



c

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FES ZARAGOZA**

**Contribución de *Fusobacterium nucleatum* en la generación de Adenosina  
por células tumorales de Cáncer Cervicouterino**

**T E S I S**

que presenta:

**ARIZAI ITZEL HERRERA HERNANDEZ**

que para obtener el título de:

**Bióloga**

**Director de tesis: Dr. Alberto Monroy García**



Ciudad de México, 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.

Herrera-Hernández, A. I.



Herrera-Hernández, A. I.

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO,  
Hospital de Oncología CMN SXXI IMSS.

“En este lugar no perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás.

Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, sé curioso porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos. Puedes mirar atrás, pero no te quedes allí...

camina hacia el futuro”.

- Walt Disney

“Deseo fervientemente que algunos de ustedes continúen el trabajo científico y mantengan en su ambición, la determinación de hacer una contribución permanente a la ciencia.”

- - Marie Curie.

### **Agradecimientos**

A los doctores María de Lourdes Mora García y Alberto Monroy García, mis asesores y mentores, por su admirable trabajo, paciencia y dedicación tanto para la ciencia como para con sus alumnos.

Al equipo de trabajo en la sección de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI IMSS, a sus alumnos (de) y a la Dra. Margarita Camorlinga Ponce, por todo el apoyo brindado.

A mis compañeros y asesores del laboratorio, Mtra. Monserrat Carrera, la laboratorista Carmina Fuentes, la Dra. Rosario García y principalmente a la Dra., Daniela Berenice Torres-Pineda, al Biól., Alberto Monroy y al Mtro., Luis Antonio Marín, por su apoyo y consejo en las técnicas del laboratorio.

Herrera-Hernández, A. I.

También quiero agradecer...

A mis amigos y asesores, la Dra. Patricia Cano Sánchez, el Dr. Jesús Pérez, Dr. Augusto Canto, a la QFB., Clarisa Retana, la Dra. Marlene M. Flores, a mis amigos del Instituto de Química, Jacob Hernández, Pedro Anzures, Alland Colorado, el Dr. Efrén García, a Eduardo, Jorge, de no ser por ellos, no habría desarrollado las técnicas que ahora sé.

Al Instituto de Química, al Hospital General, al LANGEBIO, al CINVESTAV unidad Irapuato, y a la Dra. Rosario López Vancell, por el apoyo que obtuve en su momento.

A mis mejores amigos de la carrera Isael García, Gris Ramírez, Thelma Parra, Román Trejo y Othokani Hernández.

A mis mejores amigos incondicionales, especialmente a la Q.F.B. Anilú Nava; Luis Morales, Diane Izúcar, Paola del Moral, Shunashi Aguilar, Jaime Palestina, Braulio Antonio y Alexandra Cárdenas. A mis amigos del trabajo Nayely Flores, Giovanna Ramírez, Adrián Martínez, José Ornelas, Leisy Arévalo, y al mejor equipo, que son mis amigos del “night shift”.

A varios conocidos, muchos amigos, incluso vecinos, que estuvieron ahí cuidándome o apoyándome.

Finalmente...

A mis padres, por el apoyo, por el amor y los esfuerzos para ayudarme a alcanzar mis sueños. A mis tíos, en especial a mi mamá Lety, a papá Simón, a mis madres Rosa María y Rosita, por su



Herrera-Hernández, A. I.

amor, sus consejos, su apoyo, por sus visitas. Al resto de mi familia que me alentó y me guiaron desde el comienzo.

Y a Alberto M. Mora, por todo, por las cosas más maravillosas que compartimos y tu ayuda en el proceso, es mi tesoro y tampoco habría logrado terminar unas técnicas sin tus manos extras.

## **Dedicatorias**

A Mica, porque el sueño comenzó cuando te miré a los ojos mientras llenaba el formato del examen de admisión, porque creí que serías eterna y este iba a ser el primero de muchos otros éxitos académicos que iba a compartir contigo.

A mis padres, mis abuelos, mi hermano, mis amigos, mis tíos, mi familia porque siempre estuvieron ahí.

Y a Gansito, porque ambos queríamos que llegara este día, este escrito. Gracias por creer en mí y por compartir tu tiempo y tu ser conmigo.

Y a Anilú, por todo, por siempre.

## Tabla de contenido

<b>Glosario</b> .....	12
<b>Resumen</b> .....	13
<b>Introducción</b> .....	15
<b>El Cáncer Cérvicouterino</b> .....	15
<b>La microbiota vaginal y disbiosis</b> .....	16
<b><i>Fusobacterium nucleatum</i>, un oportunista</b> .....	20
<b><i>F. Nucleatum</i> y la vía adenosinérgica</b> .....	22
<b>Planteamiento del problema.</b> .....	25
<b>Hipótesis</b> .....	26
<b>Objetivo General</b> .....	26
<b>Objetivos Particulares</b> .....	26
<b>Material y métodos.</b> .....	27
<b>Cultivo celular</b> .....	27
<b>Obtención de la bacteria.</b> .....	27
<b>Obtención de hidrolizados de nucleótidos por <i>Fusobacterium nucleatum</i></b> .....	27
<b>Cromatografía en Capa fina. (CCF)</b> .....	28
<b>Generación de Ado por células de CaCu a partir de hidrolizados de ATP por <i>F. Nucleatum</i>.</b> .....	29
<b>Resultados</b> .....	30
<b><i>F. nucleatum</i> tiene la capacidad de hidrolizar eficientemente a ATP .</b> .....	30
<b><i>F. nucleatum</i> contribuye con las células tumorales de CaCu para producir Ado a partir de la hidrólisis de ATP.</b> .....	32

<b>Discusión</b> .....	38
<b>Conclusiones</b> .....	43
<b>Perspectivas</b> .....	43
<b>Referencias</b> .....	45

### Índice de figuras

<i>Tabla 1.</i>	1836
<i>Tabla 2.</i>	18
<i>Figura 1.</i>	17
<i>Figura 2.</i>	21
<i>Figura 3.</i>	24
<i>Figura 4.</i>	31
<i>Figura 5.</i>	33
<i>Figura 6</i>	35
<i>Figura 7.</i>	36
<i>Figura 8.</i>	37

## Glosario

**Ada:** Adenosina desaminasa

**Ado:** Adenosina

**AMP:** Adenosina monofosfato.

**eAMP:** Adenosina monofosfato exógeno.

**APCP:** Adenosina 5'- $(\alpha, \beta)$ -metileno)  
difosfato

**ARs:** Receptores de adenosina

**ATP:** Adenosina trifosfato.

**eATP:** Trifosfato de adenosina exógeno.

**CaCu:** Cáncer cérvico-uterino

**CST:** Estado de la comunidad.

**CCF:** Cromatografía Capa Fina.

**CD39:** Ectonucleotidasa trifosfato  
difosfohidrolasa- 1; E-NTPDasa1

**CD73:** Ecto-5'-nucleotidasa; Ecto 5'NTasa.

**CTL:** Linfocitos citotóxicos.

**HIF-1 $\alpha$ :** Factor Uno-alfa inducible por  
hipoxia.

**TEM:** Transición Epitelial Mesenquimal.

**EHNA:** Hidrocloruro de adenina (eritro-9-  
(2-Hidroxi-3-nonil)

**VPH:** Virus de papiloma humano

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gama.

**IL-4:** Interleucina cuatro.

**IL-10:** Interleucina diez.

**INO:** Inosina

**NIC:** Neoplasia Intraepitelial Cervical

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**TME:** Microambiente tumoral

**TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento  
Transformante Beta.

**VPH-AR:** Virus del Papiloma Humano de  
Alto Riesgo.

**SIL:** Lesiones Escamosas Intraepiteliales

## Resumen

El Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres en todo el mundo y segundo en nuestro país, y representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. La infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es uno de los principales factores asociados con el desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado que eventualmente progresan a CaCu. No obstante, recientemente se ha reportado que la presencia de microbiota patógena en la mucosa del cuello uterino, puede ser un factor clave con la progresión de la enfermedad. Por otra parte, se sabe que la vía adenosinérgica participa en la generación de un microambiente inmunosupresor a través de la producción de adenosina (Ado) generada por la hidrólisis de los nucleótidos ATP/ADP y AMP mediante la actividad de varias ectonucleotidasas. Tomando en consideración que *Fusobacterium. nucleatum* es una bacteria anaerobia Gram negativa con alta capacidad patogénica, que se ha encontrado presente durante el desarrollo de CaCu, y que tiene la capacidad de hidrolizar ATP extracelular para favorecer su propagación en el sitio de la infección, y que las células tumorales de CaCu tienen la capacidad de generar grandes cantidades de Ado a partir de la hidrólisis de AMP por la actividad de la ectoenzima CD73, en este estudio, se analizó la contribución de *F. Nucleatum* con células tumorales de CaCu para producir Ado a partir de la hidrólisis de ATP. En condiciones de cultivo *in vitro* y bajo hipoxia, se determinó que *F. Nucleatum* fue capaz de hidrolizar de manera eficiente ATP/ADP en AMP. Sin embargo, observamos que esta bacteria presentó muy baja capacidad para generar Ado a partir de AMP, lo cual permitió utilizar los sobrenadantes de *F. Nucleatum* cultivada en presencia de ATP (*SFn+ATP*) en cultivos de células tumorales de CaCu para analizar la producción de Ado. De manera interesante, células tumorales de CaCu (CaSki, HeLa y C33A) fueron capaces de generar Ado, Ino e Hipoxantina a partir de

*SFn*+ATP y se observó que la producción de Ado fue aún mayor cuando la actividad de la enzima Adenosina Desaminasa (ADA), presente en las células tumorales, fue inhibida con el inhibidor específico, EHNA. Estos resultados permiten sugerir que, en un microambiente neoplásico del cuello uterino, *F. nucleatum* podría contribuir con las células tumorales de CaCu en la generación de Ado a partir de los nucleótidos ATP y ADP, debido a la combinación de la actividad ATP/ADPasa de *F. nucleatum* y de la actividad AMPasa de CD73 expresada en las células tumorales.

