1383 y 1613).

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme permitido formarme académicamente dentro de su comunidad.

Al Dr. Alberto Monroy García y a la Dra. María de Lourdes Mora García, quienes fueron mi director y asesora interna para este proyecto y me permitieron formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por haber formado parte de mi formación dentro del laboratorio y a quien agradezco su tiempo, enseñanza y comentarios a mi trabajo de investigación, los cuales fueron de vital importancia para el desarrollo del mismo.

Al Dr. Luis Ávila Ibarra por su trabajo previo, el cual fue el sustento del presente estudio. Así también agradezco sus consejos, su amistad y su tiempo para enseñarme las técnicas empleadas para el presente estudio.

A la Maestra en Ciencias Gaby Molina por formar parte de mi desarrollo dentro del laboratorio, a quien agradezco por siempre estar dispuesta a enseñarme y resolver mis dudas, así como por su amistad.

A mi compañera y amiga Ana Estrada con quien compartí mi formación dentro del laboratorio, así como Berenice Castro, Ángeles Ponce, Katya Monroy, Azucena Don y a todos mis compañeros de laboratorio.

A mis Sinodales M. en C. Rosalva Rangel C. y M. en C. Edgar I. Torres C por sus observaciones y atenciones brindadas

## *Dedicatorías*

A Dios por permitirme llegar hasta este momento

A mi papá, quien me apoyo siempre de todas las maneras posibles a pesar de muchas cosas y a quien no tengo palabras para describir todo lo que significa para mí.

A mi Mamá, a mis hermanos Seleste, Hugo y Erick Gamboa por acompañarme en cada momento de mi vida, a mis sobrinos Noemi y Renata, así como a Leo por enseñarme una gran lección de vida a pesar de ser un bebe y a quien siempre llevo en mi memoria y corazón.

A Lilibeth Ávila por su amistad de más 12 años, quien me dio ánimo para llegar a este momento

Al Dr. Uriel C. quien me ayudo en el momento más difícil de mi vida y tomo mi lucha como si también fuera suya, y gracias a su profesionalismo pude salir adelante.

# Índice

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.      | Abreviaturas   | 1  |
| 2.      | Resumen  | 2  |
| 3.      | Marco Teórico  | 3  |
| 3.1     | Cáncer   | 3  |
| 3.2     | Cáncer Cervicouterino y el Virus de Papiloma Humano  | 3  |
| 3.2.1   | Virus de Papiloma Humano (VPH)   | 5  |
| 3.2.2   | Historia Natural del VPH   | 7  |
| 3.2.3   | Progresión de la infección con VPH a Cáncer Cervicouterino (CaCU)  | 9  |
| 3.3     | Sistema Inmune   | 11 |
| 3.3.1   | Inmunidad Innata   | 11 |
| 3.3.2   | Inmunidad Adaptativa   | 12 |
| 3.3.3   | Respuesta Inmune contra VPH  | 13 |
| 3.3.4   | Infección por VPH e Inmunescape del CaCU   | 15 |
| 3.4     | Vía Adenosinérgica   | 18 |
| 3.4.1   | Papel de Adenosina en el Sistema Inmune  | 20 |
| 3.4.2   | CD73   | 21 |
| 3.4.2.1 | Regulación de la expresión de CD73   | 22 |
| 3.5     | Factor de Crecimiento Epidermal  | 23 |
| 4       | Planteamiento y Justificación del Problema   | 25 |
| 5       | Hipótesis  | 26 |
| 6       | Objetivos  | 26 |
| 7       | Metodología  | 27 |
| 7.1     | Células tumorales y condiciones de cultivo   | 27 |
| 7.2     | Detección de CD73  | 27 |
| 7.3     | Actividad Enzimática de CD73   | 28 |
| 7.4     | Proliferación Celular  | 28 |
| 7.5     | Migración Celular In Vitro “Scratch”   | 29 |
| 8       | Resultados   | 30 |
| 8.1     | EGF aumenta la expresión de CD73 en células tumorales de CaCU  | 30 |
| 8.2     | EGF induce incremento en la capacidad adenosinérgica de las células tumorales de CaCU                    | 32 |
| 8.3     | EGF disminuye la proliferación celular e induce morfología tipo mesenquimal en células tumorales de CaCU | 34 |
| 8.4     | EGF favorece la capacidad migratoria de células tumorales de CaCU  | 36 |
| 9       | Análisis de Resultados   | 39 |
| 10      | Conclusiones   | 43 |
| 11      | Perspectivas   | 44 |
| 12      | Bibliografía   | 45 |

## 1. Abreviaturas

- ADA Adenosina Desaminasa
- ADN Ácido Desoxirribonucleico
- Ado Adenosina
- ADP Difosfato de Adenosina
- AMP Monofosfato de Adenosina
- ARNm Ácido Ribonucleico mensajero
- ATP Trifosfato de Adenosina
- CaCU Cáncer Cervicouterino
- CD Células Dendríticas
- CTL Linfocitos T Citotóxicos
- EGF Factor de Crecimiento Epidermal
- EGFR Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
- EMT Transición Epitelio Mesenquimal
- FGF Factor de Crecimiento de Fibroblastos
- FTE Factor De Transcripción Específico de EGFR
- HB-EGF Factor De Crecimiento Epidermal Ligado A Heparina
- HIF1- $\alpha$  Factor 1-alfa Inducible por Hipoxia
- IFN Interferón
- IMF Intensidad Media de Fluorescencia
- INO Inosina
- IRF Factor Regulador de Interferón
- LCR Región Larga de Control
- MDSC Células Mieloides Supresoras Derivadas
- MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- NIC Neoplasia Cervical Intraepitelial
- NK Célula Natural Asesina
- ORF Marco de Lectura Abierto
- TCR Receptor de células T
- TEM Transición Epitelio Mesénquima
- Th Linfocito T Cooperador
- TLRs Receptores Tipo Toll
- TNF- $\alpha$  El Factor de Necrosis Tumoral Alfa
- TYK-2 Tirosina Cinasa 2
- VEGF Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
- VPH Virus de Papiloma Humano
- WT *Wild Type* (Tipo Silverstre)

## 2. Resumen

El Cáncer cervicouterino (CaCU) representa un problema de salud pública a nivel mundial, la alta tasa de mortalidad de esta enfermedad se le atribuye a la metástasis por lo que es de vital importancia el estudio de mecanismos y factores que favorecen la progresión de esta enfermedad.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha centrado su atención en el papel que juega la vía adenosinérgica sobre la supresión y evasión de a respuesta inmune antitumoral, así como en la progresión del CaCU. Esta vía consiste en la generación de Adenosina (Ado) a partir de la hidrólisis de ATP/ADP y AMP mediante la actividad de las ectonucleotidasas CD39 (ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, E-NTPDase1) y CD73 (ecto-5'-nucleotidasa, NT5E), respectivamente. Tomando en consideración que la expresión de CD73 puede ser regulada por diferentes factores, tal como el Factor de Crecimiento Epitelial (EGF), y que a través de la actividad de CD73 se promueve la Transición Epitelio Mesénquima (TEM) y migración de las células tumorales, en el presente estudio se analizó el efecto de EGF sobre la expresión de CD73, así como en la proliferación y capacidad migratoria de células tumorales de CaCU. Mediante el cultivo *in vitro* de las líneas CaSki (VPH-16+) y HeLa (VPH-18+) en presencia de EGF se encontró un incremento en la expresión de CD73 de aproximadamente 60% en CaSki y 1100% en HeLa. Este incremento se asoció con una mayor capacidad de las células tumorales para generar Ado a partir de la hidrólisis de AMP. Por otro lado, EGF inhibió la proliferación de las células CaSki en 40% y HeLa en 25%, e indujo cambios morfológicos relacionados con la TEM en ambas líneas celulares, los cuales fueron asociados con una mayor capacidad migratoria, particularmente en las células CaSki. Dicha capacidad fue disminuida notablemente en las células tumorales inhibidas en la expresión de CD73 por un siRNA específico para esta ectonucleotidasa.

Estos resultados sugieren la presencia de EGF en el microambiente tumoral del CaCU, además de favorecer la expresión de CD73 y, en consecuencia, la generación de Ado, que participa en la inducción de la TEM y por tanto la capacidad migratoria de las células tumorales.



### 3. Marco Teórico

#### 3.1 Cáncer

Es una enfermedad genética, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células (Jiménez y Merchant, 2003).

La expresión de oncogenes es un evento importante en las primeras etapas de la formación de tumores. Los oncogenes se activan a través de dos mecanismos: ya sea por infección de células por virus oncogénicos o por mutación de protooncogenes celulares (que generalmente son normales) a oncogenes (Imran *et al*, 2017)

El cáncer implica numerosos cambios tempo-espaciales en la fisiología celular, que en última instancia conducen a tumores malignos. El crecimiento celular anormal (neoplasia) es el punto final biológico de la enfermedad. La invasión de células tumorales a los tejidos circundantes y los órganos distantes es la causa principal de morbilidad y mortalidad en la mayoría de los pacientes con cáncer. El proceso mediante el cual las células normales se transforman en células cancerosas malignas ha sido objeto de un gran esfuerzo de investigación en las ciencias biomédicas durante muchas décadas (Seyfired y Shelton, 2010).

En la mayoría de los casos de cáncer, se trata de padecimientos crónico-degenerativos, por lo tanto, su incidencia y tasa de mortalidad tienden a incrementarse con la edad. Asimismo, se han identificado tipos de cáncer más comunes en mujeres que en hombres y viceversa, así como otros exclusivos por sexo. Por ejemplo, entre las neoplasias malignas que se desarrollan en el aparato reproductor, el cáncer Cervicouterino (CaCU) es uno de los de mayor frecuencia. (Bray *et al*, 2018)

#### 3.2 Cáncer Cervicouterino y el Virus de Papiloma Humano

En el año 2018, a nivel mundial se detectaron aproximadamente 570,000 casos de CaCU y murieron 311,000 personas a causa de esta enfermedad en todo el mundo, de las cuales el 85% ocurrió en países en vías de desarrollo (Bray *et al*, 2018). Entre los principales tumores malignos por los que fallecen las mujeres mayores de 20, el CaCU ocupa el segundo lugar. La tasa de mortalidad del CaCU, pasa de 9.3 muertes por cada 100 mil mujeres de 40 a 49 años de edad, a 15.7 y 21.6 por cada 100 mil mujeres de 50 a 59 años y de 60 a 69 años,

respectivamente; hasta llegar a 36.1 entre las mujeres adultas mayores de 70 años y más (INMUJERES, 2018; INEGI 2018)

El CaCU es el crecimiento, desarrollo y la multiplicación de manera desordenada y sin control de las células del cuello uterino, que es la parte inferior del útero (matriz) que desemboca en la parte superior de la vagina (INMUJERES, 2018).

La histología del canal cervical se caracteriza por dos tipos de epitelio. El exocervix está cubierto por un epitelio fuerte, protector, estratificado (en múltiples capas) llamado escamoso, que es una continuación del vaginal. Por otro lado, el conducto endocervical está tapizado por una única capa de células cilíndricas altas, conocido como epitelio cilíndrico. Los epitelios que recubren el endocervix y el exocervix se unen en la zona de transición, o unión escamocolumnar, en correlación con el área del cuello uterino en el sistema externo. La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) divide los carcinomas cervicouterinos en tres grupos principales: carcinomas epidermoides, adenocarcinomas y otros tumores (Pérez-Montiel *et al* 2014; Wang *et al*, 2018).

El 90% de los cánceres cervicouterinos son cánceres de células escamosas y se inician en la zona de transformación del exocervix (figura 1); el 10% restante son adenocarcinomas que surgen en la capa cilíndrica glandular del endocervix (World Health Organization 2014. González M, 2007)

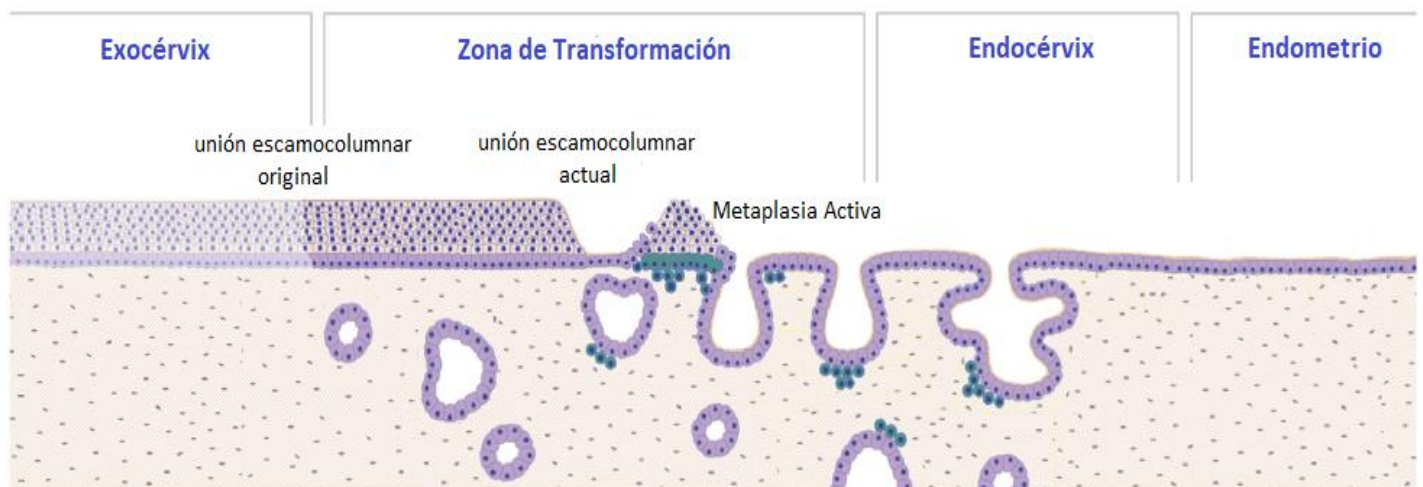


Figura 1. El cuello uterino está compuesto por el epitelio estratificado convencional del exocervix, la zona de transformación y el epitelio columnar del endocervix, que se encuentra adyacente al endometrio. Las células de reserva, que se muestran en color turquesa, se encuentran debajo del epitelio columnar de la zona de transformación y desempeñan un papel en la metaplasia normal, un proceso que conduce a la formación de un nuevo epitelio estratificado cuando sea necesario. Esto se muestra entre la unión escamocolumnar original y actual. Tomada y modificada de Doorbar y Griffin, 2019.

La infección con el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo se considera el principal agente etiológico de CaCU. Si bien la respuesta inmune contra los antígenos del VPH elimina la mayoría de las infecciones y las lesiones precursoras, solo un pequeño número de mujeres expuestas al virus desarrollan cáncer, lo que sugiere que otros factores de riesgo pueden estar involucrados (García-Rocha *et al*, 2018. Manzo-Merino *et al*, 2014). Cofactores como multiparidad, uso de anticonceptivos orales por más de cinco años, tabaquismo, infección por otras enfermedades de transmisión sexual y desnutrición se asocian con la aparición de CaCU invasivo (Bray *et al*, 2018).

Así mismo el incremento de la edad, carga viral elevada, edad temprana al inicio de la vida sexual y nivel socioeconómico bajo se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en mujeres infectadas por VPH. Las variaciones en incidencia y mortalidad de CaCU se relacionan con la situación económica (niveles de pobreza), acceso limitado a los servicios de salud y calidad de los mismos. Otros factores que influyen pueden ser la ubicación geográfica (en especial las zonas rurales), bajos niveles de educación, así como aspectos culturales y psicosociales. En América latina y el Caribe, la supervivencia de las mujeres con CaCU es más corta, porque a menudo solicitan atención cuando la enfermedad ya está avanzada. La baja supervivencia también se relaciona con una atención paliativa inadecuada y un tratamiento incompleto. En México, las variaciones dentro del país parecen estar ligadas a los niveles de pobreza (Torres-Poveda *et al*, 2014).

El origen viral del CaCU ha sido demostrado hasta en 99.7% por la presencia del ADN del VPH. Los VPH más frecuentes en el desarrollo de CaCU son los tipos 16 y 18 y, por tanto, son considerados de alto riesgo (Gutiérrez-Xicoténcatl *et al* 2014).

Los tipos de VPH más comunes en mujeres con CaCU en orden descendente de frecuencia son los tipos 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 y 35. El VPH-16 se asocia con el 54% de los carcinomas de células escamosas del cuello uterino y el 41% de los adenocarcinomas. El VPH-18 representa el 11% de los carcinomas de células escamosas y el 37% de los adenocarcinomas. Otros tipos identificados en pacientes con CaCU, pero con una frecuencia mucho menor son los tipos 39, 51, 56, 59, 68, 73 y 82 (González M, 2007).

El tipo de VPH más prevalente en CaCU es el VPH-16. De hecho, el VPH-16 se detecta en 52 a 58% de los cánceres de cuello uterino en el mundo y el segundo tipo de VPH más prevalente en el cáncer es VPH-18 (que varía entre 13 y 22%) (Van hede, 2014).

### **3.2.1 Virus de Papiloma Humano (VPH)**

El VPH es un virus pequeño de aproximadamente 55 nm, que pertenece a la familia Papillomaviridae y al género Papillomavirus. Su contenido genético posee un ADN circular de doble hebra con 7.900 pares de bases, que se encuentra asociado con histonas formando un complejo similar a la cromatina. No posee envoltura. Su cápside icosaédrica está

compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) con más de 10 marcos de lectura abiertos (ORFs) (Manzo-Merino *et al*, 2014; Silva *et al*, 2013; Ibeanu, 2011; González M, 2007).

