



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC CLASE I EN CÉLULAS
TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO A TRAVÉS DE LA VÍA CD73-
ADENOSINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. TORRES PINEDA DANIELA BERENICE

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

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. BENNY WEISS STEIDER
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC CLASE I EN CÉLULAS
TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO A TRAVÉS DE LA VÍA CD73-
ADENOSINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. TORRES PINEDA DANIELA BERENICE

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

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. BENNY WEISS STEIDER
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2020.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/593/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión virtual del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **15 de junio de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **TORRES PINEDA DANIELA BERENICE** con número de cuenta **304220245** con la tesis titulada **“MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC CLASE I EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO A TRAVÉS DE LA VÍA CD73-ADENOSINA”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. BENNY WEISS STEIDER
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de septiembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, Hospital de Oncología del CMN SXXI, IMSS, con el apoyo financiero de los proyectos: **FIS-G14/1314** (IMSS) y **240635** (CONACYT).

Asimismo, parte del trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES Zaragoza. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave del proyecto **IN225519**.

Durante los estudios de doctorado recibí los siguientes apoyos: Beca CONACYT con número de registro **282032** durante el periodo comprendido entre enero del 2016 y diciembre del 2020.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. María de Lourdes Mora García y el Dr. Benny Weiss Steider por sus observaciones y sugerencias para mejorar esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Alberto Monroy García*, por su tiempo, apoyo y orientación durante todos los años que he pertenecido a su grupo de trabajo, contribuyendo a mi crecimiento profesional.

A la *Dra. María de Lourdes Mora García*, por su apoyo en la parte experimental y por su tiempo.

Al *Dr. Benny Weiss Steider* por compartir sus conocimientos y por su asesoría para mejorar el presente trabajo.

A la *Dra. Marcela Lizano Soberón*, a la *Dra. Rebeca López Marure*, a la *Dra. Isabel Soto Cruz* y al *Dr. Juan José Montesinos Montesinos*, por sus valiosas aportaciones y comentarios, contribuyendo a la mejora y la satisfactoria conclusión de esta tesis.

A mis compañeros de *laboratorio de Inmunología y Cáncer* y del *laboratorio de Inmunobiología* por su apoyo en la parte técnica y experimental, así como, su orientación para resolver mis dudas.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Por su apoyo, cuidado y cariño, por siempre apoyarme y creer en mí.

A mi hermano

Por su confianza y compañía en cada uno de mis objetivos.

A mi esposo

Por su incondicional apoyo, confianza y amor durante esta importante etapa.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Cáncer.....	3
Cáncer cérvico-uterino (CaCu).....	4
Virus del Papiloma Humano (VPH).....	6
Estructura y genoma del VPH.....	7
Ciclo de infección del VPH.....	8
Inmunoeedición del cáncer.....	11
<i>Eliminación.....</i>	<i>12</i>
<i>Equilibrio.....</i>	<i>13</i>
<i>Escape.....</i>	<i>13</i>
Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	14
<i>Cambios en las células tumorales.....</i>	<i>15</i>
<i>Ignorancia inmunológica y tolerancia en los tumores.....</i>	<i>15</i>
<i>Factores solubles derivados del tumor.....</i>	<i>16</i>
Vía adenosinérgica.....	16
<i>Ecto-nucleotidasas.....</i>	<i>17</i>
<i>CD39 (NTPDasa1).....</i>	<i>18</i>
<i>CD73 (Ecto-5'-nucleotidasa).....</i>	<i>18</i>
<i>Receptores para adenosina.....</i>	<i>19</i>
Interleucina 10 (IL-10).....	21

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC).....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
METODOLOGÍA.....	28
<i>Cultivos celulares.....</i>	<i>28</i>
<i>Silenciamiento de CD73 en células de CaCu.....</i>	<i>28</i>
<i>Expresión de CD73 y A₂R en células de CaCu.....</i>	<i>28</i>
<i>Niveles de IL-10 en los cultivos de células de CaCu.....</i>	<i>29</i>
<i>Expresión de ARNm de IL-10 en células de CaCu.....</i>	<i>29</i>
<i>Expresión de HLA-I en células de CaCu.....</i>	<i>30</i>
<i>Ensayos de citotoxicidad.....</i>	<i>31</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>31</i>
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÉNDICE (Artículo requisito para la obtención del grado).....	61

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Estructura y organización del genoma del VPH.....	8
Figura 2. Ciclo de infección del VPH.....	10
Figura 3. Las tres fases de la inmunoección del cáncer.....	12
Figura 4. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	14
Figura 5. Actividad enzimática de CD39 y CD73.....	17
Figura 6. Vía adenosinérgica en el desarrollo y progresión de la neoplasia....	20
Figura 7. Maquinaria de presentación y procesamiento de antígenos.....	23
Figura 8. Células tumorales de CaCu cultivadas en presencia de AMP y Adenosina fueron inducidas a secretar IL-10.....	33
Figura 9. La vía CD73-Adenosina es necesaria para inducir la producción de IL-10 en células tumorales de CaCu.....	34
Figura 10. Expresión de A _{2A} R y A _{2B} R en las líneas celulares CaSki y HeLa....	35
Figura 11. El bloqueo de A _{2B} R revierte el efecto de adenosina para inducir producción de IL-10.....	37
Figura 12. Células tumorales de CaCu en presencia de AMP y Adenosina son inducidas a disminuir la expresión de moléculas HLA-I.....	38
Figura 13. La vía CD73-Adenosina participa en la disminución de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu.....	39
Figura 14. El bloqueo de A _{2B} R revierte la disminución de moléculas HLA-I inducida por adenosina en células de CaCu.....	41

Figura 15. Adenosina protege a las células de CaCu del efecto citotóxico de las células T, el cual es revertido por el bloqueo de A_{2B}R.....42

Tabla 1. Clasificación del carcinoma cérvico-uterino de acuerdo a la FIGO5

Tabla 2. Clasificación de algunos tipos de VPH.....7

RESUMEN

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina detectada en sueros y tejidos de pacientes con cáncer cérvico-uterino (CaCu) que posee propiedades inmunosupresoras y es producida por células del sistema inmune. Además, estudios previos han demostrado que estas células son capaces de producir la IL-10 a través de la activación de receptores para adenosina (A2R). Asimismo, la IL-10 es capaz de disminuir la expresión de antígenos leucocitarios humanos clase I (HLA-I) afectando el reconocimiento inmune de células tumorales y su eliminación por los linfocitos T citotóxicos (LTCs). El objetivo de este trabajo fue analizar si la vía adenosinérgica participa en la producción de la IL-10, disminuyendo la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu y protegiéndolas del reconocimiento inmune mediado por los LTCs.

Los resultados demostraron que la presencia de monofosfato de adenosina (AMP) o adenosina en cultivos de líneas celulares de CaCu CaSki y HeLa aumentaron significativamente los niveles de la IL-10. Además, el silenciamiento de CD73 (ectoenzima que produce adenosina) y el bloqueo de A2_BR disminuyó los niveles de la IL-10, revirtiendo completamente el efecto de la adenosina y demostrando que esta vía es importante para la síntesis de la IL-10. Sin embargo, cuando las líneas celulares de CaCu se cultivaron en presencia de altas concentraciones de AMP y adenosina ($\geq 10 \mu\text{M}$), la expresión de HLA-I disminuyó más del 50%. De manera interesante, el silenciamiento de CD73 y el bloqueo de A2_BR evitó la disminución de la expresión de HLA-I, revirtiendo el efecto del AMP o la adenosina.

Finalmente, un ensayo de citotoxicidad demostró que la disminución de la expresión de HLA-I a través de la IL-10 generada por la activación del receptor A2_BR, protege a las células tumorales de la lisis mediada por los LTCs, sugiriendo la presencia de un mecanismo de retroalimentación entre la vía adenosinérgica, la IL-10 y la disminución de HLA-I en células de CaCu. El bloqueo de la actividad de CD73 o de A2_BR mejoró la respuesta inmune antitumoral, sugiriendo que estas moléculas podrían ser propuestas como posibles blancos terapéuticos.

ABSTRACT

Interleukin 10 (IL-10) is an important cytokine widely studied and detected in tissues and sera in patients with cervical cancer (CeCa), it is produced by tumor cells and a wide variety of immune cells, possessing immunosuppressive properties. Nevertheless, immune cells are able to produce IL-10 through activation of adenosine receptors (A2R), which are activated by high adenosine concentrations. In addition, previous studies provided evidence that IL-10 downregulated the HLA-I expression, affecting the presentation of tumor antigens and consequently avoiding recognition and lysis by cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The purpose was to analyze whether IL-10 produced by adenosinergic pathway is involved in downregulation of HLA-I expression in cervical cancer cells, protecting them against CTL-mediated immune recognition.

The results showed that the presence of adenosine monophosphate (AMP) or adenosine in cultures of cervical cancer cells (CaSki and HeLa) induced a significant increase in the production of IL-10. In addition, the silencing of CD73 (ectoenzyme that dephosphorylate AMP to produce adenosine) reversed this effect, decreasing the levels of IL-10 as in negative control. On the other hand, the blocking of A_{2B}R completely reversed the adenosine effect to increase the production of IL-10, demonstrating that this pathway is important for the synthesis of this immunosuppressive cytokine. However, when cervical cancer cells were cultured in the presence of high concentrations of AM and adenosine ($\geq 10 \mu\text{M}$) decreased more than 50% their HLA class I expression. Interestingly, the silencing of CD73 using siRNAs and the blocking of A_{2B}R using a specific antagonist inhibited the downregulation of HLA-I expression, reversed the AMP or adenosine effect.

Finally, a cytotoxicity test demonstrated that downregulation of HLA-I expression through the IL-10 generated by A_{2B}R activation protects cervical cancer cells, evading immune recognition, suggesting the presence of a feedback loop encompassing the adenosinergic pathway, IL-10, and the downregulation of HLA-I molecules in cervical cancer cells. These findings could provide therapeutic targets for cancer treatment. Blocking the activity of CD73 and A_{2B}R enhanced the antitumor immune response, suggesting these molecules as possible therapeutic targets.

ANTECEDENTES

Cáncer

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

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

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial. En el año 2018 se registraron 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.6 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo. Cerca del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países menos desarrollados. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 29.5 millones en 2040. Los tipos de cáncer con más tasa de mortalidad al año son: cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon, mama, esófago, próstata y cérvico-uterino. Sin embargo, en hombres se presentan con mayor frecuencia el cáncer de pulmón, próstata, colon y testículo, mientras que en las mujeres destacan el cáncer de mama, colon, tiroides y cérvico-uterino (Globocan, IARC, 2020).

Cáncer cérvico-uterino

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cérvico-uterino (CaCu), es una de las principales causas de defunción por tumores malignos en las mujeres, representando el tercer lugar de incidencia y mortalidad a nivel mundial con 569,847 (6.6%) nuevos casos y 311,365 (3.3%) muertes en el año 2018, de los cuales el 70% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo (OMS, 2020).

En México, los tumores malignos con mayor incidencia en mujeres fueron cáncer de mama (39.5%), las neoplasias de tiroides (14.6%) y cáncer de cuello uterino (11%) durante el año 2018. Además, la principal causa de defunciones en mujeres por tumores malignos fue por cáncer de mama (9.9 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de cáncer cérvico-uterino (5.8 por cada 100 mil) y cáncer colorectal (5.2 por cada 100 mil). Según el INEGI, el porcentaje más alto de prevalencia en neoplasias malignas de cuello uterino y útero se concentra en la población de mujeres de entre 40 a 59 años (representa el 48% de las pacientes con tumores malignos), (INEGI, 2018). Sin embargo, cada vez es más común ver a mujeres que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica cáncer cérvico-uterino (4.1%), (Globocan, 2020; IARC, 2020).

El cáncer de cuello uterino es una neoplasia maligna del cuello del útero, desde el punto de vista histológico, el cáncer suele aparecer en la zona de transformación cervical, es decir, el área de la mucosa cervical situada entre la unión escamosa-cilíndrica original y la unión escamosa-cilíndrica nueva o restaurada (Alvarado *et al.*, 2009; Chavaro *et al.*, 2009).

En los países en desarrollo, entre el 90 y 95% de los cánceres invasores del cuello uterino corresponden histológicamente a tumores de células escamosas o carcinomas y entre el 2 y el 5% son adenocarcinomas (Globocan, 2020; IARC, 2020).

Conforme avanza la invasión del estroma, la enfermedad se vuelve clínicamente evidente y revela varios patrones de proliferación. En las fases más tempranas de la invasión estrómic, el carcinoma cérvico-uterino puede no causar síntomas ni manifestaciones clínicas y, por consiguiente, se le conoce como carcinoma invasor preclínico. La forma más temprana del carcinoma invasor se reconoce histológicamente como carcinoma microinvasor. Son cánceres que no han invadido más allá de 5 mm de profundidad y 7 mm de ancho hacia el estroma cervical subyacente. (Alonso de Ruíz *et al.*, 2005; Chavaro *et al.*, 2009).

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

Tabla 1. Clasificación del carcinoma cérvico-uterino de acuerdo a la FIGO.

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

IIA1	Tumor menos de 4 cm.
IIA2	Tumor mayor de 4 cm.
IIB	Tumor con invasión parametrial, sin llegar a la pared pélvica.
III	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o involucra el tercio inferior de vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IIIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis o presente involucro comprobado por biopsia de la mucosa vesical o rectal. El edema buloso no se considera enfermedad metastásica.
IVA	El tumor invade a la mucosa de la vejiga o recto y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.
IVB	Metástasis a distancia.

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

A principios de los años 80's, el grupo de investigación del doctor Harald Zur Hausen demostró que los virus del papiloma humano (VPH) son los agentes infecciosos responsables de la transformación neoplásica del epitelio cervical (Muñoz, 2000; López y Lizano, 2006). Esta hipótesis fue validada por hallazgos de secuencias genómicas del VPH en el 99.7% de los casos de cáncer cérvico-uterino invasor (de Villiers y Zur Hausen, 1981; Zur Hausen, 1982; López *et al.*, 2008).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los virus del papiloma son miembros de la familia *Papillomaviridae* la cual comprende una serie de virus específicos del huésped, que han sido detectados en muchas especies animales, así como en humanos (Burd, 2003, Knipe *et al.*, 2006).

Se han descrito más de 200 papilomavirus con base a las diferencias en sus secuencias genómicas, identificándose alrededor de 100 tipos específicos para humanos (de Villiers *et al.*, 2004), de los cuales al menos 30 son capaces de infectar la mucosa genital (Stanley, 2012).

Los VPH se clasifican de acuerdo a las diferencias en las secuencias del gen L1 que codifican la proteína mayoritaria de la cápside L1. Se trata de un gen bien conservado entre todos los miembros de la familia *Papillomaviridae*. Por lo tanto, se habla de género de VPH, cuando existe menos de un 60% de homología, de especie entre 60 y 70%, de tipo entre 71 y 89%, de subtipo entre 90 y 98% y de variante cuando existe aproximadamente un 98% de homología en la secuencia del gen que codifica la proteína L1 (Burd, 2003).

Las variantes de VPH son clasificadas en tipos de bajo (VPH-BR) y de alto riesgo (VPH-AR) de acuerdo con la posibilidad de desarrollar lesiones intraepiteliales y CaCu, tal como se muestra en la tabla 2 (Burd, 2003, Zur Hausen, 2002). Los VPH de alto riesgo se han identificado en 90-95% de lesiones invasivas del cérvix, los tipos 16 y 18 se han encontrado aproximadamente en el 50-70% de los carcinomas y otros tipos como el 31, 33, 35, 51, 52, 58 dan cuenta de los casos restantes (Melo *et al.*, 2003; Muñoz y Bosch, 1997).

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

Tabla 2. Clasificación de algunos tipos de VPH. Los VPH se clasifican de acuerdo al riesgo oncogénico que presentan (Tomado y modificado de Burd, 2003).

Estructura y genoma del VPH

El VPH es un virus pequeño, sin envoltura y mide aproximadamente 55 nm de diámetro. Tiene una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, la cual

contiene por lo menos 2 proteínas, L1 y L2. Cada capsómero es un pentámero de la proteína L1 (Burd, 2003).

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

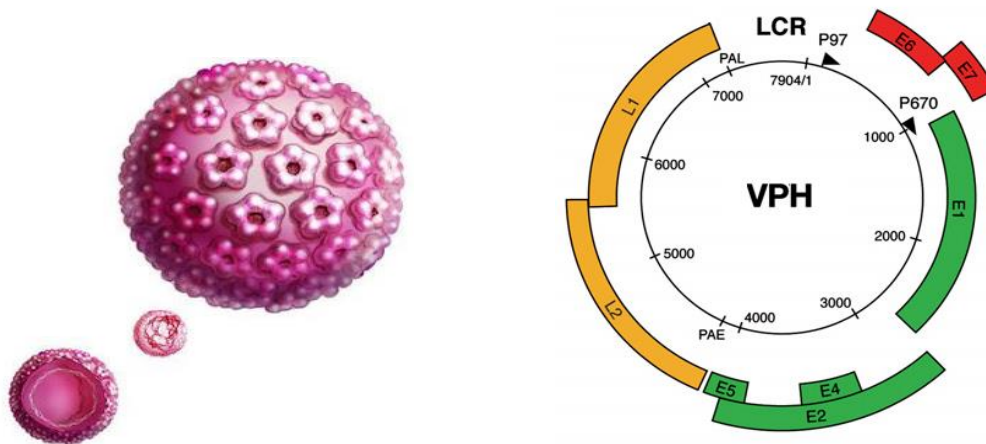


Figura 1. Estructura y organización del genoma del VPH. Se muestran las regiones del genoma viral y sus principales proteínas (Tomado y modificado de Doorbar, 2006; Picconi, 2013).

Ciclo de infección del VPH

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

Se cree que el virus entra al organismo a través de pequeños cortes o abrasiones de la piel o las mucosas. El virus debe llegar a la capa basal del epitelio o a células de metaplasia escamosa inmadura. El inicio de la replicación viral puede observarse en el estrato basal del epitelio, en donde sólo se expresan los genes de la región temprana, pero la producción de partículas virales completas ocurre sólo en el estrato superficial, cuando la célula deja de dividirse y pasa a la diferenciación terminal, lo que implica una conexión entre la diferenciación celular y la expresión genómica viral (Burchell *et al.*, 2006).

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

Los genes tardíos (L1 y L2) se expresan en las fases finales de la infección y codifican proteínas estructurales relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales (proteínas de la cápside). La transcripción de estos genes parece estar mediada por reguladores celulares de la transcripción, producidos sólo cuando la célula escamosa se diferencia (célula intermedia y superficial), lo que explica su

baja concentración en lesiones intraepiteliales de alto grado o en carcinomas invasivos (Figura 2) (Doorbar, 2007; Stanley, 2012).

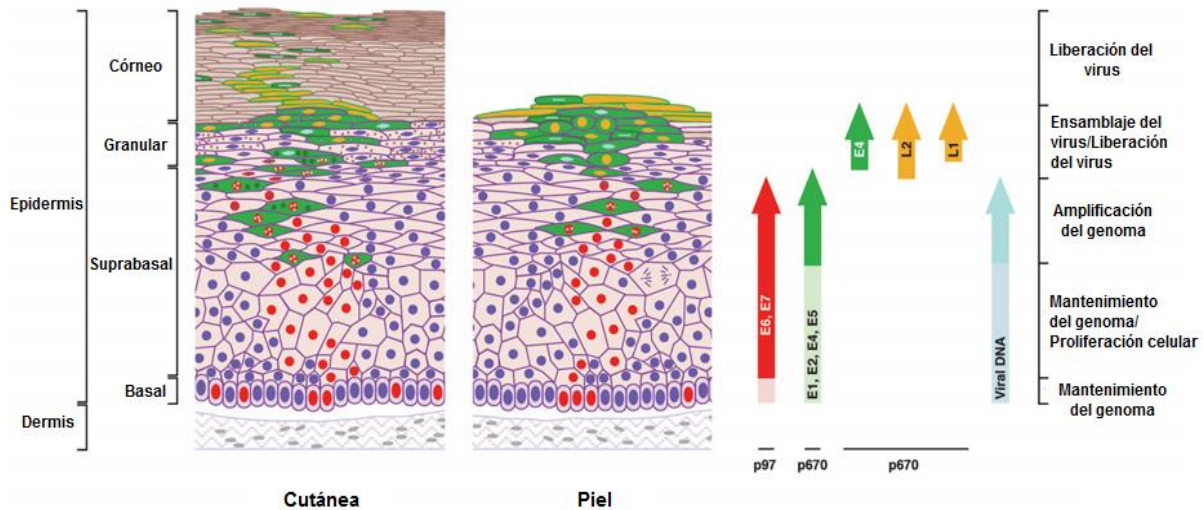


Figura 2. Ciclo de infección del VPH. Eventos clave que ocurren después de la infección por VPH, tales como la expresión de las proteínas virales a lo largo de las capas epiteliales (Tomado y modificado de Doorbar, 2006).

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

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

El hecho de que sólo una pequeña fracción de las mujeres infectadas desarrolle cáncer sugiere que el estado inmune tiene un impacto significativo sobre la capacidad de detectar la infección o sobre la progresión de la misma, encontrándose una incidencia 17 veces mayor de infección genital por el VPH en pacientes inmunosuprimidos (Burd, 2003; Melo *et al.*, 2003; Zur Hausen, 2002).

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

Inmunoedición del cáncer

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

Sin embargo, la idea de la inmunovigilancia del cáncer fue aceptada en los años noventa cuando modelos experimentales con animales utilizando ratones *knockout* validaron la existencia de la inmunovigilancia del cáncer. Actualmente, el proceso que va de la inmunovigilancia al escape inmune, forma parte de un concepto nuevo conocido como inmunoedición del cáncer, el cual se compone de tres fases esenciales: eliminación, equilibrio y escape (Dunn *et al.*, 2002) (Figura 3).