## **El Cáncer Cérvicouterino**

El Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es una patología que ha incrementado los niveles de mortandad en las últimas décadas, de tal manera que se considera la séptima causa de muerte a nivel mundial y en nuestro país ocupa el segundo lugar en mujeres (IACR, 2018). Esta afección se volvió un problema de salud muy importante, debido a que año con año se presentan cerca de 500,000 casos nuevos en el mundo, y el 80% de éstos se reportan en países en vías de desarrollo como México (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016; García-Rocha *et al.*, 2018).

El desarrollo del CaCu está relacionado con la infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), sin embargo, no es la única causa relacionada con el desarrollo de esta neoplasia. El CaCu es una enfermedad multifactorial (Walboomers *et al.*, 1999), y se ha corroborado que la infección por VPH-AR es una causa necesaria, más no suficiente para su desarrollo por lo que hay diversos factores que pueden estar involucrados en el progreso de esta enfermedad, tales como: factores mecánicos, las duchas vaginales, la detección de vaginosis bacteriana o infecciones de transmisión sexual, que alteran el microambiente vaginal (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016; Clarke *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2003; Vriend *et al.*, 2015).

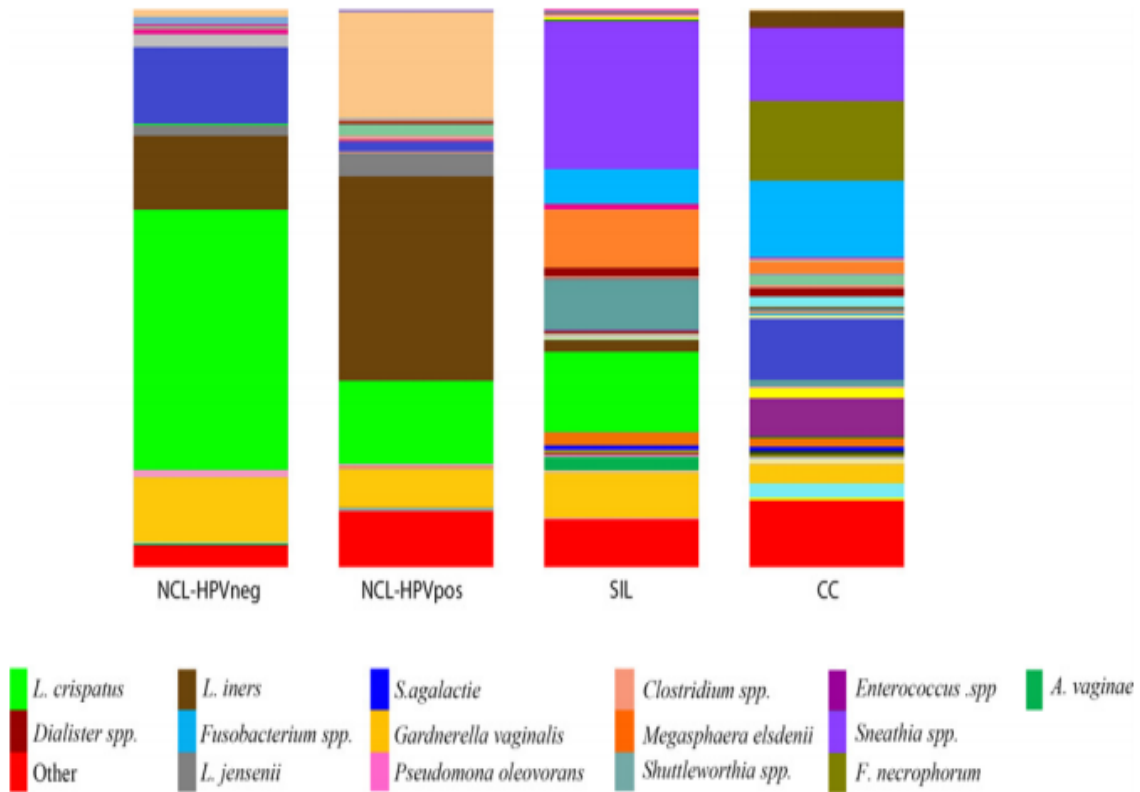
El desarrollo del CaCu implica una serie de etapas secuenciales en las que las células del cérvix presentan ciertas anormalidades histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical, NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada), NIC III (displasia severa/carcinoma *in situ*) y finalmente un cáncer invasor. Durante estas etapas el microambiente cervical y vaginal es modificado a través de la acidez, cambios en el tejido (lesiones) y la expresión de ciertas citocinas (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016; Lizano-Soberón, Carrillo Garcia, & Contreras Paredes, 2009). Cabe resaltar que, aun cuando una mujer se encuentre infectada por



VPH-AR puede no desarrollar una neoplasia si presenta una respuesta inmune adecuada capaz de controlar la infección y prevenir su progresión a una lesión precancerosa.

### **La microbiota vaginal y disbiosis**

Si bien los factores previamente mencionados contribuyen a la progresión de las lesiones en el cérvix, estos elementos también pueden favorecer la disbiosis vaginal. Estudios recientes sugieren que la diversidad y composición de la microbiota del cuello uterino contrasta según la etapa de progresión en la que se encuentre la neoplasia (Madrid-Marina y Torres-Poveda, 2018). La composición de la microbiota se clasifica de acuerdo con el estado de la comunidad (CST, por sus siglas en inglés: community state types), el cual está relacionado a los grupos taxonómicos que se han encontrado en las muestras. Dicho de otra forma, un CST en cérvix, es el conjunto de las especies bacterianas presentes en el cérvix. Por lo que recientemente, se ha propuesto que la alteración de la microbiota y/o el microambiente vaginal puede jugar un papel importante en el desarrollo de neoplasias como el CaCu (Dejea *et al.*, 2014; Lehtinen *et al.*, 2011; Sears & Garrett, 2014). Con base en ello, se han caracterizado ocho diferentes CST (I-VIII) en relación a la etapa de desarrollo del CaCu (Figura 1, Tabla 1 y Tabla 2): CST I se ha designado a mujeres sin lesión de cérvix y VPH negativo; CST II y III a mujeres con lesiones en cérvix y positivas a infección por VPH; y los CST IV y V a mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) independientemente de la infección por VPH; los CST VII y VIII en mujeres con CaCu, cabe mencionar que el esta agrupación se llevó a cabo de acuerdo con el diagnóstico histopatológico, por lo que el CST VI no fue considerado (Chase *et al.*, 2015; Madrid-Marina y Torres-Poveda, 2018; Audirac-Chalifour *et al.*, 2016).



**Figura 1** Composición de las comunidades de acuerdo con los grupos de diagnóstico histopatológico. Junto a cada rectángulo de color podemos encontrar la especie o grupo taxonómico. Las siglas NCL-VPHneg provienen del inglés y hace referencia a un cérvix sin lesión y ausencia de infección por VPH; las siglas SIL se refieren a las lesiones escamosas intraepiteliales; CC, hace alusión al diagnóstico de cáncer cervicouterino. Tomado de Audirac-Chalifour et al., (2016).

Diagnóstico	Bacterias más abundantes
Sin Lesión Cervical HPV-negativo	<i>L. iners</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Prevotella Sneathia</i>
Sin Lesión Cervical HPV-positivo	<i>L. iners</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Fusobacterium spp</i> ,
Lesiones Escamosas Intraepitelial Cervical	<i>Sneathia spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> <i>Atopobium vaginae</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Shuttleworthia satelles</i> <i>L. Crispatus</i> , <i>L. iners</i> <i>Gardnerella vaginalis</i>
Cancer Cervicouterino	<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Fusobacteria spp.</i> , <i>Sneathia spp.</i> <i>Shuttleworthia spp.</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>

**Tabla 1** Composición de la microbiota cervicovaginal en diferentes etapas de desarrollo del CaCu.

Tomado de Madrid-Marina, V y Torres-Poveda, K. (2018).