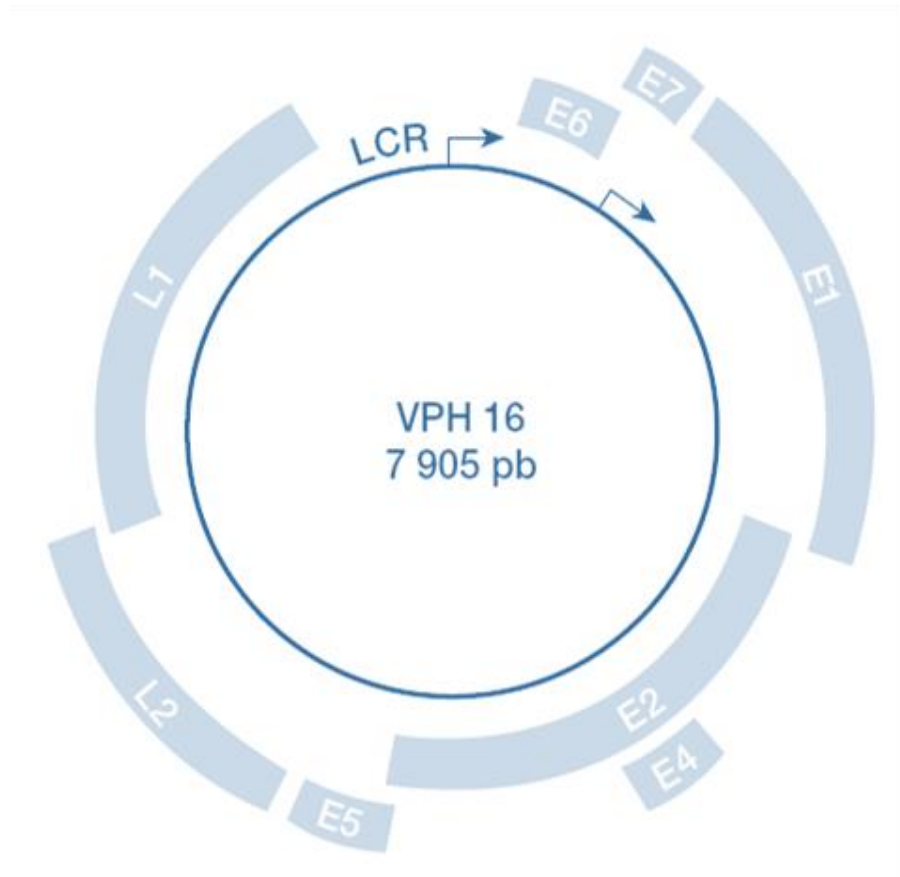


Figura 2. Organización del genoma del Virus de Papiloma Humano. Tomada de Manzo-Merino *et al*, 2014

El genoma de VPH se encuentra dividido funcionalmente en tres regiones. La primera, contiene una Región Larga de Control no codificante (LCR, por sus siglas en inglés), que presenta sitios de regulación de la replicación y transcripción viral. Esta región contiene un centro promotor llamado p97 (en VPH+16) o p105 (en VPH+18) que permite potenciar o silenciar secuencias que regulan la replicación del ADN mediante el control de la transcripción de los ORF. Además, esta región contiene la mayor variación genética entre un tipo viral y otro (Silva *et al*, 2013). La segunda es la región temprana E (early) que codifica para proteínas de expresión temprana implicadas en replicación y mantenimiento del genoma viral (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). La tercera es la región tardía L (late), que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2, componentes de 95 y 5%, respectivamente, de la cápside viral. Estas proteínas son requeridas en el ciclo viral para el ensamblaje de los viriones (Torres-Poveda *et al*, 2014).

Existen varios géneros para esta familia, de los cuales sólo Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus y Gamma-papillomavirus infectan humanos. Se han descrito más de 200 tipos de VPH, los cuales tienen tropismo por epitelios escamosos estratificados, infectando piel, mucosa oral y/o del tracto ano-genital. Los tipos de VPH cutáneos, entre ellos los tipos 1, 2, 3, 7 y 10, tienen como blanco principalmente manos y pies, formando verrugas típicas de la infección. Los VPH de tejidos mucosos infectan las células epiteliales basales de la boca, garganta tracto respiratorio o epitelio ano-genital y en cualquiera de ellos el VPH podría dar origen a un proceso carcinogénico (Silva *et al*, 2013).

Los VPH transmitidos por vía sexual son aproximadamente 40, los que pueden ser agrupados en VPH de bajo riesgo y alto riesgo oncogénico. Los VPH de bajo riesgo incluyen los tipos 6 y 11 entre los más frecuentes, lo cuales producen verrugas genitales tanto en hombres como en mujeres (Silva *et al*, 2013). Los VPH de alto riesgo se muestran junto con los de bajo riesgo en la Tabla 1.

|                    |   |
|--------------------|---|
| VPH de bajo riesgo | 6, 11, 42, 43 y 44, 54, 61, 72, 81                              |
| VPH de alto riesgo | 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70 |

Tabla 1. Clasificación de VPH según su riesgo. Información tomada de Ibeanu, 2011, Silva *et al*, 2013 y González M, 2007

### 3.2.2 Historia Natural del VPH

La historia natural de la infección depende principalmente del tipo de VPH, del estado inmunitario de la paciente y de su edad. La mayoría de las infecciones por VPH son transitorias e intermitentes (Torres-Poveda *et al*, 2014).

Este virus infecta las células basales del epitelio porque ingresa en micro lesiones, que exponen dichas células. Ahí se activa un mecanismo de endocitosis, cuyo proceso no se conoce completamente, pero se sugiere que se requiere de clatrin y heparán sulfato, mediado por la proteína L2, se han propuesto otros receptores secundarios como  $\alpha 6$ -integrina (Manzo-Merino *et al*, 2014. González M, 2007).

El genoma vírico permanece como un elemento extra cromosomal en forma de episoma. El virus replica su ADN para mantener un número de 50-100 copias de su genoma dentro de las células basales y parabasales. Las proteínas E1 y E2 son expresadas para mantener el ADN viral como episoma y facilitar la correcta segregación de los genomas durante la división celular. La proteína E2 es necesaria para el inicio de la replicación del ADN viral y la segregación del genoma. Además de su papel en la replicación y la segregación del genoma, E2 también actúa como un factor de transcripción y puede regular el promotor viral

temprano (p97 en VPH-16; p99 en VPH-31) y controlar la expresión de los oncogenes virales (E6 y E7) (Manzo-Merino *et al*, 2014. González M, 2007).

Las células basales que están infectadas con VPH continúan dividiéndose y cada una forma dos células hijas que contienen material genómico viral. Una célula del par permanece en la capa basal y conserva su capacidad de división, por lo que actúa como un repositorio para la replicación del virus, lo que requiere una división celular activa para mantener su ciclo de vida. La otra célula hija continúa hacia arriba a través de la capa suprabasal, donde se diferencia y finalmente se desprende de la superficie epitelial (Ibeanu, 2011).

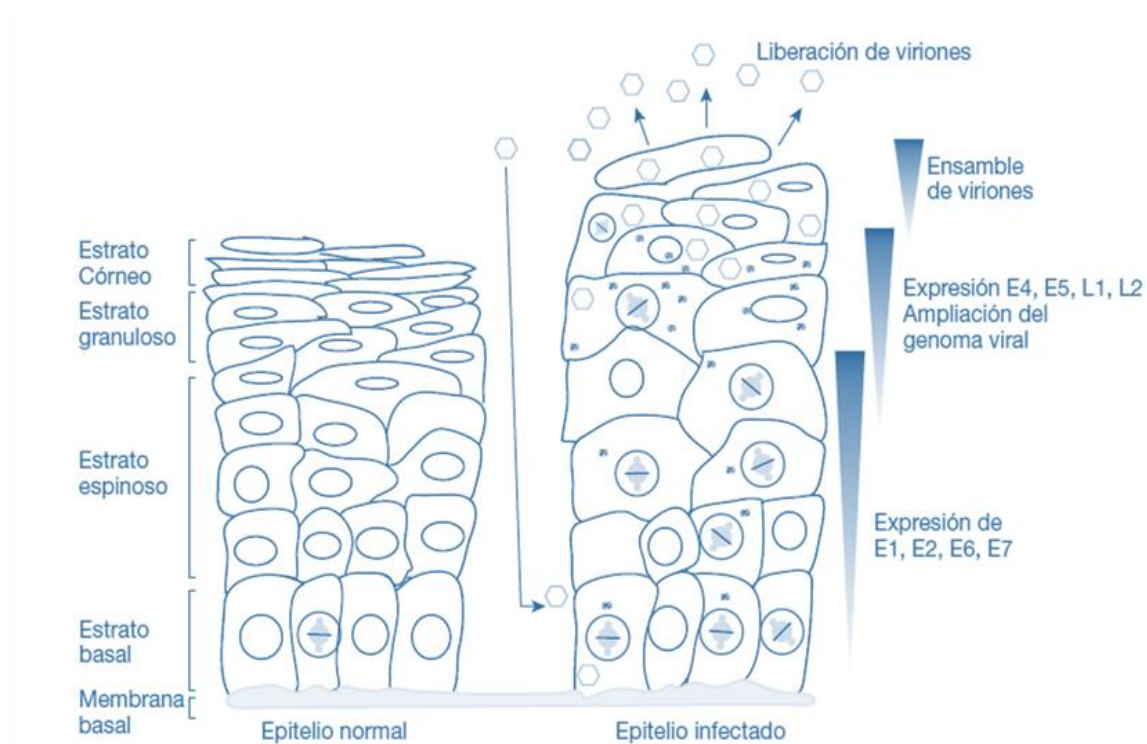


Figura 3. El ciclo viral en el epitelio estratificado. Tomado de Manzo-Merino *et al*, 2014

Para garantizar que las células cervicales se mantengan en un estado de crecimiento y división constantes, se expresan las proteínas tempranas del VPH, que estimulan y propagan el crecimiento celular a través de las acciones de los genes E5, E6 y E7. Tras la diferenciación celular en la capa suprabasal, el genoma viral se replica en 10,000 o más copias por célula, y se desencadena la expresión de los genes virales tardíos E4, L1 y L2. Las proteínas de la cápside (L1 y L2) se acumulan una vez que se ha amplificado el genoma viral. Cuando la célula alcanza la capa más externa del epitelio, el ADN viral recién sintetizado es encapsulado por L1 y L2 para formar nuevos viriones, que se liberan, y luego se repite el ciclo de vida. Los papilomavirus son no líticos y se liberan hasta que las células infectadas

llegan a la superficie epitelial. El egreso de las partículas virales se lleva a cabo gracias a la actividad residente en E4, la cual contribuye a la desestabilización de las redes de citoqueratina (figura 3) (Manzo-Merino *et al*, 2014; Ibeanu, 2011; Wang *et al*, 2018)

Cabe señalar que la progresión carcinogénica no es parte del ciclo de vida normal del VPH, sino que se asocia con un pequeño subconjunto de tipos de virus y se produce solo después de un largo período de infección.

### **3.2.3 Progresión de la infección con VPH a Cáncer Cervicouterino (CaCU)**

En la ausencia de regresión, las lesiones pueden persistir y, en algunos casos, progresar a cáncer. Una característica común de los virus tumorales es su capacidad para originar tumores en sitios donde su ciclo viral productivo no puede ser completado (Manzo-Merino *et al*, 2014).

Se sabe que la zona de transformación es un sitio particularmente susceptible al desarrollo de cáncer. Parece que los tipos de alto riesgo no pueden completar su ciclo en esta área, lo que ocasionalmente conduce a una infección abortiva. La progresión de lesiones hacia cáncer se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del hospedero. En dicho proceso suele perderse la integridad de E1 y E2, con la subsecuente expresión de los oncogenes E6 y E7 (Estevao *et al*, 2019).

La integración de genoma viral al genoma celular es un evento que interrumpe la expresión de los genes E1 y E2, previene la replicación de ADN viral y estimula el crecimiento celular. Aunque la proteína E2 es un factor de transcripción esencial, también puede funcionar como represor del principal promotor viral. En consecuencia, la pérdida de la función de E2, debido a la integración del ADN viral, induce una liberación del promotor a partir del cual se expresan las proteínas E6 y E7, las cuales son los principales estímulos oncogénicos codificados por VPH, ya que aumentan la aparición de la rotura de doble cadena tanto en el ADN del huésped como en el genoma viral. Aunque la integración del VPH puede ocurrir en todo el genoma humano, es más común en regiones cromosómicas frágiles como 3q28, 4q13.3, 8q24.21, 13q22.1 y 17q21 o cerca de grupos de micro ARN. Sin embargo, la integración del VPH no es el único factor que se ha identificado como un paso crucial en la carcinogénesis del VPH. Se encontró que los mecanismos de hipermetilación del VPH bloquean el acceso a la región promotora de E2, lo que también conduce a una expresión desequilibrada de los oncogenes virales E6 y E7 sin interrupción de E2. (Manzo-Merino *et al*, 2014; Estevao *et al*, 2019)

La importancia de E6 y E7 durante la carcinogénesis consiste en que estas actúan modificando el control del ciclo celular y regulando la apoptosis. Combinadas, estas

proteínas pueden immortalizar las células, de modo que las células conservan su capacidad mitótica para generar clones que también tienen el fenotipo immortalizado y no experimentan diferenciación terminal (Wang *et al*, 2018).

Las proteínas E6 y E7 también son capaces de interactuar y modular las actividades de otras proteínas celulares, con lo cual contribuyen al efecto carcinogénico. Notablemente, las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo se unen a ciertas proteínas que poseen dominios PDZ, incluidas las que supuestamente poseen actividad de supresión tumoral. Sin embargo, Los genes E6 y E7 de los VPH de bajo riesgo no poseen actividad immortalizante y muestran una capacidad débil de interacción con los blancos celulares (Manzo-Merino *et al*, 2014).

Las infecciones por VPH se clasifican como productivas o proliferativas. Las infecciones productivas dan como resultado la formación de partículas virales intactas. Por el contrario, la infección proliferativa se caracteriza por la integración del ADN viral en el genoma (González M, 2007).

En las mujeres cuya infección no se resuelve con éxito, estas lesiones pueden progresar a neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (NIC 1) y posteriormente a NIC2, NIC3 o cáncer (Figura 4).

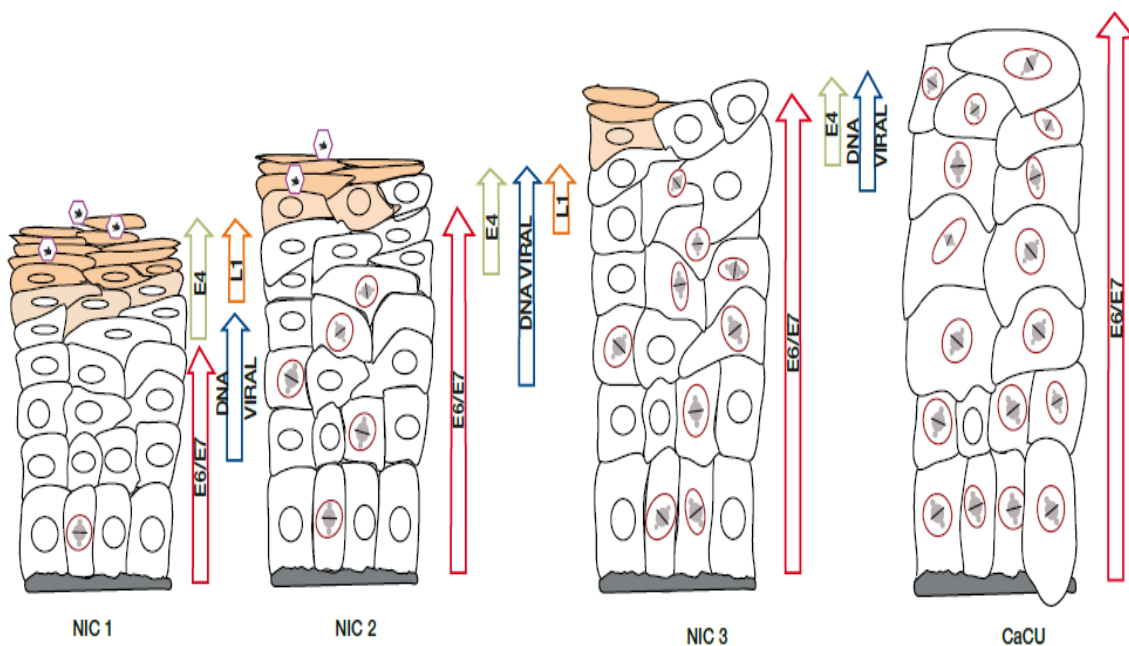


Figura 4 Evolución de las lesiones intraepiteliales cervicales hacia cáncer y su relación con productos del VPH. Tomado de Manzo-Merino *et al*, 2014



Las lesiones cervicales de bajo grado (NIC1) se asemejan a las infecciones productivas, mientras que las lesiones de alto grado como NIC2 y NIC3 tienen una fase proliferativa más extensa, y las etapas productivas del ciclo de vida del virus son deficientes (Doorbar, 2005).

La respuesta inmune es un factor clave en la lucha contra la infección por VPH y la carcinogénesis cervical. Sin embargo, el VPH puede promover la evasión inmunológica a través de la expresión del oncogén E5, que es responsable de la modulación de varios mecanismos inmunitarios, incluida la presentación de antígenos y la vía inflamatoria (Wang *et al*, 2018).