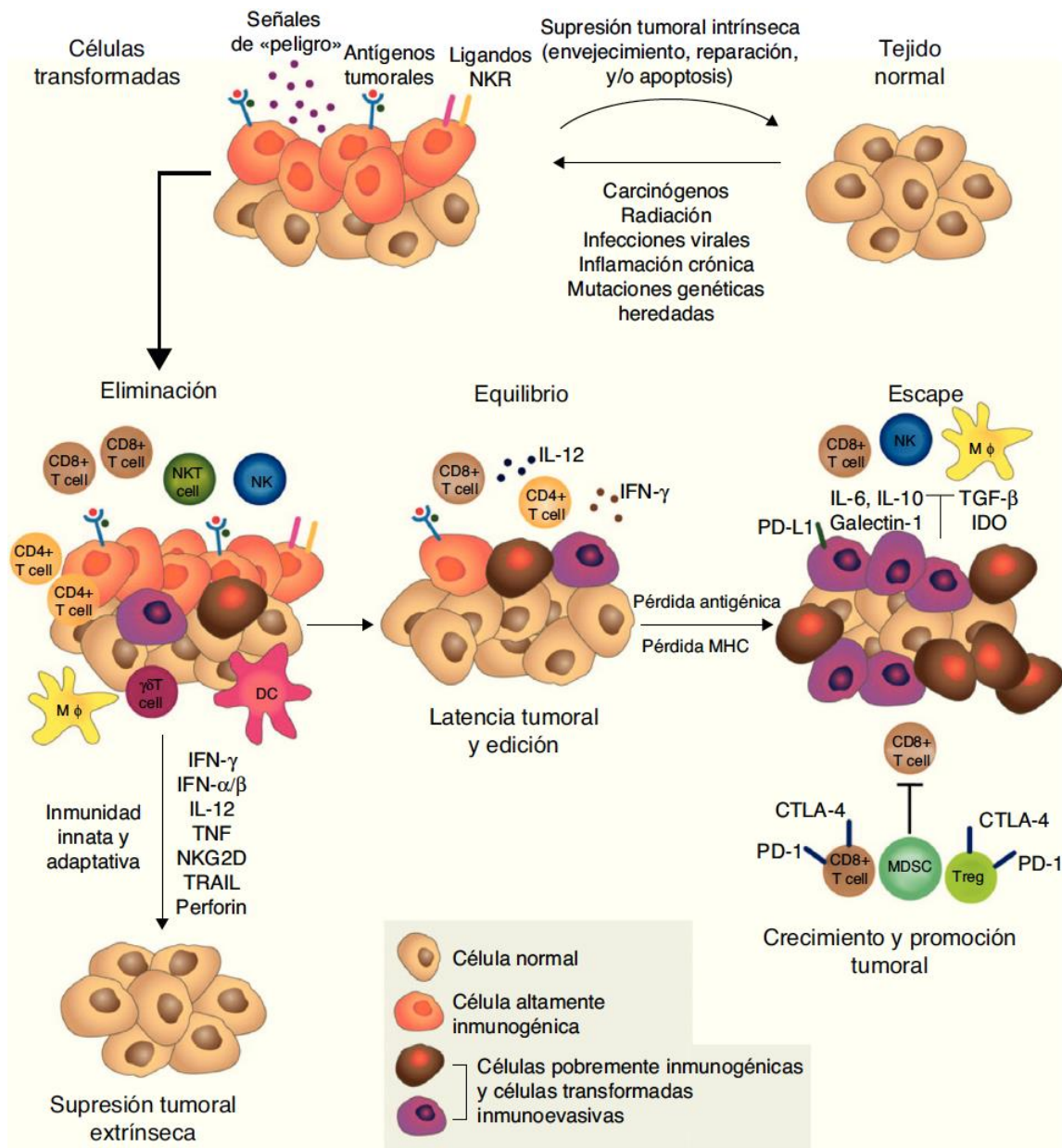


Figura 3. Las tres fases de la inmunoección del cáncer. La inmunoección es el resultado de tres procesos que funcionan de forma independiente o en secuencia para controlar y dar forma al cáncer (Tomado y modificado de Schreiber *et al.*, 2011).

Eliminación

En esta fase, las moléculas y células de la inmunidad innata y adaptativa trabajan en conjunto para detectar, localizar y reconocer la presencia de células tumorales nacientes, así como destruirlas para prevenir el desarrollo de una neoplasia maligna. Las siguientes 4 fases se han propuesto para el proceso de eliminación. 1) El reconocimiento de las células tumorales por las células del

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

Equilibrio

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

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

Escape

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

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

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Las células tumorales desarrollan durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T anti-tumorales. Los conceptos más recientes sobre como las células tumorales pueden escapar o inhibir las funciones normales del sistema inmune son la ignorancia inmunológica y tolerancia en los tumores, los cambios en las células tumorales y los factores solubles derivados del tumor (Figura 4) (Rivoltini *et al.*, 2002).

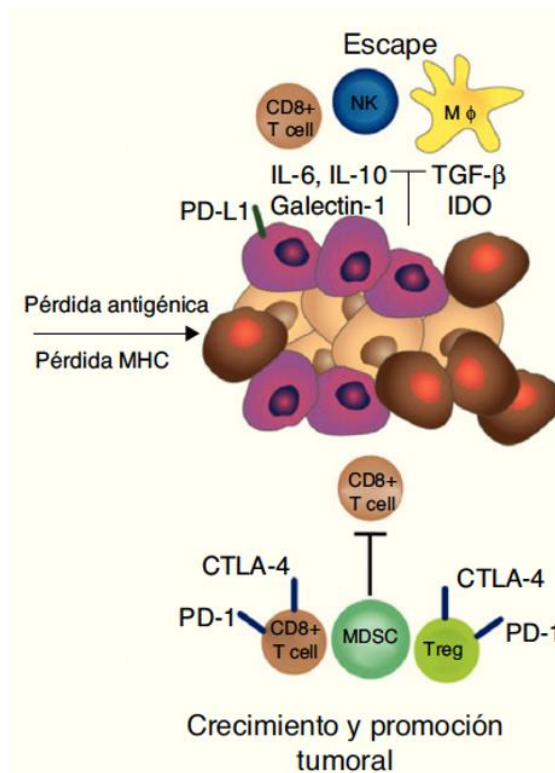


Figura 4. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. En la fase de escape, el crecimiento de las células tumorales ya no está bloqueado por la inmunidad ya que, han desarrollado mecanismos de evasión, tales como pérdida de la expresión del MHC y la producción de citocinas inmunosupresoras. Así que, las células tumorales emergen para causar una enfermedad clínicamente aparente (Tomado y modificado de Schreiber *et al.*, 2011).

Ignorancia inmunológica y tolerancia en los tumores

Una respuesta inmune específica contra el tumor está regulada por los niveles de antígenos tumorales que pueden servir como blancos para las células T efectoras y las etapas de maduración de las células presentadoras de antígenos tales como DCs (Ochsenbein *et al.*, 1999). Por lo tanto, las células tumorales están rodeadas por otro tipo de células, tales como, DCs inmaduras, fibroblastos, endotelio y matriz extracelular. Los fibroblastos y las células endoteliales compiten con las DCs por el antígeno, lo que permite la progresión tumoral. Se sabe que, los niveles suficientes de antígenos tumorales pueden producir una respuesta inmune, la cual es mediada por DCs maduras que presentan los antígenos tumorales a las células T (Spiotto *et al.*, 2002). Sin embargo, incluso en la presencia de niveles suficientes de antígeno tumoral, las DCs inmaduras pueden inhibir la maduración de las DCs y la activación de las células T, lo que resulta en tolerancia inmunológica (Mahnke *et al.*, 2002).

Cambios en las células tumorales

La falta de reconocimiento de los antígenos tumorales es mediada por defectos en el procesamiento y la presentación de antígenos a los LTC. Los principales defectos producidos son la pérdida de TAP-1, moléculas del MHC clase I, $\beta 2m$, LMP-2 y LMP-7, así como, mutaciones o cambios epigenéticos que afectan la expresión de receptores para IFN- γ y de los componentes de la vía de señalización JAK-STAT, lo que permite que, los tumores permanezcan invisibles para el sistema inmune adaptativo y crezcan sin control (Vaseley *et al.*, 2011).

Además, las células tumorales pueden presentar defectos en la vía de señalización Fas/Ligando Fas (FasL) o una sobreexpresión de Bcl-2. También se puede generar la pérdida de las moléculas de coestimulación, como es el caso de la familia B7, así como factores de transducción de señales, tales como CD3 ζ , p56^{lck}, JAK-2, señalización de calcio, NF κ Bp65 y la producción de IL-2 (Lockhart *et al.*, 2001; Khong y Restifo, 2002).

Factores solubles derivados del tumor

Una variedad de factores solubles derivados del tumor contribuye a la aparición de complejas redes inmunosupresoras regionales y locales, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IL-10, TGF- β , prostaglandina E₂, fوسفاتidilserina, Fas, FasL y MICA solubles (Teraben *et al.*, 2000). Aunque son depositados en el sitio del tumor primario, estos factores secretados pueden ampliar los efectos inmunosupresores en los nódulos linfáticos locales y en el vaso, por lo tanto, promueven la invasión y la metástasis (Kim *et al.*, 2007). La secreción de factores inmunosupresores como el TGF- β inhiben proliferación, activación y diferenciación de las células T (Li *et al.*, 2006), las células NK también pueden suprimir la eficacia de las respuestas de los linfocitos T citotóxicos a través de mecanismos relacionados con la producción de IL-13 y TGF- β (Teraben *et al.*, 2000), IL-10 afecta la funcionalidad de las DCs y protege a las células tumorales de la citotoxicidad mediada por los linfocito T citotóxicos (LTC) (Gerlini *et al.*, 2004).

Sin embargo, recientemente se ha propuesto otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune, conocido como vía adenosinérgica, durante la cual se acumula adenosina (Ado) extracelular en tejidos tumorales, lo cual constituye un importante mecanismo de escape inmune por parte del tumor (Stagg *et al.*, 2010).

Vía adenosinérgica

La generación de adenosina extracelular implica la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina, particularmente, del trifosfato de adenosina (ATP) (Thompson *et al.*, 2004). Actualmente, se sabe que bajo diferentes estímulos, el ATP puede ser liberado al espacio extracelular y actuar como transmisor al estimular de manera autócrina o parácrina a las células adyacentes. Dentro de los estímulos que promueven la liberación de ATP, se encuentran: los impulsos eléctricos, los estímulos mecánicos, el cambio de volumen celular, la isquemia, la hipoxia, la liberación por estímulos químicos (neurotransmisores) y la lisis celular. Se sabe que el ATP, una vez que se encuentra en el espacio extracelular, puede

ser hidrolizado por la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1 (CD39) para generar ADP y AMP. Finalmente, el AMP generado es hidrolizado por la 5' ectonucleotidasa (CD73) para producir adenosina (Kobie *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2012).

Ecto-nucleotidasas

Existen diferentes familias de las ecto-nucleotidasas que actúan en el espacio extracelular y son responsables de la generación de adenosina a partir de nucleótidos de adenina (ATP, ADP o AMP): 1) La familia de las ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasas (ENTPDasas), que incluye cuatro miembros unidos a la membrana celular (NTPDasa1 o CD39, NTPDasa2, NTPDasa3, NTPDasa8); estas enzimas se expresan diferencialmente e hidrolizan ATP o ADP con afinidades diferentes. 2) La familia de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPP), capaz de hidrolizar nucleósido trifosfatos a monofosfatos y pirofosfatos (PPi). 3) La familia de las fosfatasas alcalinas (AP), incluye enzimas que degradan un amplio rango de sustratos, liberando fosfato inorgánico (Pi). 4) La familia 5'-nucleotidasa (CD73), con un solo miembro anclado a la membrana plasmática que hidroliza AMP a adenosina (Robson *et al.*, 2006; Aliagas *et al.*, 2014) (Figura 5).

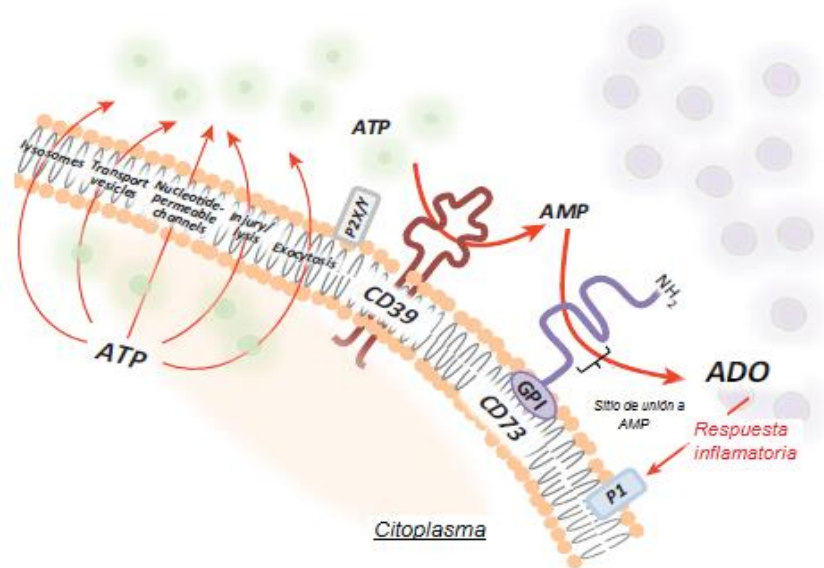


Figura 5. Actividad enzimática de CD39 y CD73. El ATP liberado al espacio extracelular es degradado a AMP por CD39, y a adenosina por CD73. Los altos niveles de adenosina ejercen un potente efecto inmunosupresor (Tomado y modificado de Antonioli *et al.*, 2013).

CD39 (NTPDasa1)

CD39 es una proteína integral de membrana, está constituida por 510 aminoácidos. Estructuralmente, tiene dos dominios transmembrana, un dominio citoplasmático pequeño que comprende los segmentos NH₂- y COOH- terminal, y un dominio hidrofóbico extracelular grande. CD39 se vuelve activo catalíticamente tras su localización en la superficie celular, y su glicosilación es importante para el correcto plegamiento de la proteína y la actividad enzimática (Deaglio *et al.*, 2007; Ávila-Ibarra, 2014).

CD39 se expresa constitutivamente en vaso, timo, pulmón y placenta, en células endoteliales y en células del sistema inmune, tales como células B, NK, DCs, células de Langerhans, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células T reguladoras. Además, la expresión de CD39 incrementa en tumores sólidos tales como, cáncer colorrectal, de páncreas, de cabeza y cuello, así como, en leucemia crónica, sugiriendo que esta enzima puede estar involucrada en el desarrollo y progresión de neoplasias malignas (Saldanha *et al.*, 2011; Antonioli *et al.*, 2013).

CD73 (ecto-5'-nucleotidasa)

CD73 también conocida como ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'-NT, EC 3.1.3.5), es una ectoenzima de superficie celular unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 70 kDa, su expresión es inducida por la activación del factor inducible de hipoxia (HIF-1 α), la exposición a interferones (IFN) tipo I y por la activación de la vía de señalización Wnt (Sadej *et al.*, 2006; Stagg *et al.*, 2011). Además, CD73 se encuentra en muchos tipos de cáncer en humano y en ratón, donde produce elevadas concentraciones de adenosina que pueden promover el crecimiento tumoral por la estimulación de la angiogénesis e inhibiendo las respuestas inmunes antitumorales (Jin *et al.*, 2010; Ávila-Ibarra, 2011; Wang *et al.*, 2011).

CD73 se expresa constitutivamente en células endoteliales, epiteliales y células T reguladoras Foxp3⁺. También se encuentra ampliamente expresada en

diversos tumores sólidos tales como, colon, glioma, pulmón, páncreas, ovario y mama (Spychala, 2000; Sitkovsky *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Stagg *et al.*, 2011).

La elevada expresión y actividad de CD73 están asociadas con la invasión, la metástasis tumoral y con un menor tiempo de supervivencia de los pacientes, lo que indica que hay una estrecha relación entre CD73 y la progresión del cáncer (Jin *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la expresión de CD73 en conjunto con CD39 en un tumor limitan la inmunidad antitumoral de los LTC mediante la generación de adenosina extracelular (Gessi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).

Receptores para adenosina

Después de su liberación, la adenosina induce sus efectos biológicos a través de la interacción con cuatro receptores de superficie celular clasificados por datos moleculares, bioquímicos y farmacológicos en cuatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Gessi *et al.*, 2007). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas. Dichos receptores ejercen su acción en las células regulando la concentración de segundos mensajeros tales como el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3) (Rangel *et al.*, 2007).

Bajo condiciones normales, la adenosina es constantemente producida tanto intracelular como extracelularmente y su concentración basal (cerca de 100 nM) es regulada a través de la actividad metabólica de la adenosina cinasa y la adenosina desaminasa (ADA). En condiciones de hipoxia, isquemia, inflamación o deficiencia de ADA la producción de adenosina incrementa drásticamente a muy altas concentraciones (10 – 100 μ M) lo cual, conduce a la activación de los receptores para adenosina (ARs) (Gessi *et al.*, 2007).

En las células tumorales, la activación de los ARs promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis mientras que, en las células endoteliales induce la producción de VEGF, lo cual incrementa la angiogénesis (Merighi *et al.*, 2006). Además, los tumores son capaces de liberar exosomas, es decir, pequeñas

vesículas que presentan CD39 y CD73 en su superficie, las cuales tiene la capacidad de llegar a otros órganos a través del torrente sanguíneo y fomentar la generación de nichos metastásicos (Merighi *et al.*, 2005; Antonioli *et al.*, 2013) (Figura 6).

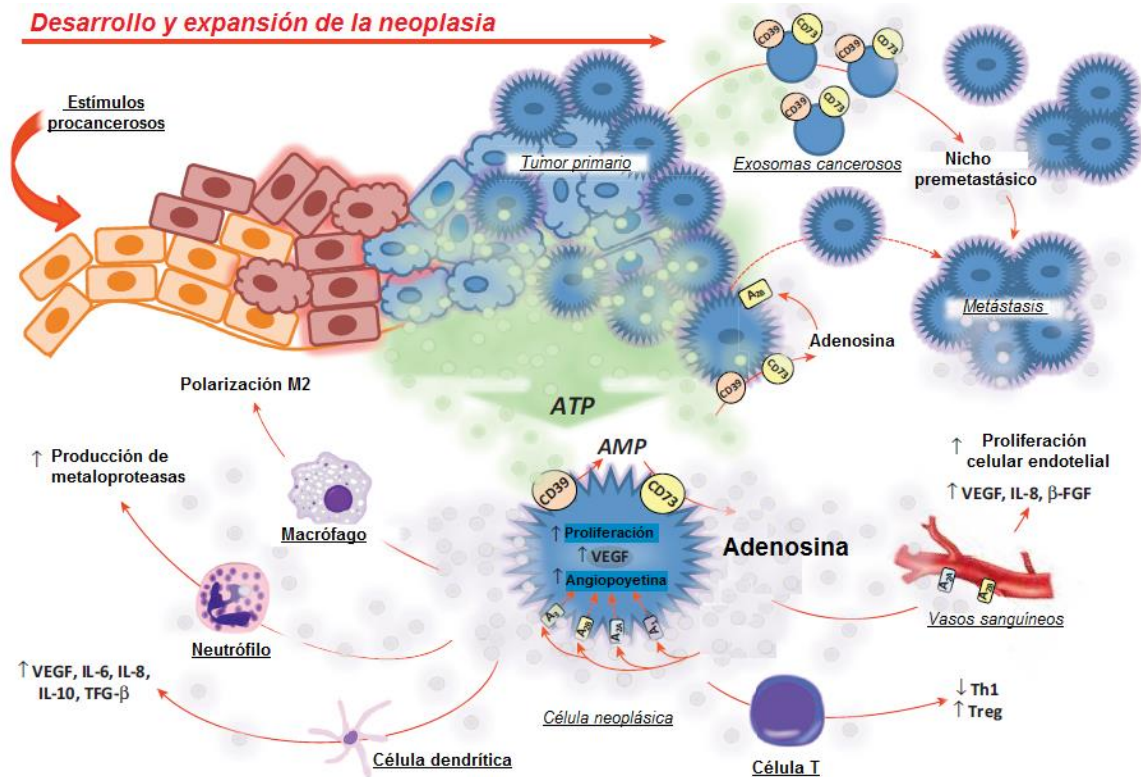


Figura 6. Vía adenosinérgica en el desarrollo y progresión de la neoplasia. La adenosina promueve el crecimiento tumoral activando los receptores para adenosina A1, A2_A, A2_B y A3 y mejorando la habilidad invasiva y metastásica (Tomado y modificado de Antonioli *et al.*, 2013).

Los ARs también se expresan en neutrófilos, macrófagos, DCs y linfocitos T y parece que su activación representa una potente vía inmunosupresora endógena que regula la excesiva respuesta inmune contra estímulos externos (Gessi *et al.*, 2007).

Se ha reportado que el receptor A2_A dispuesto en la membrana de los linfocitos T, protege a los tumores de la actividad antitumoral por estas células efectoras en un microambiente rico en adenosina (Otha *et al.*, 2006; Stagg *et al.*, 2011). La señalización mediada por el receptor A2_A en las células T resulta en la

inhibición de la activación y de la expresión del receptor del linfocito T y muchas otras funciones efectoras, incluyendo proliferación mediante la inhibición de la IL-2, la citotoxicidad, expansión y la secreción de citocinas importantes con función antitumoral como el interferon gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-4, además de promover la anergia de las mismas (Figura 7) (Sevigny *et al.*, 2007; Sitkovsky y Ohta, 2005; Ohta *et al.*, 2006).

Los receptores A_{2A} y A_{2B} se acoplan a proteínas G_s y desencadenan la acumulación de cAMP intracelular a través de la estimulación de adenilil ciclasa intracelular. El aumento de cAMP intracelular actúa sobre la proteína cinasa A, generando un amplio rango de efectos inmunosupresores, incluyendo aumento de la producción de citocinas inmunosupresoras tales como, TGF- β e IL-10 (Kalhan *et al.*, 2012; Leone *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha demostrado que la activación del receptor A_{2B} en células de la microglia, adipocitos y macrófagos induce la producción de la IL-10, mientras que suprime la producción de citocinas proinflamatorias (Koscsó *et al.*, 2012).

Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 es una citocina con propiedades inmunosupresoras que afecta la función de diferentes tipos de células del sistema inmune. Además, es producida por linfocitos T, monocitos, macrófagos, linfocitos B, células NK, eosinófilos y células tumorales (Bhairavabhotla *et al.*, 2007).

No obstante, se ha comprobado que la IL-10 promueve el crecimiento del tumor en cáncer de mama, pulmón y melanoma y cáncer cérvico-uterino (Clerici *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1998). Además, tiene un efecto inhibitor sobre la activación de macrófagos, la producción de citocinas y la expresión de moléculas HLA-I en las

células tumorales, así como, la presentación de antígenos tumorales (Wang *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2006; Terrazzano *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 1997).

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

Entre los diferentes mecanismos de escape, la alteración de la expresión del MHC clase I es uno de los mecanismos más usados por las células tumorales. El MCH se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y está dividido en tres regiones diferentes, entre ellas podemos encontrar a los genes de clase I (HLA-A, B, C). Inicialmente estos genes se llamaron antígenos humanos leucocitarios (HLA), ya que se pensó que eran solamente expresados por leucocitos, actualmente se conocen como genes o antígenos de clase I (HLA-I). Las moléculas de clase I están compuestas de dos cadenas polipeptídicas separadas, una cadena α codificada por el MHC de 44 kDa y otra cadena β de 12 kDa codificada por el cromosoma 15 (López *et al.*, 2005).