CST	Organismos	Relación
I	<i>L. crispatus</i>	21%
II	<i>L. iners</i>	17%
III	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	10%
IV	<i>Sneathia spp</i>	17%
V	<i>G. vaginalis</i>	7%
VI	<i>Streptococcus agalactiae</i>	7%
VII	<i>Fusubacterium necrophorum</i>	7%
VIII	<i>Fusubacterium spp</i>	14%

**Tabla 2.** Estados de la comunidad (CST) y los grupos taxonómicos más representativos en cérvix. Tomado de Madrid-Marina & Torres-Poveda, 2018

Durante el progreso de la enfermedad se ha reportado que el ambiente cervicovaginal es modificado de tal forma que, aumenta la acidez vaginal y simultáneamente, la expresión de citocinas inmunosupresoras como el Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF- $\beta$ ) e Interleucina diez (IL-10), lo que conlleva a un estado de inmunosupresión local. Normalmente, los mecanismos de defensa presentes son, entre otros, la presencia de Lactobacilos, un bajo pH vaginal (<4.5) y péptidos antimicrobianos. Sin embargo, cuando ocurre un desbalance en el sistema de defensa, se presentan cambios fisicoquímicos que producen alteraciones histológicas en la mucosa vaginal y el epitelio cervical, lo que produce una presión en la selección de la microbiota, de tal forma que explica el incremento de poblaciones bacterianas no benéficas. Por tanto, las especies que ya viven como parte de la microbiota vaginal pueden volverse oportunistas de las nuevas condiciones fisiológicas, y también, pueden aprovechar la ausencia de otras comunidades predominantes como los lactobacilos. Tal sucede con especies que sobreviven y se vuelven un organismo comensal que incluso puede verse favorecido por la presencia del VPH. Un organismo de este tipo es *Fusobacterium nucleatum*, que como parte de la familia *Fusobacterium*, este grupo tiene presencia en diferentes estadios de la neoplasia e incluso en un cérvix sano, ver Figura 1 (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016).

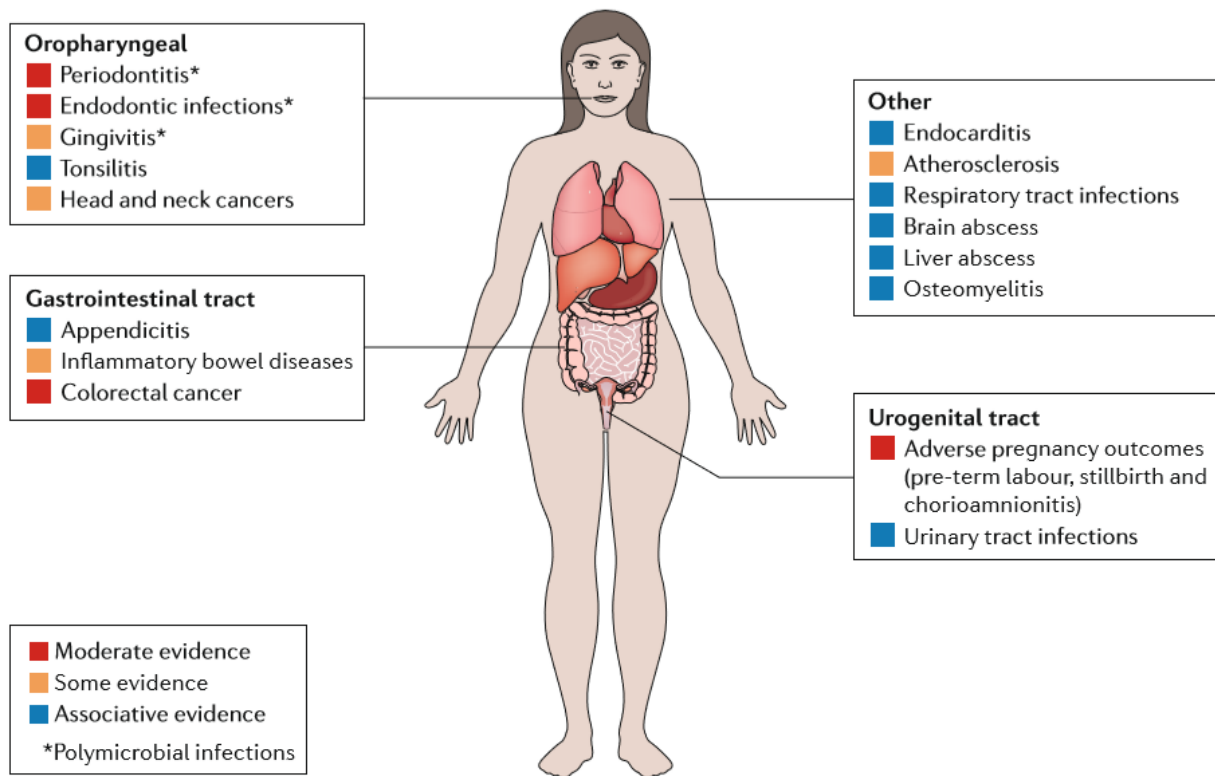
Sorprendentemente, *F. nucleatum* es una especie relacionada con otras neoplasias como el cáncer colorrectal e infecciones severas como la periodontitis. En el caso particular del CaCu, *F. nucleatum* se ha encontrado en NIC y predominantemente en los estadios tardíos de CaCu (formando parte de los CST I, VI y VII) y altamente asociado con altos niveles de IL-4, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$  (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016). De hecho, en un estudio cohorte en Corea, las bacterias pertenecientes al género *Fusobacteria* e incluso *Sneathia spp.*, se han identificado como posibles marcadores microbiológicos asociados con la infección de VPH (Lee *et al.*, 2013).

Las especies de *Fusobacterium* son anaerobios gramnegativos que son parte de la flora de la mucosa de boca, intestino, entre otras mucosas (Brennan y Garrett, 2019; Castellarin *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2014; Kostic *et al.*, 2013, 2012; Rubinstein *et al.*, 2013; Segata *et al.*, 2012; Signat *et al.*, 2011).

### ***Fusobacterium nucleatum*, un oportunista**

Desde el momento en que esta bacteria está reportada como un huésped de mucosas como la boca, y que también está relacionada con infecciones como la periodontitis, podemos inferir que esta bacteria puede ser transferida a la vagina y cérvix a través de cunnilingus (Hill, 1998). No obstante, además de estar relacionada a infecciones bucales u otras mucosas, este microbio está comúnmente reportado en otras infecciones del cuerpo humano (Figura 2) (Bolstad, Jensen, & Bakken, 1996) y en neoplasias de colon, por lo que podríamos definir a esta bacteria como un oportunista de las condiciones en las que se encuentra, y su capacidad infecciosa debería considerarse alta, véase Figura 1 (Brennan y Garrett, 2019; Han, 2015; Hill, 1998; Marrazzo y Hillier, 2013). La bacteria *F. nucleatum* pertenece a la Familia *Bacteroidaceae*, no forma esporas, no es móvil y es gramnegativa. De manera interesante, la morfología de las colonias no es un parámetro consistente de las fusobacterias y no es suficiente para la identificación de especies (Bolstad *et al.*, 1996). Se ha reportado que esta bacteria es resistente a múltiples antibióticos incluyendo vancomicina, neomicina, eritromicina, amoxicilina, ampicilina, entre otras (Abu-Fanas *et al.*, 1991; Bolstad *et al.*, 1996), lo que vuelve a la infección de esta bacteria como un reto más por resolver en pacientes con infección por VPH-AR y/o con lesiones neoplásicas.

Hasta ahora se ha reportado que el mecanismo de adhesión, invasión y diseminación de esta bacteria es a través de un factor de virulencia denominado FadA, el cual es capaz de activar la vía de señalización WNT, clave para la sobrevivencia celular, así como para la vía de proliferación (Ding & Tan, 2016; Han Yiping, Kaphingst, Persky, & Lachance, 2010; Liu *et al.*, 2014; Rubinstein *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Esquema de las enfermedades orales y extraorales asociadas a *F. nucleatum*. Tomado de Brennan & Garrett, (2019).