### **3.3 Sistema Inmune**

El sistema inmunológico es un conjunto interactivo de órganos linfoides, células, factores humorales y citocinas. La función esencial del sistema inmunológico en la defensa del huésped se ilustra mejor cuando éste falla; una subactividad del mismo resulta en infecciones graves y tumores, en cambio una hiperactividad resulta en enfermedades alérgicas y autoinmunes (Parkin y Cohen, 2001).

Sus principales funciones son la defensa contra microorganismos y la inmunovigilancia contra la emergencia de tumores y de enfermedades autoinmunes y alérgicas. Desde el punto de vista funcional podemos clasificarlo en Sistema Inmune Innato y Adquirido (o específico). Sin embargo, esta clasificación es sólo didáctica, ya que ambos sistemas funcionan de manera integrada. Esto se evidencia de dos formas: La primera, es que el sistema inmune innato activa el sistema inmune adquirido en respuesta a las infecciones, y la segunda consiste en que el sistema inmune adquirido utiliza los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar los microorganismos (Toche, 2012).

#### **3.3.1 Inmunidad Innata**

El Sistema Inmune Innato es la primera línea de defensa del huésped. Posee mecanismos pre-existentes que se activan de manera rápida y que preceden a la Inmunidad Adaptativa en la respuesta defensiva. Responde de la misma manera frente a diferentes estímulos infecciosos y posee una especificidad limitada, es decir, distingue estructuras comunes a grupos de microorganismos pudiendo no distinguir diferencias finas entre ellos (Toche, 2012).

La inmunidad innata está representada por barreras físicas, químicas y biológicas, células especializadas y moléculas solubles, presentes en todos los individuos, independientemente del contacto previo con agentes ofensivos o inmunógenos, y no

cambia cualitativamente ni cuantitativamente después del contacto. Las principales células efectoras de la inmunidad innata son macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CDs) y células asesinas naturales (NK). La fagocitosis, la liberación de mediadores inflamatorios, la activación de las proteínas del sistema del complemento, así como la síntesis de proteínas de fase aguda, las citocinas y las quimiocinas son los mecanismos principales en la inmunidad innata. Estos mecanismos son activados por estímulos específicos. Las moléculas que se encuentran comúnmente en la superficie de los microorganismos, como los lipopolisacáridos, la manosa y los ácidos teicoicos, constituyen patrones moleculares asociados a patógenos y activan la respuesta inmune innata mediante la interacción con diferentes receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patrones, entre los cuales se encuentran: Familia de receptores tipo Toll (TLRs). Esta interacción es similar a la complementariedad entre el antígeno y el anticuerpo o entre el antígeno y el receptor de células T (TCR), pero en este caso, no hay diversidad o capacidad de adaptación para generar nuevos receptores. o reconocimiento de nuevos patrones moleculares que aquellos ya programados en el código genético (Cruvinel *et al*, 2010).

### **3.3.2 Inmunidad Adaptativa**

Las características principales de la respuesta adaptativa son: especificidad y diversidad de reconocimiento, memoria, respuesta especializada, autocontrol y tolerancia a los componentes del propio organismo. Aunque las principales células involucradas en la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos, las células presentadoras de antígenos desempeñan un papel clave en su activación, presentando los antígenos asociados con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) al linfocito T (Cruvinel *et al*, 2010).

La inmunidad adaptativa depende del reconocimiento de antígenos específicos por los linfocitos T o B citotóxicos y la posterior formación de anticuerpos correspondientes. Esto requiere linfocitos T cooperadores (Th). Los dos tipos principales son Th1, asociado con los linfocitos T citotóxicos y Th2 asociado con los linfocitos B. La regulación del sistema inmunológico depende del equilibrio entre estos dos tipos de células. La inmunidad específica se adquiere cada vez que se encuentran nuevos antígenos, incluidos microorganismos. Cada vez que el sistema inmunitario se encuentra con una nueva infección, desarrolla o aprende inmunidad contra esa infección, y se forma una memoria inmunológica para que la próxima vez que se encuentre la misma infección, el individuo sea inmune y no haya una respuesta inflamatoria (Storey y Jordan, 2008).

El sistema inmune adaptativo posee dos tipos de respuestas inmunes: Inmunidad Humoral e Inmunidad Celular. La Respuesta Inmune Celular es mediada por linfocitos T y constituye

el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) promoviendo la destrucción de estos en fagocitos o eliminando células infectadas. Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos T CD4+ cuya principal función es la secreción de citoquinas y los linfocitos T CD8+ que eliminan células infectadas y tumorales. La Respuesta Inmune Humoral es mediada por anticuerpos o Inmunoglobulinas que son secretados por los linfocitos B. La inmunidad humoral constituye el principal mecanismo de defensa frente a infecciones bacterianas. Los anticuerpos o Inmunoglobulinas (Ig) son polipéptidos compuestos por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas. Poseen una región constante que determina su isotipo (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) y funciones biológicas, además de una región hipervariable (Fab) de unión al antígeno (Toche, 2012).

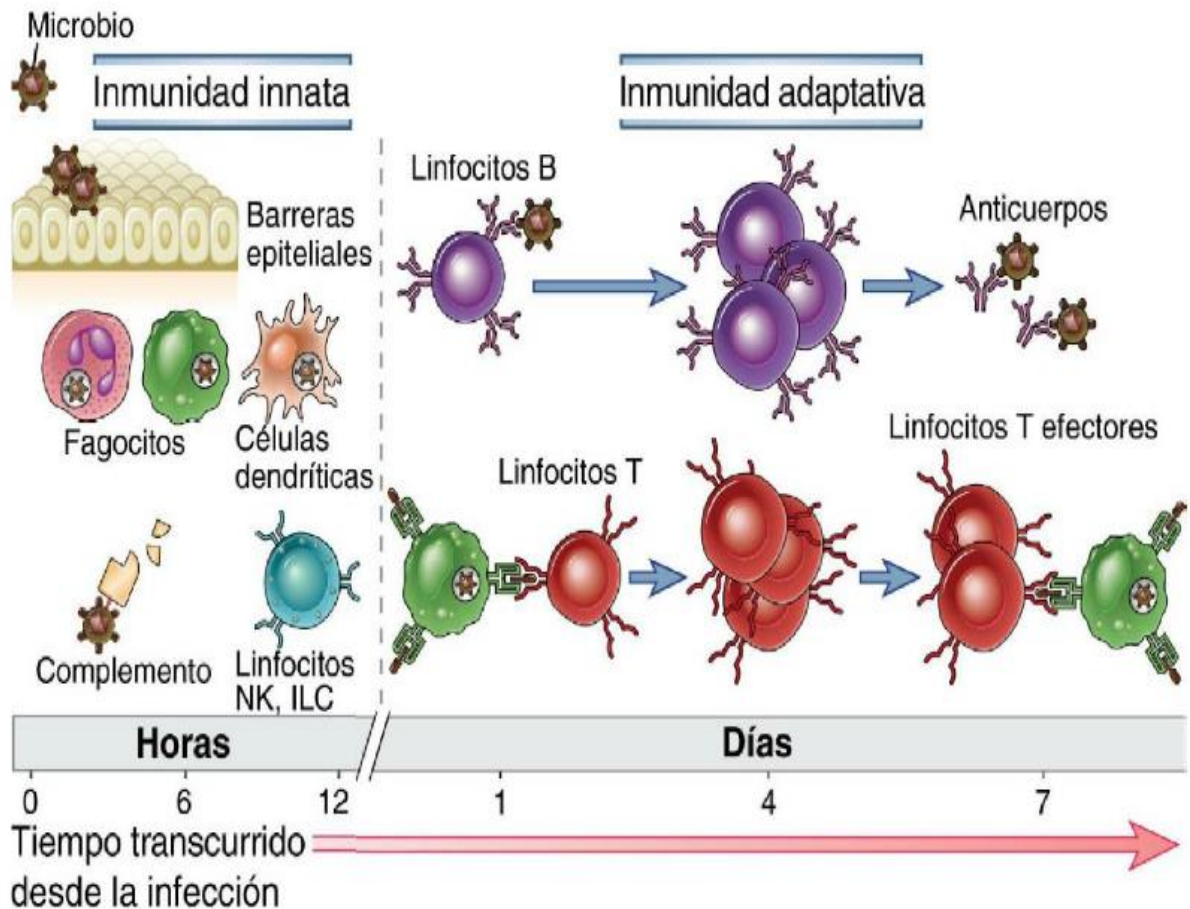


Figura 5. Inmunitades innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa inicial contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas aparecen después y requieren la activación de los linfocitos. La cinética de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa son aproximaciones y pueden variar en diferentes infecciones. Tomada de Abbas et al, 2015

### 3.3.3 Respuesta Inmune contra VPH

La piel representa la primera defensa contra las infecciones por VPH y otros patógenos. Un papel crítico para el sistema inmunológico de la piel es distinguir entre los organismos que representan una amenaza y los que coexisten mutuamente con el huésped. La piel es un sitio inmunológicamente activo, la actividad inmunológica es desencadenada por daño tisular, inflamación y reconocimiento inmune de patrones moleculares asociados a patógenos, además, las células epiteliales producen una variedad de compuestos antimicrobianos que incluyen  $\alpha$ -defensinas que bloquean la localización nuclear del VPH. (Hibma, 2012)

Tras la infección de las células del epitelio por VPH, se desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos, intervención de células asesinas naturales (NK), de anticuerpos naturales, e incluso del sistema del complemento, que formarán una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. Las células reticulares de Langerhans (LC), y algunos queratinocitos funcionan como células presentadoras de antígenos (APC). Estas células fagocitan partículas virales para digerirlas en endosomas y comenzar un proceso de activación, que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con MHC clase II, CD40 y B7, así como la migración a los ganglios linfáticos locales. Las LC junto con el MHC, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), y citocinas como IL-12 o IL-10, activan los LT nativos y dirigen su diferenciación hacia células efectoras. La información adquirida por las células dendríticas (DC) dirige la inmunidad mediada por Linfocitos T cooperadores o citotóxicos, Th1 o Th2. Las DC emplean un patrón de reconocimiento por medio de receptores tales como los de la familia “toll-like receptor” (TLR), que detectan la infección. Las células NK inducen la apoptosis de las células infectadas por el virus y de las células tumorales. (Rincón *et al*, 2007)

Como segunda línea de defensa, la inmunidad adaptativa, inducida por las células presentadoras de antígeno a través de una respuesta Th1 (Linfocitos T Cooperadores), puede eliminar las células infectadas por el VPH a través de los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) dirigidos a las oncoproteínas E2, E6 y E7. Las células T  $\gamma\delta$  podrían mejorar la función de los CTL contra el VPH, ya que están presentes en el tracto genital y mejoran la respuesta Th1. Paralelamente, la inmunidad humoral local específica del cuello uterino contribuye a la defensa del huésped contra el VPH. En la lámina propia del endocervix, se detectan numerosas células plasmáticas que producen IgG e IgA. En los modelos de infección en animales, la respuesta inmune mediada por células es seguida de cerca por la seroconversión y la producción de anticuerpos contra la proteína de la cápside principal L1. En humanos, la seroconversión se detecta entre 6 y 18 meses después de la primera prueba de ADN para VPH en sujetos con infección persistente (Figura 6) (Van hede, 2014).

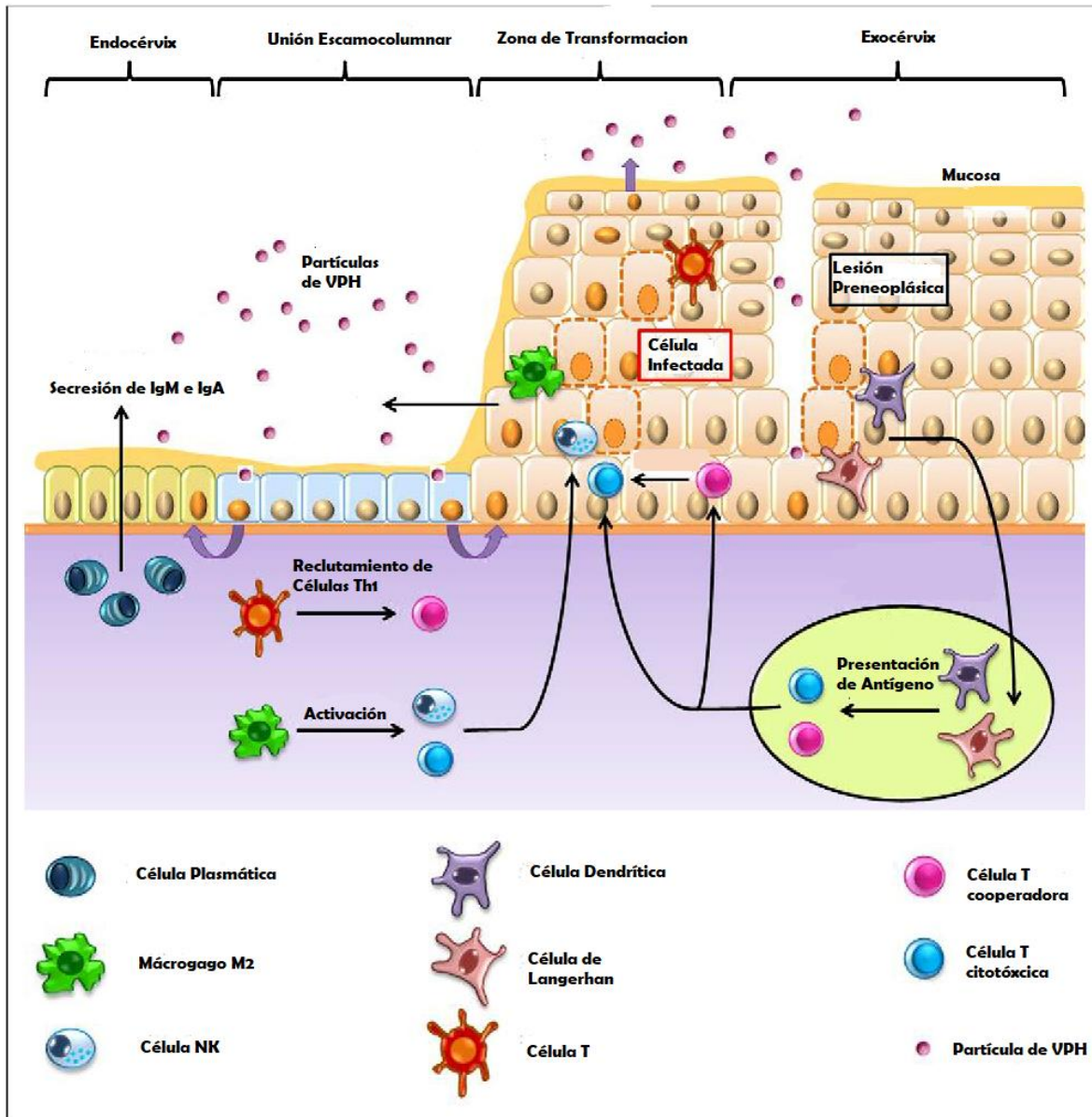


Figura 6. Respuesta del Sistema Inmune a la Infección contra el VPH. Tomada de Van Haden, 2014

### 3.3.4 Infección por VPH e Inmunescape del CaCU

Los queratinocitos cervicales son el tipo de célula principal en la epidermis, con ciertas funciones inmunes, como la secreción de citocinas. La defensa inmunitaria innata comprometida en estos, es una característica importante de la evasión de la infección por VPH a la respuesta inmune, lo que finalmente resulta en una infección por virus persistente y el desarrollo hacia lesiones pre-neoplásicas. Las proteínas del VPH regulan a la baja las vías de señalización inmunes innatas en los queratinocitos infectados. La liberación de las citocinas pro-inflamatorias se reduce y, en consecuencia, hay menos activación y migración de células de Langerhans y menos reclutamiento de CD y macrófagos del estroma. Se sabe

que, *in vitro*, E6 y E7 pueden reducir los niveles superficiales de E-cadherina, lo que puede interferir con la migración de las células de Langerhans y estas, no se activan por la internalización de las cápsides del VPH. Los números de células de Langerhans disminuidos y la E-cadherina reducida son características reconocidas de la infección por VPH. Las células epiteliales normalmente secretan citocinas para inducir la quimiotaxis, lo que conduce a la repoblación de los precursores de células de Langerhans. Esta actividad quimiotáctica está mediada a través de la proteína inflamatoria de los macrófagos, MIP-3 $\alpha$ . La expresión de MIP-3 $\alpha$  se inhibe en células que muestran evidencia de expresión de E6 y E7 con el deterioro resultante de la presentación del antígeno. En contraste, las CD estromales se pueden activar y estimular las células T específicas del VPH (Song *et al* 2015; Ibeanu, 2011).