El reconocimiento de antígenos tumorales por los LTC es dependiente de la presentación adecuada de péptidos a través de moléculas HLA-I (Garrido, 2019; Mehta *et al.*, 2008). Las proteínas que son blanco de presentación por moléculas HLA-I se someten a un estricto proceso de maduración en el retículo endoplásmico, son marcadas con ubiquitina y llevadas al proteasoma en donde ocurre la degradación a péptidos mediante 3 subunidades enzimáticas conocidas como: gran peptidasa multifuncional 2 (LMP-2), gran peptidasa multifuncional 7 (LMP-7) y gran peptidasa multifuncional 10 (LMP-10) (Peaper y Cresswell, 2008; Sadegh-Nesseri *et al.*, 2008). Posteriormente los péptidos unidos a proteínas Hsp70 son trasladados hacia el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP), un heterodímero compuesto de dos subunidades TAP-1 y TAP-2, el cual se encarga de introducir los péptidos al interior del retículo endoplásmico para su ensamblaje con las moléculas HLA-I (Parcej y Tampé, 2010). Las moléculas de HLA-I son ensambladas con ayuda de moléculas chaperonas (calnexina, calreticulina, tapasina y ERp57) a beta 2 microglobulina (β_2m) (Hansen y Bouvier, 2009).

Subsecuentemente, los péptidos transportados son cortados por la aminopeptidasa 1 del retículo endoplásmico (ERAAP1) y ensamblados en el complejo HLA-I volviéndolo estable al mismo tiempo que las moléculas chaperonas son disociadas (Parcej y Tampé, 2010). Por último, el complejo HLA-I/péptido estable sale del retículo endoplásmico a través de una vesícula y vía aparato de Golgi, llega a la superficie celular para su reconocimiento por LTC (Figura 7) (Hansen y Bouvier, 2009).

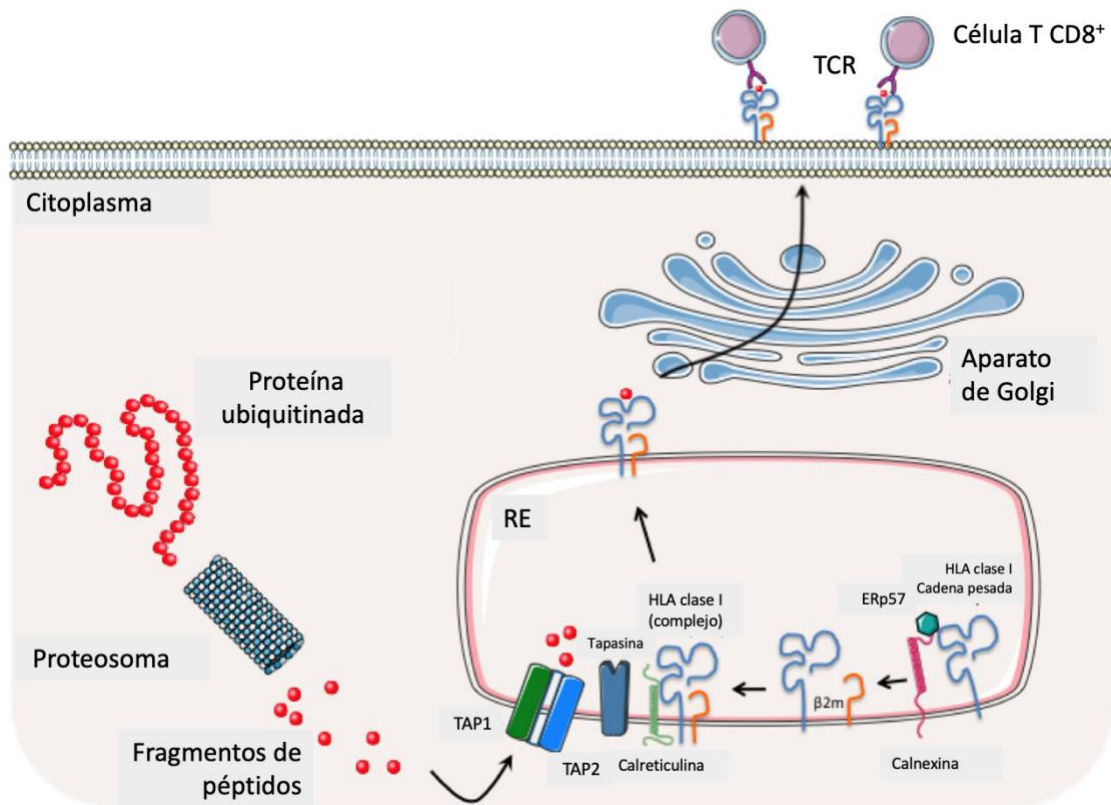


Figura 7. Maquinaria de presentación y procesamiento de antígenos. La degradación de las proteínas está dada por el proteosoma generando pequeños péptidos que son transportados hacia el retículo endoplásmico por las proteínas TAP, después los péptidos son editados por ERAAP1 y se asocian a la molécula HLA-I y a β_2m . Finalmente, los péptidos son presentados en la membrana celular para ser detectados por los receptores de los linfocitos T citotóxicos (Tomado y modificado de Concha-Benavente *et al.*, 2016).

No obstante, diversos estudios *in vitro* han demostrado la pérdida parcial o total de los componentes de la maquinaria del procesamiento de antígenos en diferentes tumores sólidos tales como, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorectal, cáncer gástrico, cáncer de vejiga y CaCu (Romero *et al.*, 2005). Esta deficiente expresión de moléculas HLA-I permite una ventaja para los tumores

malignos para que las células neoplásicas escapen de la muerte mediada por los LTC (Meissner, 2005; Facoetti *et al.*, 2005). También se han reportado mutaciones en la expresión de β_2 -microglobulina que resultan en un fallido ensamblaje de las moléculas HLA-I en cáncer de vejiga, mama, rectal, gástrico y melanoma (Romero *et al.*, 2005; Maleno *et al.*, 2006; Garrido, 2019). En CaCu se ha reportado una expresión deficiente de moléculas HLA-I asociada a la metástasis y a la pérdida de la expresión de TAP-1 (Cromme *et al.*, 1994).

Existen varios mecanismos que pueden alterar la expresión de moléculas HLA-I, tales como la inhibición del transporte o la glicosilación incompleta de moléculas HLA-I; la mutación en los genes TAP y demás componentes de la maquinaria del procesamiento de antígenos; mutación o arreglos en el gen para β_2 -microglobulina; cambios en la estructura de los genes de clase I; alteraciones en la unión de factores transcripcionales; la regulación negativa de las moléculas HLA-I por oncogenes (Romer *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 1999; Brady *et al.*, 2000; Koopman *et al.*, 2000). En cáncer cérvico-uterino frecuentemente se encuentra una pérdida o disminución de la expresión de moléculas HLA-I en los epitelios.

También se ha reportado que la síntesis de IL-10 por las células tumorales reduce la expresión de moléculas HLA-I, sugiriendo un mecanismo de tolerancia, basado en el escape del reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T citotóxicos (Bolpetti *et al.*, 2010). En pacientes con CaCu se ha observado una correlación entre la alta expresión de IL-10 y las LIEAG, lo que sugiere que la cantidad de IL-10 secretada por células tumorales incrementa en las etapas más avanzadas de la enfermedad (Bermúdez-Morales *et al.*, 2008; Mindiola *et al.*, 2008; Azar *et al.*, 2004; Nagaraj y Datta, 2009). En este contexto se sabe que la mezcla de citocinas que se producen en el microambiente tumoral tienen un papel muy importante en la patogénesis. Sin embargo, poco se conoce a cerca de los mecanismos que están involucrados en la producción de citocinas en las células tumorales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el desarrollo del CaCu, la infección persistente por VPH-AR, favorece la integración de secuencias oncogénicas (E2, E6 y E7) en la célula huésped, lo cual induce la transcripción de citocinas inmunoregulatoras como IL-10. Esta citocina, además de tener efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores, también promueve la evasión del reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos, a través de la disminución en la expresión de moléculas HLA-I en las células infectadas por VPH-AR. Por otro lado, se sabe que durante el desarrollo tumoral se producen altas concentraciones de Ado a través de la hidrólisis de los nucleótidos ATP/ADP por la actividad secuencial de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Además, las altas concentraciones de Ado en el microambiente tumoral estimulan la producción de citocinas como IL-10 y ejercen efectos inmunosupresores sobre poblaciones de células efectoras del sistema inmune cuando activan los receptores A₂R. Sin embargo, en CaCu se desconoce el mecanismo por el cual las células tumorales producen IL-10 para evitar el reconocimiento inmune, por lo que, se plantearon las siguientes preguntas: ¿La vía CD73-Ado favorece la producción de IL-10 a través de la activación de los receptores A₂R en las células tumorales de CaCu? ¿La generación de Ado e IL-10 mediante esta vía, disminuye la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu para favorecer la evasión del reconocimiento inmune?

HIPÓTESIS

Se espera que células tumorales de CaCu al ser cultivadas en presencia de AMP o Ado, sean capaces generar IL-10 a través de la activación de los receptores A₂R y en consecuencia modular de manera negativa la expresión de moléculas HLA-I para evadir el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la capacidad de células tumorales de CaCu CaSki y HeLa para producir IL-10 a través de la vía CD73-Ado y su efecto en la desregulación de moléculas HLA-I para evadir el reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de AMP y Ado sobre la generación de IL-10 en células tumorales de CaCu.
- Analizar el papel de la vía CD73-Ado en la producción de IL-10 en células tumorales de CaCu inhibiendo la expresión de CD73 con un ARN de interferencia.
- Determinar la expresión de receptores A_{2A}R y A_{2B}R en células tumorales de CaCu.
- Analizar el efecto de la señalización de Ado sobre los receptores A₂R para generar IL-10 en las células tumorales de CaCu, empleando agonistas y antagonistas específicos de los receptores A₂R.
- Determinar los niveles de ARNm de IL-10 en las células tumorales de CaCu cultivadas en presencia de Ado, y de agonistas y antagonistas específicos para los receptores A₂R.
- Analizar el efecto de AMP y Ado sobre la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu.
- Analizar el efecto de AMP y Ado sobre la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu inhibidas en la expresión de CD73.
- Evaluar la expresión de moléculas HLA-I en células de CaCu cultivadas en presencia de Ado, y de agonistas y antagonistas específicos para los receptores A₂R.
- Analizar el efecto de Ado y su interacción con receptores A₂R sobre la evasión de la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos.

METODOLOGÍA

○ **Cultivos celulares**

Para llevar a cabo este trabajo se emplearon 2 líneas celulares tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino. **HeLa** positiva a la infección con VPH tipo 18 y a la expresión de CD73 y **CaSki** positiva a la infección con VPH tipo 16 y a la expresión de CD73. Las líneas celulares se mantuvieron bajo condiciones de cultivo, empleando medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal de bovino (SFB; Gibco) al 10%, 100 IU/ml de penicilina y 100 μ M/ml de estreptomina (Gibco) a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂.

○ **Silenciamiento de CD73 en células de CaCu**

Para inhibir la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCu, se emplearon moléculas de ARN de interferencia de doble cadena dirigidos específicamente contra las dos isoformas del gen CD73 (NM_001204813.1 y NM_002526.3). El vector pSIREN-Retro Q, contiene un gen de resistencia a la puromicina, la selección de transfectantes estables se realizó mediante el cultivo de las células en presencia de puromicina, de acuerdo con el manual de usuario. Las células tumorales seleccionadas, con mayor inhibición de la expresión de CD73 fueron utilizadas.

○ **Expresión de CD73 y A₂R en células de CaCu**

La expresión de CD73, A_{2A}R y A_{2B}R en la membrana de las células tumorales se determinó por citometría de flujo y se emplearon los anticuerpos: anticuerpo monoclonal antiCD73-PE (BD Biosciencias, San Diego, CA, USA); anticuerpo monoclonal anti-A_{2A}R-PE (NOVUS Biologicals, Colorado, USA) y anticuepo policlonal ADORA2B ALEXA FLUOR 350 (Bioss Antibodies, Massachusetts, USA), respectivamente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de las condiciones de cultivo, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS suplementado al 2% con SFB e incubadas con el anticuerpo durante 30 minutos a

4°C y en oscuridad. Las células marcadas se analizaron con ayuda del citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), 10,000 eventos se analizaron y los restos celulares se descartaron, posteriormente se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada uno de los casos.

- ***Niveles de IL-10 en los cultivos de células de CaCu***

Con el propósito de averiguar si Ado es capaz de inducir la producción y secreción de IL-10 en células tumorales de CaCu, las líneas celulares CaSki y HeLa fueron cultivadas durante 24 y 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de AMP y Ado (1 µM, 10 µM y 100 µM). Los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos de las celulares de CaCu fueron colectados y analizados con un kit de ELISA para detectar IL-10 humana (Human IL-10 Standard ABTS ELISA Development Kit) (PeproTech, NJ, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas fueron leídas con ayuda de un espectrofotómetro a 405nm.

- ***Expresión de ARNm de IL-10 en células de CaCu***

Para determinar el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en las células de CaCu cultivadas solo con medio o con los diferentes tratamientos, las células tumorales fueron cosechadas y lavadas dos veces con PBS. El ARN se extrajo con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El cDNA fue sintetizado a partir de 500 ng/µl of ARN con el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los productos del RT-PCR de las células de CaCu se usaron para analizar la expresión de IL-10 por RT-PCR punto final. Para controlar las variaciones en las cantidades de ARN, se midió β-actina como un control de normalización. IL-10 se amplificó mezclando 2.5 mM de MgCl₂ con 5 µl de cDNA de cada muestra para obtener una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante para PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). Las reacciones se realizaron en un termociclador TC1000-G (Biobase, USA) de acuerdo con su protocolo. El cDNA se desnaturalizó por 5 minutos a 94 °C, posteriormente la

amplificación se hizo en 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, la alineación a la mejor temperatura de cada par de primers y el último ciclo fue una extensión a 72 °C por 5 minutos. La electroforesis de los productos amplificados se realizó en un gel de agarosa al 1.5 %. El gel se tiñó con GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) para visualizar los productos del PCR amplificados utilizando un transiluminador UV. Los primers específicos utilizados para IL-10 y β -actina fueron los siguientes: IL-10 forward 5'GCATCACCTCCTCCAGGTAA'3, reverse 3'TGAAGGATCAGCTGGACAAC'5; y β -actina forward 5'GGGTCAGAAGGATTCCTATG'3, reverse 3'GGTCTCAAACATGATCTGGG'5. Las concentraciones relativas se evaluaron por un análisis densitométrico de imágenes autográficas digitalizadas utilizando el Programa ImageJ NIH de dominio público (disponible en internet: <http://imagej.nih.gov/ij/>). Las concentraciones relativas se compararon con el grupo control (células cultivadas solo con medio). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

- ***Expresión de HLA-I en células de CaCu***

La expresión de las moléculas HLA-I en la superficie de las líneas celulares de CaCu se determinó por citometría de flujo y se utilizó el anticuerpo monoclonal W6/32, el cual reconoce un epítipo conformacional de las cadenas α de las moléculas HLA-A, -B y -C asociadas con β_2 -microglobulina. Este anticuerpo fue donado por el Dr. Gerd Moldenhauer del German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany. Después de cultivar las células bajo las diferentes condiciones de cultivo, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS suplementado al 2% con SFB e incubadas con el anticuerpo durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Las células que solo se tiñeron con el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se usaron como control negativo. Las células marcadas se analizaron con ayuda del citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), 10,000 eventos se analizaron y los restos celulares se descartaron, posteriormente se determinó la IMF para cada uno de los casos.

- **Ensayos de citotoxicidad**

Para analizar la capacidad de los linfocitos T efectores para reconocer y eliminar a las células tumorales con baja expresión de moléculas HLA-I, se generaron linfocitos T CD8+ específicos empleando un método previamente reportado por nuestro grupo de trabajo (García-Rocha *et al.*, 2015). Se obtuvieron linfocitos T CD8+ específicos para los péptidos antigénicos KLPHQLCTEL derivado de la proteínas E6 y YMLDLQPETT derivado de la proteínas E7 del VPH-16 que se unen específicamente al alelo HLA-A*02:01.

Células CaSki fueron cultivadas durante 48 horas en presencia de 10 μ M de Ado; 5 ng/ml de IL-10 recombinante humana (rhIL-10); 10 μ M de Ado con 10 μ M de ZM241385; 10 μ M de Ado con 10 μ M de MRS1754 o 10 μ M de Ado en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-IL-10. Subsecuentemente, las células CaSki fueron marcadas con 5 (6)-diacetato carboxifluoresceína N-succinimidil ester (CFSE) (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) y las células T CD8+ fueron marcadas con el anticuerpo CD8-APC (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La solución de viabilidad celular 7-AAD (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) se utilizó para medir la lisis celular. Las células efectoras (LTC) y las células blanco (células CaSki) fueron incubadas por 4 horas en un radio 20:1. Las células viables se analizaron en un citómetro FACSCanto, se colectaron un mínimo de 100,000 eventos para determinar el porcentaje de células blanco positivas a CFSE/7AAD. En algunos casos, peróxido de hidrógeno al 5% se utilizó para la lisis total de las células blanco. El porcentaje de lisis se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

% citotoxicidad = 100 x [(lisis experimental (CFSE⁺, 7-AAD⁺) / lisis basal (CFSE⁺, 7-AAD⁺))]

- **Análisis estadístico**

Todos los datos numéricos están expresados como promedios \pm la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado. Las comparaciones fueron hechas con el test Kruskal-Wallis en el software GraphPad Prism (GraphPad, Software, La Jolla, CA, USA). Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Células de CaCu incrementan la producción de IL-10 a través de la vía CD73-Ado

Recientemente, nuestro grupo de trabajo describió la expresión y actividad funcional de CD73 para generar Ado en líneas celulares de CaCu (Mora-García *et al.*, 2017). Con el propósito de averiguar si Ado es capaz de inducir la producción y secreción de IL-10 en células tumorales de CaCu, las líneas celulares CaSki y HeLa fueron cultivadas durante 24 y 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de AMP y Ado (1 μ M, 10 μ M y 100 μ M). Los sobrenadantes fueron colectados para evaluar los contenidos de IL-10 mediante la técnica de ELISA.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de las células CaSki y HeLa, dependiente de las concentraciones de AMP o Ado adicionadas a los cultivos celulares. El mayor incremento en la concentración de IL-10 se observó a las 48 horas de cultivo empleando ya sea 10 o 100 μ M de AMP o Ado, éste fue de 2 – 4.5 veces en CaSki (Figura 8 A y C) y de 3 – 6 veces en HeLa (Figura 8 B y D), en relación a la concentración de IL-10 detectada en los cultivos celulares sin AMP o Ado (utilizados como control (-)).

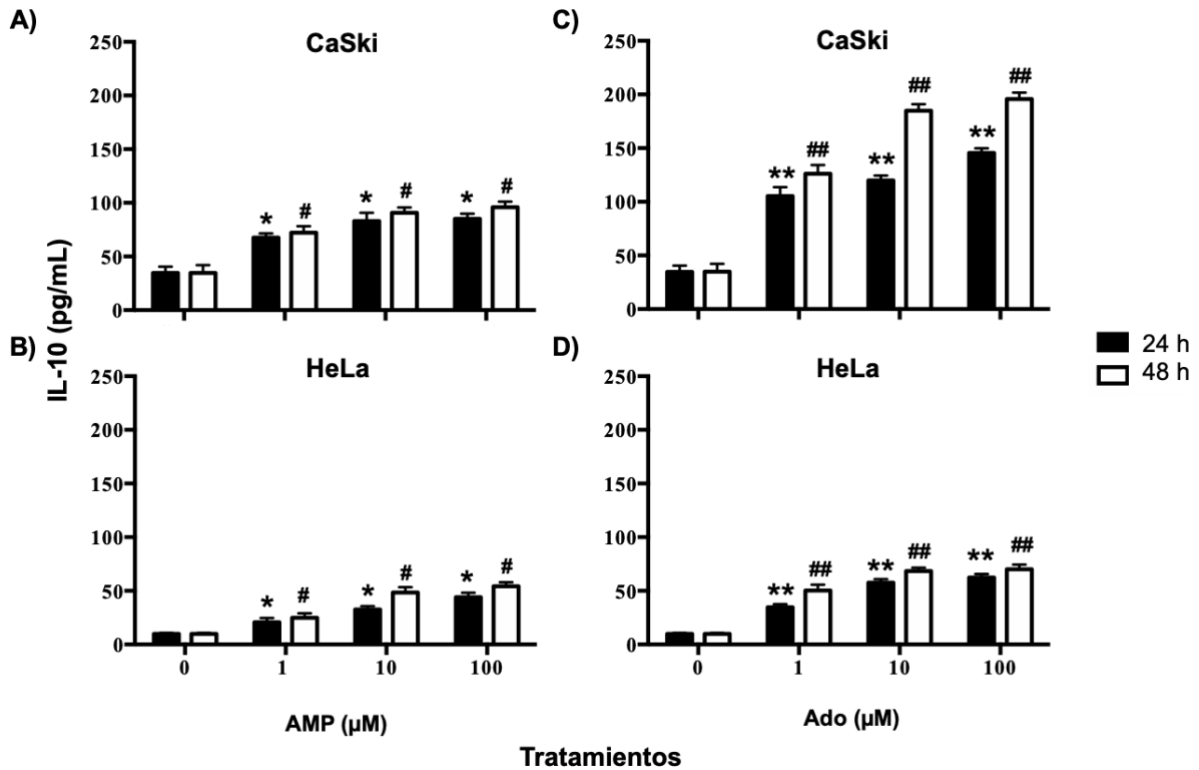


Figura 8. Células tumorales de CaCu cultivadas en presencia de AMP y Ado fueron inducidas a secretar IL-10. Células tumorales CaSki y HeLa (1×10^5) fueron cultivadas durante 24 o 48 horas en presencia de 1 μM , 10 μM o 100 μM de AMP (A y B) o Ado (C y D). La concentración de IL-10 fue analizada cada 24 horas mediante la técnica de ELISA. Los datos son representativos de tres ensayos independientes, se muestran los promedios \pm SD. *,# $p < 0.05$, **,# $p < 0.001$ para el contenido de IL-10 en los sobrenadantes de células tratadas con respecto al control negativo (Ctl (-)) en cada tiempo de cultivo.

Para determinar si la Ado producida por la actividad enzimática de CD73 participaba en la generación de IL-10, se procedió a inhibir la expresión de CD73 en las células tumorales CaSki y HeLa con ayuda de ARNs de interferencia dirigidos a las isoformas NM-001204813.1 y NM-002526.3 de CD73. Las células desreguladas en CD73 fueron seleccionadas con puromicina y se denominaron CaSki-pS/siRNA-CD73 y HeLa-pS/siRNA-CD73. La expresión de CD73 se analizó por citometría de flujo.