Por tanto, *F. nucleatum*, puede considerarse como un factor clave en el desarrollo y progresión de CaCu. En un estudio se analizó el comportamiento de las biopelículas generadas por *F. nucleatum* en mucosas bucales estimuladas con ATP, y se comprobó que esta bacteria

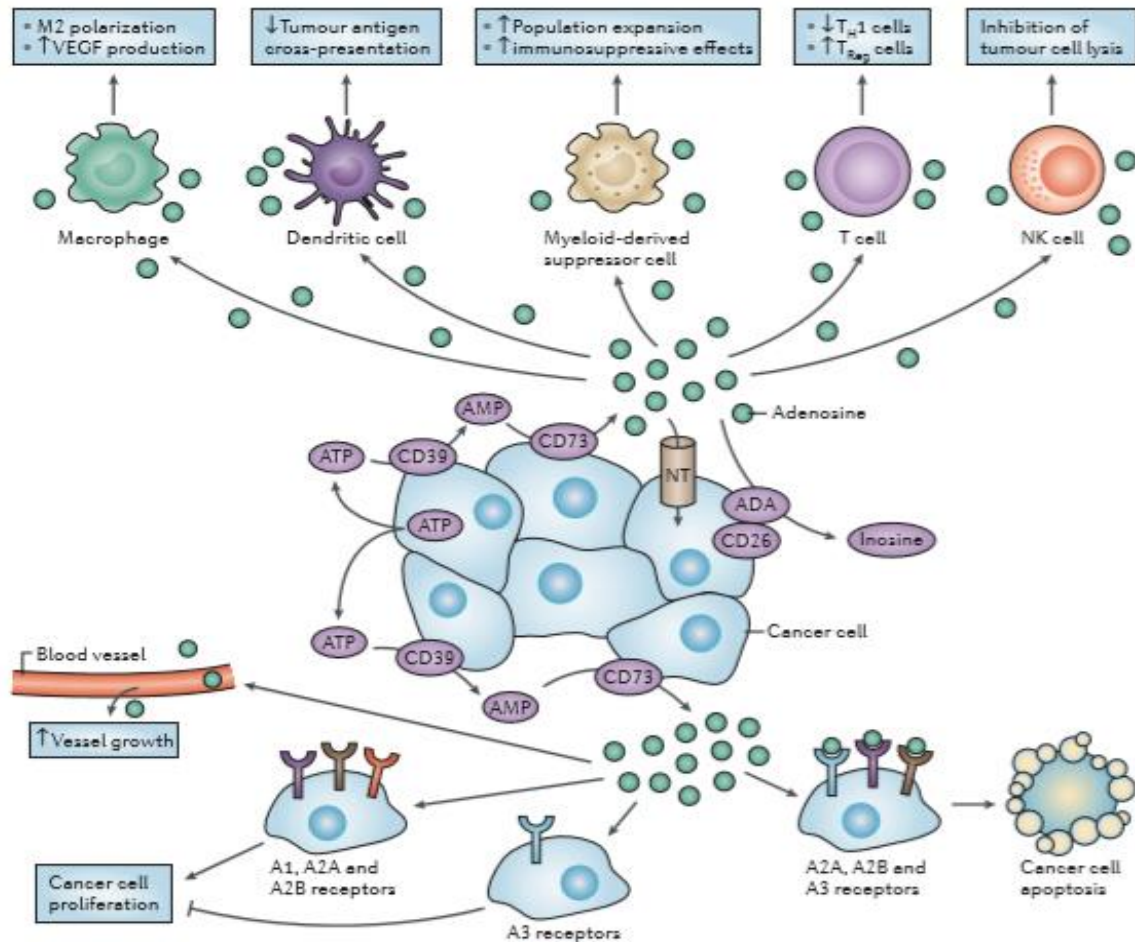
periodontal es capaz de hidrolizar la molécula de señalización del huésped, eATP (Adenosín trifosfato extracelular), para desprenderse de las biopelículas formadas. Una alta concentración de eATP indica potencialmente una inmunidad suprimida en el huésped debido al daño celular, lo que significa un momento oportuno para que las bacterias de la biopelícula sobrevivan y se dispersen formando nuevas colonias (Ding & Tan, 2016b). Esto explicaría la presencia de la bacteria en los CST en diferentes etapas de la enfermedad.

#### ***F. Nucleatum* y la vía adenosinérgica**

Previamente se mencionó que una alta expresión del TGF- $\beta$  parece estar asociada a la presencia de *F. Nucleatum*; este factor también favorece la persistencia de la infección de VPH-AR, y además, promueve la formación del tumor, la transición epitelial-mesenquimal (TEM, por sus siglas en inglés), la invasión y metástasis de las células tumorales de CaCu (Zhu *et al.*, 2016). Cabe mencionar que, la presencia de TGF- $\beta$  en el microambiente tumoral (TME) estabiliza el factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), el cual a su vez induce la expresión de la ectonucleotidasa CD39 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1, ENTPD1, CD39, EC 3.6.1.5) la cual hidroliza ATP/ADP a AMP; y de la 5'-ectonucleotidasa (CD73, EC 3.1.3.5) que convierte AMP en adenosina (Ado) (Robson, Sévigny, & Zimmermann, 2006; Zimmermann, Zebisch, & Sträter, 2012). Por lo tanto, la expresión de TGF- $\beta$  genera altas concentraciones de Ado en el microambiente tumoral. Así mismo es un factor que induce la expresión de CD39/CD73 en linfocitos T y células dendríticas, y al mismo tiempo, contribuye a incrementar la expresión de estas ectonucleotidasas en células supresoras mieloides y en células T reguladoras dentro del microambiente tumoral (Regateiro *et al.*, 2011).

Aunado a esto, la Ado puede ser utilizada en diferentes rutas mediadas por receptores de Ado (AR: A1, A2A, A2B y A3) acoplados a proteínas G, los cuales regulan las señales extracelulares en las células blanco. Es importante mencionar que la concentración de Ado en el microambiente tumoral se encuentra entre 10-100  $\mu\text{M}$  y ejerce los siguientes efectos en el hospedero cuando interacciona con receptores de alta afinidad A2A: la supresión de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL), células asesinas naturales, macrófagos, células B, neutrófilos y células dendríticas. Así mismo, cuando la Ado interactúa con receptores A1R, A2AR y A2BR, promueve el crecimiento tumoral induciendo la proliferación, invasión y metástasis de células tumorales (Figura 3), (Fredholm *et al.*, 2011; Kasama *et al.*, 2015; Nikbakht *et al.*, 2016; Sitkovsky *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2014). Cuando Ado interactúa con A2AR y A2BR induce la producción de TGF- $\beta$  en diferentes tipos celulares causando efectos antiinflamatorios y de inmunorregulación.





**Figura 3.** La vía de adenosina en el microambiente y la progresión tumorales. La vía de la Ado participa en la creación de un microambiente tumoral inmune-tolerante al regular las funciones de las células inmunes e inflamatorias, como los macrófagos, las células dendríticas, las células supresoras derivadas de mieloides, las células T y las células asesinas naturales (NK). La vía de la adenosina también regula el crecimiento y la diseminación del cáncer al incitar la proliferación de células cancerosas, la apoptosis y la angiogénesis a través de receptores de adenosina que se expresan en las células cancerosas y las células endoteliales, respectivamente. Los tumores sólidos expresan altos niveles de CD39 y CD73, así como bajos niveles de transportadores de nucleósidos (NT), ecto-adenosina desaminasa y su cofactor CD26, lo que conduce a un aumento en la señalización de adenosina en el entorno del cáncer. Tomado de Antonioli, Blandizzi, Pacher, & Haskó, (2013).

Nuestro grupo de investigación recientemente reportó que células tumorales de CaCu expresan altos niveles de CD73 y son capaces de generar grandes cantidades de Ado a partir de la hidrólisis de AMP y suprimen las actividades efectoras de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al.*, 2017). También se reportó que células infectadas por VPH-16, derivadas de citologías cervicales de pacientes con NIC-1, expresan altos contenidos de CD73, y que fluidos cervicales de estas pacientes, son capaces de generar Ado a partir de AMP (Mora-García *et al.*, 2019). En consecuencia, resulta relevante conocer los diferentes factores que favorecen la producción de Ado en el microambiente del CaCu.

### **Planteamiento del problema.**

Se ha postulado que la microbiota cérvico-vaginal puede participar en la supresión de la respuesta inmune durante el desarrollo del CaCu. No obstante, los mecanismos por los cuales se lleva a cabo este proceso no han sido completamente dilucidados. Recientemente nuestro grupo de investigación reportó que células tumorales de CaCu expresan altos niveles de CD73 en la membrana celular, y son capaces de generar grandes cantidades de Ado a partir de la hidrólisis de AMP, la cual suprime las funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha reportado que *F. Nucleatum*, una especie de bacteria anaerobia gramnegativa, se ha asociado con el desarrollo y la progresión de CaCu, además de que esta bacteria es capaz de hidrolizar al ATP extracelular y favorecer su propagación en el sitio de la infección (Ding & Tan, 2016). Tomando en consideración que la producción de ATP extracelular es incrementada notablemente en un microambiente tumoral perturbado, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿La bacteria *F. Nucleatum*, contribuye con las células tumorales de CaCu en la producción de Ado?

### **Hipótesis**

Si se le proporciona ATP a *Fusobacterium nucleatum*, entonces esta bacteria será capaz de hidrolizar a este nucleótido y contribuir con las células tumorales de CaCu en la generación de Ado.

### **Objetivo General**

Analizar la contribución de *F. nucleatum* con células tumorales de CaCu para generar Ado.

### **Objetivos Particulares**

- 1.- Analizar *in vitro* la capacidad de *F. nucleatum* para hidrolizar ATP.
- 2.- Analizar la contribución de *F. nucleatum* con células tumorales de CaCu (CaSki, HeLa y C33A) para generar Ado a partir de la hidrólisis de ATP.