Más allá de sus propiedades oncogénicas, las proteínas E6 y E7 inducen múltiples mecanismos para la evasión inmune innata, especialmente en las primeras etapas de replicación. Recientemente, se muestra que E7 afecta la respuesta del Regulador de IFN tipo1 (IRF-1) al regular negativamente la activación de TLR9. A diferencia de TLR9, las vías TLR 3, 5y 8 se activan en queratinocitos infectados por VPH de alto riesgo. Los altos niveles de expresión de TLR8 en células de cáncer cervicouterino se asocian con la sobreexpresión del linfoma de Células-B 2 (CTE-2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en estas células. Además, se descubrió que hay una expresión marcada de TLR4 en las células positivas para VPH de alto riesgo y que su expresión está asociada con el tipo de virus, así como con el grado histopatológico. Una mayor expresión de TLR4 se encuentra en las células VPH-16 en comparación con las células VPH-18, y en el cáncer cervicouterino en comparación con las Neoplasias Intraepitelial Cervicales. Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de TLR4 se correlaciona con la resistencia apoptótica de las células infectadas con VPH. La proteína E6 desempeña un papel en la modulación directa del sistema inmunológico al regular a la baja el Factor Regulador del Interferón tipo 3 (IRF-3), un factor de transcripción conocido del IFN- $\beta$ , lo que disminuye la respuesta inmune contra los antígenos del VPH. E6 también disminuye a la respuesta inmune inducida por el IFN- $\alpha$ , al inhibir la fosforilación de la tirosina cinasa 2 (TYK-2) a través de la vía STAT / TYK-2 y, por lo tanto, evita la unión entre IFN- $\alpha$  y su receptor. Además, la regulación a la baja de IFN- $\kappa$  por E6, probablemente debido a la hipermetilación dependiente de E6, reduce el transductor de señal y el activador de la transcripción 1 (STAT1), así como la expresión del TLR3, el miembro 10 de la superfamilia TNF de las proteínas pro-apoptóticas (TNFSF10) y el factor 1 asociado a XIAP (XAF1) y p53. Este inadecuado microentorno coestimulador parece inducir una función deficiente de las células de Langerhans (Song *et al* 2015; Estevao *et al*, 2019)

También los macrófagos pueden ser parte de la progresión de la enfermedad. Se sabe que los macrófagos asociados a tumores, también denominados macrófagos M2, pueden promover la proliferación y migración de las células cancerosas, la angiogénesis y la restricción de las defensas inmunitarias. Durante la progresión de la lesión cervical, el



número de macrófagos M2 aumenta significativamente. El aumento de M2 es un evento clave para el proceso patológico de la carcinogénesis. Los macrófagos M2 en los tumores pueden romper la membrana basal permitiendo el crecimiento del tumor y la metástasis. También promueven la diferenciación de células T nativas a células reguladoras T a través de IL-10. Las células presentadoras de antígenos cervicales captan y procesan los antígenos del VPH para presentarlos a las células B y T en el ganglio linfático e inician una respuesta inmune adaptativa contra la infección por VPH. La respuesta inmune adaptativa también está dirigida por una proteína de VPH, ya que la proteína E5 puede regular negativamente el procesamiento de las moléculas MHC en la superficie celular, lo que evita el reconocimiento de los CTL de las células infectadas. En adenocarcinomas pobremente diferenciados, la secreción de inmunoglobulinas se ve afectada (Figura 7) (Van hede, 2014; Song *et al* 2015).

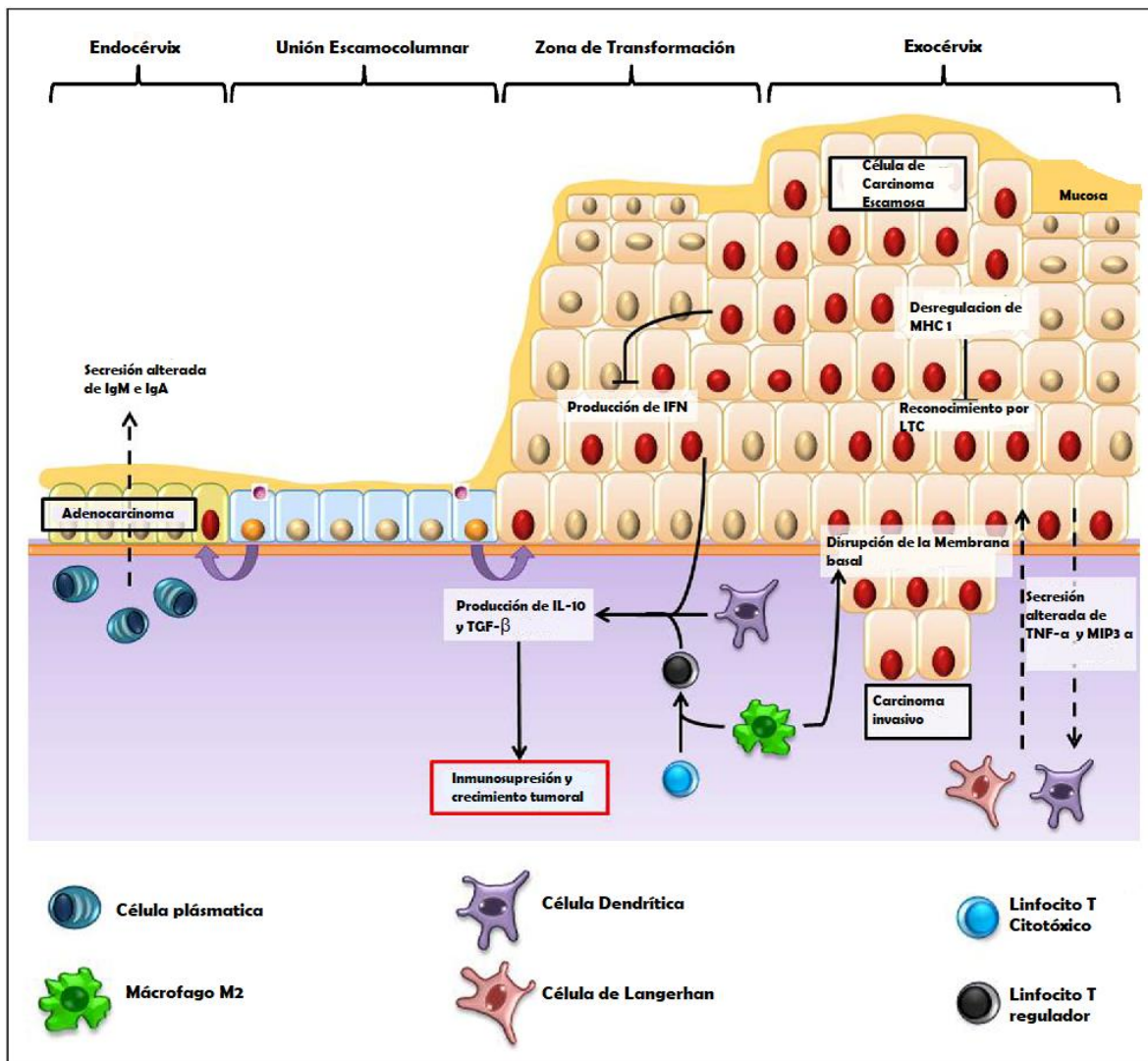


Figura 7. Inmunoescape de Células infectadas por VPH. Imagen Tomada de Van hede, 2014)

Se sabe, además que la infección por VPH solo ocurre en las células epiteliales, la presentación de antígenos virales al sistema inmune del huésped está restringida. La carga viral y la persistencia determinan la violencia de la respuesta de anticuerpos. La presencia de anticuerpos contra el VPH es a largo plazo, pero no ayuda a eliminar las infecciones establecidas. Se considera que las proteínas de la cápside del VPH (L1 y L2) estimulan las respuestas de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Se ha demostrado que los anticuerpos anti-L1 neutralizantes son tipo-específicos. Los anticuerpos anti-L2 son menos eficientes que los anticuerpos anti-L1, debido a que un pequeño fragmento de la proteína L2 puede exponerse en la superficie y ser reconocido por los anticuerpos neutralizantes. En contraste con los anticuerpos anti-L1, los anticuerpos anti-L2 muestran reactividad cruzada a varios genotipos de VPH (Kardani *et al*, 2015).

### 3.4 Vía Adenosinérgica

El Trifosfato de Adenosina (ATP) extracelular es una importante molécula de señalización del sistema inmunológico. El ATP extracelular regula la activación de los inflammasomas NLRP3, promueve la quimiotaxis de los fagocitos e induce la expresión de los genes sensibles al Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa (HIF1- $\alpha$ ). El ATP y sus metabolitos Difosfato de Adenosina (ADP), Monofosfato de Adenosina (AMP) y adenosina (Ado) también son reguladores importantes en la homeostasis inmune. La hidrólisis de ATP a Ado, así como la concentración de Ado extracelular se determina mediante un complejo mecanismo de ectoenzimas y un sistema de captación (Dong *et al*, 2016). Las nucleotidasas unidas a membrana y las solubles son responsables en la hidrólisis del ATP extracelular y, además, están implicadas en diversas afecciones patológicas. Las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73, en particular, han demostrado ser críticas para el catabolismo de ATP extracelular a la adenosina y, por lo tanto, para el mantenimiento en la homeostasis inmune (Figura 8) (Allard *et al*, 2016).

El ATP / ADP se hidroliza en AMP por CD39 (ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, E-NTPDase1), el cual sucesivamente es hidrolizado en adenosina por la ecto-5'-nucleotidasa (CD73, NT5E). La adenosina generada puede ser desaminada y convertirse en inosina a través de la actividad de Adenosina Desaminasa (ADA), la cual se encuentra asociada a su cofactor dipeptidil-peptidasa 4 (CD26) (Dong *et al*, 2016).

El sistema de captación, que incluye transportadores de nucleósidos de equilibrio y transportes de nucleósidos de concentración, envía adenosina extracelular al espacio intracelular, regulando así la concentración de adenosina extracelular y terminando la señalización del receptor de adenosina. La adenosina activa sus receptores de superficie celular acoplados a la proteína G en las células diana, que generan diversas respuestas celulares que tienen como objetivo restaurar la homeostasis inmune. Hasta la fecha, se han



identificado cuatro receptores de adenosina: A1, A2A, A2B y A3. Los receptores A1, A2A y A2B están conservados y son altamente homólogos (80-95%), mientras que A3R varía sustancialmente entre las diferentes especies. La señalización del receptor de adenosina depende del nivel de adenosina extracelular. Los datos acumulados han demostrado que la adenosina se comporta como una señal inmunosupresora a través de la activación de sus receptores (Dong *et al*, 2016).

Se ha demostrado que la vía adenosinérgica media la supresión inmunitaria y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la misma. (Dong *et al*, 2016). La vía adenosinérgica fue caracterizada primero por Yegutkin y colaboradores en células endoteliales humanas y linfocitos tanto de donadores normales como de pacientes leucémicos. Las ectonucleotidasas CD39 y CD73 se expresan en varios tipos de células: CD39 se expresa en monocitos, células B y en un subconjunto de células T; mientras que CD73 se expresa en subconjuntos de células T, células mieloides, células estromales de médula ósea, células epiteliales tímicas y células B humanas. Además, la inducción de CD39 se promueve con la exposición a citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-6 e IL-27), estrés oxidativo e hipoxia. Células B, Tregs, células Th17, células NK y células supresoras derivadas de mieloides pueden coexpresar CD39 y CD73 (Ferretti *et al*, 2018).

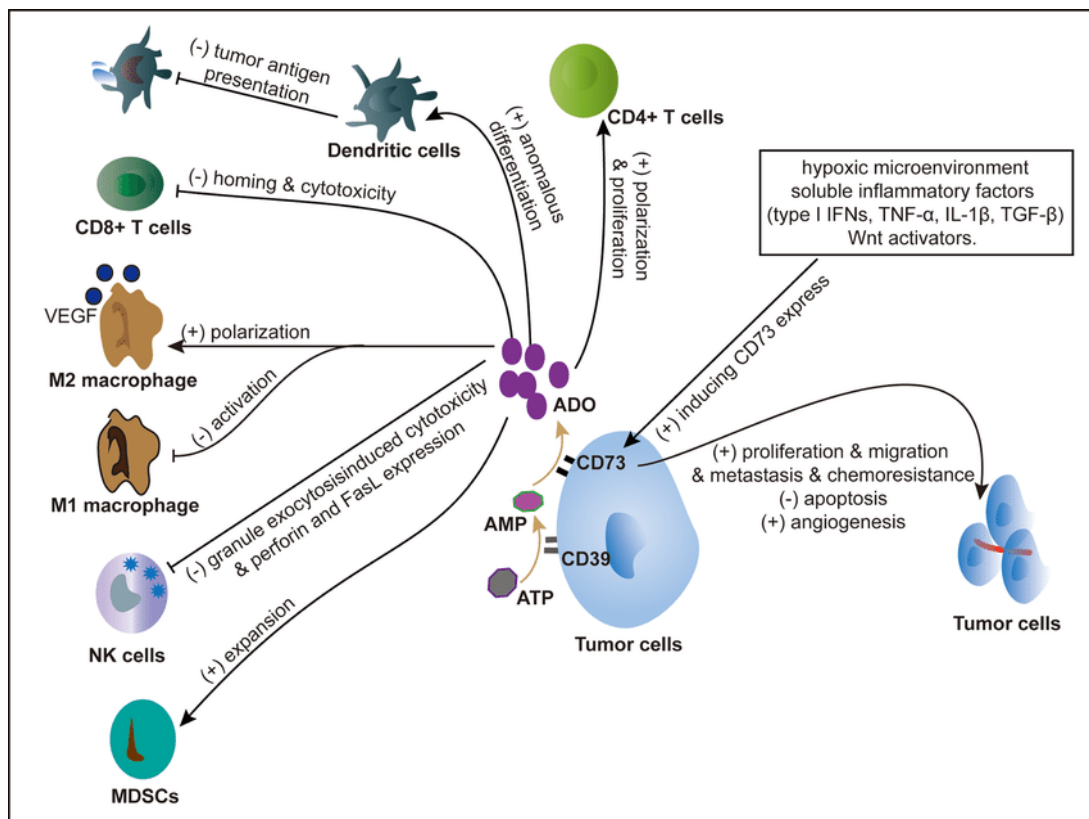


Figura 8. Vision General de la Via Adenosinergica. Tomada de Wang *et al*, 2017

### 3.4.1 Papel de la Adenosina en el Sistema Inmune

La adenosina (Ado) es un nucleósido de purina, que desempeña funciones importantes en diferentes sistemas de órganos humanos (es decir, sistemas nervioso, reproductor, cardíaco, renal, respiratorio, hepático e inmune) (Ferretti *et al*, 2018).

La adenosina es una molécula que ejerce una señal inmunosupresora y puede proteger a las células y los tejidos de una respuesta inflamatoria excesiva y de un daño mediado por la respuesta inmune (Dong *et al*, 2016).

La concentración de esta molécula en fluidos biológicos y espacios extracelulares es en general muy baja (<100nM). Sin embargo, los niveles de Ado aumentan dramáticamente en condiciones de estrés, como hipoxia, cáncer, lesión tisular, respuestas inflamatorias o sepsis cuya concentración puede ser mayor a 100  $\mu$ M (Ferretti *et al*, 2018).

Varias fuentes de Ado extracelular pueden liberarse pasiva o activamente en el microambiente del tumor. La adenosina extracelular se produce probablemente ya sea debido a la difusión pasiva o al transporte activo de adenosina intracelular o debido a la hidrólisis enzimática de ATP extracelular (Zhang, 2010).

En condiciones hipóxicas, la privación de oxígeno limita la disponibilidad de fuentes de energía e induce la acumulación de ATP a nivel extracelular el cual es hidrolizado a adenosina en los tumores. Tras la liberación de ATP al microambiente tumoral, las señales de ATP a través de los receptores purinérgicos principalmente P2 (P2XR y P2YR), promueven la inmunidad antitumoral. Alternativamente, el ATP extracelular se degrada rápidamente en adenosina, y la adenosina se une a los receptores purinérgicos P1 para dificultar la infiltración y activación de las células inmunitarias (Vijayan, 2017).

La Ado extracelular puede ejercer un efecto sobre el microambiente inmune del tumor a través de múltiples vías:

1. Limitando la actividad citotóxica de las células inmunitarias efectoras. Las células T reguladoras (células Treg) son una subpoblación de células T que modulan la respuesta inmune y mantienen la tolerancia inmunológica. Las células Treg generalmente suprimen la respuesta inmunitaria al suprimir la proliferación y la función de las células T efectoras. Se ha demostrado que la función supresora de las células Treg depende de la expresión de CD73 en la superficie de las células Treg. Se ha reportado que las células Treg CD4+CD25+CD73+ inhiben fuertemente la proliferación de células T efectoras cuando son mantenidas en co-cultivo, mientras que las células CD4+CD25-CD73- no presentaron dicha actividad inmunosupresora (Dong *et al*, 2016).

La Ado reduce de manera significativa la activación de células T CD8+ e inhibe la actividad efectora de células NK al interferir en el proceso de exocitosis de gránulos citotóxicos y reducir la capacidad de las células NK para adherirse a las células tumorales (Wang *et al*, 2017; Zhang, 2010).

2. Mejorando de los efectos inmunosupresores:

Ado inhibe la activación de macrófagos M1 e induce la polarización de macrófagos M2 a través de su interacción con los receptores A2A y A2B. Las células supresoras de origen mieloide (MDSC, por sus siglas en inglés) desempeñan un papel vital en el daño de la vigilancia inmunológica del tumor. La Ado promueve la expansión y acumulación de la MDSC en el medio tumoral mediante la participación de los receptores A2B en las células precursoras mieloides. (Wang *et al*, 2017)

3. Induciendo la diferenciación anómala y debilitando la función de las células presentadoras de antígeno. El enlace Ado con el receptor A2B puede alterar el fenotipo de las células dendríticas, disminuir el nivel de presentación del antígeno tumoral y aumentar la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Wang *et al*, 2017).

Además de regular al sistema inmunitario, la Ado participa en la angiogénesis y en la proliferación, diferenciación y la apoptosis de las células cancerosas. Por tanto, la presencia de Ado en el estroma tumoral afecta de manera directa el desarrollo, progresión y metástasis tumoral, a través de sus efectos directos sobre las células cancerosas (Antonioli, 2013; Wang *et al*, 2017).