Al cultivar las líneas celulares CaSki y HeLa en presencia de 10 μM de AMP o Ado, como era de esperarse, se observó un incremento en la concentración de IL-10 en los sobrenadantes. Sin embargo, el efecto producido por el AMP en las células

CaSki y HeLa fue revertido al inhibir la expresión de CD73 con un siRNA o su actividad enzimática con APCP (inhibidor específico de CD73) (Figura 9 A y B). Mientras tanto, el siRNA no logró revertir la producción de IL-10 en las células CaSki y HeLa en presencia de Ado. Estos resultados sugieren que Ado exógena o la producción autócrina de este nucleósido a través de la actividad de CD73 es importante para inducir la producción de IL-10 en las células tumorales de CaCu.

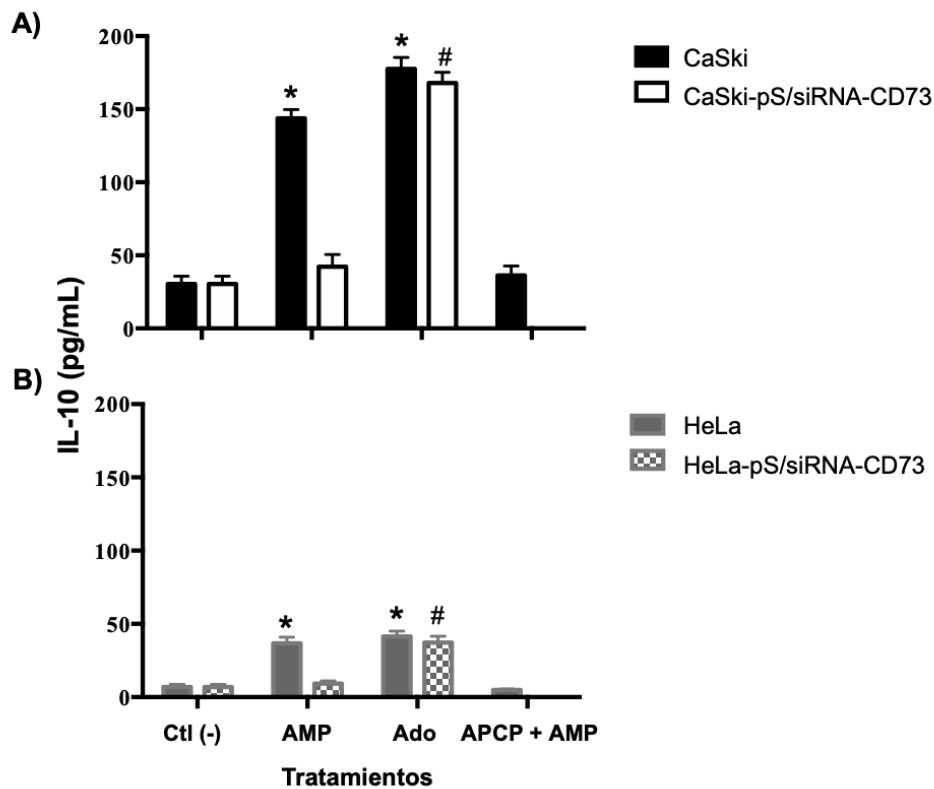


Figura 9. La vía CD73-Adenosina es necesaria para inducir la producción de IL-10 en células tumorales de CaCu. Células CaSki, CaSki pS/siRNA-CD73, HeLa y HeLa pS/siRNA (1x10⁵) fueron cultivadas en presencia de 10 μ M de AMP o adenosina (Ado). Después de 48 horas, los sobrenadantes fueron colectados y se determinaron los contenidos de IL-10 mediante ELISA. Adenosine 5'- (α,β -methylene) diphosphate (APCP) fue adicionado en cultivos de CaSki y HeLa para inhibir la actividad de CD73. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes y se muestran los promedios \pm SD. *,# p<0.001 para la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de células tratadas con respecto a su control correspondiente.

El bloqueo del receptor $A_{2B}R$ revierte el efecto de Ado para inducir la producción de IL-10 en células de CaCu

La Ado es una molécula ubicua capaz de ejercer diferentes efectos fisiológicos mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G llamados A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ y A_3R . Se ha reportado que la señalización a través de $A_{2A}R$, y principalmente $A_{2B}R$, en varios tipos de células inmunes está relacionada con el incremento de citocinas como la IL-10 (Nemeth *et al.*, 2005; Koscs *et al.*, 2012; Bhairavabhotla *et al.*, 2007). Para fines de este estudio, se analizó la expresión de A_2R en las células CaSki y HeLa mediante citometría de flujo, encontrándose que ambas líneas celulares expresan los receptores $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ en la membrana celular (Figura 10).

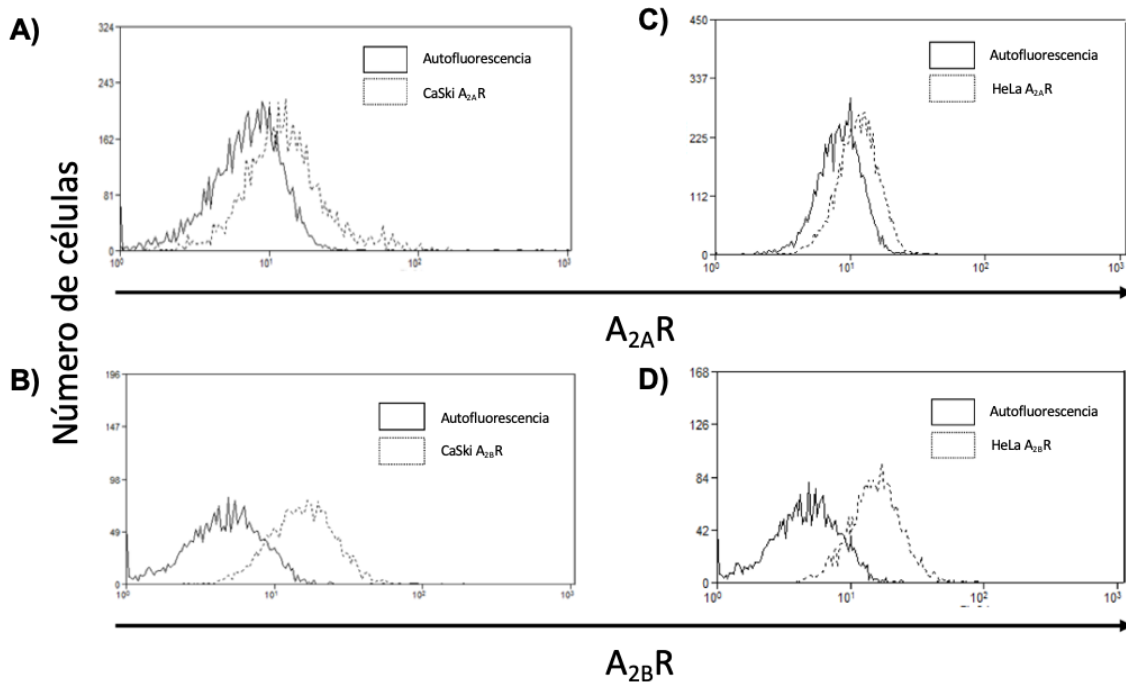


Figura 10. Expresión de $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ en las líneas celulares CaSki y HeLa. La expresión de $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ (histogramas con líneas punteadas) en la membrana de las células tumorales fue determinado por citometría de flujo. Se muestra la fluorescencia natural (autofluorescencia) de cada línea celular (histogramas con líneas continuas).

Para determinar si la interacción de Ado con los receptores A_{2A} y A_{2B} inducía la producción IL-10 en células de CaCu, las líneas celulares CaSki y HeLa fueron cultivadas durante 30 minutos en presencia de 10 µM de ZM241385 o MRS1754, antagonistas específicos de los receptores A_{2A} y A_{2B}, respectivamente, posteriormente se adicionó Ado o NECA (agonista no selectivo de los receptores de Ado) a una concentración final de 10 µM. En células del sistema inmune, se ha observado que NECA es capaz de inducir la producción de IL-10 (Nemeth *et al.*, 2005; Koscs *et al.*, 2012), por lo que se usó como control positivo en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que NECA, al igual que Ado, incrementaron 3 veces los niveles de IL-10 en relación con los niveles basales de esta citocina producidos por las células CaSki y HeLa en cultivo. Sin embargo, la producción de IL-10 inducida por Ado en CaSki y HeLa fue disminuida fuertemente por la adición del antagonista MRS1754 en un 68% y 41%, respectivamente, mientras que la adición del antagonista ZM241385 redujo la producción de IL-10 en 41% y 21%, respectivamente (Figura 11 A y B). De manera similar, el efecto inhibitorio del antagonista MRS1754 se observó al reducir la expresión del ARNm para IL-10 en ambas líneas celulares (Figura 11).

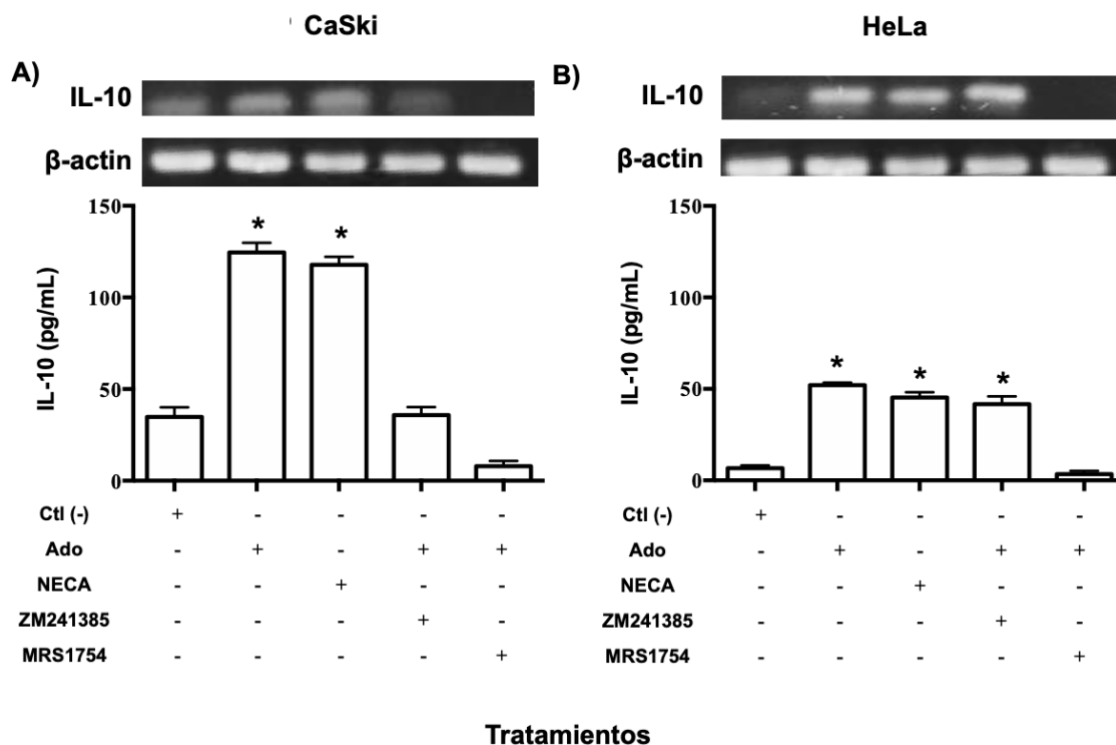


Figura 11. El bloqueo de A_{2B}R revierte el efecto de adenosina para inducir producción de IL-10 en células de CaCu. Células tumorales CaSki y HeLa fueron cultivadas en presencia de 10 μM de adenosina (Ado). Treinta minutos antes de agregar Ado, 10 μM de ZM241385 y de MRS1754, antagonistas específicos de A_{2A}R y A_{2B}R respectivamente, se agregaron a los cultivos. NECA (10 μM), un agonista no selectivo de los receptores de Ado, fue usado como control para la inducción de IL-10. Después de 48 horas, las concentraciones de IL-10 en los sobrenadantes se analizaron por ELISA. La expresión del ARNm de IL-10 en las células tratadas se analizó por RT-PCR. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y se muestran los promedios ± SD. * p<0.05 para el nivel de IL-10 en los sobrenadantes de células tratadas comparadas con el control.

La interacción de Ado con el receptor A_{2B}R induce protección en las células de CaCu contra la actividad citotóxica de las células T.

Nuestros resultados previos demostraron que AMP y Ado inducen la producción de IL-10 en células tumorales de CaCu. Para determinar si estas moléculas afectan la expresión de moléculas HLA-I, las células tumorales CaSki y HeLa se cultivaron durante 24 y 48 horas con diferentes concentraciones de AMP y Ado.

Los resultados mostraron una disminución de moléculas HLA clase I de manera dosis dependiente, sin embargo, la mayor disminución se observó después de 48 horas cuando se utilizaron concentraciones mayores a 10 μM de AMP y Ado (Figura 12). El tratamiento con 10 μM de AMP o Ado redujo la expresión de moléculas HLA-I en las células CaSki en 35% y 60%, respectivamente (Figura 12 A y C), mientras que, en las células HeLa la disminución fue de 25% y 35%, respectivamente (Figura 12 B y D).

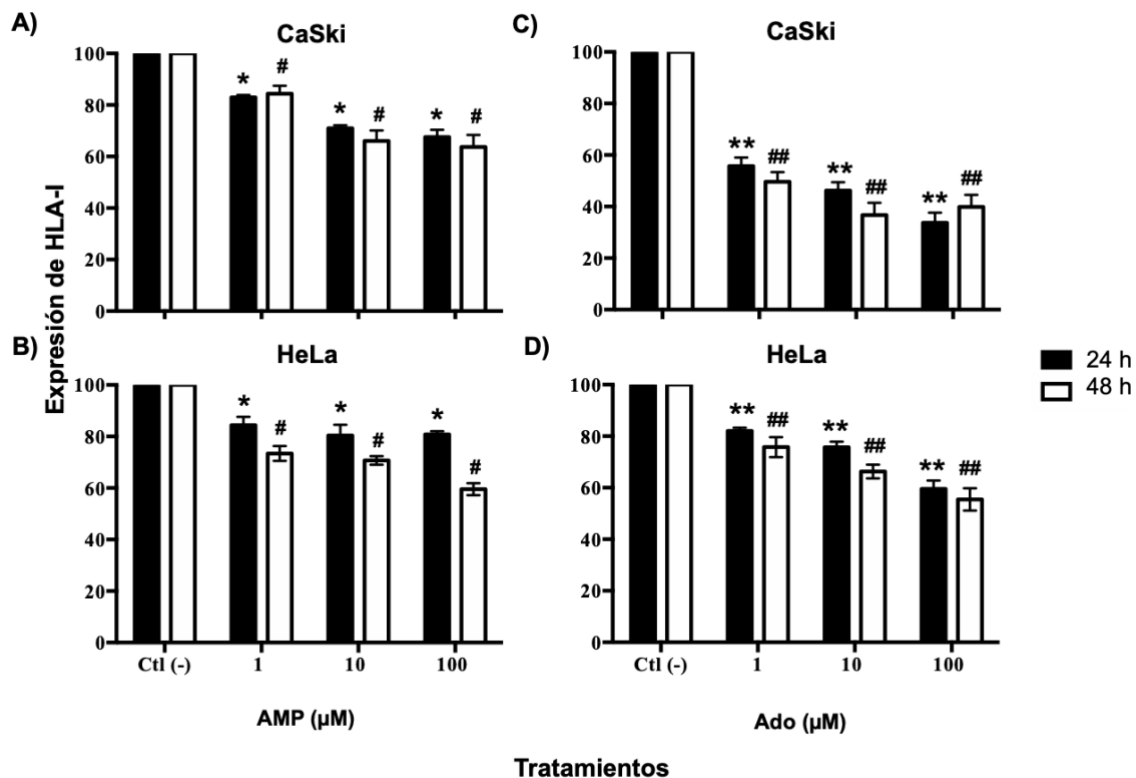


Figura 12. Células tumorales de CaCu en presencia de AMP y Ado son inducidas a disminuir la expresión de moléculas HLA-I. Células tumorales CaSki y HeLa (1×10^5) fueron cultivadas por 24 y 48 horas en presencia de 1 μM , 10 μM y 100 μM de AMP (A y B) o Ado (C y D). La expresión de moléculas HLA-I en las líneas celulares se analizó por citometría de flujo. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes, se muestran los promedios \pm SD. *,# p<0.05, **,## p<0.001 para la expresión de moléculas HLA-I de células tratadas con respecto al control negativo (Ctl (-)) en cada tiempo de cultivo.

El efecto de AMP sobre la expresión de HLA-I fue revertido por la adición de APCP en ambas líneas celulares (Figura 13). Por otra parte, en las células CaSki-pS/siRNA-CD73 y HeLa-pS/siRNA-CD73 la disminución de la expresión de moléculas HLA-I solo se observó cuando estas células fueron tratadas con Ado. Lo cual indica que la generación autócrina de Ado a través de la hidrólisis de AMP por la actividad enzimática de CD73, puede participar en la desregulación de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu (Figura 13).

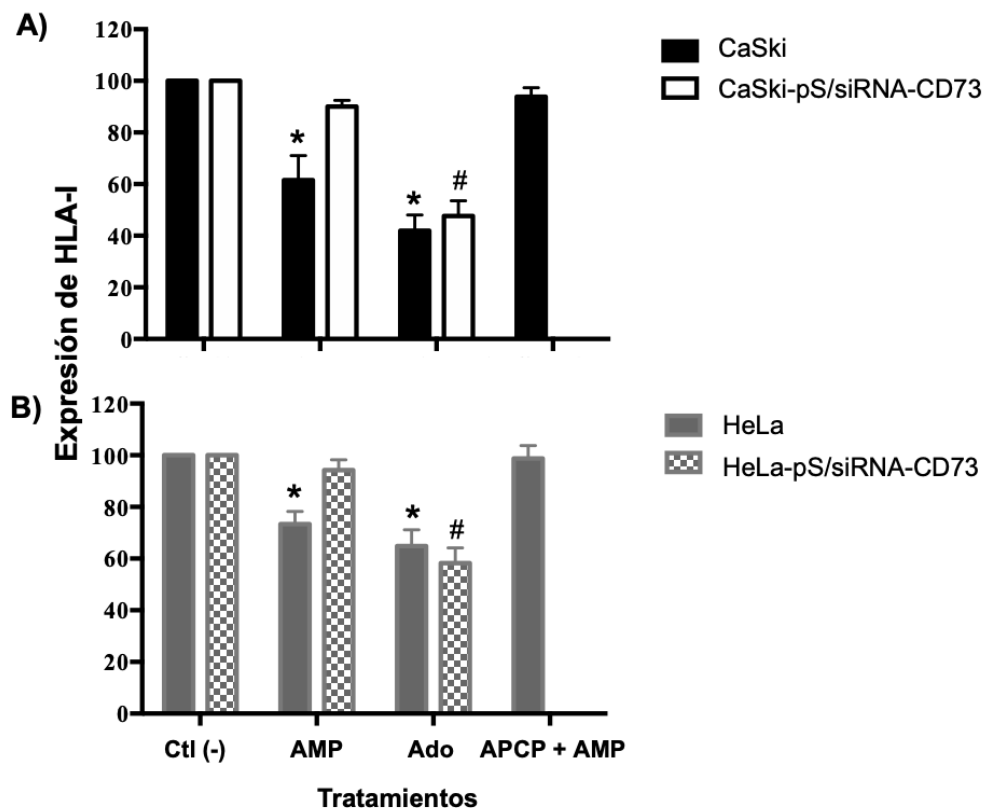


Figura 13. La vía CD73-Adenosina participa en la disminución de moléculas HLA-I en células tumorales de CaCu. Células CaSki, CaSki-pSi/siRNA-CD73, HeLa y HeLa pS/siRNA-CD73 fueron cultivadas en presencia de 10 μ M de AMP o adenosina (Ado). APCP se agregó a los cultivos para inhibir la actividad de CD73. Después de 48 horas se analizó la expresión de moléculas HLA-I en las líneas celulares por citometría de flujo. Los resultados muestran el promedio de tres ensayos independientes, se muestran los promedios \pm SD. *,# (p<0.05) Indica las diferencias significativas en la expresión de moléculas HLA-I en células tratadas con respecto a su control correspondiente.

Con la finalidad de analizar si el contenido de IL-10 en los sobrenadantes de las células tumorales fue el responsable de la disminución de la expresión de moléculas HLA-I en las células tumorales de CaCu, las células CaSki y HeLa se cultivaron en presencia de Ado o IL-10 recombinante humana (como control). De manera interesante se observó que la IL-10 recombinante disminuyó la expresión de las moléculas HLA-I de manera similar a la Ado, mientras que, la adición de un anticuerpo neutralizante anti-IL-10 revirtió completamente el efecto que produjo la Ado y la IL10 recombinante sobre la expresión de moléculas HLA-I en las células tumorales (Figura 14). Tomando en cuenta que la interacción de Ado con los receptores $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ está estrechamente relacionada con la generación de IL-10, también se analizó el efecto de los antagonistas ZM241385 (antagonista para $A_{2A}R$) y MRS1754 (antagonista para $A_{2B}R$) sobre la expresión de moléculas HLA clase I. La adición del antagonista MRS1754 revirtió completamente el efecto generado por Ado para disminuir la expresión de moléculas HLA-I en las células tumorales, lo cual sugiere que la señalización del receptor $A_{2B}R$ por Ado es relevante para inducir la producción de IL-10 y afectar, en consecuencia, la expresión de moléculas HLA-I (Figura 14).