## **Material y métodos.**

### **Cultivo celular**

Para este estudio, se utilizaron las líneas celulares de CaCu CaSki (VPH16+), HeLa (VPH18+) y C33A (VPH-), las cuales fueron cultivadas en medio RPMI-1640 y/ OPTI-MEM reducido en suero (Gibco®) con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco®) y antibióticos: 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco®), a una temperatura de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y un ambiente de humedad saturante en una incubadora (Scientific®, USA).

### **Obtención de la bacteria**

Las bacterias se obtuvieron de una cepa certificada por la ATCC (BD 25586) a través del Cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Al descongelar esta bacteria, se sembró en cajas de Agar-Sangre en jarras de anaerobios o con sistema de Gas tipo Gas Pak™ EZ Campy Container System (260680 de BD®).

La cepa de *Fusobacterium nucleatum* se propagó en cajas de Petri con medio agar-sangre de carnero en un ambiente hipóxico con una mezcla de gases 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub>, y/o con sistemas de generadores de gas a partir de carbón activado (GasPak).

### **Obtención de hidrolizados de nucleótidos por *Fusobacterium nucleatum***

Se diluyeron colonias de bacterias de *F. nucleatum* en tubos cónicos de 15 mL en presencia de medio OPTI-MEM, para obtener una suspensión bacteriana en escala de McFarland de 8, que equivale a una absorbancia entre 0.94 – 0.98 a 625 nm, que, en términos de densidad,

aproximadamente se encuentran  $24 \times 10^8$  bacterias en suspensión. Una vez que la suspensión obtuvo a la densidad requerida, las bacterias se centrifugaron cinco minutos a 300 g, y posteriormente, se agregaron los nucleótidos ATP, ADP y AMP a una concentración final de 5mM. En algunos tubos se añadió EHNA, un inhibidor específico de la enzima adenosina desaminasa (ADA) con la finalidad de bloquear la conversión de Ado a Inosina (Ino). Las bacterias con cada tratamiento fueron cultivadas durante 72 horas en condiciones hipóxicas usando un sistema de GasPak, y posteriormente se recuperaron los sobrenadantes mediante centrifugación de los tubos a 385g durante 10 minutos.

### **Cromatografía en Capa fina (CCF)**

Los productos de la hidrólisis de los nucleótidos, utilizados como sustratos, en los cultivos de *F. Nucleatum* fueron analizados mediante cromatografía en capa fina (CCF). Muestras de 1 $\mu$ L de cada sobrenadante fueron aplicados en placas de Sílica-gel (TLC-PET) con poro de 60 Å de diámetro (Sigma™ 99577-25EA, USA). Como controles se prepararon soluciones de ATP, ADP, AMP, Ado, Ino e hipoxantina sintéticas a una concentración de 5mM. Alícuotas de 1 $\mu$ L de cada solución fueron aplicadas a las placas de sílica gel. Las muestras se eluyeron durante 1 h, usando como fase móvil las siguientes mezclas de solventes: A) isobutanol:alcohol isoamílico:etoxietanol:amoníaco:agua en proporción 9:6:18:9:15, para identificar los productos de la hidrólisis de ATP, ADP y AMP; y B) isobutanol:etilacetato:metanol:amoníaco en proporción 7:4:3:4, para identificar los productos de la hidrólisis de AMP. Las placas fueron visualizadas usando un transiluminador de luz UV.

### **Generación de Ado por células de CaCu a partir de hidrolizados de ATP por *F. Nucleatum*.**

Para la generación de Ado a partir de hidrolizados de ATP por *F. Nucleatum*, se utilizaron las líneas celulares CaSki, HeLa y C33A. Las células tumorales ( $1 \times 10^6$ ) fueron cultivadas durante 5 horas en presencia de 40% de hidrolizados de ATP por *Fusobacterium nucleatum* en un volumen total de 200 $\mu$ L. La producción de Ado fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos mediante CCF. Como control positivo las células tumorales fueron cultivadas en presencia de AMP sintético a una concentración final de 5mM. Como controles negativos, las células tumorales se incubaron en presencia de sobrenadante de *F. nucleatum* cultivado en ausencia de ATP, y células tumorales cultivadas con medio de cultivo solo. Así mismo, APCP, inhibidor específico de la actividad enzimática de CD73, fue adicionado para comprobar la actividad funcional de esta enzima en las células tumorales de CaCu.

### **Tratamiento de resultados**

Las placas de sílica gel fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV).

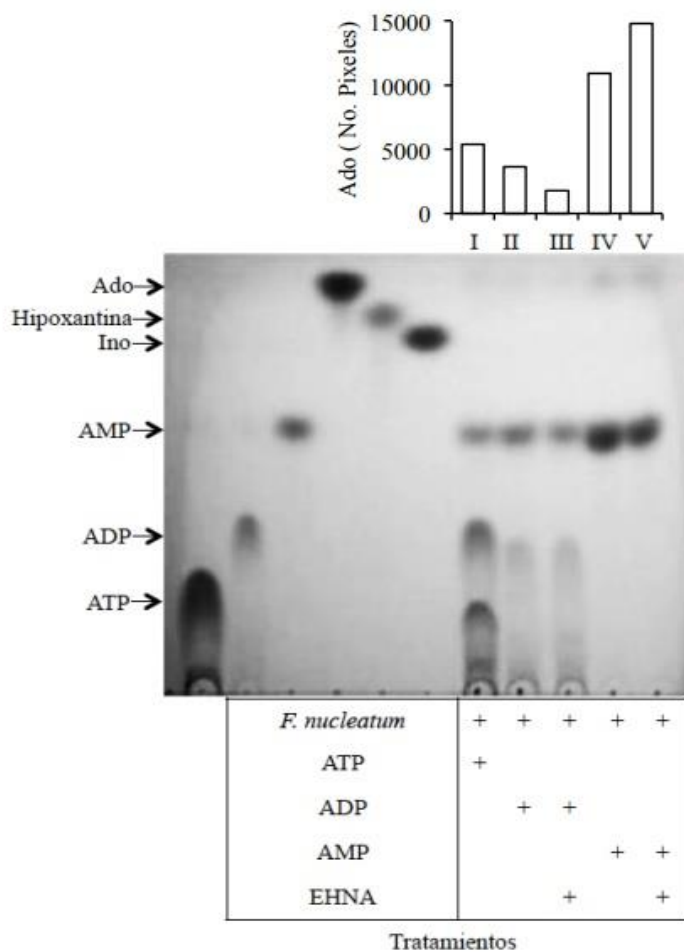
Así mismo se utilizó el programa ImageJ para determinar la densitometría de las bandas que se observan en las placas de sílica.

## Resultados

### ***F. nucleatum* tiene la capacidad de hidrolizar eficientemente a ATP .**

Se ha reportado que *F. Nucleatum* está asociada con el desarrollo y la progresión de CaCu, además de que esta bacteria es capaz de hidrolizar al ATP extracelular y favorecer su propagación en el sitio de la infección (Ding y Tan, 2016b). Por otro lado, en estudios previos nuestro grupo de investigación ha reportado que las células tumorales de CaCu expresan altos niveles de la ectonucleotidasa CD73 y son capaces de producir grandes cantidades de Ado a partir de AMP (Mora-García *et al.*, 2017). Por tanto, en este estudio se procedió a analizar la contribución de *F. Nucleatum* con células tumorales de CaCu para producir Ado a partir de la hidrólisis de ATP. En principio, se analizó la capacidad de *F. Nucleatum* para hidrolizar los nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP). Para ello, la bacteria fue propagada en placas de agar-sangre bajo condiciones de hipoxia en jarras de incubación, empleando sobres de GasPak™ como fuente de gases, como se mencionó en materiales y métodos, y posteriormente se prepararon suspensiones de la bacteria con medio OPTI MEM a la escala 8 de McFarland conteniendo los nucleótidos ATP, ADP o AMP a una concentración final de 5mM. En algunos tubos se adicionó EHNA, un inhibidor específico de la enzima ADA, para evitar la conversión de Ado a Inosina. Las bacterias con los diferentes tratamientos fueron cultivadas durante 72 horas en condiciones de hipoxia. Transcurridas las 72 horas, los sobrenadantes de los cultivos fueron recuperados por centrifugación y analizados por cromatografía en capa fina de sílica gel para visualizar los productos de la hidrólisis de los nucleótidos. *F. nucleatum* fue capaz de hidrolizar el ATP en ADP y AMP (Carril I, *Figura 4*) y el ADP en AMP (Carril II. *Figura 4*). No obstante, *F. nucleatum* presentó muy baja capacidad para hidrolizar a AMP en Ado,

observándose una banda muy tenue de Ado (Carril IV, *Figura 4*). De hecho, en los tubos que contenían ATP y ADP también se observó que *F. nucleatum* generó una cantidad marginal de Ado. Cabe mencionar que la adición de EHNA, no incrementó el contenido de Ado en los cultivos de *F. nucleatum* con ADP (Carril III, *Figura 4*) y AMP (Carril V, *Figura 4*). Estos resultados dan evidencia de que *F. nucleatum* presenta fuerte actividad ATP/ADPasa y casi nula actividad AMPasa, así como nula actividad de ADA.