### 3.4.2 CD73

La ectoenzima CD73 (ecto-5'-nucleotidasa; EC 3.1.3.5) es codificada por el gen *NT5E*, existe como homodímero, de manera soluble o unido a la membrana. El CD73 unido a la membrana es una proteína de 70 KDa, se ancla a través de una unión glicosilfosfatidilinositol, mientras que la forma soluble es un resultado de la escisión proteolítica o específica del fosfatidilinositol (Allard *et al*, 2016; Wang *et al*, 2017; Zhang, 2010).

Desde un punto de vista estructural, el CD73 está organizado en tres dominios: (i) un dominio N-terminal que contiene sitios de unión a metales; (ii) un dominio C-terminal que contiene el sitio catalítico; y (iii) una hélice alfa corta que une los dominios N y C-terminal. Se han descrito glicofomas de CD73 con diferentes pesos moleculares y actividades enzimáticas. El CD73 funcional consiste en un homodímero unido de forma no covalente estabilizado por interacciones hidrófobas entre dominios C-terminales adyacentes. La

homodimerización de CD73, así como la unión de dos iones de zinc, se requieren para la actividad catalítica. Los homodímeros CD73 existen en dos conformaciones: abierta y cerrada. La hidrólisis de AMP requiere que la enzima realice ciclos a través de estados conformacionales abiertos y cerrados (Allard *et al*, 2017)

CD73 cataliza la conversión de adenosina (Ado) de AMP liberada al ambiente extracelular y controla una variedad de respuestas fisiológicas, así como el desarrollo de cáncer. (Wang *et al*, 2017)

CD73 tiene funciones no enzimáticas y enzimáticas en el entorno del tumor. Para las funciones no enzimáticas, CD73 desempeña un papel fundamental para la proliferación de células tumorales, adhesión celular, la angiogénesis y la apoptosis, a través de la modulación de la señalización extrínseca, como EGFR / Akt, VEGF / Akt y el deterioro de la inmunidad antitumoral. CD73 otorga a las células tumorales un fenotipo invasivo, al reducir la adhesión célula-célula e inducir la transición epitelio mesénquima (TEM) a través de la regulación de cadherina-1 y vimentina. Así que CD73 contribuye significativamente a la metástasis tumoral. Las funciones enzimáticas se refieren a la adenosina generada por CD73 que desempeña un papel importante en la tolerancia inmune del tumor (Wang *et al*, 2017; Allard *et al*, 2016).

Se cree que CD73, originalmente definido como un antígeno de diferenciación de linfocitos, funciona como una molécula de señalización en los linfocitos T, y como una molécula de adhesión que es importante para la unión de los linfocitos al endotelio. Estudios recientes han implicado a CD73 en el control de una variedad de respuestas fisiológicas; incluido el transporte de iones y fluidos epiteliales, pre-condicionamiento isquémico, lesión tisular, función plaquetaria, hipoxia y fuga vascular. Sin embargo, el papel de CD73 en el cáncer sigue siendo objeto de estudio. Se sabe que CD73 participa en interacciones célula-célula y célula-matriz (Zhang, 2010).

#### **3.4.2.1 Regulación de la Expresión de CD73**

Estudios recientes demostraron que CD73 estaba sobre-expresado en varios tipos de tumores malignos sólidos, acompañado de una alta actividad enzimática, que puede mediar en la producción de adenosina extracelular (Wang *et al*, 2017; Zhang, 2010)

Las células tumorales contribuyen por sí mismas a elevar los niveles de Ado en el microambiente tumoral a través de la actividad enzimática CD73 en la superficie de dichas células. Se asume, por lo tanto, que se induzcan altos niveles en la expresión de CD73 en el microambiente tumoral local (Zhang, 2010).

Además, la alta expresión de CD73 se ha asociado con un pronóstico adverso y un deterioro de la inmunidad antitumoral en varios cánceres humanos. Si bien la activación del factor

inducible por hipoxia (HIF) promueve la expresión de CD73 y la activación de la señalización adenosinérgica, otros factores también pueden regular la expresión de CD73 en el microentorno del tumor. Además, también se ha demostrado que la presencia de citocinas inflamatorias, como los IFN tipo I, IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2 y TGF- $\beta$  inducen la expresión de CD73 (Allard *et al*, 2016). Las vías de señalización tumoral, como WNT, mutaciones en TP53 o KRAS y pérdida de señalización del receptor de estrógeno también se han asociado con una mayor expresión de CD73 (Allard *et al*, 2017).

Dentro del estudio de CD73 se ha encontrado que, la expresión de esta ecto-enzima se ha relacionado con el aumento en la actividad de la misma, En 1998 Stefanovic y colaboradores demostraron que EGF está implicado en la regulación de la actividad de CD73 (5'-nucleotidasa), y que podría desempeñar un papel en la contractilidad y proliferación en células mesangiales (Antoniolli *et al*, 2016).

### 3.5 Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor, EGF) es un polipéptido de aproximadamente (6Kd) que promueve el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular a través de la unión del ligando con su receptor (EGFR) en la superficie celular. El EGF presenta 53 aminoácidos y 6 residuos de cisteína que confieren 3 puentes disulfuro intramoleculares («dominio EGF») a su estructura tridimensional, fundamentales para la afinidad con el receptor (Esquirol y Herrero, 2015). EGF se encuentra en concentraciones altas (50–500 ng/ml) en bilis, orina, leche y líquido prostático, en concentraciones medias (5–50 ng/ml) en lágrimas, líquido folicular, esperma y plasma seminal, y concentraciones bajas (1-2 ng/ml) en plasma, suero y saliva. (Wee y Wang, 2017)

La familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) desempeña un papel importante en el crecimiento de tumores. Este fenómeno requiere proteínas reguladoras del crecimiento, como el receptor de EGF (EGFR) o el protooncogén erbB2 (Meert *et al*, 2002).

El EGF tiene afinidad por el EGFR de la membrana celular; el complejo ligando-receptor activa la tirosina cinasa, iniciando cambios bioquímicos celulares sucesivos: aumenta el calcio intracelular, la glucólisis, la síntesis de proteínas y la expresión de algunos genes (como el propio gen del EGFR), llevando a la síntesis de ADN, al crecimiento y a la proliferación celular, derivando en la proliferación de los queratinocitos, aumentando su adhesividad y motilidad, mientras induce la acción de fosfatasa duales específicas que atenúan su propia señal, inhibiendo la propia actividad del EGF. En queratinocitos y otras células cutáneas, el EGF suprime la expresión de genes responsables de la diferenciación celular epidérmica, pero produciendo efectos distintos sobre la transcripción de los genes en células endoteliales y sobre líneas de células epiteliales transformadas y oncogénicas (Esquirol y Herrero, 2015).

La actividad incontrolada de EGF/EGFR se ha implicado en muchos procesos del desarrollo tumoral, incluyendo la promoción de proliferación celular, induciendo la expresión de ciclina D1, que promueve la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S. La angiogénesis al incrementar la producción de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la interleucina 8 y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), la invasión, la metástasis y la supervivencia (Lahera y González, 2010).

## 4. Planteamiento y Justificación del Problema

Es bien conocido que la infección por VPH de alto riesgo es el principal factor etiológico en el desarrollo de CaCU, sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos que favorecen la proliferación, invasión y metástasis de las células tumorales. Estudios recientes han reportado que la expresión de la ecto-nucleotidasa CD73 en la membrana de las células tumorales puede favorecer dichos mecanismos asociados a la progresión tumoral (Antoniolli *et al*, 2013; Dong *et al*, 2014).

Además, se sabe que la actividad de CD73, y por lo tanto su expresión, puede ser regulada por diferentes factores, por ejemplo, EGF (Stefanovic, *et al*. 1998), el cual además promueve la TEM y la migración de las células tumorales (Qureshi *et al*, 2015). Asimismo, se ha reportado que el EGF participa de manera importante en el desarrollo y evolución del CaCU (Schrevel *et al*, 2017; Zhu *et al*, 2016).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación recientemente reportó que células tumorales de CaCU expresan en membrana CD73 y son capaces de producir grandes cantidades de adenosina e inhibir a través de este nucleósido las actividades efectoras de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al*, 2017).

Tomando en cuenta estos antecedentes, el presente estudio tuvo como finalidad analizar si EGF induce incremento en la expresión de CD73 en células tumorales de CaCU, y si esta ecto-nucleotidasa juega un papel en la proliferación y capacidad migratoria de las células tumorales de CaCU.

Los resultados a obtener en este estudio serán de gran relevancia para contribuir en el entendimiento de los mecanismos que subyacen en la progresión de esta enfermedad.

## 5. Hipótesis

Se sabe que CD73 favorece la proliferación, migración e invasión de células tumorales independientemente de su actividad enzimática. Además, se sabe que EGF es capaz de inducir la expresión de CD73 en algunos tipos celulares. Nuestro grupo de investigación ha reportado que células tumorales de CaCU expresan en membrana CD73. En consecuencia, si se cultivan células tumorales de CaCU en presencia de EGF se espera encontrar un incremento en la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCU y que esta ectonucleotidasa favorezca la proliferación y migración de las mismas.

## 6. Objetivos

### General

Analizar el efecto de EGF sobre la expresión de CD73 y su participación en la proliferación y capacidad migratoria de células tumorales de CaCU.

### Particulares

- Determinar el efecto de EGF sobre la expresión de CD73 en células tumorales de CaCU.
- Analizar la actividad enzimática de CD73 en células tumorales de CaCU cultivadas en presencia de EGF.
- Analizar la participación de CD73 sobre la proliferación de células tumorales de CaCU.
- Analizar la participación de CD73 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCU.



## 7. Metodología

### 7.1. Células Tumorales y Condiciones de Cultivo

Para este estudio se utilizaron las líneas celulares CaSki (VPH+16) y HeLa (VPH+18), así como las células CaSki-CD73I (VPH+16, CD73-) y HeLa-CD73I (VPH+18, CD73-) generadas previamente en nuestro laboratorio de investigación empleando un vector pSIREN conteniendo un siRNA para inhibir la expresión de CD73 (CD73I). Asimismo, células tumorales transfectadas con el vector pSIREN conteniendo el gen reportero de luciferasa, fueron utilizadas como control irrelevante (Ctl-Irr) (García-Rocha *et al*, 2018)

Las células fueron cultivadas *in vitro* con medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) (Gibco BRL, Life Technologies, USA) al 10 % y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad y con una temperatura constante de 37°C en una incubadora (Forma Scientific, USA) con 5 % de CO<sub>2</sub> y un ambiente de humedad saturante.

### 7.2. Detección de CD73

La detección de CD73 se realizó mediante citometría de flujo de manera basal en las líneas celulares CaSki y HeLa, o tratadas previamente durante 72 horas con diferentes concentraciones de EGF (6.25, 12.5, 25, y 50 ng/mL) para determinar la concentración de EGF a utilizar en ensayos posteriores. Brevemente, en una placa de 96 pozos se colocaron  $5 \times 10^4$  células por pozo de cada línea celular. Posteriormente fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-CD73-PE (R&D Systems, USA) a una dilución 1:50 con solución amortiguadora (PBS + 2% SFB).

Posteriormente las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora, después se resuspendieron en 200 µL de solución de PBS conteniendo 2% de paraformaldehído y se transfirieron a tubos para la lectura de 10 000 eventos en un citómetro de flujo (FACS-Aria BD, USA), los datos obtenidos fueron reportados como Intensidad Media de Fluorescencia (IMF).

### 7.3. Actividad Enzimática de CD73

Para determinar la actividad enzimática de CD73 en las células tumorales de CaCU,  $5 \times 10^4$  células tumorales cultivadas previamente durante 72 horas en presencia o ausencia de EGF fueron incubadas en presencia o ausencia de 2.5 mM de AMP.

Para bloquear la actividad enzimática de CD73, en algunos cultivos se adicionó APCP (Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate, Sigma, USA) a una concentración final de 2.5 mM. La conversión de AMP a Adenosina se llevó a cabo un ensayo de cromatografía en capa fina. Para ello, al inicio de cada cultivo y después de 5 horas se tomaron alícuotas de 1  $\mu$ L de cada sobrenadante y éstos se colocaron sobre laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel para cromatografía en capa fina (CCF) (5.5cm x 5.5cm) (Sigma, USA).

Como testigos se emplearon muestras de 1  $\mu$ L de Adenosina (Ado) e Inosina (Sigma, Life science) a una concentración de 5 mM. Las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 5 mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol, alcohol isoamílico, etoxietanol, amoniaco y agua, en proporciones 9:6:18:9:15, respectivamente. La elución se dejó correr durante 60 minutos en la cámara de elución, y posteriormente fueron retiradas para su secado a temperatura ambiente. Finalmente, los productos generados fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador con cámara con luz ultravioleta (UV).

### 7.4. Proliferación Celular

Para analizar el efecto de EGF en la proliferación de las células tumorales de CaCU,  $2 \times 10^3$  células tumorales cultivadas previamente durante 24, 72 y 120 horas de incubación en presencia o ausencia de EGF, así como de AMP y APCP 10 mM, fueron sembradas por triplicado en placas de 96 pozos. Después de los tiempos de incubación antes mencionados se evaluó el número celular utilizando la técnica de incorporación de cristal violeta. Para ello, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS y se esperó a que los pozos se secan para eliminar cualquier residuo de PBS, en seguida se adicionó el colorante cristal violeta al 0.1% con etanol al 20 %, dejando actuar por 20 minutos, después se realizaron lavados exhaustivamente para eliminar el exceso de colorante y la placa se dejó secar al aire para después adicionar ácido acético al 10% por 15 minutos. Posteriormente se procedió a determinar la absorbancia de la solución de ácido acético a 590 nm por espectrofotometría en un lector de placas (Molecular Devices, USA).

### **7.5. Migración Celular In Vitro “Scratch”**

Placas de 6 pozos fueron preparadas para este tipo de ensayo, colocando una tira adhesiva sobre cada uno de los pozos y después fueron esterilizadas 20 minutos en presencia de luz UV.

Posteriormente se sembraron  $5 \times 10^5$  células tumorales CaSki, CaSki-CD73I, HeLa y HeLa-CD73I y fueron cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de EGF. Una vez formada la monocapa de células en adherencia, se procedió a retirar la tira para crear una herida. Se retiraron las células desprendidas mediante lavado suave con PBS. Después de eliminar el PBS se adicionaron 2 ml de medio RPMI + 1% de SFB, esto con el fin de minimizar la proliferación celular, pero justo lo suficiente para prevenir el desprendimiento de las células.

Se tomaron fotos de la zona de la herida a tiempo 0 y 72 horas después, y se comparó la velocidad en la cual las células situadas en el borde de la herida migraron para cubrir el área en donde las células fueron desprendidas

### **7.6. Análisis estadísticos**

Los datos numéricos se presentan como el valor promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas mediante análisis estadístico multivariado utilizando GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Prismsoftware, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas a una  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados

### 8.1. EGF aumenta la expresión de CD73 en células tumorales de CaCU

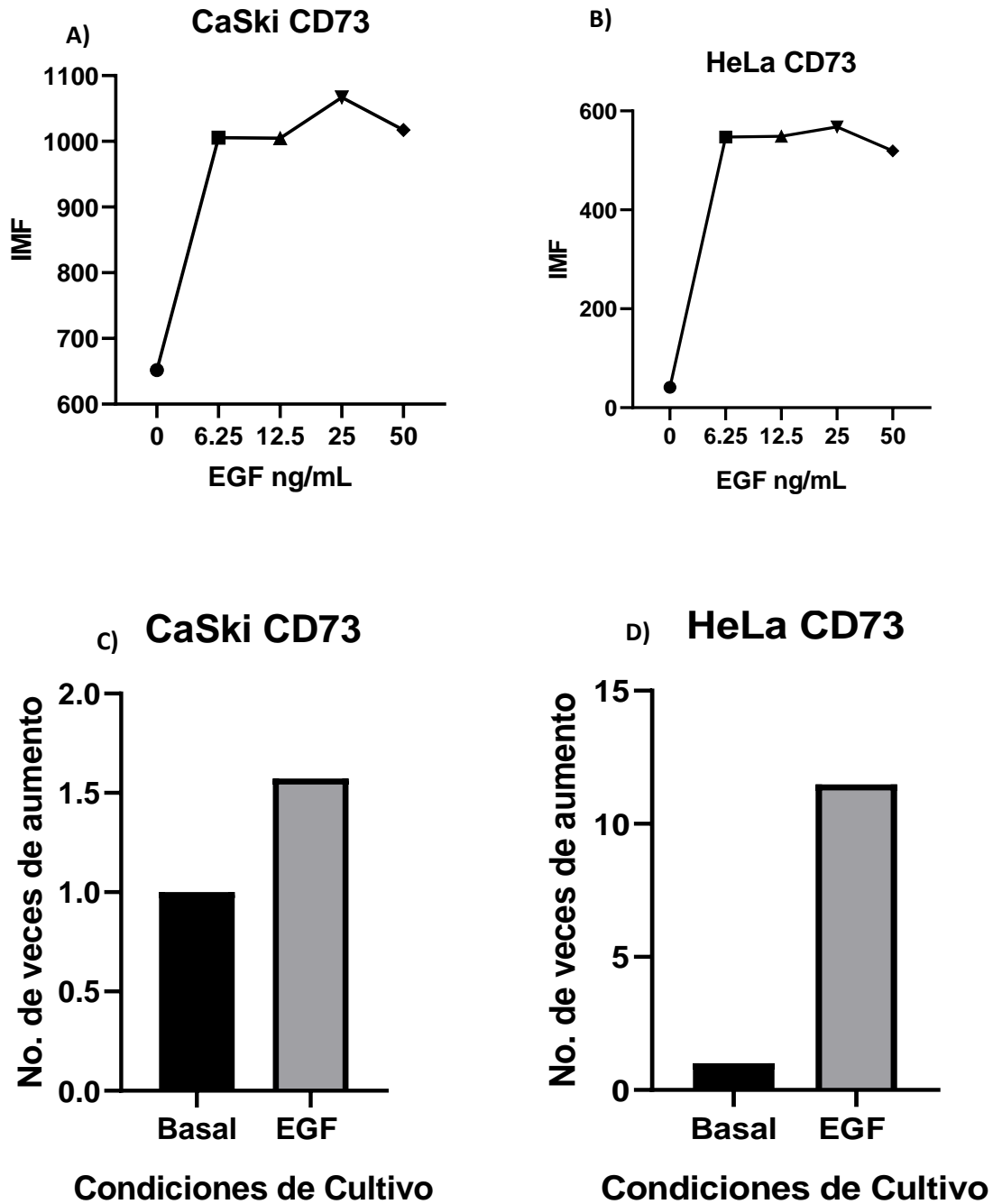
Nuestro grupo de trabajo fue el primero en reportar que células tumorales de CaCU positivas a la infección por VPH presentan mayor expresión de CD73 y capacidad de generar adenosina en relación con aquellas negativas a la infección por VPH (Mora-García *et al*, 2017).