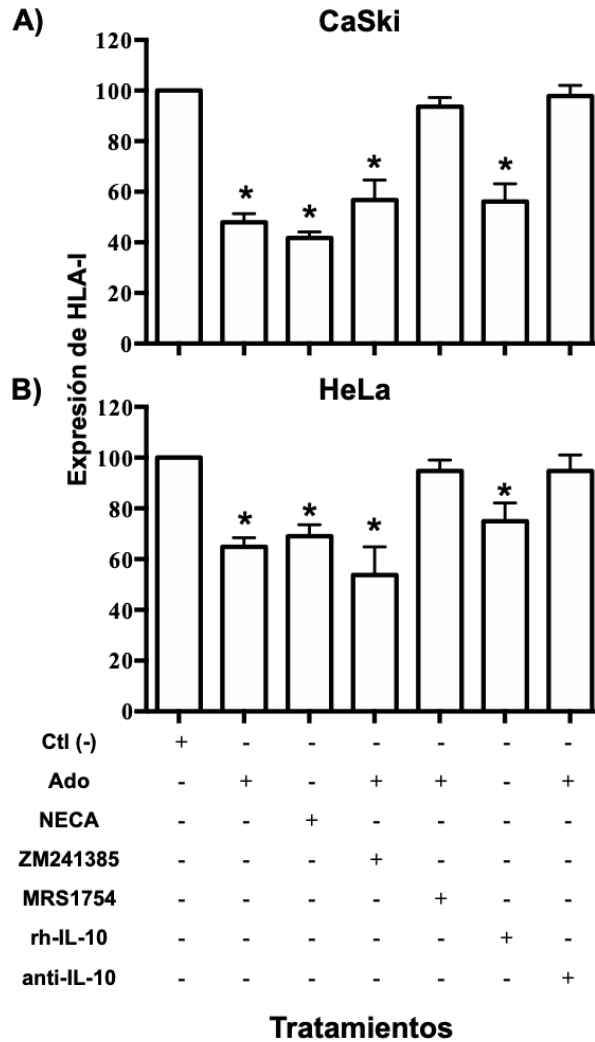


Figura 14. El bloqueo de A2BR revierte la disminución de moléculas HLA-I inducida por Ado en células de CaCu. Células CaSki y HeLa (1×10^5) fueron cultivadas en presencia de $10 \mu\text{M}$ de adenosina (Ado). Treinta minutos antes de agregar Ado, $10 \mu\text{M}$ de ZM241385 o MRS1754, antagonistas específicos de $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$ respectivamente fueron adicionados a los cultivos. Después de 48hrs, la expresión de moléculas HLA-I se analizó por citometría de flujo. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes, se muestran los promedios \pm SD. * ($p < 0.05$) para la expresión de moléculas HLA-I en células tratadas con respecto al control negativo (Ctl (-)).

Finalmente, para comprobar el mecanismo de evasión inmune de las células tumorales mediado por la vía CD73-Ado, células CaSki fueron previamente cultivadas en presencia de $10 \mu\text{M}$ de Ado; 5 ng/ml de IL-10 recombinante humana (rhIL-10); $10 \mu\text{M}$ de Ado con $10 \mu\text{M}$ de ZM241385; $10 \mu\text{M}$ de Ado con $10 \mu\text{M}$ de MRS1754 o $10 \mu\text{M}$ de Ado en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-IL-10. Posteriormente, se cocultivaron linfocitos T citotóxicos específicos, los cuales fueron

previamente estimulados con péptidos antigénicos derivados de las proteínas E6 y E7 de VPH-16 y que se unen específicamente al alelo HLA-A2 (Kast *et al.*, 1994; Rensing *et al.*, 1995; García-Rocha *et al.*, 2015).

Como se esperaba, Ado e IL-10 recombinante favorecieron la evasión del reconocimiento inmune en las células tumorales, mientras que el bloqueo del receptor A_{2B}R y la neutralización de IL-10, empleando un anticuerpo neutralizante, revertieron el efecto de Ado, haciendo a las células tumorales más sensibles a la actividad citotóxica de los linfocitos T (Figura 15). Estos resultados indican que la interacción de Ado con el receptor A_{2B}R incrementa la producción de IL-10 en las células tumorales y las induce a disminuir la expresión de moléculas HLA-I para protegerlas de la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos.

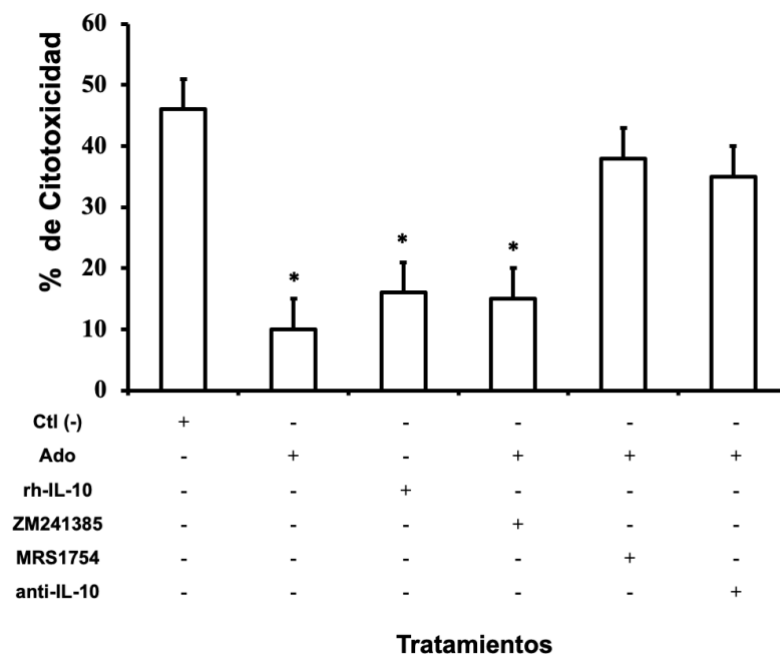


Figura 15. Adenosina protege a las células de CaCu del efecto citotóxico de las células T, el cual es revertido por el bloqueo de A_{2B}R. Para determinar si adenosina protege a las células de CaCu del efecto citotóxico de células T específicamente activadas, células CaSki fueron previamente cultivadas por 48 horas en presencia de 10 µM o 5 ng/mL de IL-10 recombinante humana. Posteriormente, se cocultivaron con linfocitos T CD8⁺ específicos para los péptidos antigénicos KLPQLCTEL (18-26 residuos) derivados de la proteína E6 del VPH-16 o TLHEYMLDL (7-15 residuos) y YMLDLQPETT (11-20 residuos) derivados de la proteína E7 del VPH-16. La actividad de los linfocitos T citotóxicos fue evaluada midiendo la viabilidad de las células marcadas con CFSE y 7-AAD. Los resultados son representativos de tres ensayos independientes, se muestran los promedios ± SD. * (p<0.05) comparada con la actividad de linfocitos T citotóxicos sobre células CaSki cultivadas en ausencia de adenosina (Ctl (-)).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Nuestro grupo de trabajo reportó que las células de CaCu expuestas a AMP pueden generar grandes cantidades de Ado para suprimir las funciones de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al.*, 2017). No obstante, en el presente estudio se proporcionan, por primera vez, evidencias de que las células de CaCu son inducidas a incrementar la producción de IL-10 a través de la vía adenosinérgica. Células de CaCu cultivadas en presencia de AMP o Ado fueron inducidas a expresar y secretar IL-10. De manera interesante, el silenciamiento de CD73 o el bloqueo del receptor A_{2B}R con un antagonista específico, revirtió este efecto. Además, la IL-10 producida indujo un decremento en la expresión de moléculas HLA-I en células de CaCu.

Se ha reportado que Ado al interactuar con los receptores A_{2A}R y A_{2B}R es capaz de inhibir la activación de células efectoras del sistema inmune al incrementar los niveles de AMPc, produciendo en consecuencia una reducción en la síntesis de citocinas proinflamatorias e incremento en la síntesis de citocinas inmunosupresoras, tales como IL-10 (Kocsso *et al.*, 2012; Ohta *et al.*, 2001; Regateiro *et al.*, 2013). En el presente estudio, observamos que el tratamiento de las células tumorales CaSki y HeLa con concentraciones mayores a 10 μ M de AMP o de Ado, fueron inducidas a producir IL-10. Es importante mencionar que las células CaSki produjeron mayores cantidades de IL-10 en relación con las células HeLa, 190 pg/ml y 75 pg/ml, respectivamente. Estos resultados pueden estar relacionados por la capacidad de las células para generar Ado, y por la cantidad de A₂Rs expresados en las células tumorales. En el año 2017, nuestro grupo de investigación reportó una mayor expresión de CD73 en las células CaSki con respecto a las células HeLa, lo cual se relacionó con una mayor capacidad de las células CaSki para producir Ado (Mora-García *et al.*, 2017). De manera interesante, encontramos que cuando las células CaSki y HeLa fueron interferidas a expresar CD73 empleando un siRNA, ambas líneas celulares redujeron de manera importante la capacidad para producir IL-10. Este efecto fue más notable en las células HeLa. No obstante, cuando se adicionó Ado exógena ambas líneas

celulares inhibidas en CD73 recuperaron la capacidad para producir IL-10 de manera similar a las respectivas líneas celulares parentales. Por otro lado, se ha reportado que la generación de citocinas inmunosupresoras, tal como IL-10 y TGF- β , a través de la señalización por Ado, está mediada principalmente por los receptores A_{2A} y A_{2B}. En nuestros resultados encontramos que la adición de MRS1754, antagonista de los receptores A_{2B}, revirtió fuertemente la producción de IL-10 estimulada por la Ado en ambas líneas celulares, mientras que la adición de ZM241385, antagonista de A_{2A}, solo produjo un efecto importante en la reducción de la producción de IL-10, inducido por Ado, en las células CaSki. Cabe mencionar que al analizar la expresión de los receptores A_{2A} y A_{2B}, se encontró una mayor expresión de receptores A_{2B} en las células CaSki en relación con las células HeLa. Esto puede estar relacionado con una mayor señalización de Ado a través de este receptor para inducir la producción de IL-10, tal como ha sido observado en las células efectoras del sistema inmune (Nemeth *et al.*, 2005; Koscsó *et al.*, 2012; Bhairavabhotla *et al.*, 2007).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo no solo demostraron que la vía adenosinérgica participa en la generación de IL-10, sino que las cantidades de IL-10 producidas por las células tumorales son capaces de inducir una significativa disminución de la expresión de moléculas HLA-I. De manera interesante, la disminución en expresión de las moléculas HLA-I en las células tumorales disminuyó en relación con la producción de IL-10 por las células tumorales, encontrándose un 40% y 60% de reducción en las células HeLa y Caski, respectivamente, después de que las células fueron tratadas con Ado o AMP. De manera importante, también se demostró la participación de la vía CD73-Ado en este fenómeno, debido a que las células tumorales inhibidas en la expresión de CD73, no disminuyeron la expresión de moléculas HLA-I al ser tratadas con AMP, a menos de que estas células fueran estimuladas con Ado para producir IL-10. También se demostró que la señalización de Ado a través de del receptor A_{2B} es fundamental en este fenómeno, ya que al emplear el antagonista para el receptor A_{2B} (MRS1754) se revirtió la disminución en la expresión de moléculas HLA-I en las

células tumorales, de manera similar a cuando se utilizó un anticuerpo neutralizante anti-IL-10.

En el caso particular del CaCu, varios estudios han demostrado que la presencia del VPH correlaciona directamente con la expresión de CD73, incluso se ha observado que las proteínas virales E6 y E7 podrían estar participando en la sobreexpresión de esta ectoenzima (Beckenkamp *et al.*, 2014; Mora-García *et al.*, 2017; García-Rocha *et al.*, 2018; Gutiérrez-Hoya *et al.*, 2019; Mora-García *et al.*, 2019). Por esta razón, linfocitos T citotóxicos específicos para reconocer péptidos de las proteínas E6 y E7 se cocultivaron en presencia de células tumorales de CaCu para evaluar su actividad citotóxica. Asimismo, los tratamientos con Ado o IL-10 recombinante fueron suficientes para proteger a las células tumorales de la actividad citotóxica de los LTC mientras que, el antagonista para el receptor A_{2B} o un anticuerpo neutralizante anti- IL-10 favoreció el reconocimiento de las células tumorales por linfocitos T citotóxicos.

Tomando en cuenta que los tumores de CaCu se caracterizan por producir altas concentraciones de IL-10, la cual además de suprimir la función de células efectoras de la respuesta inmune (Piersma, 2011; Feng *et al.*, 2012; Nemeth *et al.*, 2005; Bours *et al.*, 2006; Berti *et al.*, 2017; Sheu *et al.*, 2001), disminuye la expresión de moléculas HLA-I en las células tumorales para evadir el reconocimiento inmune (Feng *et al.*, 2012; Montesinos *et al.*, 2013; Nemeth *et al.*, 2005; Bours *et al.*, 2006; Berti *et al.*, 2017; Sheu *et al.*, 2001), y que en otros tumores como melanoma, glioblastoma, cáncer de ovario, gástrico, esófago y próstata también se ha observado baja expresión de moléculas HLA-I asociado con la producción de citocinas inmunosupresoras (Belicha *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2008; Tsuchikawa *et al.*, 2011; Seliger *et al.*, 2010), de acuerdo a nuestros resultados, el bloqueo de la actividad hidrolítica de CD73 o de la señalización de receptores de Ado clave en la producción de estas citocinas, tal como A_{2B}R, podría ser considerada como una estrategia potencial para el tratamiento del CaCu y de otros tipos de cáncer.

CONCLUSIONES

La vía CD73-Ado juega un papel importante en la inducción de la expresión y secreción de IL-10 en células de CaCu a través de la generación de Ado y la activación del receptor A_{2B}R.

La IL-10 producida a través de la vía adenosinérgica desregula la expresión de moléculas HLA-I en células tumorales, lo cual las protege del reconocimiento inmune mediado por linfocitos T citotóxicos.

PERSPECTIVAS

Dilucidar las vías de señalización involucradas en la generación de IL-10 a través de la activación del receptor A_{2B}R, así como, la vía de señalización implicada en la desregulación de moléculas HLA-I mediante IL-10.

Analizar en un modelo tumoral *in vivo* el papel de antagonistas específicos para el receptor A_{2B}R sobre el reconocimiento antitumoral a través de la modulación de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B., Jhonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2004). *Biología Molecular de la Célula*. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona.
2. Aliagas E., Vidal A., Texidó L., Ponce J., Condom E. y Satué M. M. (2014). *High expression of ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 in human endometrial tumors*. *Mediators of inflammation*; 1-9.
3. Alonso de Ruiz P., Lazcano-Ponce E., Hernández-Avila M. (2000). *Cáncer cervicouterino*. Diagnóstico, prevención y control. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.
4. Alvarado D., Mantilla D. L. y González M. (2009). *Lesión intraepitelial de bajo grado endocérvix: conducta*. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*; 69 (1): 41-47.
5. Antonioli L., Pacher P., Vizi E. S. y Haskó György. (2013). *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. *Trends in Molecular Medicine*; 19 (6): 355-367.
6. Ávila-Ibarra L. (2011). *Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino*. Tesis de Licenciatura, Fes Zaragoza, UNAM.
7. Ávila-Ibarra L. (2014). *Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) como mecanismo inmunosupresor de células tumorales de cáncer de cuello uterino*. Tesis de Maestría, Fes Zaragoza, UNAM.
8. Azar K. K., Tani M., Yasuda H., Sakai A., Inoue M. y Sasagawa T. (2004). *Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions*. *Human Pathology*; 35 (11): 1376–1384.
9. Beckenkamp A., Santana D. B., Bruno A. N., Calil L. N., Casali E. A., Paccez J. D., Zerbini L., Ienz G., Wink M. y Buffon A. (2014). *Ectonucleotidase*

- expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. Biochemistry and Cell Biology; 92 (2): 95–104.*
10. Belicha-Villanueva A., McEvoy S., Cycon K., Ferrone S., Gollnick S. O. y Bangia N. (2008). *Differential contribution of TAP and tapasin to HLA class I antigen expression. Immunology; 124(1): 112–120.*
 11. Bermúdez-Morales V.H., Gutierrez L. X., Alcocer-Gonzalez J. M., Burguete A., Madrid-Marina V. (2008). *Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. Cancer Invest. 26:1037-1043.*
 12. Berti F. C., Pereira A. P., Cebinelli G. C., Trugilo K. P. y Brajao de Oliveira K. (2017). *The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. Cytokine Growth Factor Reviews; 34: 1-13.*
 13. Bhairavabhotla R., Verma V., Tongaonkar H., Shastri S., Dinshaw K. y Chiplunkar S. (2007). *Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics; 44: 350-356.*
 14. Bolpetti A., Silva J. S., Villa L. L., y Lepique A. (2010). *Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. BMC Immunology; 11 (1): 27.*
 15. Bours M. J., Swennen E. L., Di Virgilio F., Cronstein B.N. y Dagnelie P. C. (2006). *Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacology and Therapeutics. 112 (2): 358-404.*
 16. Brady C. S., Bartholomew J. S., Burt D. J., Duggan-Keen M. F., Glenville S., Telford N. y Stern P. L. (2000). *Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. Tissue Antigens; 55 (5): 401–411.*
 17. Burchell A. N., Winer R. L., De Sanjosé S. y Franco E. (2006). *Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. Vaccine. 3: 52-61.*
 18. Burd E. M. (2003). *Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews; 16 (1): 1-17.*

19. Chavaro N., Arroyo G., Alcázar L., Muruchi G. y Pérez I. (2009). *Cáncer cervicouterino*. *Anales de radiología México*;1: 61-79.
20. Chow L. T., Broker T. R. y Steinberg B. M. (2010). *The natural history of human papillomavirus infections of mucosal epithelial*. *APMIS*. 118: 422-449.
21. Clerici M., Merola M., Ferrario E., Trabattoni D., Villa M. L., Stefanon B., Venzon D. J., Shearer G. M., De Palo G. y Clerici E. (1997). *Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection*. *Journal of National Cancer Institute*. 89: 245-250.
22. Concha-Benavente F., Srivastava R., Ferrone S. y Ferris R. L. (2016). *Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells*. *Oral Oncology*; 58: 52–58.
23. Cromme F. V., van Bommel P. F., Walboomers J. M., Gallee M. P., Stern P. L., Helmerhorst T. J., Stukart M. J. y Meijer C. J. (1994). *Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours*. *British Journal of Cancer*; 69: 1176-1181.
24. Deaglio S., Dwyer K. M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J. F., Enjoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V. K., Strom T. B. y Robson S. C. (2007). *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediate immune suppression*. *The Journal of Experimental Medicine*; 204: 1257-1265.
25. de Villiers, E. M. y Zur Hausen H. (1981). *Molecular cloning of viral DNA from human genital warts*. *Journal of Virology*; 40: 932 – 935.
26. De Villers E. M., Fauquet C. y Broker T. R. (2004). *Classification of papillomaviruses*. *Virology*. 324: 17-27.
27. Doorbar J. (2006). *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. *Clinical Science*; 110: 525-541.
28. Doorbar J. (2007). *Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection*. *Disease Markers*. 23: 297-313.

29. Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., y Schreiber R. D. (2002). *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunology. 3: 991-8.
30. Facchetti A., Nano R., Zelini P., Morbini P., Benericetti E., Ceroni M., Campoli M. y Ferrone S. (2005). *Human Leukocyte Antigen and Antigen Processing Machinery Component Defects in Astrocytic Tumors*. Clinical Cancer Research; 11 (23): 8304–8311.
31. Feng Q., Wei H., Morihara J., Stern J., Yu M., Kiviat N. y Hellstrom, K. E. (2012). *Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma*. Gynecologic Oncology; 127 (2): 412–419.
32. Fernández L., Álvarez R., Arango M., Alcocer J. M., Cruz J., Escobar X., Orozco M., Franco S., Camacho R., Guerra M. E., Madrid V., Tamez R. y Rodríguez C. (2006). *Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients*. The Breast; 15 (4): 482-489.
33. García-Rocha, R., Moreno-Lafont, M., Mora-García, M. L., Weiss-Steider, B., Montesinos, J. J., Piña-Sánchez, P., & Monroy-García, A. (2015). *Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF- β 1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity*. Cytokine; 76(2): 382–390.
34. García-Rocha, R., Monroy-García, A., Hernández-Montes, J., Weiss-Steider, B., Gutiérrez-Serrano, V., del Carmen Fuentes-Castañeda, M., ... de Lourdes Mora-García, M. (2018). *Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1*. Cytokine.
35. Gariglio P. y Rangel L. (1992). *Virus and cancer*. Review Spanish. Salud Pública México; 34(3):308-317.
36. Garrido F. (2019). *HLA Class-I Expression and Cancer Immunotherapy*. MHC Class-I Loss and Cancer Immune Escape, 79–90.
37. Gerlini G., Tun-Kyi A., Dudli C., Burg G., Pimpinelli N. y Nestle F. (2004). *Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on*

- dendritic cells in metastatic tumor lesions*. American Journal of Pathology; 165:1853–63.
38. Gessi S., Varani K., Merighi S., Fogli E., Sacchetto V., Benini A., Leung E., Mac-Lennan S. y Borea P. A. (2007). *Adenosine and lymphocyte regulation*. Purinergic Signalling; 3:109-116.
 39. GLOBOCAN, IARC, *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018*, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, [Consulta: jueves, 23 de abril de 2020].
 40. Gutiérrez-Hoya, A., Zerecero-Carreón, O., Valle-Mendiola, A., Moreno-Lafont, M., López-Santiago, R., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz, I. (2019). *Cervical Cancer Cells Express Markers Associated with Immunosurveillance*. Journal of Immunology Research; 2019: 1–10.
 41. Guzmán L., Alcocer J. y Madrid V. (1998). *Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cancer*. Review Spanish. Salud Pública México; 40(1):38-46.
 42. Han L. Y., Fletcher M. S., Urbauer D. L., Mueller P., Landen C. N., Kamat A. A., Lin Y. G., Merritt W. M., Spannuth W. A., Deavers M. T., De Geest K., Gershenson D. M., Lutgendorf S. K., Ferrone S. y Sood A. K. (2008). *HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma*. Clinical Cancer Research; 14: 3372-3379.
 43. Hansen T. H. y Bouvier M. (2009). *MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies*. Nature Reviews Immunology; 9 (7): 503–513.
 44. Hernández M. M. y Ríos H. M. A. (1999). *Oncogenes y Cáncer*. Revista Cubana de Oncología, 15 (2): 131-139.
 45. Hilders C., Ras L., Van Eendenburg J., Nooyen Y. y Fleuren G. (1994). *Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma*. International Journal of Cancer; 15:57(6):805-813.
 46. Hildesheim A., Schiffman M. H., Gravitt P. E. (1994). *Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women*. Journal of Infectious Diseases; 169 (2): 235 – 40.

47. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, 1998: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 338 (7): 423–8.
48. INEGI, *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*, 2018, <http://www.inegi.org.mx/>, [Consulta: lunes, 20 de marzo de 2018].
49. Jacobs N., Giannini S. L., Doyen J., Baptista A., Moutschen M., Boniver J. y Delvenne P. (1998). *Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix*. *Clinical and Experimental Immunology*; 111: 219-224.
50. Jacobson K. A., Balasubramanian R., Deflorian F. y Gao Z. (2012). *G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions*. *Purinergic Signalling*; 8:419-436.
51. Jin D., Fan J., Wang L., Thompson L. F., Liu A., Daniel B. J., Shin T., Curiel T. J. y Zhang B. (2010). *CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression*. *Cancer Research*; 70 (6): 2245-2255.
52. Kalhan A., Gharibi B., Vázquez M., Jasani B., Neal J., Kidd M., Modlin I. M., Pfragner R., Rees D. A. y Ham J. (2012). *Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy*. *Purinergic Signalling*; 8:265-274.
53. Karp G. (2006). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill. México.
54. Kast W. M., Brandt R. M., Sidney J., Drijfhout J. W., Kubo R. T., Grey H. M., Melief C. J. and Sette A. (1994). *Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins*. *Journal of Immunology*; 152 (8): 3904-3912.
55. Khong H. y Restifo N. (2002). *Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes*. *Nature Immunology*; 3: 999-105.
56. Kim R., Emi M. y Tanabe K. (2005). *Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses*. *Cancer Biology and Therapy*; 4: 924-933.
57. Kim R., Emi M. y Tanabe K. (2007). *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. *Immunology*; 121: 1-14.