**Figura 4.** Cromatografía en capa fina mostrando la hidrólisis de ATP, ADP y AMP por *F. nucleatum*. La bacteria *F. nucleatum* fue cultivada durante 72 horas en presencia de 5mM de ATP, ADP o AMP en condiciones de hipoxia. En algunos cultivos se adicionó EHNA, para inhibir la actividad de la enzima ADA y evitar la conversión de Ado a Inosina (Ino) para que posteriormente los sobrenadantes de los cultivos fueran recuperados por centrifugación y

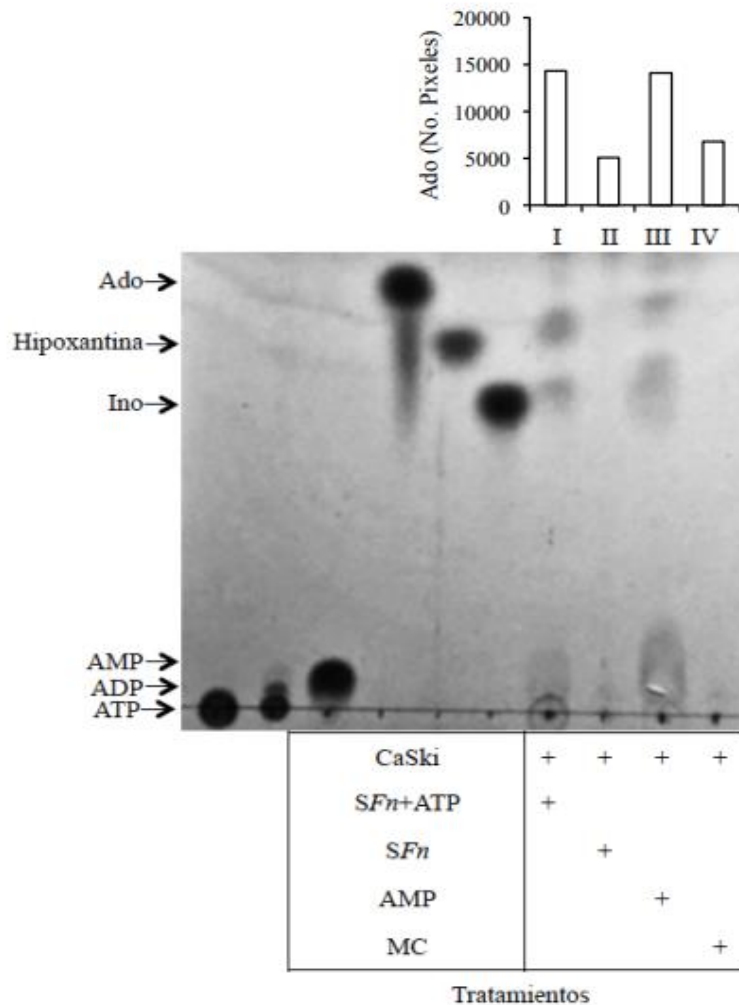


Herrera-Hernández, A. I.

analizados por cromatografía en capa fina de sílica gel para visualizar los productos de la hidrólisis de los nucleótidos. Ado, adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; ADP, difosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; EHNA, hidrocloreuro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil). Carriles I-V, tratamientos. Se muestra un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

***Fusobacterium nucleatum* contribuye con las células tumorales de CaCu para producir Ado a partir de la hidrólisis de ATP.**

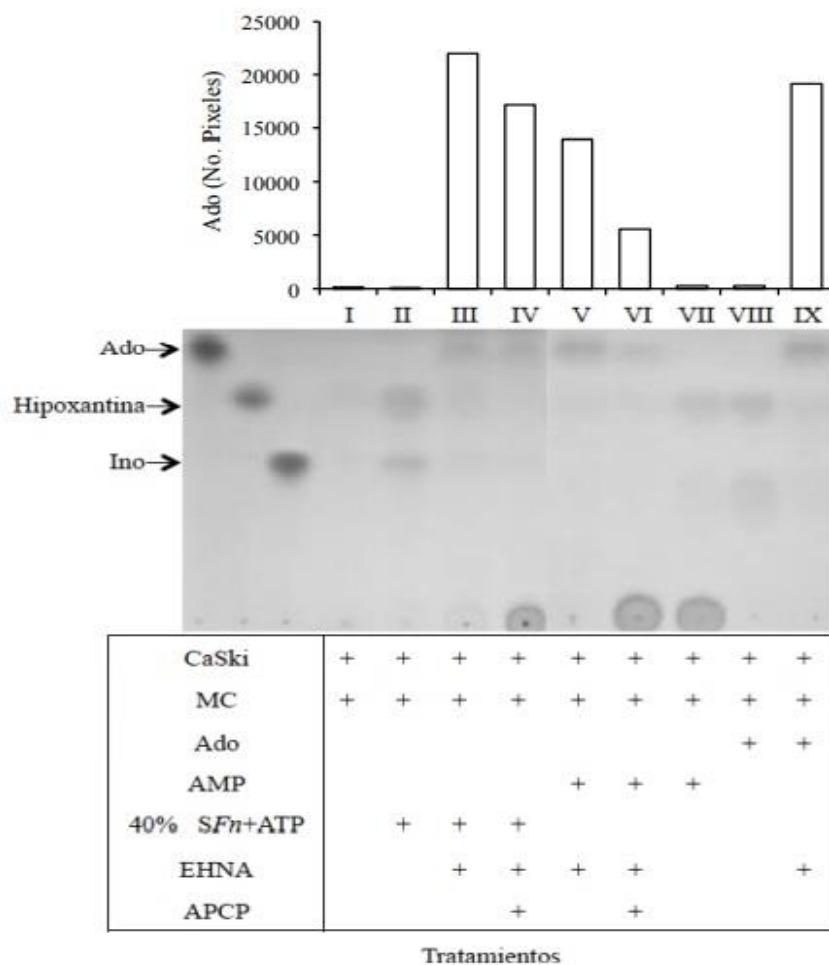
Después de corroborar que las bacterias *F. nucleatum* fueron capaces de generar AMP a partir de la hidrólisis de ATP, se procedió a determinar si células de CaCu generaban Ado a partir de los hidrolizados de ATP producidos por *F. nucleatum*. Para ello, alícuotas de  $1 \times 10^6$  células tumorales CaSki fueron incubadas durante 5 horas en medio de cultivo suplementado al 40% con sobrenadantes de la bacteria *F. nucleatum* cultivada durante 72 horas en presencia (Sobrenadante de *F. nucleatum* (SFn) +ATP) o ausencia (SFn) de 5mM de ATP. Como control positivo, las células CaSki fueron cultivadas en presencia de 2.5 mM de AMP. Las células CaSki fueron capaces de generar Ado, Hipoxantina e Inosina (Ino) cuando fueron cultivadas con 40% de SFn+ATP (Carril I, *Figura 5*) de manera similar al control positivo (Carril III, *Figura 5*). Por otro lado, solo una cantidad marginal de Ado fue detectada en los sobrenadantes de CaSki incubada en presencia de SFn (Carril II, *Figura 5*) o de medio de cultivo solo (Carril IV, *Figura 5*).



**Figura 5.** Células tumorales de CaCu generan Ado, Hipoxantina e Inosina a partir de los hidrolizados de ATP por *F. nucleatum*. Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células tumorales CaSki fueron incubadas durante 5 horas en medio de cultivo suplementado al 40% con sobrenadantes de la bacteria *F. nucleatum* cultivada durante 72 horas en presencia (*SFn+ATP*) o ausencia (*SFn*) de 5mM de ATP. Células CaSki cultivadas en presencia de 2.5 mM de AMP fueron utilizadas como control positivo, y en medio de cultivo solo (MC) como control negativo. El volumen total de cada cultivo fue de 200 $\mu$ l. Después de la incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y analizados para la detección de adenosina (Ado), inosina (Ino) e hipoxantina. Trifosfato de adenosina (ATP), Difosfato de adenosina (ADP), Monofosfato de adenosina (AMP), Ado, Ino e Hipoxantina sintéticos fueron utilizados como controles. Carriles I-IV, tratamientos. Se muestra un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