Asimismo, en estudios previos hemos encontrado que algunas citocinas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) incrementa la expresión de CD73 en células tumorales positivas a VPH-16 y VPH-18 (Ávila-Ibarra *et al*, 2019). Tomando en consideración que el EGF participa de manera importante en el desarrollo y evolución del CaCU (Schrevel *et al*, 2017; Zhu *et al*, 2016), y que además está implicado en la movilidad y proliferación de varios tipos celulares (Stefanovic, *et al*. 1998), en el presente estudio se analizó el efecto de este factor en la proliferación y capacidad migratoria de las células tumorales CaSki y HeLa de CaCU.

En principio se analizó el efecto de EGF sobre la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCU. Para ello,  $5 \times 10^4$  células tumorales fueron tratadas durante 72 horas, con diferentes concentraciones (6.25, 12.5, 25, y 50 ng/mL) de este factor de crecimiento. Posteriormente se determinó la expresión de CD73 mediante citometría de flujo.

Es importante mencionar que a partir de 6.25 ng/mL de EGF ambas líneas celulares incrementaron la expresión de CD73 de manera importante, obteniéndose la mayor expresión de esta ectonucleotidasa a la concentración de 25ng/mL de EGF.

La Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD73 observada para CaSki y HeLa a nivel basal fue de 650 y 50, respectivamente. El tratamiento con 25ng/mL de EGF incrementó la IMF de CD73 a 1066 y 550 en CaSki y HeLa, respectivamente, correspondiendo a un incremento neto de 1.6 y 11 veces la expresión de CD73 en estas líneas celulares, respectivamente (Figura 9 C y D). Por tanto, la concentración de 25 ng/mL EGF fue utilizada en los experimentos subsecuentes.



**Figura 9. Efecto de EGF sobre la expresión CD73 en células tumorales de CaCU.** Las células tumorales CaSki y HeLa fueron cultivadas durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de EGF (0, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/mL). Posteriormente se determinó la expresión de CD73 en las células tumorales mediante citometría de flujo, considerando 10,000 eventos. Se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de la expresión de CD73 en la membrana de las células CaSki (A) y HeLa (B) a dichas concentraciones de EGF. Asimismo, se muestra el número de veces en el incremento de la expresión de CD73 de EGF en CaSki (C) y HeLa (D) a una concentración de 25 ng/mL de EGF, respecto a su expresión basal, la cual fue normalizada a 1.

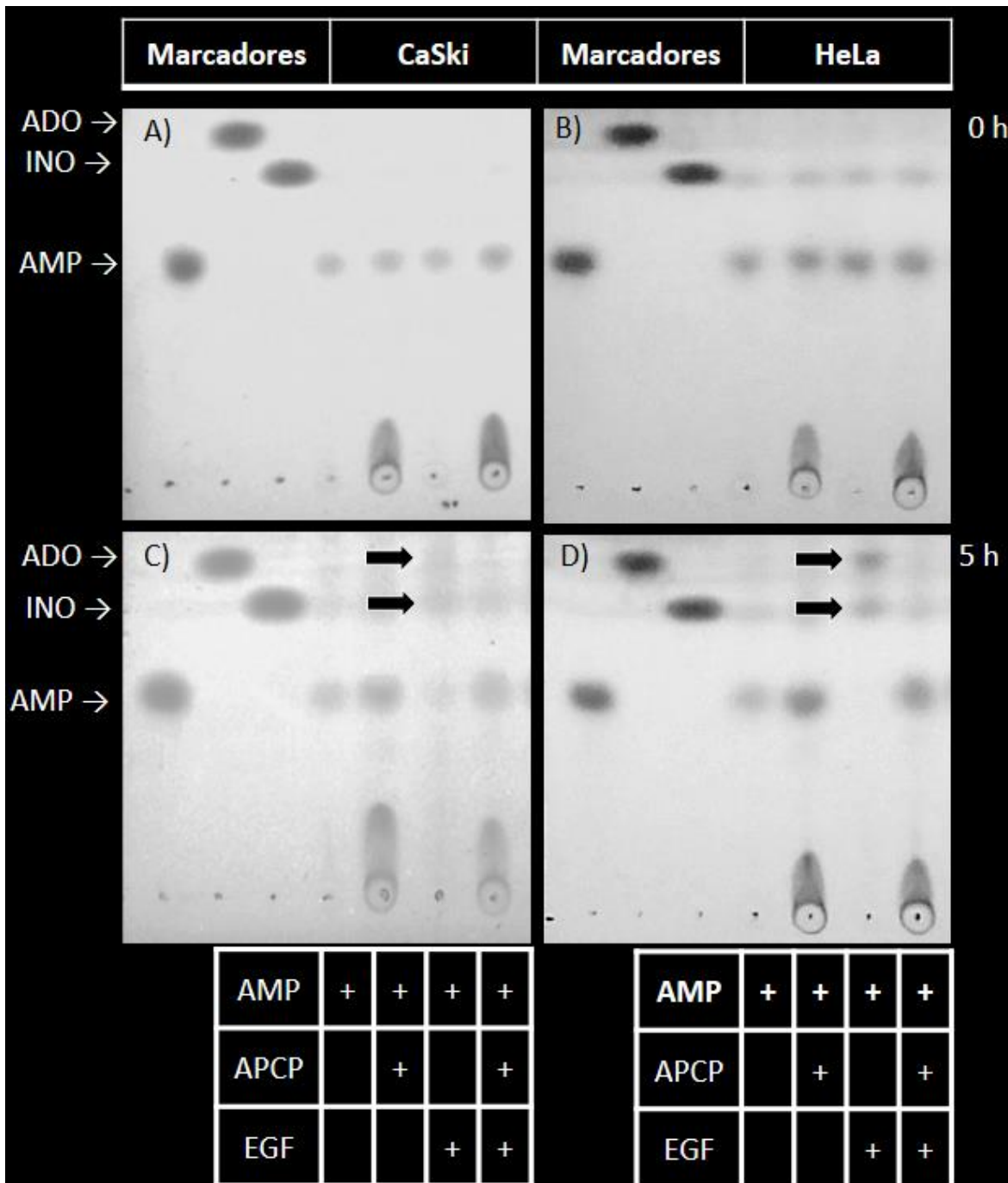
## 8.2. EGF induce incremento en la capacidad adenosinérgica de las células tumorales de CaCU

CD73 es una ecto-nucleotidasa anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI-) presente en balsas de lípidos de membrana celular, activa como un homodímero ligado a disulfuro, que cataliza la hidrólisis de AMP en Ado (Allard *et al*, 2012)

Con la finalidad de evaluar si el tratamiento con EGF incrementa la capacidad hidrolítica de AMP en las células tumorales de CaCU,  $5 \times 10^4$  células CaSki y HeLa previamente cultivadas con 25 ng/mL de EGF fueron incubadas en presencia de AMP y en presencia o ausencia de APCP, inhibidor específico de CD73. Al inicio y después de 5 horas de incubación se tomaron muestras de los sobrenadantes y se eluyeron en cromatografía en capa fina para analizar la hidrólisis de AMP.

Como se puede observar en la Figura 10, después de 5 horas de incubación, las células CaSki (Figura 10B) y HeLa (Figura 10D) hidrolizaron una gran cantidad de adenosina (carril 4). No obstante, las hidrólisis de AMP fue fuertemente inhibida en presencia de APCP (inhibidor específico de CD73), observándose un mayor contenido de AMP sin ser hidrolizado por ambas líneas celulares (carril 5).

De manera interesante, las células tumorales previamente tratadas con EGF mostraron mayor capacidad de hidrolizar AMP y generar tanto adenosina (flecha amarilla) como inosina (flecha azul), (Figuras 10B y 10D, carril 6). Es importante mencionar que las células HeLa tratadas con EGF hidrolizaron completamente el AMP, convirtiéndolo en adenosina e inosina (Figura 10D, carril 6). Por otra parte, la adición de APCP a los cultivos de CaSki y HeLa tratados con EGF, inhibió fuertemente la actividad de CD73 (Figuras 10B y 10D, carril 7). Estos resultados sugieren que el tratamiento con EGF además de incrementar fuertemente la expresión de CD73, también indujo incremento en la expresión de la enzima adenosina desaminasa.



**Figura 10. EGF incrementa la capacidad hidrolítica de AMP en células tumorales de CaCU.**  $1 \times 10^5$  células tumorales CaSki y HeLa fueron cultivadas durante 72 horas en presencia y ausencia de 25 ng/mL de EGF. Posteriormente las células tumorales fueron cultivadas en presencia de 2.5 mM de AMP y en presencia o ausencia de 2,5 mM de APCP, inhibidor específico de CD73, en un volumen final de 100 $\mu$ L. Al inicio (tiempo 0) o después al tiempo 5 horas de incubación, se tomaron muestras de 1 $\mu$ L de cada sobrenadante y se colocaron en placas de cromatografía en capa fina. Se muestra la elución de los productos de la hidrólisis al inicio y después de 5 horas de incubación en CaSki (A-B) y HeLa (C-D). Los carriles 1, 2 y 3 muestran los controles: AMP, adenosina (Ado) e inosina (INO), respectivamente.

### **8.3. EGF disminuye la proliferación celular e induce morfología tipo mesenquimal en células tumorales de CaCU**

La adenosina puede llevar a cabo la señalización celular en condiciones fisiológicas y patológicas, incluida la regulación de la tumorigénesis. Estos efectos están estrechamente relacionados con las concentraciones de adenosina extracelular, la expresión de receptores de adenosina en la superficie celular y los mecanismos de transducción de señales activados después de la interacción adenosina-ARs (Bavaresco, 2008).

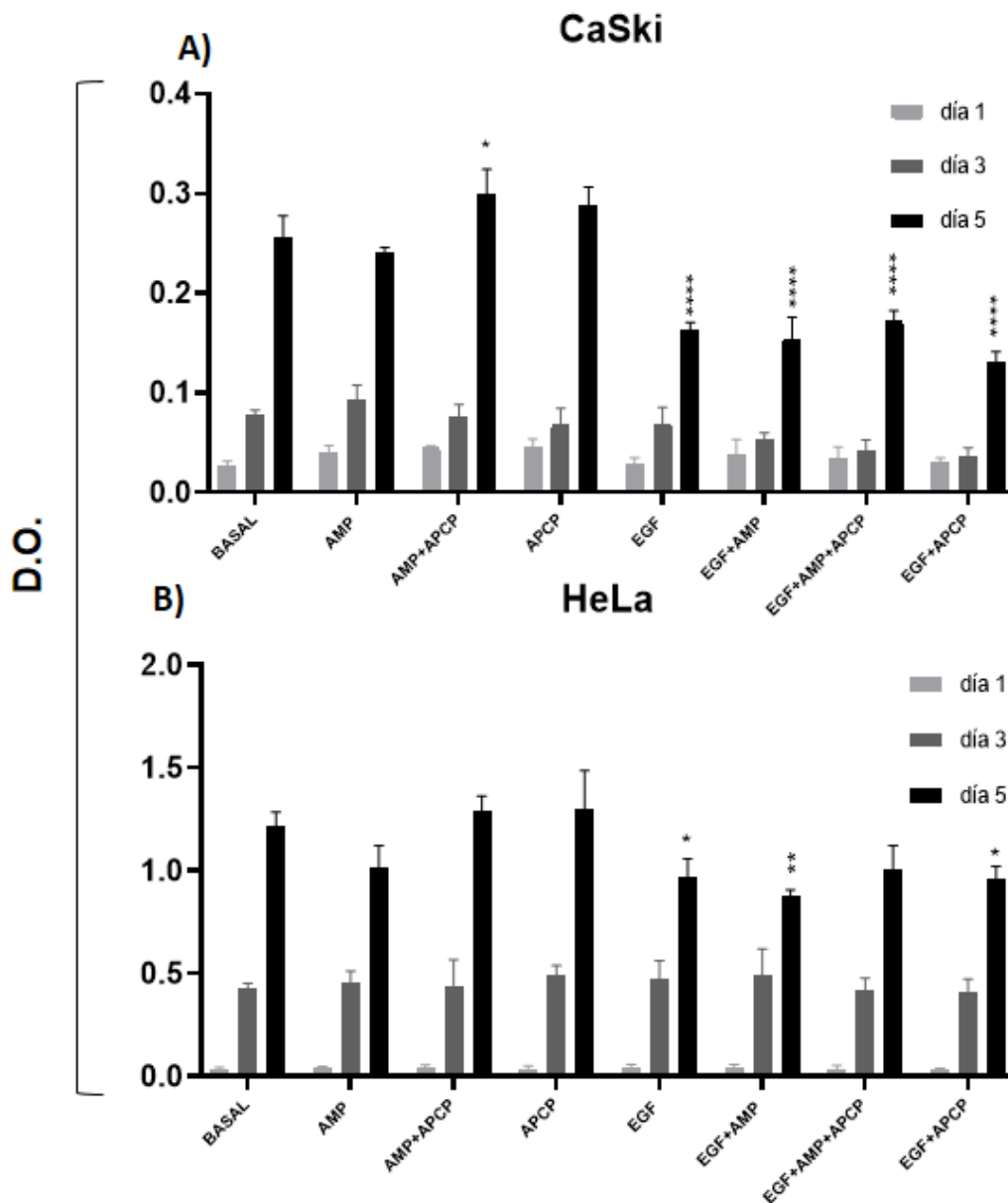
Varios estudios han encontrado que independientemente de su actividad enzimática, CD73 puede promover la proliferación y migración de varios tipos de células cancerosas incluyendo el CaCU (Gao, 2017).

Tomando en consideración que EGF indujo incremento en la expresión de CD73 y de la capacidad de generar adenosina en las células tumorales de CaCU, se procedió a analizar si este efecto también favorecía la proliferación de estas células tumorales. Para ello,  $2 \times 10^3$  células tumorales CaSki y HeLa tratadas previamente durante 72 horas en presencia o ausencia de EGF, fueron cultivadas en presencia de 10mM de AMP.

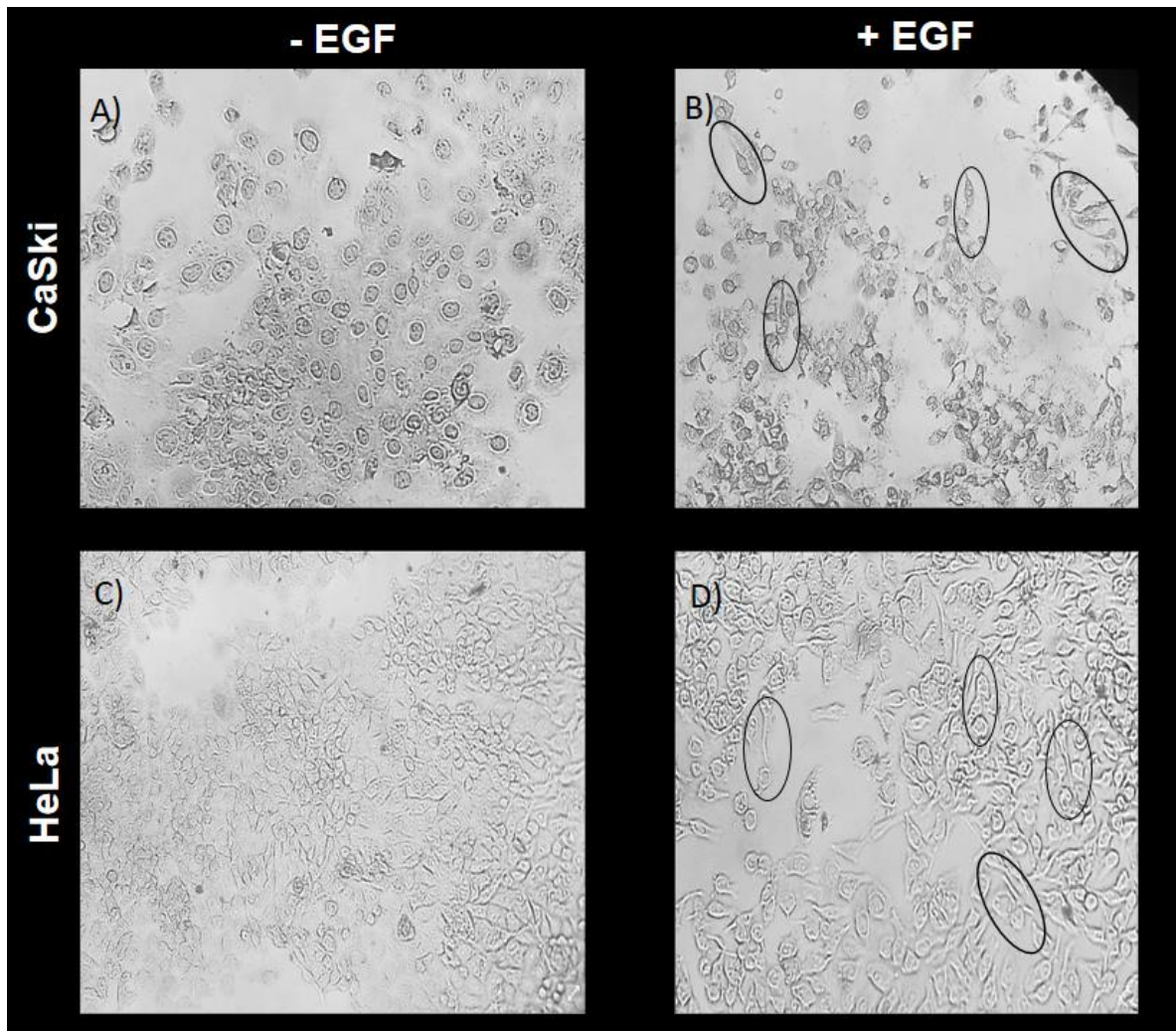
En algunos ensayos se utilizó APCP, inhibidor específico de CD73. Después de 5 días de cultivo, se encontró que la adición de AMP, APCP o AMP+ APCP, no modificó la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, en ambas líneas celulares, el tratamiento previo con EGF disminuyó de manera significativa la proliferación de las células tumorales respecto aquellas cultivadas en ausencia de este factor de crecimiento, aproximadamente 40% en las células CaSki (Figura 11 A) y 25% en las células HeLa (Figura 11 B).