58. Knipe D., Lamb R., Howley P., Griffin D. y Martin M. (2006). *Papillomaviruses, Section II: Specific virus families*. Virology; 3091.
59. Kobie J., Shah P., Yang L., Rebhahn J., Fowell D. y Mosmann T. (2006). *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine*. Journal of Immunology; 177: 6780–6786.
60. Koopman L. A., van der Slik A. R., Giphart M. J., y Fleuren, G. J. (1999). *Human Leukocyte Antigen Class I Gene Mutations in Cervical Cancer*. Journal of the National Cancer Institute; 91 (19): 1669–1677.
61. Koopman L., Corver W., van der Slik A., Giphart M. y Fleuren G. (2000). *Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer*. Journal of Experimental Medicine; 191 (6): 961-976.
62. Koscsó B., Csóka B., Selmeczy Z., Himer L., Pacher P., Virág L. y Haskó G. (2012). *Adenosine Augments IL-10 Production by Microglial Cells through an A_{2B} Adenosine Receptor-Mediated Process*. Journal of Immunology; 188: 445-453.
63. Leone, R.D., Horton, M.R., Powell, J.D., (2015). *Previews something in the air: hyperoxic conditioning of the tumor microenvironment for enhanced immunotherapy*. Cancer Cell 27, 435–436.
64. Li M., Wan Y., Sanjabi S., Robertson A. y Flavell R. (2006). *Transforming growth factor- β regulation of immune responses*. Annual Review of Immunology; 24:99–146.
65. Lockhart D. C., Chan A. K., Mak S. et al. (2001). *Loss of T-cell receptor-CD3zeta and T-cell function in tumor-infiltrating lymphocytes but not in tumor-associated lymphocytes in ovarian carcinoma*. Surgery; 129: 749-756.
66. López-Martínez A., Chávez-Muñoz C. y Granados J. (2005). *Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad*. Revista de Investigación Clínica; 57(2): 132-141.

67. López A. y Lizano M. (2006). *Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina*. Instituto Nacional de Cancerología; 1: 31-55.
68. López R., Martínez L. A. y Sánchez M. (2008). *Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma*. *Infectious Agents and Cancer*; 3 (3): 1-13.
69. Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A. H. y Jonuleit H. (2002). *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. *Immunology and Cell Biology*; 80: 477-483.
70. Maleno I., Romero J. M., Cabrera T., Paco L., Aptsiauri N., Cozar J. M., Tallada M., Lopez-Nevot M. A. y Garrido F. (2006) *LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas*. *Immunogenetics*; 58: 503–510.
71. Malmberg K. J. (2004). *Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape?*. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 53: 879-892.
72. Mehta A. M., Jordanova E. S., Kenter G. G., Ferrone S. y Fleuren G. J. (2008). *Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma*. *Cancer Immunology and Immunotherapy*; 57: 197-206.
73. Meissner M. (2005). *Defects in the Human Leukocyte Antigen Class I Antigen Processing Machinery in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Association with Clinical Outcome*. *Clinical Cancer Research*; 11 (7): 2552–2560.
74. Melo A., Montenegro S., Hooper T., Capurro I., Roa J. C. y Roa I. (2003). *Tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile*. *Revista Médica de Chile*; 131: 1382-1390.
75. Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S., Baraldi P. G. y Borea P. A. (2005). *A₃ Adenosine Receptors Modulate Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Human A375 Melanoma Cells*. *Neoplasia*; 7 (10): 894-903.

76. Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., Maclennan S. y Borea P. A. (2006). *Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells*. *Biochemical Pharmacology*; 72 (1): 19-31.
77. Mindiola R., Caulejas D., Núñez-Troconis J., Araujo M., Delgado M. y Mosquera J. *Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix*. *Investigación Clínica*; 49: 533-545.
78. Montalvo G., Coronel J. A., Alvarado A., Cantú D., Flores D., Ortega A., González A., Isla D., Muñoz D. E., Robles J. U., Solorza G., Mota A., Gallardo D., Morales F., Cetina M. L. y Herrera A. (2011). *Oncoguía: Cáncer Cervicouterino*. *Cancerología*; 6: 61-69.
79. Montesinos, J. J., Mora-García, M. de L., Mayani, H., Flores-Figueroa, E., García-Rocha, R., Fajardo-Orduña, G. R., ... Monroy-García, A. (2013). *In Vitro Evidence of the Presence of Mesenchymal Stromal Cells in Cervical Cancer and Their Role in Protecting Cancer Cells from Cytotoxic T Cell Activity*. *Stem Cells and Development*; 22(18): 2508–2519.
80. Mora-García, M. L., Ávila-Ibarra, L. R., García-Rocha, R., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., Don-López, C. A., ... Monroy-García, A. (2017). *Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway*. *Cellular Immunology*; 320: 46–55.
81. Mora-García, M. L., López-Cisneros, S., Gutiérrez-Serrano, V., García-Rocha, R., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., ... Monroy-García, A. (2019). *HPV-16 Infection Is Associated with a High Content of CD39 and CD73 Ectonucleotidases in Cervical Samples from Patients with CIN-1*. *Mediators of Inflammation*; 2019: 1–13.
82. Muñoz N. (2000). *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence*. *Journal of Clinical Virology*; 19:1-5.
83. Muñoz N. y Bosch F. X. (1997). *Cervical cáncer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention*. *Salud Pública de México*; 39 (4): 274-282.

84. Nagaraj N. S. y Datta P. K. (2009). *Targeting the transforming growth factor- β signaling pathway in human cancer*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*; 19 (1): 77–91.
85. Nemeth Z. H., Lutz C. S., Csoka B., Deitch E. A., Leibovich S. J., Gause W. C., Tone M., Pacher P., Vizi E. S. y Hasko G. (2005). *Adenosine Augments IL-10 Production by Macrophages through an A2B Receptor-Mediated Posttranscriptional Mechanism*. *The Journal of Immunology*; 175(12): 8260–8270.
86. Ochsenbein A. F., Klenerman P., Karrer U., Ludewig B., Pericin M., Hengartner H. y Zinkernagel R. M. (1999). *Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*; 6: 2233-2238.
87. Ohta A. y Sitkovsky M. (2001). *Role of G-protein-couple adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage*. *Nature*; 414 (6866): 916-920.
88. Ohta A., Gorelik E. y Prasad S. (2006). *A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*; 103: 13132-13137.
89. Organización Mundial de la Salud, *Cáncer*, 2020, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>, [Consulta: martes, 16 de abril de 2020].
90. Pan Y., Trojan J., Guo Y., y Anthony D. D. (2013). *Rescue of MHC-1 Antigen Processing Machinery by Down-Regulation in Expression of IGF-1 in Human Glioblastoma Cells*. *PLoS ONE*; 8(3): 1-11.
91. Parcej D., y Tampé R. (2010). *ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition*. *Nature Chemical Biology*; 6 (8): 572–580.
92. Peaper D. R. y Cresswell P. (2008). *Regulation of MHC Class I Assembly and Peptide Binding*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 24 (1): 343–368.
93. Piersma S. J. (2011). *Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients*. *Cancer Microenvironment*; 4: 361-375.

94. Rangel G., Garay T. y Arellano R. (2007). *El ATP como transmisor químico extracelular*. Revista Mexicana de Neurociencia; 8 (3): 276-285.
95. Regateiro F. S., Cobbold S. P. y Waldmann H. (2013). CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. Clinical and Experimental Immunology; 171 (1): 1-7.
96. Rensing M. E., Sette A., Brandt R. M., Ruppert J., Wentworth P. A., Hartman M., Oseroff C., Grey H. M., Melief C. J. y Kast W. M. (1995). *Human epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides*. Journal of Immunology; 154 (11): 5934-5943.
97. Rivoltini L., Carrabba M., Huber V., Castelli C. y Novellino L. (2002). *Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction*. Immunology Review; 188: 97-113.
98. Robson S. C., Sévigny J y Zimmermann H. (2006). *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signaling; 2:409-430.
99. Romero J. M., Jiménez P., Cabrera T., Cózar J. M., Pedrinaci S., Tallada M., Garrido F y Ruiz-Cabello F. (2004). *Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/β2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer*. International Journal of Cancer; 113 (4): 605–610.
100. Romero I., Martinez M., Garrido C., Collado A., Algarra I., Garrido F., García-Lora A. M. (2012). *The tumour suppressor Fhit positively regulates MHC class I expression on cancer cells*. Journal of Pathology; 227 (3): 367–379.
101. Sadegh-Nasser S., Chen M., Narayan K., y Bouvier, M. (2008). *The convergent roles of tapasin and HLA-DM in antigen presentation*. Trends in Immunology; 29 (3): 141–147.
102. Sadej R., Sychala J. y Skladanowski A. (2006). *Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metástasis promoting antigens in human melanoma cells*. Nucleotides Nucleic Acids; 25: 1119-1123.

103. Saldanha F., Ferreira F., Palma P., Araujo A., Queiroz R., Covas D., Zago M. y Panepucci R. (2011). *Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes*. Stem Cell Research. 7 (1): 66-74.
104. Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). *Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion*. Science; 331(6024): 1565–1570.
105. Seliger B., Stoehr R., Handke D., Mueller A., Ferrone S., Wullich B., Tannapfel A., Hofstaedter F. y Hartmann A. (2009). *Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer*. Cancer Immunology. Immunotherapy; 59 (4): 529–540.
106. Sevigny C., Li L., Awad A., Huang L., McDuffie M., Linden J., et al. (2007). *Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigenrecognition*. Journal of Immunology; 178:4240–4249.
107. Sheu B.-C., Lin R.-H., Lien H.-C., Ho H.-N., Hsu S.-M., y Huang S.-C. (2001). *Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical Cancer*. The Journal of Immunology; 167(5): 2972–2978.
108. Sitkovsky M. y Ohta A. (2005). *The 'danger' sensors that STOP the immune response: theA2 adenosine receptors?* Trends in Immunology; 26: 299-304.
109. Sitkovsky M., Kjaergaard J., Lukashev D. y Ohta A. (2008). *Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: Tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia*. Clinical Cancer; 14: 5947-5952.
110. Spiotto M. T., Yu P., Rowley D. A., Nishimura M. I., Meredith S. C., Gajewski T. F., Fu Y., X. y Schreiber H. (2002). *Increasing tumor antigen expression overcomes 'ignorance' to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells*. Immunity; 7: 737-747.
111. Spychala J. (2000). *Tumor-promoting functions of adenosine*. Pharmacology and Therapeutics; 87: 161–173.
112. Stagg J., Divisekera U., McLaughlin N., Sharkey J., Pommey S., Denoyer D., Dwyer K. y Smyth M. (2010). *Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast*

- tumor growth and metastasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences; 107 (4): 1547-1552.
113. Stagg J., Divisekera U., Duret H., et al. (2011). *CD73-Deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis*. Research Cancer; 71:2892-2900.
 114. Stanley M. A. (2012). *Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus*. Clinical Microbiology Reviews. 25 (2): 215-222.
 115. Teraben M., Matsui S., Noben-Trauth N., Chen H. y Watson C. (2000). *NK T cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway*. Nature Immunology; 1: 515–20.
 116. Terrazzano G. et al. (2000). *HLA class I antigen downregulation by interleukin (IL)-10 is predominantly governed by NF-kB in the short term and by TAP1-2 in the long term*. Tissue Antigens; 55: 326–332.
 117. Thompson L., Eltzschig H., Ibla J., Van De Wiele C., Resta R., Morote-Garcia J. y Colgan S. (2004). *Crucial Role for Ecto-5-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia*. Journal of Experimental Medicine; 200 (11): 1395–1405.
 118. Tindle R. (2002). *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. Nature Reviews; 2: 1-7.
 119. Tsuchikawa T., Ikeda H., Cho Y., Miyamoto M., Shichinohe T., Hirano S. y Kondo S. (2011). *Association of CD8+ T cell infiltration in oesophageal carcinoma lesions with human leucocyte antigen (HLA) class I antigen expression and survival*. Clinical and Experimental Immunology; 164: 50-56.
 120. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). *Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer*. Annual Review of Immunology; 29(1): 235–271.
 121. Wang L., Zhou X. y Zhou T. (2008). *Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology; 134: 365–372.
 122. Wang L., Fan J., Thompson L., Zhang Y., Shin T., Curiel T. y Zhang B. (2011). *CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to*

- promote tumor growth in mice*. Journal of Clinical Investigation; 121 (6): 2371–2382.
123. Wilson V. G., West M. y Woytek K. (2002). *Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features*. Virus Genes; 24: 275-90.
124. Yue F. Y., Dummer R., Geertsen R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S. y Burg G. (1997). *Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA Class-II and I ICAM-1 molecules*. International Journal of Cancer; 71, 630–637.
125. Zitvogel L., Tesniere A y Kroemer G. (2006). *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nature Reviews Tumor Immunology; 6: 715-727.
126. Zou W. (2005). *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nature Reviews Cancer. 5: 263-274.
127. Zur Hausen H. (1982). *Human genital cancer; synergism between two virus infection and/or synergism between a virus infection and initiating events?* Lancet II; 1370-1772.
128. Zur Hausen H. (2000). *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis*. Journal of the National Cancer Institute; 92: 690-698.
129. Zur Hausen H. (2002). *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nature Reviews; 2: 342-350.



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Adenosine augments the production of IL-10 in cervical cancer cells through interaction with the A_{2B} adenosine receptor, resulting in protection against the activity of cytotoxic T cells

Daniela Berenice Torres-Pineda^{a,b}, María de Lourdes Mora-García^c, Rosario García-Rocha^c, Jorge Hernández-Montes^c, Benny Weiss-Steider^c, Juan José Montesinos-Montesinos^d, Christian Azucena Don-López^c, Luis Antonio Marín-Aquino^a, Ricardo Muñoz-Godínez^a, Luis Roberto Ávila Ibarra^c, Ricardo López Romero^e, Alberto Monroy-García^{a,c,*}

^a Laboratorio de Inmunología y Cáncer, UIMEO, H Oncología, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

^b Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Ciudad de México, Mexico

^c Laboratorio de Inmunobiología, UIDCC-UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM, Ciudad de México, Mexico

^d Laboratorio de Células Troncales Mesequimales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

^e Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cervical cancer
Interleukin-10
HLA Class I downregulation
Adenosinergic pathway
A_{2B} adenosine receptor
Immune evasion

ABSTRACT

Cervical cancer (CeCa) produces large amounts of IL-10, which downregulates the major histocompatibility complex class I molecules (HLA-I) in cancer cells and inhibits the immune response mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTLs). In this study, we analyzed the ability of CeCa cells to produce IL-10 through the CD73–adenosine pathway and its effect on the downregulation of HLA-I molecules to evade CTL-mediated immune recognition. CeCa cells cultured in the presence of $\geq 10 \mu\text{M}$ AMP or adenosine produced 4.5–6 times as much IL-10 as unstimulated cells. The silencing of CD73 or the blocking of A_{2B}R with the specific antagonist MRS1754 reversed this effect. In addition, IL-10 decreased the expression of HLA-I molecules, resulting in the protection of CeCa cells against the cytotoxic activity of CTLs. The addition of MRS1754 or anti-IL-10 reversed the decrease in HLA-I molecules and favored the cytotoxic activity of CTLs. These results strongly suggest the presence of a feedback loop encompassing the adenosinergic pathway, the production of IL-10, and the downregulation of HLA-I molecules in CeCa cells that favors immune evasion and thus tumor progression. This pathway may have clinical importance as a therapeutic target.

1. Introduction

Cervical cancer (CeCa) is the fourth most common type of cancer in women worldwide and represents one of the main health problems worldwide [1]. It has been estimated that approximately 90% of deaths by CeCa in 2015 occurred in low- and middle-income countries, where

the death rate by this disease is 18 times higher than in developed countries [2]. Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is one of the main risk factors for the development of low-grade squamous intraepithelial lesions (SIL) and eventually CeCa [3]. During the progression of CeCa, the integration of HR-HPV sequences in the host cell genome and the expression of proteins E2, E6, and E7

Abbreviations: Ado, adenosine; Anti-IL-10, anti-human neutralizing antibody against IL-10; APCP, adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate; ARs, adenosine receptors; ATCC, American Type Culture Collection; CD39, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1; CD73, 5'-ectonucleotidase; CeCa, Cervical cancer; CTLs, cytotoxic T lymphocytes; HIF-1 α , Hypoxia-inducible factor 1 α ; HLA-I, major histocompatibility complex class I molecules; HR-HPV, high-risk human papillomavirus; Ino, inosine; MDSCs, myeloid-derived suppressor cells; MFI, mean fluorescence intensity; MRS1754, 8-[4-(((4-cyanophenyl)carbamoylmethyl)oxy)phenyl]-1,3-di(n-propyl)xanthine hydrate; NECA, 1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-deoxy-N-ethyl-b-D-ribofuranuronamide; NK, natural killer cells; rhIL-10, recombinant human interleukin-10; SILs, low-grade squamous intraepithelial lesions; TME, tumor microenvironment; T regs, regulatory T cells; ZM241385, 4-(-2-[7-amino-2-(2-furyl)](1,2,4)triazolo[2,3- α] [1,3,5]triazin-5-yl-amino)ethyl)phenol

* Corresponding author at: Oriente 170 No. 160 Colonia Moctezuma 2a Sección, Delegación Venustiano Carranza, C.P. 15530 Ciudad de México, Mexico.

E-mail addresses: deby@comunidad.unam.mx (D.B. Torres-Pineda), albertomon@yaho.com (A. Monroy-García).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155082>

Received 10 January 2020; Received in revised form 21 March 2020; Accepted 26 March 2020
1043-4666/ © 2020 Published by Elsevier Ltd.

induce the transcription of immunoregulatory cytokines, such as IL-10, which in addition to having anti-inflammatory and immunosuppressive activity favors the evasion of the immune response of the host [4–7]. In this context, the downregulation of class I human leukocyte antigens (HLA-I) is a phenomenon frequently observed in tumor cells to escape immune recognition mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) [8–10], and the presence of IL-10 in the tumor microenvironment is strongly associated with this mechanism [11–13]. Persistent infection by HR-HPV has been strongly associated with the presence of IL-10 in cervical tissues [4,15], and an increased level of this cytokine has been associated with downregulation of HLA-I molecules in cells infected with HR-HPV [12–14]. In fact, in patients with CeCa, high expression of IL-10 in cervical tissue correlates with higher-grade lesions [15–17]. The mechanisms by which IL-10 expression and secretion are induced in CeCa cells have not been fully elucidated.

On the other hand, the signaling of adenosine (Ado) through specific receptors ($A_{2A}R$ and $A_{2B}R$) in cells of the immune response, such as macrophages, microglia cells, and invariant natural killer T cells, has anti-inflammatory effects when promoting IL-10 production [18–20]. Ado, an endogenous purine nucleoside, is a biologically active extracellular signaling molecule that is produced in sites of metabolic stress associated with hypoxia, ischemia, trauma, or inflammation and even in the tumor microenvironment (TME) through the adenosinergic pathway, where high concentrations of adenosine triphosphate/adenosine diphosphate (ATP/ADP), more than 50 μM , are hydrolyzed to AMP by the ectoenzyme CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, ENTPD1; EC 3.6.1.5) and subsequently to Ado by the activity of 5'-ectonucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) [21–23]. The majority of the extracellular signaling activities of Ado are mediated by receptors in the cell membrane, which are coupled to G proteins and are divided into four subtypes ($A_{1}R$, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ and $A_{3}R$) [24–26].

We recently reported that CeCa cells express high levels of CD73 and generate large amounts of Ado from the hydrolysis of AMP [27]. In this study, we analyzed the ability of CeCa cells to produce IL-10 through the CD73-adenosine pathway and its effect on the downregulation of HLA-I molecules to evade CTL-mediated immune recognition.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

The CaSki (HPV16⁺) and HeLa (HPV18⁺) CeCa cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. CaSki and HeLa cells with inhibited expression of CD73, generated by our working group [28], were also used in this study.

2.2. Cell cultures

To analyze the participation of the adenosinergic pathway in the secretion of IL-10 and the expression of HLA-I molecules in CeCa cells, 1×10^5 tumor cells were cultured in 24-well plates for 48 h in the presence of different concentrations (1 μM , 10 μM , and 100 μM) of AMP or Ado. Cells cultured with 10 μM 1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-deoxy-N-ethyl-b-D-ribofuranuronamide (NECA), a nonselective AR agonist (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), were used as a positive control [19]. To inhibit the activity of CD73, 10 μM adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate (APCP), a specific inhibitor of CD73, was added. To block $A_{2}R$ s, a 10 μM concentration of the specific antagonist [4-(2-(7-amino-2-(2-furyl)(1,2,4)triazolo(2,3-a) (1,3,5)triazin-5-yl-amino) ethyl)phenol, ZM241385] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or [8-[4-(((4-Cyanophenyl)carbamoyl)methyl)oxy]phenyl]-1,3-di(n-propyl) xanthine hydrate, MRS1754] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added 30 min before the addition of Ado to cell cultures, as previously reported [28]. Cultures were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 IU/ml

penicillin, and 100 μM /ml streptomycin (Gibco) at 37 °C in 5% CO₂.

To decrease the expression of HLA-I, tumor cells were cultured in the presence of 5 ng/ml recombinant human IL-10 (rhIL-10, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). To neutralize the biological activity of rhIL-10 or IL-10 produced by the cells, 20 ng/ml of the rabbit anti-human IL-10-specific neutralizing antibody (anti-IL-10, PeproTech, NJ, USA) was added, as previously reported [29].

2.3. Expression of HLA-I in CeCa cells

The expression of HLA-I molecules in CeCa cells was determined by flow cytometry using the W6/32 monoclonal antibody, which recognizes a conformational epitope in the heavy chain complex/ β_2 -microglobulin. This antibody was generously provided by Dr. Gerd Moldenhauer of the German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany. Cells stained only with goat anti-mouse secondary antibody labeled with FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as a negative control. Cell samples were analyzed on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). After cellular debris was removed, a total of 10,000 events were analyzed for mean fluorescence intensity (MFI). In all experiments, MFI was determined at least three times. The results were compared with the baseline expression of HLA-I in CeCa cells, which was set to the value of 100.