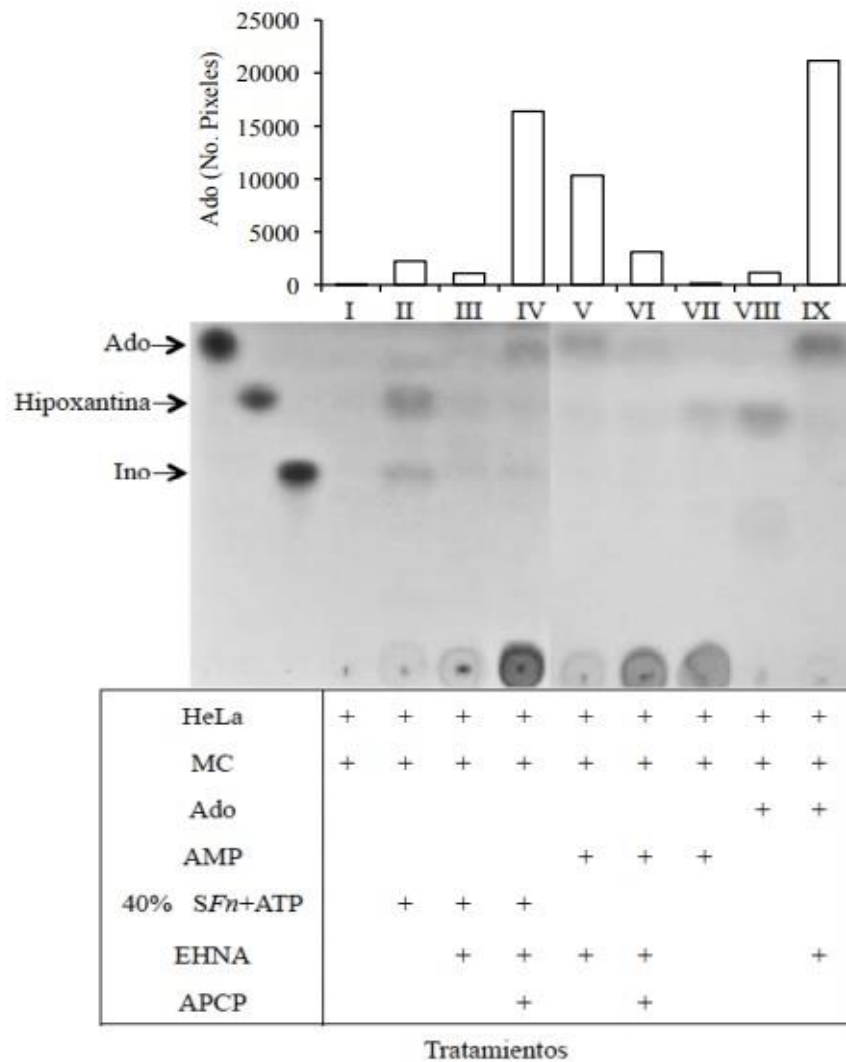
Se sabe que la enzima adenosina desaminasa (ADA) juega un papel crucial en la regulación de los niveles de Ado, al desaminar este nucleósido y convertirlo en Ino (Bagheri, Saboury, & Haertlé, 2019). En el ensayo previo, nosotros observamos que las células tumorales CaSki fueron capaces de generar Ado y un alto contenido de los metabolitos Ino e Hipoxantina a partir de *SFn+ATP*, sugiriendo una importante actividad funcional de ADA en las células tumorales de CaCu. Para corroborar dicha actividad, células tumorales CaSki, HeLa y C33A fueron incubadas durante 5 horas con 2.5mM de Ado y en presencia o ausencia de 1mM de EHNA, inhibidor específico de ADA. Al incubar las tres líneas celulares con solo medio de cultivo (MC) no se produjo Ado, Ino o Hipoxantina, carril I, *Figuras 6, 7, y 8*, respectivamente. Sin embargo, cuando se incubaron en presencia de Ado, este nucleósido fue convertido completamente en Ino e Hipoxantina por las tres líneas celulares, Carril VIII de las *Figuras 6, 7, y 8*, respectivamente. La adición de EHNA inhibió completamente la conversión de Ado en Ino y, por tanto, la generación de Hipoxantina en los cultivos de las tres líneas celulares, Carril IX de las *Figuras 6, 7, y 8*, respectivamente. De manera similar, cuando las tres líneas celulares fueron incubadas con 2.5mM de AMP o en presencia de 40% de *SFn+ATP* se detectó Ino e Hipoxantina en los sobrenadantes, Carriles VII y II de las *Figuras 6, 7, y 8*, respectivamente. Asimismo, bajo estas condiciones, la adición de EHNA inhibió la generación de Ino e Hipoxantina, Carriles V y III de las *Figuras 6, 7, y 8*, respectivamente. Por otra parte, la adición de APCP, inhibidor específico de la actividad enzimática de CD73, inhibió la generación de Ado en mayor medida cuando AMP fue adicionada al cultivo (Carril VI *Figuras 6, 7, y 8*). Sin embargo, la inhibición fue menor o nula cuando el *SFn+ATP* fue adicionado al cultivo (Carril IV *Figuras 6, 7, y 8*), sugiriendo la presencia de actividad hidrolítica de AMP, independiente de CD73, en el *SFn+ATP*. Estos resultados sugieren que *F. nucleatum* en un microambiente neoplásico del

cuello uterino, puede contribuir con las células tumorales en la generación de Ado a partir de la hidrólisis ATP y de los nucleótidos ADP y AMP.



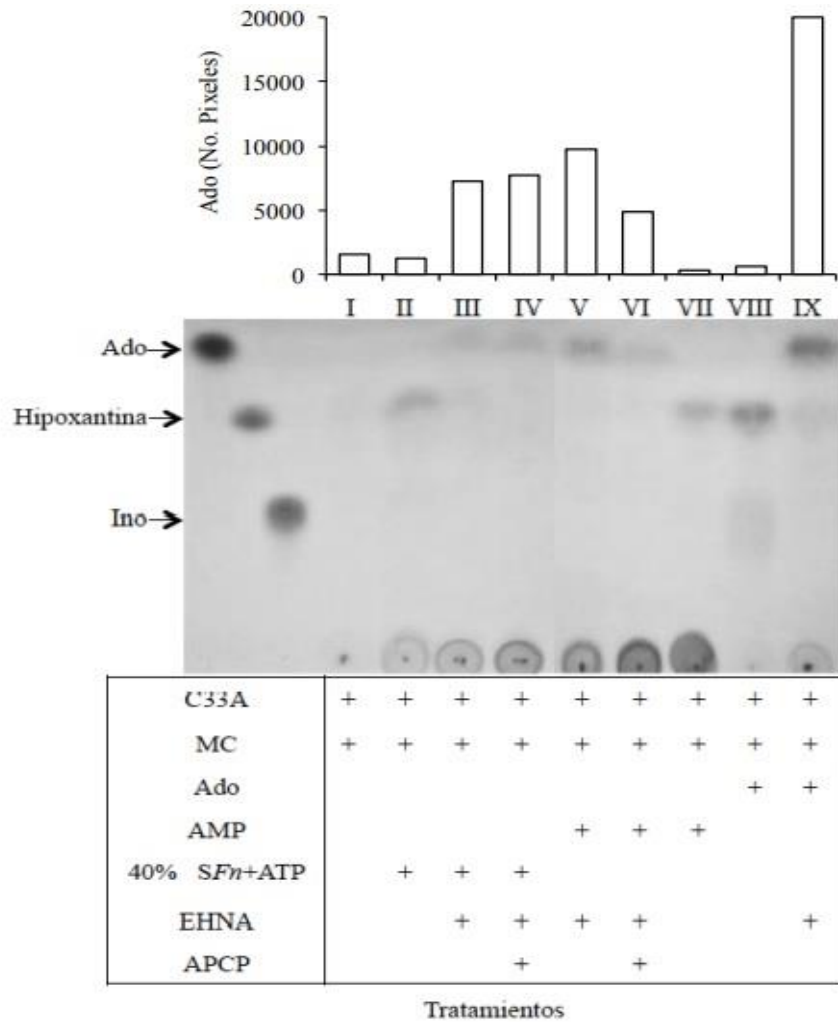
**Figura 6.** EHNA mantiene la adenosina generada por las células tumorales CaSki tratadas con hidrolizados de ATP producidos por *F. nucleatum*. Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células tumorales CaSki fueron incubadas durante 5 horas con medio de cultivo suplementado al 40% con sobrenadantes de la bacteria *F. nucleatum* cultivada durante 72 horas en presencia (*SFn*+ATP) de 5mM de ATP, o de 2.5 mM de Ado o AMP. Células CaSki cultivadas con medio de cultivo solo (MC) fueron utilizadas como control negativo. Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) (EHNA), inhibidor de la enzima Adenosina Desaminasa, o Adenosina 5'- $\alpha$ ,  $\beta$ -metileno) difosfato (APCP),

inhibidor selectivo de CD73, fueron adicionados en algunos tratamientos. El volumen total de cada cultivo fue de 200µL. Después de la incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y analizados para la detección de adenosina, inosina e hipoxantina. Trifosfato de adenosina (ATP), Difosfato de adenosina (ADP), Monofosfato de adenosina (AMP), Ado, Ino e Hipoxantina sintéticos fueron utilizados como controles. Carriles I-IX, tratamientos. Se muestra un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.