Adicionalmente, se observó que las células tumorales CaSki o HeLa que recibieron tratamiento con EGF modificaron su morfología epitelial a tipo mesenquimal (Figura 12).





**Figura 11. Efecto de EGF en la proliferación de células tumorales de CaCU.** Células tumorales CaSki (A) y HeLa (B) fueron tratadas previamente durante 72 horas en presencia o ausencia de EGF, posteriormente  $2 \times 10^3$  células fueron cultivadas en presencia de 10mM de AMP. En algunos ensayos se utilizó APCP, inhibidor específico de CD73. Después de 5 días de cultivo, se determinó la proliferación celular mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Se muestran los valores de Densidad Óptica (D.O.). \*, indica diferencia significativa respecto a la proliferación basal ( $p < 0.05$ ).

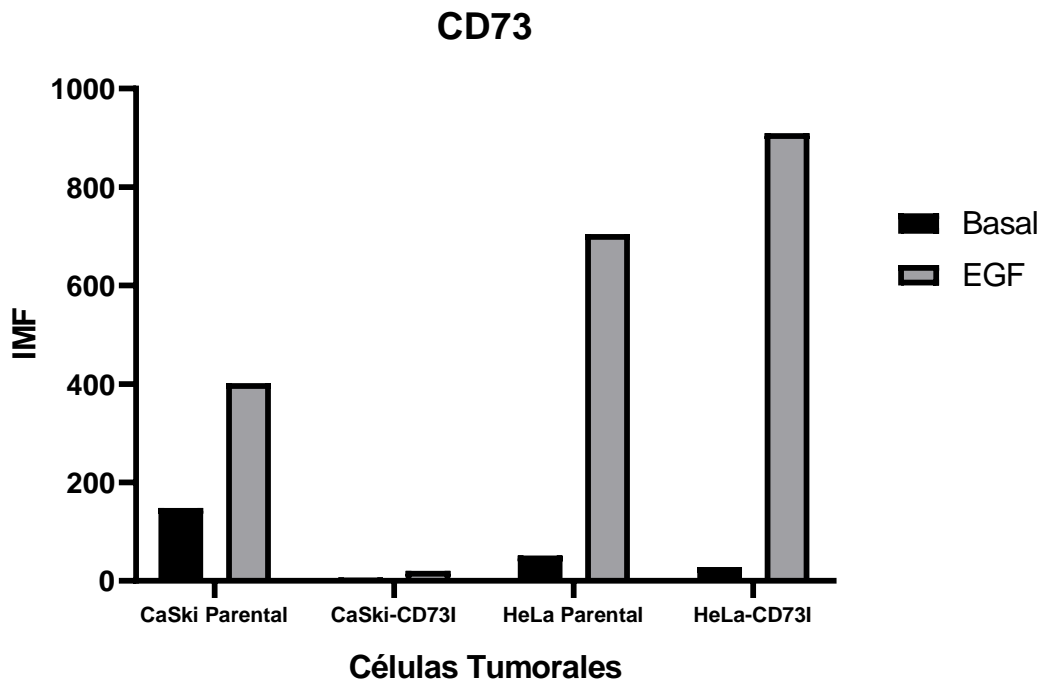


**Figura 12. EGF induce un cambio de morfología epitelial a tipo mesenquimal en las células tumorales de CaCU.** Células tumorales CasKi y HeLa fueron cultivadas en presencia o ausencia de 25 ng/mL de EGF. Después de 5 días de cultivo se tomaron fotografías de los cultivos celulares. Se muestran imágenes de los cultivos de las células CaSki (A-B) y HeLa (C-D) cultivadas en presencia o ausencia de EGF, como se indica. Células con morfología de tipo mesenquimal son indicadas en oвалos.

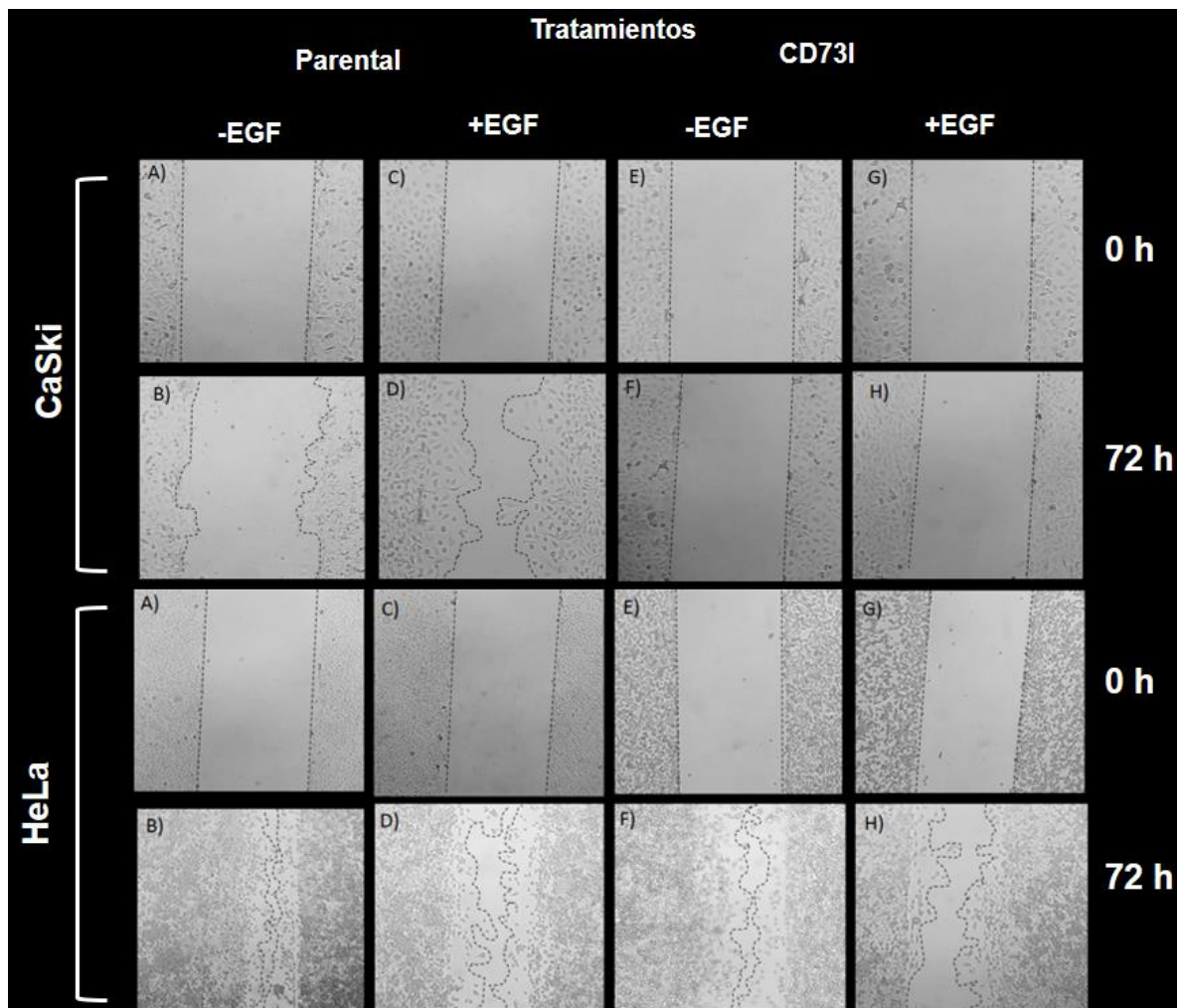
#### 8.4. EGF favorece la capacidad migratoria de células tumorales de CaCU.

La metástasis es un proceso en el cual las células tumorales se desprenden del tumor de origen y pasan a través de la circulación sanguínea y linfática para establecerse en órganos secundarios (Wang *et al*, 2004). En este proceso las células tumorales llevan a cabo varios mecanismos tales como la regulación negativa de las moléculas de adhesión, la producción de metaloproteinasas para degradar la matriz extracelular y la transición epitelio mesénquima (TEM), originando en consecuencia tumores metastásicos más agresivos. Tomando en consideración que el tratamiento con EGF indujo incremento en la expresión de CD73, además de un cambio importante de la forma epitelial a tipo mesenquimal en las células tumorales de CaCU, se procedió a analizar si esta propiedad favorecía su capacidad

migratoria. Para ello, las líneas celulares CaSki y HeLa cultivadas en presencia o ausencia de EGF fueron sujetas a ensayos de migración mediante la técnica de "scratch" o "herida" en monocapas de cultivos celulares. Por otra parte, células tumorales CaSki y HeLa previamente inhibidas en la expresión de CD73 (CaSki-CD73I, HeLa-CD73I) fueron utilizadas como control negativo. De manera interesante, las células HeLa-CD73I tratadas con EGF, recuperaron la expresión de CD73 de manera similar a la línea parental HeLa (Figura 13). Después de 72 horas de haber realizado la herida al cultivo celular, las células CaSki tratadas con EGF incrementaron en más de 60% su capacidad migratoria en relación con aquellas que no recibieron tratamiento. En contraste, aquellas inhibidas en la expresión de CD73, carecieron de movilidad. En el caso particular de las células HeLa, las células tratadas con EGF no presentaron diferencias importantes en su capacidad migratoria en relación con aquellas que no fueron tratadas, debido a que, *per se*, estas células tumorales mostraron alta capacidad migratoria. No obstante, las células HeLa-CD73I tratadas o no con EGF mostraron marginalmente menor capacidad migratoria que las células HeLa parentales (Figura 14).



**Figura 13** Expresión de CD73 en las células tumorales de CaCU. Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de CD73 células tumorales CaSki y HeLa Parentales y en aquellas previamente inhibidas en la expresión de CD73 mediante siRNA específicos (CaSki-CD73I y HeLa-CD73I).



**Figura 14. Efecto de EGF en la capacidad migratoria de células tumorales de CaCU.** Células tumorales CaSki y HeLa parentales e inhibidas en la expresión de CD73 (CaSki-CD73I o HeLa-CD73I) fueron cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de EGF. Posteriormente se realizó una herida en cada una de las monocapas celulares y se tomaron fotografías de los cultivos celulares al inicio y después de 72 horas. Se muestran fotografías representativas de los ensayos una vez realizada la lesión y después de 72 horas.

## 9. Análisis de Resultados

CD73 es una proteína de la superficie celular codificada por el gen *NT5E*, y desempeña un papel crucial en la señalización adenosinérgica. CD73 tiene funciones tanto enzimáticas como no enzimáticas en las células (Wang *et al*, 2007). Estudios previos demostraron que CD73 está sobreexpresado en muchos tipos de líneas celulares de cáncer (Chhabra, 2018. Schrevel *et al*, 2017). De hecho, nuestro grupo de investigación reportó que células tumorales de CaCU positivas a la infección por VPH expresan altos niveles de CD73 en la membrana y son capaces de generar grandes cantidades de Ado a partir de la hidrólisis de AMP, para suprimir las funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al*, 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que CD73 es un regulador clave involucrado en la progresión del cáncer. Por ejemplo, el grupo de investigación de Gao *et al*, 2017 encontró que CD73 promueve la proliferación y migración de células tumorales de CaCU independientemente de su actividad enzimática. Por tanto, identificar los factores que modulan la expresión de esta ectoenzima en las células tumorales puede resultar importante en el entendimiento de la progresión de la enfermedad y como blanco terapéutico.

Tomando en cuenta que el receptor de EGF (EGFR) es un factor importante en la fisiopatología del CaCU debido a que entre 70-90% de los tumores de CaCU de pobre pronóstico sobre-expresan el EGFR, y a que la activación de este receptor a través de su ligando natural (EGF) es capaz de incrementar la actividad enzimática de CD73 (Schrevel *et al*, 2017. Stefanovic *et al*, 1998), en el presente estudio analizamos el efecto de EGF sobre la expresión de CD73 en células tumorales CaSki y HeLa de CaCU. Asimismo, analizamos el efecto de este factor de crecimiento en la proliferación y migración de las células tumorales.

De manera interesante, encontramos que EGF indujo un incremento importante en la expresión de CD73 de aproximadamente 60% en CaSki y 1100% en HeLa. Este incremento se asoció con una mayor capacidad de las células tumorales para generar Ado a partir de la hidrólisis de AMP. Por otro lado, EGF inhibió la proliferación de las células CaSki en 40% y HeLa en 25%, e indujo cambios morfológicos importantes, de tipo epitelial a mesenquimal en ambas líneas celulares, los cuales fueron asociados con una mayor capacidad migratoria, particularmente en las células tumorales CaSki.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con los obtenidos por el grupo de Streicher *et al* 2017, quien encontró que la expresión de CD73 fue incrementada entre 5-40 veces en 3 de 6 líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas en

comparación con las líneas celulares parentales. Dicho efecto fue corroborado al emplear drogas inhibitoras del receptor de EGF (EGFR), y por la generación de líneas celulares mutadas en el EGFR, obteniendo disminución en la expresión de CD73, lo cual sugiere una relación causal entre la ruta de EGFR y la expresión de CD73 (Streicher *et al*, 2017).

EGFR, también conocido como ErbB1 / HER1, desempeña un papel importante en promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis, además se ha descrito como un proto-oncogén. En células normales, se estima que la expresión de EGFR es de  $10^3$ - $10^4$  receptores por célula, mientras que en las células cancerosas se ha observado una sobre-expresión de más de  $10^6$  receptores por célula. Por otro lado, se sabe que EGF regula su propio receptor, ya que aumenta la expresión de ARN de EGFR al estimular la expresión del Factor de transcripción específico de EGFR (FTE) (Wee y Wang, 2007, Muthusami *et al*, 2014). De hecho, se ha reportado que en las células CaSki y HeLa el EGFR es incrementado y fosforilado tras la estimulación con EGF (Olsen *et al*, 2006; Martinho *et al*, 2017).

La expresión de EGFR se ha encontrado incrementada en el 72,5% de los pacientes con cáncer cervicouterino invasivo y en el 25% de los pacientes con neoplasia cervical intraepitelial con relación al tejido cervical normal. Además, se ha encontrado que los tumores más grandes tienen niveles de EGFR significativamente más altos, lo que sugiere que la interacción de EGF con el EGFR puede desempeñar un papel importante en la progresión del CaCU (Eiblmaier, 2008). Además, se ha reportado la expresión de EGFR tanto en CaSki como en HeLa, ya que tras la estimulación con EGF, se observó EGFR fosforilado en estas líneas. Por análisis de Western Blot e Inmunofluorescencia se ha podido observar mayor expresión de este receptor en CaSki que en HeLa. (Martinho *et al*, 2017).

Por otro lado, la generación de Ado mediante la actividad enzimática de CD73, también se ha asociado con el incremento en la expresión de EGFR. En células tumorales de cáncer de mama, el bloqueo de CD73 a través de un inhibidor de su actividad enzimática o mediante el uso de shRNA de interferencia, se observó disminución en la expresión de EGFR, y dicho efecto fue revertido mediante la adición de Ado o NECA, un agonista de los A2R (Zhi *et al*, 2012).