2.4. Expression of CD73 and $A_{2}R$ in CeCa cells

The expression of CD73, $A_{2A}R$ and $A_{2B}R$ in the tumor cell membrane was determined by flow cytometry using the following antibodies: anti-CD73-PE monoclonal antibody (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti- $A_{2A}R$ -PE monoclonal antibody (NOVUS Biologicals, Colorado, USA), and the polyclonal antibody ADORA2B ALEXA FLUOR[®] 350 (Bioss Antibodies, Massachusetts, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions. The determinations were made in a FACSCanto flow cytometer. After discarding cell debris, 10,000 events were analyzed, and the MFI was determined in each case.

2.5. Hydrolytic activity of CD73 in CeCa cells

To determine the enzymatic activity of the ectonucleotidase CD73 in CeCa cells, 1×10^5 tumor cells were washed twice with PBS and then cultured in the presence of 5 mM AMP in a total volume of 100 μl of RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, which was dialyzed previously with a membrane (molecular weight cutoff of 12 kDa). To inhibit the enzymatic activity of CD73, the tumor cells were incubated in the presence of 5 mM APCP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After 30 min of incubation with the inhibitor, AMP was added to a final concentration of 5 mM. To analyze the generation of Ado in the cell cultures, supernatant samples were collected at the beginning and after 5 h of incubation. Ado was detected by thin-layer chromatography (TLC) using fluorescent plates previously coated with gel (Whatman; GE Healthcare, Freiburg, Germany). For this purpose, 2- μl samples of each supernatant were loaded onto the plates and subsequently eluted for 1 h using a mobile phase composed of a mixture of isobutanol: ethyl acetate: methanol: ammonia (7: 4: 3: 4) [30]. As standards, 1- μl samples of AMP, Ado, inosine (Ino), and hypoxanthine (Hyp) (Sigma-Aldrich) were used at 5 mM. Finally, the compounds were visualized and photographed under a UV transilluminator (UVP Biodo-H System, Upland, CA). Supernatant samples were also quantitatively analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) (Acquity UPLC, Waters, Milford MA, EE.UU.) using standard amounts of synthetic Ado as previously reported by our working group [27]. All experiments were run in triplicate.

2.6. Expression of IL-10 mRNA in CeCa cells

To determine the expression level of IL-10 mRNA in CeCa cells

cultured with medium alone or with different treatments, the tumor cells were harvested and washed twice with PBS. RNA was then extracted with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the supplier's instructions. cDNA was synthesized from 500 ng/ μ l of RNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The RT-PCR products of the CeCa cells were used to analyze the expression of IL-10 by endpoint RT-PCR. To control for the variations in the amounts of RNA, we measured β -actin as a normalization control. IL-10 was amplified by adding 5 μ l of cDNA from each sample plus 2.5 mM MgCl₂ to a reaction mixture with a final volume of 25 μ l according to the manufacturer's instructions for PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). The reactions were performed in a TC1000-G thermocycler (Biobase, USA) according to its protocol. cDNA was denatured for 5 min at 94 °C, and amplification was performed in 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at the best temperature for each primer pair, and extension at 72 °C. The last cycle was a 5-min extension at 72 °C. The amplified products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel. The gel was stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) to visualize the amplified PCR products on a UV transilluminator. The specific primers used for IL-10 and β -actin were as follows: IL-10 forward 5'GCATCACCTCCTCCAGGTAA'3, reverse 3'TGAAGGATCAGCTGGACAAC'5; β -actin forward 5'GGGTCA GAAGGATTCCTATG'3, reverse 3'GGTCTCAAACATGATCTGGG'5. The relative concentrations were evaluated by a densitometric analysis of autographic images digitized using the public domain ImageJ (available online: <http://imagej.nih.gov/ij/>). The relative concentrations were compared with the control group (cells cultured only with medium). All experiments were run in triplicate.

2.7. Levels of IL-10 in cultures of CeCa cells

The IL-10 levels in the culture supernatants of the CeCa cells were analyzed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for human IL-10 (Human IL-10 Standard ABTS ELISA Development Kit, PeproTech, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Cytotoxicity assays

To analyze the ability of effector T lymphocytes to recognize CeCa cells with low HLA-I expression, TCD8⁺ cells with specificity for the KLPQLCTEL antigenic peptide (residues 18–26 derived from the E6 protein of HPV-16 or TLHEYMLDL (residues 7–15) and YMLDLQPETT (residues 11–20) derived from the E7 protein of HPV-16, which bind specifically to the HLA-A0201 allele, were obtained by a method previously reported by our group [29]. CaSki cells cultured for 48 h with 10 μ M Ado or with 10 ng/ml rhIL-10 in the presence or absence of the anti-human IL-10 neutralizing antibody were marked with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA), and CD8⁺ T cells were labeled with a CD8-APC antibody (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) following the protocol provided by the supplier.

The cell viability solution 7-AAD (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) was used to measure cell lysis. Effector cells and target cells were incubated for 4 h in a 20:1 ratio. Viable cells were analyzed on a FACSCanto flow cytometer, collecting a minimum of 100,000 events, to determine the percentage of CFSE/7-AAD-positive target cells. In some cases, 5% hydrogen peroxide was used for total lysis of target cells. The percentage of lysis was calculated according to the following formula: % cytotoxicity = 100 \times [experimental lysis (CFSE⁺, 7-AAD⁺) – basal lysis (CFSE⁺, 7AAD⁺)].

2.9. Statistical analysis

All numerical data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) from experiments performed in triplicate. The comparisons were made by the Kruskal-Wallis test within GraphPad Prism software

(GraphPad, Software, La Jolla, CA, USA). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. CeCa cells increase their production of IL-10 through the CD73-Ado pathway

IL-10 is a pleiotropic cytokine that is highly secreted in the TME and has been strongly associated with escape from the immune response [15,31–32]. It has also been increased in the serum and tissues of patients with CeCa [6–7,15]. However, the mechanisms that lead to the production of IL-10 in tumor cells are not fully known. Ado signaling through A₂Rs induces the production of IL-10 in different cell types [18–20]. We have recently demonstrated that CeCa cells can produce large amounts of Ado from the functional activity of CD73 [27]. Therefore, to investigate whether CeCa cells are induced to produce IL-10 through the CD73-Ado pathway, 1 \times 10⁵ CaSki (HPV-16⁺) and HeLa (HPV-18⁺) tumor cells were cultured for 24 h or 48 h in the presence of different concentrations (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, and 100 μ M) of AMP or Ado. Subsequently, the IL-10 concentration in the supernatant was measured by ELISA. We initially corroborated the functional activity of CD73 in CeCa tumor cells by culturing 1 \times 10⁵ CaSki and HeLa tumor cells in the presence of 5 mM AMP and in the presence or absence of 5 mM APCP, a specific inhibitor of CD73. The generation of Ado by both cell lines was strongly inhibited in the presence of APCP (Supplementary Fig. 1).

On the other hand, the presence of AMP or Ado in cultures of CeCa cells induced a significant dose-dependent increase in the production of IL-10, such that the highest concentrations of IL-10 were detected at 48 h of culture in 10 μ M or 100 μ M AMP or Ado. When using 10 μ M AMP or Ado, an increase in the concentration of IL-10 was detected relative to the basal culture condition (the absence of these molecules), by 2- or 4.5-fold in the supernatants of the CaSki cells (Fig. 1A and C) and 3- or 6-fold in the supernatants of the HeLa cells (Fig. 1B and D), respectively. It is noteworthy that the concentration of IL-10 in the supernatant of cells treated with 10 μ M vs. 100 μ M AMP or Ado was not significantly different, so these molecules were used at a concentration of 10 μ M in subsequent assays.

We have previously generated CaSki and HeLa cells with down-regulated expression and enzymatic activity of CD73 using siRNAs directed to the isoforms NM-001204813.1 and NM-002526.3 of CD73. These cells were termed CaSki-pS/siRNA-CD73 and HeLa-pS/siRNA-CD73, respectively [28]. When we cultured these cells in the presence of 10 μ M AMP or Ado, we observed that both produced IL-10 when cultured only in the presence of Ado. In contrast, parental CaSki and HeLa cell lines produced IL-10 when cultured in the presence of AMP or Ado. The addition of APCP to the culture of the parental lines reversed the production of IL-10 induced by AMP (Fig. 2A and B). These results strongly suggest that CeCa cells are induced to increase the production of IL-10 through the CD73-adenosine pathway.

3.2. A_{2B}R blockade reverses the Ado effect to induce IL-10 production in CeCa cells

A_{2A}R and A_{2B}R are involved in the production of IL-10 in various types of immune cells [18–19,32]. To determine whether the interaction of Ado with these receptors induces the production of IL-10 in CeCa cells, the CaSki and HeLa cell lines were cultured in the presence of 10 μ M Ado and in the presence or absence of 10 μ M ZM241385 or MRS1754, specific antagonists of A_{2A}R and A_{2B}R, respectively. The expression of A_{2A}R and A_{2B}R receptors was determined by flow cytometry (Supplementary Fig. 2). To analyze the participation of these receptors in the production of IL-10, CaSki and HeLa cells were cultured for 30 min in the presence of 10 μ M ZM241385 or MRS1754 and then in the presence of 10 μ M Ado. NECA, a nonselective AR agonist known for

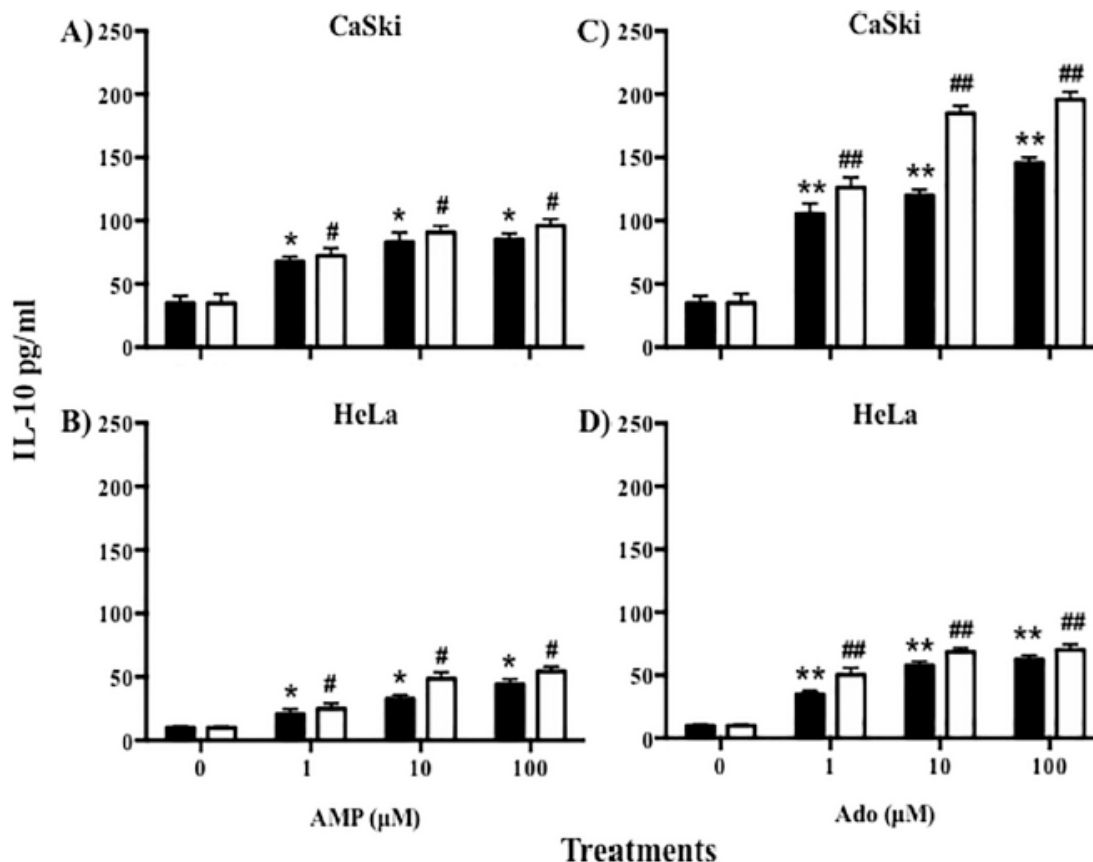


Fig. 1. CeCa cells cultured in the presence of AMP and Ado are induced to secrete IL-10. CaSki and HeLa cells (1×10^5) were cultured for 24 h (■) or 48 h (□) in the presence of 1 μ M, 10 μ M, or 100 μ M AMP (A and B) or Ado (C and D). Samples of the supernatants were collected every 24 h to measure the level of IL-10 by ELISA. The data are representative of three independent experiments, and the mean \pm SEM is shown. *, # $p < 0.05$, **, ## $p < 0.001$ for the IL-10 content of the supernatants of the treated cells with respect to the negative control (Ctl (-)) at each culture time.

inducing IL-10 production in immune cells [18–19], was used as a positive control. As expected, Ado and NECA induced a significant increase in IL-10 production by CeCa cells, more than three times its basal production (Fig. 3). Interestingly, MRS1754 had a greater effect than ZM241385 on reversing the production of IL-10 induced by Ado in tumor cells: 68% vs. 32% in CaSki cells and 41% vs. 21% in HeLa cells (Fig. 3). On the other hand, the increase in the production of IL-10 induced by Ado in CaSki and HeLa cells was associated with the up-regulation of IL-10 mRNA in both cell lines. Similarly, the addition of MRS1754 strongly reduced the expression of IL-10 mRNA in both cell lines (Fig. 3). These results indicate that $A_{2B}R$ participates significantly in the production of IL-10 by CeCa cells.

3.3. The interaction of Ado with $A_{2B}R$ induces the protection of CeCa cells against the cytotoxic activity of T cells

IL-10 can downregulate the expression of HLA-I molecules and thereby protect tumor cells from CTL-mediated immune recognition [13,33]. Considering that CeCa cells are induced to produce IL-10 when cultured in the presence of AMP or Ado, we analyzed whether, under these culture conditions, a decrease in the expression of HLA-I molecules in tumor cells was induced. Initially, CaSki and HeLa cells were cultured for 24 or 48 h in the presence of different concentrations of AMP or Ado, and the greatest decrease in the expression of HLA-I molecules was observed after 48 h at a concentration ≥ 10 μ M AMP or Ado (Supplementary Fig. 3). When using 10 μ M AMP or Ado, CaSki

cells decreased their expression of HLA-I by 35% or 60%, respectively (Fig. 4A), and HeLa cells decreased their expression by 25% and 35%, respectively (Fig. 4B). The addition of APCP completely reversed the decrease in HLA-I induced by AMP in both cell lines (Fig. 4). On the other hand, CaSki-pS/siRNA-CD73 and HeLa-pS/siRNA-CD73 cells only had decreased expression of HLA-I molecules when they were cultured in the presence of Ado (Fig. 4).

To analyze whether IL-10 contained in the supernatants was responsible for the decrease in the expression of HLA-I molecules in tumor cells, a neutralizing anti-IL-10 antibody was added to the cultures of CaSki and HeLa cells in the presence of Ado. The addition of the anti-IL-10 neutralizing antibody completely reversed the effect that Ado and rhIL-10 (control) had on downregulating the expression of HLA-I molecules in CaSki and HeLa cells (Fig. 5). Taking into account that CeCa cells are induced to produce IL-10 through the interaction of Ado with $A_{2A}R$ and $A_{2B}R$, we proceeded to analyze whether the blocking of both receptors reversed the decrease in the expression of HLA-I molecules induced by Ado in tumor cells. Interestingly, only $A_{2B}R$ blockade completely reversed the Ado effect to downregulate the expression of HLA-I molecules in CaSki and HeLa cells (Fig. 5), suggesting that the interaction between Ado and $A_{2B}R$ is paramount for immune evasion in CeCa cells. To corroborate this mechanism, CaSki tumor cells cultured previously with Ado or rhIL-10 were challenged with CTLs that were previously stimulated with antigenic peptides derived from the HPV-16 E6 and E7 proteins, which bind specifically to the HLA-A2 allele [34–35] and that we have previously analyzed in CaSki cells [29].

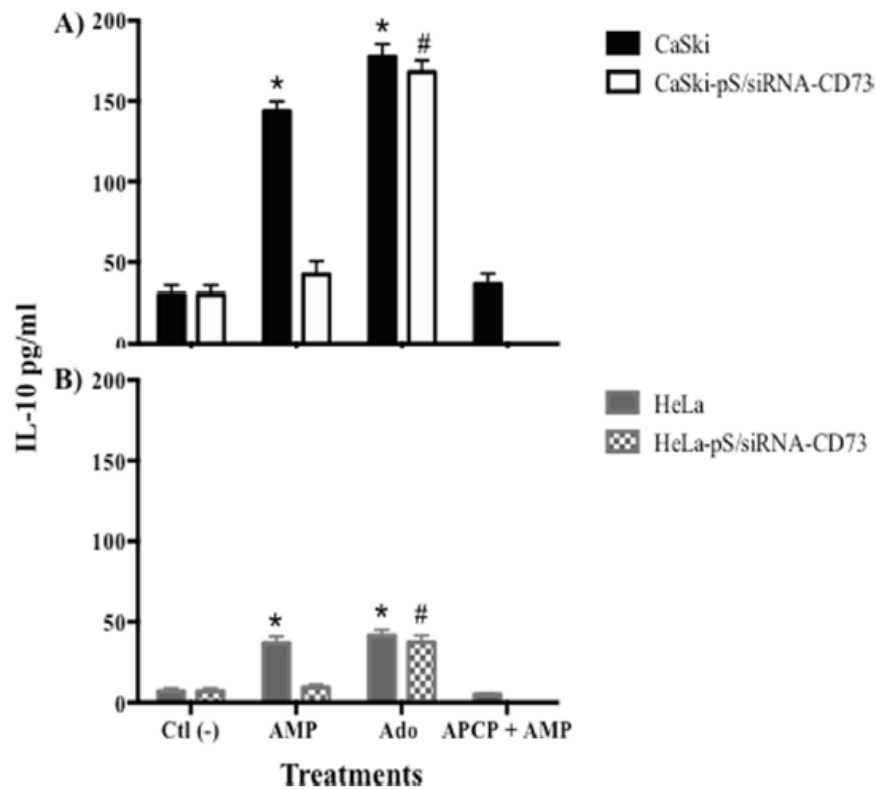


Fig. 2. The CD73-Ado pathway is necessary to induce the production of IL-10 in CeCa cells. CaSki, CaSki-pS/siRNA-CD73, HeLa, and HeLa-pS/siRNA-CD73 cells (1×10^5) were cultured in the presence of 10 μ M AMP or adenosine (Ado). After 48 h, the supernatants were collected, and the IL-10 concentrations were determined by ELISA. Adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate (ACPC) was added to cultures of CaSki and HeLa cells to inhibit the activity of CD73. The data are representative of three independent experiments, and the mean \pm SEM is shown. *[#] $p < 0.001$ for the IL-10 concentration in the supernatant of the treated cells with respect to their corresponding control.

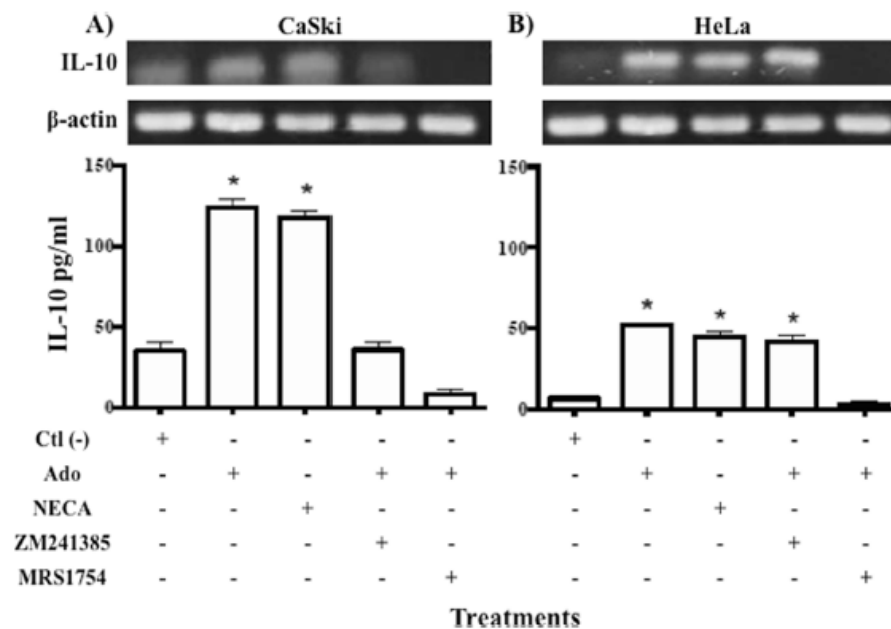


Fig. 3. A_{2B}R blockade reverses the Ado effect to induce IL-10 production in CeCa cells. CaSki and HeLa cells (1×10^5) were cultured in the presence of 10 μ M adenosine (Ado). Thirty minutes before the addition of AMP or Ado, 10 μ M ZM241385 and MRS1754, specific antagonists of A_{2A}R and A_{2B}R, respectively, were added to some cultures. NECA (10 μ M), a nonselective AR agonist, was used as a control for the induction of IL-10. After 48 h, the IL-10 concentrations in the supernatants were analyzed by ELISA. The expression of IL-10 mRNA in the treated cells was analyzed by RT-PCR. The data are representative of three independent experiments, and the mean \pm SEM is shown. * $p < 0.05$ for the IL-10 level in the supernatant of the treated cells compared to the control.

The blocking of A_{2A}R and A_{2B}R in tumor cells cultured in the presence of Ado was also analyzed. Only the blocking of A_{2B}R or the addition of the anti-IL-10 neutralizing antibody reversed the Ado effect to favor the evasion of the cytotoxic activity of T lymphocytes in CaSki cells cultured in the presence of Ado (Fig. 6). These results indicate that the interaction of Ado with A_{2B}R primarily increases the production of IL-10 in CeCa cells and induces them to downregulate the expression of

HLA-I molecules to protect them from T cell-mediated cytotoxic lysis.

4. Discussion

Persistent infection with HR-HPV is key to cervical carcinogenesis [36]. The generation of IL-10 in the local microenvironment also plays a crucial role in the suppression and evasion of the immune system and,

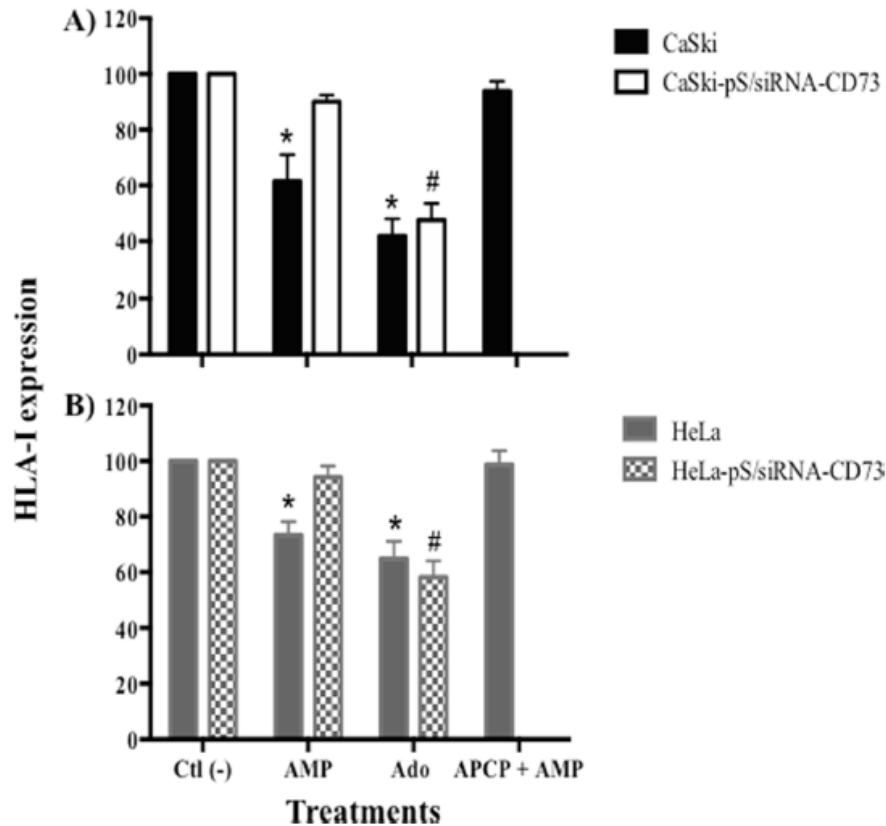


Fig. 4. The CD73-Ado pathway is necessary to induce the downregulation of HLA-I molecules in CeCa cells. CaSki, CaSki-pS/siRNA-CD73, HeLa, or HeLa-pS/siRNA-CD73 cells (1×10^5) were cultured in the presence of 10 μ M AMP or adenosine (Ado). After 48 h, the supernatants were collected, and the IL-10 levels were determined by ELISA. Adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate (APCP) was added to cultures of CaSki and HeLa cells to inhibit the activity of CD73. Please include in the figure 4 legend: *# $p < 0.001$, indicate downregulation of HLA-I molecules of the treated cells with respect to their corresponding control.

therefore, the progression of the disease [37]. In the microenvironment of the cervix, during the different stages of HPV infection, the production of IL-10 can be induced and maintained by different cellular sources, including infected keratinocytes, some subsets of dendritic cells, tumor-associated macrophages, regulatory T cells (Treg) and tumor cells [38–39]. After HPV infection, IL-10 increases as a result of the action of the HPV E2, E6, and E7 proteins on the transcription of IL-10 genes, while IL-10 stimulates the expression of HPV E6 and E7 [6,15], thus generating a vicious cycle that favors an immunosuppressive microenvironment in the cervix that could facilitate the progression from a simple HPV infection to SIL and eventually CeCa. On the other hand, the production of high concentrations of IL-10 in various tumors has been associated with the hypoxic conditions that occur in the TME [40–42], suggesting that other factors can influence the production of IL-10 to promote tumor growth. We previously reported that CeCa cells exposed to AMP generate large amounts of Ado to suppress the effector functions of CTLs [27]. This study provided the first evidence that CeCa cells are induced to increase the production of IL-10 through the adenosinergic pathway. CeCa cells cultured in the presence of AMP or Ado were induced to express and secrete IL-10. Interestingly, the silencing of CD73 or the blocking of $A_{2B}R$ with a specific antagonist reversed this effect. In addition, the produced IL-10 induced a decrease in the expression of HLA-I molecules in CeCa cells. Ado exerts inhibitory effects on effector cells of the immune system through its interaction with $A_{2A}R$ and $A_{2B}R$, which are coupled to G proteins and increase the levels of cAMP, thus decreasing the production of proinflammatory cytokines and increasing the synthesis of immunosuppressive cytokines, such as IL-10 [19,43–44]. In this study, we observed that Ado concentrations $> 10 \mu$ M were necessary to induce a 4.5- to 6-fold increase in IL-10 production in CeCa cells compared to

basal production, and the addition of MRS1754 strongly reversed the production of IL-10 induced by Ado. These results suggest that signaling pathways similar to those of the effector cells of the immune system [18–19,32] can occur in CeCa cells to induce the production of IL-10 through $A_{2B}R$. In addition, this demonstrated that IL-10 produced by Ado-treated tumor cells is important to downregulate the expression of HLA-I molecules in CeCa cells and protect them against the cytotoxic activity of CTLs because the addition of the anti-IL-10 neutralizing antibody reversed this protective effect in CeCa cells.

Considering that CeCa tumors are characterized by high production of IL-10, which affects the suppression of effector immune response cells and the downregulation of HLA-I molecules in tumor cells to evade immune recognition [5,18,24,39,45], blocking the activity of the CD73-Ado and/or $A_{2B}R$ pathway in both tumor cells infected by HR-HPV and immune cells producing IL-10 [18–19,32] can be considered a potential strategy for the treatment of CeCa.

5. Conclusions

This study provides the first evidence that the Ado pathway plays an important role in the induction of secretion and expression of IL-10 in CeCa cells through the generation of Ado and activation of $A_{2B}R$. IL-10 produced through this pathway downregulates HLA-I molecules in tumor cells, resulting in protection against CTL-mediated immune recognition. These results strongly suggest the presence of a feedback loop between the adenosinergic pathway, the production of IL-10, and the downregulation of HLA-I molecules in CeCa cells to favor immune evasion and thus tumor progression. Therefore, this pathway may have clinical importance as a therapeutic target.

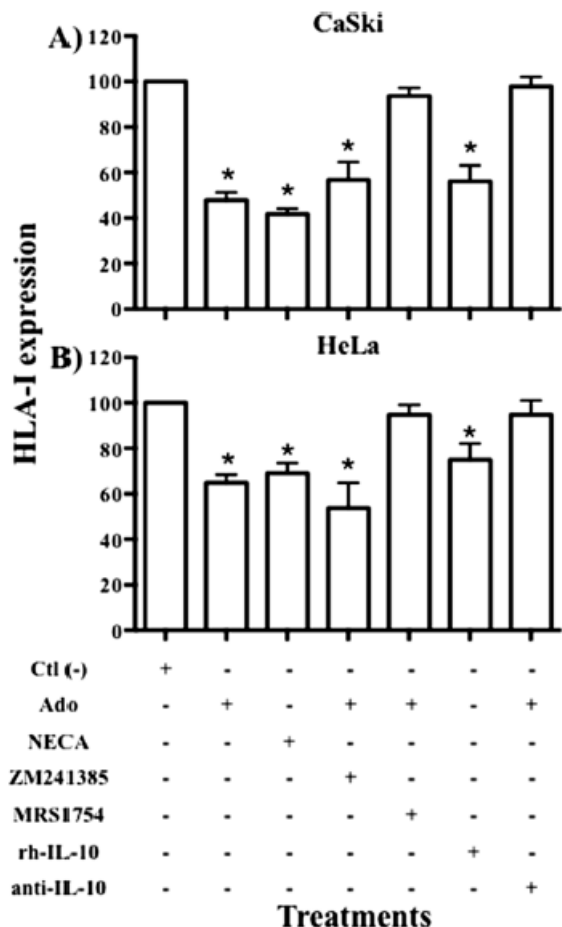


Fig. 5. A_{2b}R blockade reverses the decrease in Ado-induced HLA-I molecules in CeCa cells. CaSki and HeLa cells (1×10^5) were cultured in the presence of 10 μ M adenosine (Ado). Thirty minutes before the addition of AMP or Ado, 10 μ M ZM241385 or MRS1754, the specific antagonist of A_{2a}R or A_{2b}R, respectively, was added to some cultures. After 48 h, the expression of HLA-I molecules was analyzed by flow cytometry as indicated in Section 2. The data are representative of three independent experiments, and the mean \pm SEM is shown. * $p < 0.05$ for the expression of HLA-I molecules in treated cells with respect to the negative control (Ctl (-)).

CRedit authorship contribution statement

Alberto Monroy García and María de Lourdes Mora García participated in the conceptualization, funding acquisition, supervision, writing-review and editing. Daniela Berenice Torres Pineda, Rosario García Rocha, Chistian Azucena Don López, Luis Antonio Marín Aquino, Ricardo Muñoz Godínez, Luis Roberto Ávila Ibarra and Ricardo López Romero participated in the methodology, data curation and validation. Juan José Montesinos Montesinos, Benny Weiss Steider and Jorge Hernández Montes participated in the formal analysis and visualization of the study.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

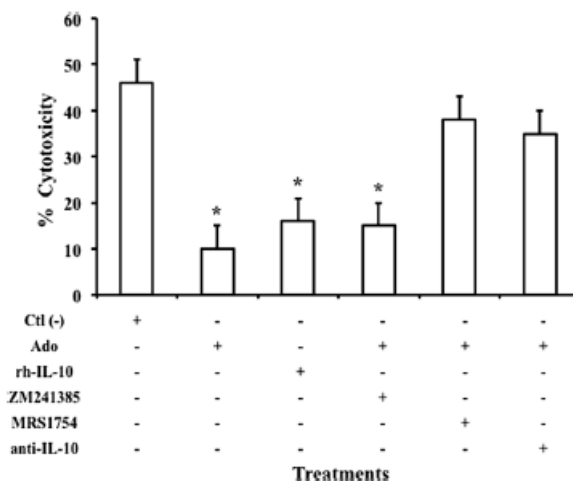


Fig. 6. Ado protects CeCa cells from the cytotoxic effect of T cells, which is reversed by A_{2b}R blockade. To determine if Ado could protect CeCa cells from the cytotoxic effect of specifically activated T cells, CaSki cells were cultured for 48 h in the presence of 10 μ M adenosine (Ado) or 5 ng/ml rhIL-10, harvested, and challenged with CTL (CD8⁺ T lymphocytes) specific for the KLPQLCTEL antigenic peptide (residues 18–26) derived from the E6 protein of HPV-16 or TLHEYMLDL (residues 7–15) and YMLDLQPETT (residues 11–20) derived from the protein E7 of HPV16. CTL activity was evaluated by measuring the viability of cells marked with CFSE and 7-AAD, as indicated in Section 2. * $p < 0.05$ compared to the activity of CTL on CaSki cells cultured in the absence of Ado (Ctl (-)). The data represent 3 independent experiments; the mean \pm SEM is shown.

Acknowledgements

This study was performed with the following funds: Mexican Social Security Institute (Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)) Grant No. FIS-G14/1314, National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)) Grant No. 240635 to AMG, and DGAPA-PAPIIT Grant No. IN225519 to MLMG. We also appreciate the support given to M en C. Daniela Berenice Torres Pineda for Doctorate Scholarship No. 282032 from CONACyT. We also thank Dr. Lourdes A. Arriaga Pizano and MSc. Jessica Lakshmi Prieto Chávez from the Flow Cytometry Instrument Center of IMSS for their support in the flow cytometry analysis.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155082>.

References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (6) (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] WHO, Early Diagnosis and Screening, 2017. <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/en/>. (Accessed 06 January 2020).
- [3] E.J. Crosbie, M.H. Einstein, S. Franceschi, H.C. Kitchener, Human papillomavirus and cervical cancer, *Lancet* 382 (9895) (2013) 889–899, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60022-7).
- [4] J.M. Alcocer-Gonzalez, J. Berumen, R. Tamez-Guerra, V. Bermudez-Morales, O. Peralta-Zaragoza, R. Hernandez-Pando, J. Moreno, P. Gariglio, V. Madrid-Marina, In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells, *Viral Immunol.* 19 (3) (2006) 481–491, <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.481>.
- [5] Q. Feng, H. Wei, J. Morihara, J. Stern, M. Yu, N. Kiviat, I. Hellstrom, K.E. Hellstrom, Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma, *Gynecol. Oncol.* 127 (2) (2012) 412–419, <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.07.098>.
- [6] K. Torres-Poveda, M. Bahena-Roman, C. Madrid-Gonzalez, A.I. Burguete-Garcia,

- V.H. Bermudez-Morales, O. Peralta-Zaragoza, V. Madrid-Marina, Role of IL-10 and TGF-beta1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia, *World J. Clin. Oncol.* 5 (4) (2014) 753–763, <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.753>.
- [7] A.G. Bais, I. Beckmann, J. Lindemans, P.C. Ewing, C.J. Meijer, P.J. Snijders, T.J. Helmerhorst, A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions, *J. Clin. Pathol.* 58 (10) (2005) 1096–1100, <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.025072>.
- [8] F. Garrido, MHC/HLA Class I Loss in Cancer Cells, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1151 (2019) 15–78, https://doi.org/10.1007/978-3-030-17864-2_2.
- [9] F. Garrido, I. Algarra, A.M. Garcia-Lora, The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions, *Cancer Immunol. Immunother.* 59 (10) (2010) 1601–1606, <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0893-2>.
- [10] C.S. Brady, J.S. Bartholomew, D.J. Burt, M.F. Duggan-Keen, S. Glenville, N. Telford, A.M. Little, J.A. Davidson, P. Jimenez, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido, P.L. Stern, Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer, *Tissue Antigens* 55 (5) (2000) 401–411, <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2000.550502.x>.
- [11] B. Li, F. Wang, C. Ma, T. Hao, L. Geng, H. Jiang, Predictive value of IL-18 and IL-10 in the prognosis of patients with colorectal cancer, *Oncol. Lett.* 18 (1) (2019) 713–719, <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10338>.
- [12] F. Salazar-Onfray, M.N. Lopez, A. Mendoza-Naranjo, Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape, *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (1–2) (2007) 171–182, <https://doi.org/10.1016/j.cytogr.2007.01.015>.
- [13] M. Matsuda, F. Salazar, M. Petersson, G. Masucci, J. Hansson, P. Pisa, Q.J. Zhang, M.G. Masucci, R. Kiessling, Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression, *J. Exp. Med.* 180 (6) (1994) 2371–2376, <https://doi.org/10.1084/jem.180.6.2371>.
- [14] G. Terrazzano, M.F. Romano, M.C. Turco, S. Salzano, A. Ottaiano, S. Venuta, S. Fontana, C. Manzo, S. Zappacosta, E. Carbone, HLA class I antigen down-regulation by interleukin (IL)-10 is predominantly governed by NK-kappaB in the short term and by TAP1 + 2 in the long term, *Tissue Antigens* 55 (4) (2000) 326–332, <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2000.550406.x>.
- [15] V.H. Bermudez-Morales, L.X. Gutierrez, J.M. Alcocer-Gonzalez, A. Burguete, V. Madrid-Marina, Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape, *Cancer Invest.* 26 (10) (2008) 1037–1043, <https://doi.org/10.1080/07357900802112693>.
- [16] R. Mendiola, D. Caulejas, J. Nunez-Troconis, M. Araujo, M. Delgado, J. Mosquera, Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix, *Invest. Clin.* 49 (4) (2008) 533–545.
- [17] M. Clerici, M. Merola, E. Ferrario, D. Trabattini, M.L. Villa, B. Stefanon, D.J. Venzon, G.M. Shearer, G. De Palo, E. Clerici, Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (3) (1997) 245–250, <https://doi.org/10.1093/jnci/89.3.245>.
- [18] Z.H. Nemeth, C.S. Lutz, B. Csoka, E.A. Deitch, S.J. Leibovich, W.C. Gause, M. Tone, P. Pacher, E.S. Vizi, G. Hasko, Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism, *J. Immunol.* 175 (12) (2005) 8260–8270, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8260>.
- [19] B. Koscoso, B. Csoka, Z. Selmeczy, L. Himer, P. Pacher, L. Virag, G. Hasko, Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process, *J. Immunol.* 188 (1) (2012) 445–453, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101224>.
- [20] M. Nowak, L. Lynch, S. Yue, A. Ohta, M. Sitkovsky, S.P. Balk, M.A. Exley, The A2AR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells, *Eur. J. Immunol.* 40 (3) (2010) 682–687, <https://doi.org/10.1002/eji.200939897>.
- [21] A. Bahreyni, S.S. Samani, E. Ghorbani, F. Rahmani, R. Khayami, Y. Toroghian, R. Behnam-Rassouli, M. Khazaei, M. Ryzhikov, M.R. Parizadeh, M. Hasanazadeh, A. Avan, S.M. Hassanian, Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer, *J. Cell. Physiol.* 233 (4) (2018) 2715–2722, <https://doi.org/10.1002/jcp.26056>.
- [22] S.C. Robson, J. Sevigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance, *Purinergic Signal* 2 (2) (2006) 409–430, <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>.
- [23] H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Strater, Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases, *Purinergic Signal* 8 (3) (2012) 437–502, <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>.
- [24] M.J. Bours, E.L. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation, *Pharmacol. Ther.* 112 (2) (2006) 358–404, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>.
- [25] B.B. Fredholm, L.J. AP, K.A. Jacobson, K.N. Klotz, J. Linden, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol. Rev.* 53(4) (2001) 527–552.
- [26] J. Linden, Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) 775–787, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.775>.
- [27] M.L. Mora-García, L.R. Avila-Ibarra, R. Garcia-Rocha, B. Weiss-Steider, J. Hernandez-Montes, C.A. Don-Lopez, V. Gutierrez-Serrano, L.J. Titla-Vilchis, M.C. Fuentes-Castaneda, A. Monroy-Mora, L.F. Jave-Suarez, R. Chacon-Salinas, L. Vallejo-Castillo, S.M. Perez-Tapia, A. Monroy-Garcia, Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway, *Cell. Immunol.* 320 (2017) 46–55, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.09.002>.
- [28] R. Garcia-Rocha, A. Monroy-Garcia, J. Hernandez-Montes, B. Weiss-Steider, V. Gutierrez-Serrano, M. Del Carmen Fuentes-Castaneda, L.R. Avila-Ibarra, C.A. Don-Lopez, D.B. Torres-Pineda, M. de Lourdes Mora-Garcia, Cervical cancer cells produce TGF-beta1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-beta1, *Cytokine* 118 (2019) 71–79, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.018>.
- [29] R. Garcia-Rocha, M. Moreno-Lafont, M.L. Mora-Garcia, B. Weiss-Steider, J.J. Montesinos, P. Pina-Sanchez, A. Monroy-Garcia, Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF-beta1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity, *Cytokine* 76 (2) (2015) 382–390, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.09.001>.
- [30] G.G. Yegutkin, Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(6) (2014) 473–497, <http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>.
- [31] J.A. Rodriguez, L. Galeano, D.M. Palacios, C. Gomez, M.L. Serrano, M.M. Bravo, A.L. Combita, Altered HLA class I and HLA-G expression is associated with IL-10 expression in patients with cervical cancer, *Pathobiology* 79 (2) (2012) 72–83, <https://doi.org/10.1159/000334089>.
- [32] R.K. Bhairavabhotla, V. Verm, H. Tongaonkar, S. Shastri, K. Dinshaw, S. Chiplunkar, Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer, *Indian J. Biochem. Biophys.* 44 (5) (2007) 350–356.
- [33] M. Todaro, M. Zerilli, L. Ricci-Vitiani, M. Bini, M. Perez Alea, A. Maria Florena, L. Miceli, G. Condorelli, S. Bonventre, G. Di Gesu, R. De Maria, G. Stassi, Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells, *Cancer Res.* 66 (3) (2006) 1491–1499, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-2514>.
- [34] W.M. Kast, R.M. Brandt, J. Sidney, J.W. Drijfhout, R.T. Kubo, H.M. Grey, C.J. Melief, A. Sette, Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins, *J. Immunol.* 152 (8) (1994) 3904–3912.
- [35] M.E. Resing, A. Sette, R.M. Brandt, J. Ruppert, P.A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H.M. Grey, C.J. Melief, W.M. Kast, Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides, *J. Immunol.* 154 (11) (1995) 5934–5943.
- [36] J. Doorbar, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin Sci (Lond)* 110 (5) (2006) 525–541, <https://doi.org/10.1042/cs20050369>.
- [37] F.C.B. Berti, A.P.L. Pereira, G.C.M. Cebinelli, K.P. Trugilo, K. Braja de Oliveira, The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma, *Cytokine Growth Factor Rev.* 34 (2017) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.cytogr.2017.03.002>.
- [38] M. Saraiva, A. O'Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (3) (2010) 170–181, <https://doi.org/10.1038/nri2711>.
- [39] A. Kobayashi, V. Weinberg, T. Darragh, K. Smith-McCune, Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis, *Mucosal Immunol.* 1 (5) (2008) 412–420, <https://doi.org/10.1038/mi.2008.33>.
- [40] C. Cui, K. Fu, L. Yang, S. Wu, Z. Cen, X. Meng, Q. Huang, Z. Xie, Hypoxia-inducible gene 2 promotes the immune escape of hepatocellular carcinoma from nature killer cells through the interleukin-10-STAT3 signaling pathway, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38 (1) (2019) 229, <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1233-9>.
- [41] Y. Xiong, L. Liu, Y. Xia, Y. Qi, Y. Chen, L. Chen, P. Zhang, Y. Kong, Y. Qu, Z. Wang, Z. Lin, X. Chen, Z. Xiang, J. Wang, Q. Bai, W. Zhang, Y. Yang, J. Guo, J. Xu, Tumor infiltrating mast cells determine oncogenic HIF-2alpha-conferred immune evasion in clear cell renal cell carcinoma, *Cancer Immunol. Immunother.* 68 (5) (2019) 731–741, <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02314-y>.
- [42] Y. Zhang, N. Pan, Y. Sheng, M. Zhou, Z. Wen, Y. Chen, F. Huang, L.X. Wang, Hypoxia enhances IL-10-producing B cell generation through upregulating high-mobility group B1 on tumor cell-released autophagosomes, *Immunol. Lett.* 216 (2019) 36–42, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.09.005>.
- [43] A. Ohta, M. Sitkovsky, Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down-regulation of inflammation and protection from tissue damage, *Nature* 414 (6866) (2001) 916–920, <https://doi.org/10.1038/414916a>.
- [44] F.S. Regateiro, S.P. Cobbold, H. Waldmann, CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments, *Clin. Exp. Immunol.* 171 (1) (2013) 1–7, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04623.x>.
- [45] B.C. Sheu, R.H. Lin, H.C. Lien, H.N. Ho, S.M. Hsu, S.C. Huang, Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer, *J. Immunol.* 167 (5) (2001) 2972–2978, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2972>.