De acuerdo con nuestros resultados, el incremento de CD73 observado en las células tratadas con EGF, también correspondió con el incremento en la capacidad de las células tumorales de CaCU para generar Ado a través de la fosfohidrólisis de AMP llevada a cabo por CD73. Lo anterior se puede corroborar con los resultados obtenidos en este trabajo en el carril de las células tratadas con EGF en presencia de AMP de las figuras 10 C) y 10 D), en donde se observa la generación de este nucleótido en presencia de EGF con una banda mayormente marcada en comparación a los carriles 4 de ambas figuras el cual refleja la generación basal de Adenosina. La participación de CD73 se corrobora en los carriles en donde las células fueron tratadas con EGF en presencia de APCP, inhibidor específico para CD73, en donde la banda es

más tenue, dichos resultados son comparables con los observados previamente en nuestro grupo de estudio, donde células tumorales de CaCU son capaces de producir Ado de manera basal o en presencia de TGF- $\beta$  (Ávila-Ibarra *et al*, 2019)

No obstante, contrario a lo que se esperaba, las células de CaCU tratadas con EGF, después de 3 días de cultivo disminuyeron su proliferación. Este fenómeno puede relacionarse con un estado de arresto del ciclo celular o con muerte celular, debido a que la Ado generada como consecuencia del incremento de CD73 inducido en las células tumorales tras el tratamiento con EGF, puede conducir a este fenómeno mediante su interacción con los receptores de Ado (Merighi, 2002; Long *et al*, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que A2B representa un receptor “primer” de muerte celular inducido por p53 que estimula la apoptosis en respuesta a la acumulación de adenosina extracelular causada por el tratamiento farmacológico, quimioterapéutico o el estrés hipóxico. Se sabe que el gen que codifica para este receptor es un gen diana directo a p53, así como también que en condiciones en las que la adenosina extracelular se acumula, p53 induce la expresión de A2B y que, en este contexto, la señalización de A2B contribuye a aproximadamente el 50% de la muerte celular. (Long *et al*, 2013). Por otro lado, otro receptor de Ado involucrado en la muerte celular es A2A ya que se ha reportado que, al utilizar agonistas o antagonistas selectivos para este receptor de adenosina se encontró que la estimulación de A2A reduce la viabilidad celular, mientras que, al mismo tiempo, mejora la proliferación celular. La estimulación de A3 contrarrestó la muerte celular inducida por A2A, pero redujo la proliferación celular. Además, se encontró que la estimulación de A3 asegura la supervivencia celular. Por lo tanto, se demostró que la Ado es capaz de desencadenar una señal de supervivencia a través de la activación del receptor A3 y de inducir a muerte a las células a través del receptor A2A (Merighi, 2002. Long *et al*, 2013).

Por otra parte, se ha evidenciado que EGF provoca la muerte celular más eficazmente que el uso de drogas inhibitoras de EGFR en células cancerosas con sobreexpresión de este receptor (EGFR) mediante la activación rápida y robusta de p38/MAPK y la inactivación de ERK1 / 2, lo que conduce irreversiblemente a la inducción de la muerte celular (Song *et al*, 2009).

Otro aspecto importante observado en nuestro estudio fue la inducción de cambios morfológicos de tipo epitelial a mesenquimal en las células de CaCU tratadas con 25 ng/mL de EGF, los cuales fueron comparables con los reportados previamente por Muthusami *et al*, 2014, en células ME180 de CaCU tratadas con 50ng/mL de EGF. Adicionalmente, también se reportó que estos cambios fueron asociados con la pérdida de E-cadherina, e incremento de N-cadherina en células de CaCU tratadas con 100 ng/mL de EGF (Cui *et al*, 2016).

Aunque aparentemente estos cambios morfológicos inducidos por EGF en las células tumorales de CaCU favorecieron su capacidad migratoria, nosotros demostramos que, al

menos en las células CaSki, esta capacidad fue dependiente de la expresión de CD73, debido a que células CaSki-CD73I pre-tratadas con EGF, fueron inhibidas completamente en su capacidad migratoria. Lo cual concuerda con lo reportado previamente por Gao *et al*, 2017, quien describió que la sobre-expresión de CD73, independientemente de su actividad enzimática, promueve la migración de las células CaCU.

Adicionalmente, otros autores han reportado que el incremento de la capacidad migratoria promovida por EGF se encuentra asociado con la inducción de FTS (del inglés, Fused Toes Homologue) (Muthusami *et al*, 2014), así como al incremento de Anexina 2 (Cui *et al*, 2016), activación de STAT3 (Moreno-Jaime *et al*, 2016) y a la regulación de NHE1 (Chiang *et al*, 2007).

Recientemente se ha reportado que el Factor de Crecimiento Epidérmico de Unión Heparina (HB-EGF), el cual pertenece a la familia de EGF y conserva el “dominio EGF”, está presente en aproximadamente 78% de los tumores de pacientes con CaCU, además de encontrarse en mayor concentración y tener más afinidad hacia el EGFR que el propio EGF (Schrevel *et al*, 2017). Por tanto, sería importante conocer si este factor autócrino también induce la expresión de CD73, y en consecuencia incrementa la capacidad migratoria de las células tumorales de CaCU. Lo cual, postularía tanto a EGF como a HB-EGF, como marcadores importantes en la progresión de la enfermedad, y blancos terapéuticos potenciales.



## 10. Conclusiones

EGF indujo un incremento en la expresión de CD73 en las líneas celulares CaSki y HeLa, así como en la capacidad de ambas líneas celulares de generar Adenosina a partir de AMP, lo cual también implicó una alta actividad de CD73. Este incremento de CD73 mediado por EGF se asoció con la disminución en la proliferación celular de estas líneas celulares e indujo cambios morfológicos de tipo epitelial a mesenquimal en las células tumorales, y al evaluar la capacidad migratoria de estas, se encontró que la inhibición de la expresión de CD73 disminuyó fuertemente la migración de las células CaSki y marginalmente la de las células HeLa

## **11. Perspectivas**

- Evaluar la expresión de EGFR en presencia de EGF
- Evaluar la expresión de CD73 en presencia de EGF en otras líneas de CaCU
- Evaluar la expresión de CD73 en presencia de otros ligandos de EGFR
- Evaluar la expresión y actividad enzimática de ADA en presencia de ligandos de EGFR
- Evaluar la actividad citotóxica de EGF u otros ligandos de EGFR

## 12. Bibliografía

- Abbas A, Lichtman A y Pillai S (2015) (2008), *Inmunología celular y molecular*, 8ª ed., Elsevier. Madrid p. 1-7
- Allard B, Longhi M, Robson S C y Stagg J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*, 276(1), 121–144.
- Allard D, Allard B, Gaudreau P, Chrobak P y Stagg J. (2016). CD73–adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. *Immunotherapy*, 8(2), 145–151
- Allard, B., Turcotte, M., & Stagg, J. (2012). CD73-Generated Adenosine: Orchestrating the Tumor-Stroma Interplay to Promote Cancer Growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, pp. 2012, 1–8.
- Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P y Haskó G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 842–857.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi E S y Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 19(6), 355-367.
- Ávila-Ibarra L R, Mora-García M de L, García-Rocha R, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Montesinos J, Lizano-Soberon M, García- López P, Don-López C, Torres-Pineda D, Chacón-Salinas R, Vallejo-Castillo L, Pérez-Tapia S, Monroy-Garcia, A. (2019). Mesenchymal stromal cells derived from normal cervix and cervical cancer tumors increase CD73 expression in cervical cancer cells through TGF- $\beta$ 1 production. *Stem Cells and Development*.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari A R, Rockenbach L, Farias P F, Wink M, Delgado-Cañedo A y Battastini, A. M. O. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1-2), 61–68
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L y Jemal A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*; 68:394–424
- Chhabra R. (2018). let-7i-5p, miR-181a-2-3p and EGF/PI3K/SOX2 axis coordinate to maintain cancer stem cell population in cervical cancer. *Scientific Reports*, 8(1).
- Chiang Y, Chou C-Y, Hsu K-F, Huang Y-F y Shen M-R. (2007). EGF upregulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness. *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), 810–819.
- Cruvinel-Wilson de M, Mesquita-Júnior D, Araújo-Pereira J A, Catelan-Takao T, Souza-de Silva A W, Silva-da Pereira N y Andrade-Coelho L E (2010). Immune system – Part I: Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Bras J Rheumatol*, 50(4), 434–438

- Cui L, Song J, Wu L, Cheng L, Chen A, Wang Y, ... Huang L. (2016). Role of Annexin A2 in the EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human CaSki cells. *Oncology Letters*, 13(1), 377–383
- Dong K, Gao Z y Zhang H, (2014). The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases *Immunol Res.* 64(5-6):1133-1141
- Doorbar J y Griffin H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research*.
- Doorbar J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32, pp 12-13
- Eiblmaier M, Meyer L A, Watson M A, Fracasso P M, Pike L J y Anderson C J (2008). Correlating EGFR expression with receptor-binding properties and internalization of <sup>64</sup>Cu-DOTA-cetuximab in 5 cervical cancer cell lines. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(9), 1472–1479
- Esquirol Causa J y Herrero Vila E. (2015). Factor de crecimiento epidérmico, innovación y seguridad. *Medicina Clínica*, 145(7), 305–312.
- Estevao Di, Costa N R, Gil da Costa R M y Medeiros R. (2019). Hallmarks of VPH carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. pp. 154-160
- Ferretti E, Horenstein A L, Canzonetta C, Costa F y Morandi F. (2018). Canonical and non-canonical adenosinergic pathways. *Immunology Letters*.
- Gao Z, Wang H, Lin F, Wang X, Long M, Zhang H y Dong K. (2017). CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer*, 17(1).
- García-Rocha R, Monroy-García A, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Gutiérrez-Serrano V, Fuentes-Castañeda M D, Ávila-Ibarra L R, Don-López C A, Torres-Pineda D B y Mora-García M D. (2018). Cervical cancer cells produce TGF-β1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-β1. *Cytokine*.
- González M. (2007). Molecular biology of cáncer cervical. *Clin Transl Oncol* 9:347-354
- Gutiérrez-Xicoténcatl L, de la Fuente-Villarreal D y Astudillo H. (2014) *Biología molecular para el diagnóstico del cáncer cervicouterino*. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4) pp. 34-35.
- Hibma M H (2012). The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. *The open virology journal*, 6, 241–248.
- Ibeanu Okechukwu A. (2011) *Molecular pathogenesis of cervical cáncer*. *Cancer Biology & Therapy* 11 (3), pp.295-298
- Imran A, Qamar H, Ali Q, Naeem H, Riaz M, Amin S, Kanwal N, Ali F, Sabar M y Nasir I. (2017). Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iran J Public Health*. 46 (11): pp.1475-1485
- INEGI, (2018). "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL...DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)". Consultado en [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)

- Instituto Nacional de Las Mujeres (INMUJER) 2018. Cáncer de mama y cérvico-uterino. Consultado en [http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/cama\\_cacu.pdf](http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/cama_cacu.pdf)
- Jiménez L y Merchant H. (2003). *Biología Molecular y Celular*. Editorial Pearson Educación. pp 663-664
- Kardani K, Mardani G y Bolhassani A. (2015). HPV prophylactic vaccines: Second-generation or first-generation vaccines. *Journal of Solid Tumors*, 5(2) p. 114
- Lahera Sánchez T y González Hernández O. (2010). El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2), 172-180
- Lee M Y. y Shen, M R. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. *American journal of translational research*, 4(1), 1–13.
- Long J S, Crighton D, O’Prey J, MacKay G, Zheng L, Palmer T M, ... Ryan K M (2013). Extracellular Adenosine Sensing—A Metabolic Cell Death Priming Mechanism Downstream of p53. *Molecular Cell*, 50(3), 394–406.
- Manzo-Merino J, Jimenez-Lima R y Cruz-Gregorio A. (2014). *Biología molecular del cáncer cervicouterino*. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4) pp. 18-24
- Martinho O, Silva-Oliveira R, Cury F P, Barbosa A M, Granja S, Evangelista A F, ... Reis R M. (2017). HER Family Receptors are Important Theranostic Biomarkers for Cervical Cancer: Blocking Glucose Metabolism Enhances the Therapeutic Effect of HER Inhibitors. *Theranostics*, 7(3), 717–732.
- Meert A-P, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte J-J, Mascaux C y Sculier J-P. (2002). The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 20(4), 975–981.
- Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz K-N, ... Borea P. (2002). Adenosine Receptors as Mediators of Both Cell Proliferation and Cell Death of Cultured Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(4), 923–933.
- Mora-García M L, Ávila-Ibarra L R, García-Rocha R, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Don-López C A, Gutiérrez-Serrano V, Titla-Vilchis I J, Fuentes-Castañeda M C, Monroy-Mora A, Jave-Suárez LF, Chacón-Salinas R, Vallejo-Castillo L, Pérez-Tapia S M y Monroy-García A. (2017) Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway.. *Cell Immunol*. 320:46-55
- Moreno-Jaime B, Esparza-López J, Castro-Sánchez A, Escobar-Arriaga E, Medina-Franco H, León-Rodríguez E. e Ibarra-Sánchez M de J. (2016). El factor de crecimiento epidérmico induce transición epitelio-mesénquima en cultivos primarios de cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(1), 10–15.
- Muthusami S, Prabakaran D S, Yu J-R y Park, W.-Y. (2014). EGF-induced expression of (FTS) facilitates epithelial–mesenchymal transition and promotes cell migration in ME180 cervical cancer cells. *Cancer Letters*, 351(2), 252–259.
- Olsen J V, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, y Mann M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635–648.

- Parkin J y Cohen B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789
- Pérez-Montiel D, Alvarado-Cabrero I, Chablé-Montero F, Arrazola-González J, Vilches-Cisneros N, Barrón-Rodríguez L y Chanona-Vilchis J. (2014) Patología del Cáncer Cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4) pp. 34-35
- Qureshi R, Arora H y Rizvi MA. (2015) EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Lett*; 356(2 Pt B):321-31
- Ren Z, Li, C Z, Ca W, Yang R, Lu W. Liu Z., ... Zhang C P. (2016). CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. *Oncotarget*, 7(38), 61690–61702
- Rincón O, Pareja L, Jaramillo S y Aristizábal B. (2007). VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO, RESPUESTA INMUNE Y CÁNCER CERVICAL: UNA RELACIÓN COMPLEJA. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 58 (3), 202-212.
- Schrevel M, Osse EM, Prins FA, Trimboos JBMZ, Fleuren GJ, Gorter A y Jordanova ES. (2017) Autocrine expression of the epidermal growth factor receptor ligand heparin-binding EGF-like growth factor in cervical cancer. *Int J Oncol*. 50(6):1947-1954.
- Seyfried T N y Shelton, L M (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism*, 7, 7.
- Silva R, León D, Brebi P, Lli C, Roa J C y Sánchez, R. (2013) Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chilena Infecto*; 30 (2): pp 186-188
- Sociali G, Raffaghello L, Magnone M, Zamporlini F, Emionite L, Sturla L, Bianchi G, Vigiariolo T, Nahimana A, Nencioni A, Raffaelli N y Bruzzzone S. (2015). Antitumor effect of combined NAMPT and CD73 inhibition in an ovarian cancer model. *Oncotarget*, 7(3), 2968–2984
- Song D, Li H, Li H y Dai, J. (2015) Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). *Oncology Letters*, 10(2), pp 601-604
- Song J, Lee S, Hong J P, Chang S E, Choe H y Choi, J. (2009). Epidermal growth factor competes with EGF receptor inhibitors to induce cell death in EGFR-overexpressing tumor cells. *Cancer Letters*, 283(2), 135–142.
- Stefanovic V, Vlahovic P y Miltic-Zlathovic M, (1998). Epidermal Growth Factor Upregulates Aminopeptidase N and 5'-Nucleotidase in Human Glomerular Mesangial Cells. *Kidney Blood Press Res* 21:310–316
- Storey M y Jordan S. (2008). An overview of the immune system. *Nursing Standard*, 23(15), 47–52
- Streicher K, Higgs B W, Wu S, Coffman K, Damera G, Durham, N, ... Ranade K. (2017). Increased CD73 and reduced IFNG signature expression in relation to response rates to anti-PD-1(L1) therapies in EGFR-mutant NSCLC. *Journal of Clinical Oncology*, 35(15\_suppl), 11505–11505. doi:10.1200/jco.2017.35.15\_suppl.11505
- Toche, P Paola (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457.

- Torrez-Poveda K, Cruz-Valdez A y Marina-Madrid A. (2014) Epidemiología del Cáncer Cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4) pp. 4-17
- Van hede D, Langers I, Delvenne P y Jacobs N. (2014). Origin and immunoescape of uterine cervical cáncer. *Presse Med*. 43. Pp 413-414
- Vijayan D, Young A, Teng M y Smyth M. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 709–724
- Wang R, Zhang Y, Lin X, Gao Y y Zhu Y (2017) Prognostic value of CD73-adenosinergic pathway in solid tumor: A meta-analysis and systematic review. *Oncotarget* 8(34): pp 57327-5730
- Wang S-J, Saadi W, Lin F, Minh-Canh Nguyen C y Li Jeon N. (2004). Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis. *Experimental Cell Research*, 300(1), 180–189.
- Wang X, Huang X, y Zhang Y. (2018). Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Frontiers in Microbiol*. 9:2896. pp. 3-8
- Wang, L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z y Zhou, P. (2007). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134(3), 365–372.
- Wee P y Wang Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(12), 52.
- World Health Organization, (2014). *Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice 2ª Edición*, Washington, DC pp. 28-40.
- Zhang B. (2010). CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Research*, 70(16), 6407–6411
- Zhi X, Wang Y, Yu J, Yu J, Zhang L, Yin L y Zhou P. (2012). Potential prognostic biomarker CD73 regulates epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer. *IUBMB Life*, 64(11), 911–920
- Zhu H, Luo H, Shen Z, Hu, X, Sun L y Zhu X. (2016). Transforming growth factor- $\beta$ 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer. *Tumor Biology*, 37(6), pp. 7076–7080
- Zhu J, Zeng Y, Li W, Qin,H, Lei Z, Shen D, ... Liu Z. (2017). CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*.