**Figura 7.** EHNA mantiene la adenosina generada por en las células tumorales HeLa tratadas con hidrolizados de ATP producidos por *F nucleatum*. Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células tumorales HeLa fueron incubadas durante 5 horas con medio de cultivo suplementado al 40% con sobrenadantes de la bacteria *F. nucleatum* cultivada durante 72 horas en

presencia (*SFn*+ATP) de 5mM de ATP, o de 2.5 mM de Ado o AMP. Células CaSki cultivadas con medio de cultivo solo (MC) fueron utilizadas como control negativo. Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) (EHNA), inhibidor de la enzima Adenosina Desaminasa, o Adenosina 5'-( $\alpha$ ,  $\beta$ -metileno) difosfato (APCP), inhibidor selectivo de CD73, fueron adicionados en algunos tratamientos. El volumen total de cada cultivo fue de 200 $\mu$ L. Después de la incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y analizados para la detección de adenosina, inosina e hipoxantina. Trifosfato de adenosina (ATP), Difosfato de adenosina (ADP), Monofosfato de adenosina (AMP), Ado, Ino e Hipoxantina sintéticos fueron utilizados como controles. Carriles I-IX, tratamientos. Se muestra un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.



**Figura 8.** EHNA mantiene la adenosina generada por las células tumorales C33A tratadas con hidrolizados de ATP producidos por *F. nucleatum*. Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células tumorales C33A fueron incubadas durante 5 horas con medio de cultivo suplementado al 40% con sobrenadantes de la bacteria *F. nucleatum* cultivada durante 72 horas en presencia (*SFn+ATP*) de 5mM de ATP, o de 2.5 mM de Ado o AMP. Células CaSki cultivadas con medio de cultivo solo fueron utilizadas como control negativo. Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) (EHNA), inhibidor de la enzima Adenosina Desaminasa, o Adenosina 5'- $\alpha$ ,  $\beta$ -metileno) difosfato (APCP), inhibidor selectivo de CD73, fueron adicionados en algunos tratamientos. El volumen total de cada cultivo fue de 200 $\mu$ L. Después de la incubación, los sobrenadantes fueron recuperados y analizados para la detección de adenosina, inosina e hipoxantina. Trifosfato de adenosina (ATP), Difosfato de adenosina (ADP), Monofosfato de adenosina (AMP), Ado, Ino e Hipoxantina sintéticos fueron utilizados como controles. Carriles I-IX, tratamientos. Se muestra un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

## Discusión

Se ha establecido que la infección persistente por VPH-AR es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de lesiones intraepiteliales del cuello uterino que pueden progresar a CaCu (Walboomers *et al.*, 1999). Por tanto, varios elementos que incluyen el tipo de VPH infectante, la edad de la infección, el tener múltiples parejas sexuales, factores inmunológicos, factores genéticos, factores hormonales y la presencia de microbiota patógena, pueden ser factores clave asociados con la progresión de la enfermedad (Zheng & Ding, 2018). De acuerdo con ello, recientemente se ha reportado que factores biológicos, como la vaginosis bacteriana o las infecciones de transmisión sexual (Guo, You, Qiao, Zhao, & Geng, 2012; Vriend *et al.*, 2015) alteran el microambiente vaginal y han sido identificados como cofactores en la persistencia de la infección por VPH-AR (Clarke *et al.*, 2012). Asimismo, una microbiota vaginal anormal ha

sido asociada con la adquisición de infección por VPH-AR (Gao, Weng, Gao, & Chen, 2013), la cual junto con la producción de citocinas inmunosupresoras en el sitio de la infección, pueden desempeñar un papel importante en la promoción de la displasia cervical (Behbakht *et al.*, 2002; Madrid-Marina & Torres-Poveda, 2018). En este contexto, se ha encontrado que la diversidad y composición de la microbiota del cuello uterino es notoriamente diferente en cada etapa de la historia natural del CaCu (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016). Por ejemplo, *Lactobacillus spp* es muy abundante en el cuello uterino de mujeres sin alteraciones en Papanicolaou; mientras que *Lactobacillus Crispatus* y *Lactobacillus iners* son las especies más abundantes en mujeres sin lesiones cervicales negativas y positivas a la infección por VPH-AR, respectivamente (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016; Chase *et al.*, 2015; Ravel *et al.*, 2011; Shannon *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2012). En contraste, la presencia de *Sneathia spp* es común en pacientes positivas a VPH y con lesiones intraepiteliales escamosas. Mientras que en estados avanzados de CaCu las especies de *Fusobacterium* (por ejemplo: *F. spp*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*) son más abundantes que en las primeras etapas, independientemente del tipo de VPH infectante (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016; Chase *et al.*, 2015; Ravel *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012). No obstante, aún no se han dilucidado los mecanismos por los cuales estas comunidades microbianas pueden favorecer el desarrollo de CaCu. Recientemente nuestro grupo de investigación reportó que células tumorales de CaCu expresan altos niveles de la ectonucleotidasa CD73 en la membrana celular y son capaces de generar grandes cantidades de Ado a partir de la hidrólisis de AMP, la cual suprime las funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al.*, 2017). Tomando en consideración que *F. nucleatum* es una bacteria anaerobia Gram negativa con alta capacidad patogénica (Huggan & Murdoch, 2008), además de que esta bacteria es capaz de hidrolizar al ATP extracelular y favorecer su propagación en el sitio de la infección (Ding & Tan, 2016), en



este estudio se analizó la contribución de *F. Nucleatum* con células tumorales de CaCu para producir Ado a partir de la hidrólisis de ATP.

En condiciones de cultivo *in vitro* y bajo hipoxia, nosotros determinamos que *F. Nucleatum* fue capaz de hidrolizar de manera eficiente ATP/ADP en AMP. Sin embargo, observamos que esta bacteria presentó muy baja capacidad para generar Ado a partir de AMP, lo cual permitió utilizar los sobrenadantes de *F. Nucleatum* cultivada en presencia de ATP (*SFn*+ATP) en cultivos de células tumorales de CaCu para analizar la producción de Ado. Greninger *et al.*, (2016), publicaron una secuencia de 284aa de fosfatasa alcalina (GenBank: OHU82297.1) obtenida de la secuencia genómica de *F. Nucleatum*, lo cual hace suponer que la principal actividad ATP/ADPasa, encontrada en los *SFn*+ATP, se deba a la fosfatasa alcalina presente en esta bacteria. Cabe mencionar que, en ensayos preliminares, nuestro grupo de investigación observó que la adición de polioxotungstenato de sodio (POM-1), inhibidor específico de la ectonucleotidasa CD39, no inhibió la actividad ATP/ADPasa de *F. Nucleatum*, lo cual nos puede indicar la ausencia de esta ectonucleotidasa en esta bacteria.

Por otra parte, observamos que los sobrenadantes de las células tumorales de CaCu (CaSki, HeLa y C33A) incubadas durante 5 horas en presencia de los *SFn*+ATP contenían principalmente Ino e Hipoxantina y sólo cuando EHNA, inhibidor específico de la enzima adenosina desaminasa (ADA), fue adicionada a los cultivos celulares se pudo detectar la presencia de Ado. Este mismo fenómeno se observó cuando las células tumorales fueron incubadas en presencia de AMP o Ado. ADA participa de manera importante en el metabolismo de purinas, al desaminar adenosina o 2'-deoxiadenosina y producir inosina o 2'-deoxinosina, respectivamente (Franco *et al.*, 1997). Por otro lado, la enzima Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP), convierte Ino o 2'-deoxinosina en hipoxantina (Giuliani *et al.*, 2016). Por tanto, la generación de Ino e Hipoxantina como

productos finales de la hidrólisis de AMP contenida en los *SFn*+ATP, sugiere que estas enzimas están presentes en altas cantidades en las células de CaCu y pudieran tener un efecto protector en estas células tumorales ante altas concentraciones de Ado en el microambiente tumoral, puesto que se ha observado que Ino tiene un efecto antitumor significativamente menor que adenosina (Han, Cheng, Gao, Zhao, & Zhang, 2017). Por otro lado, la actividad de CD73 en las células tumorales de CaCu se pudo corroborar a través de la adición de APCP, inhibidor específico de esta nucleotidasa, reduciendo de manera importante la generación de Ado por las células tumorales cuando éstas fueron incubadas en presencia de AMP, pero poco en presencia de *SFn*+ATP, sugiriendo que el AMP contenido en el *SFn*+ATP también fue hidrolizado por la actividad de la fosfatasa alcalina producida por la bacteria *F. Nucleatum*.

*F. nucleatum* es un residente común de la microbiota orofaríngea en humanos, capaz de causar abscesos, diseminación e infecciones sistémicas, a menudo en diferentes sitios del cuerpo a la vez (Afra, Laupland, Leal, Lloyd, & Gregson, 2013). Además, se ha demostrado que el *F. nucleatum* se adhiere e invade epitelios, y puede penetrar a las células endoteliales a través de una nueva adhesina denominada FadA (Liu *et al.*, 2014). En consecuencia, el daño causado por la invasión de esta bacteria en los diferentes tejidos puede ocasionar la liberación de una cantidad importante de ATP, el cual al interactuar con receptores específicos en células dendríticas y macrófagos también puede promover la activación de un proceso inflamatorio (Bours, Swennen, Di Virgilio, Cronstein, & Dagnelie, 2006). Por tanto, *F. nucleatum* además de contribuir en la liberación de ATP en el tejido del cuello uterino infectado y promover inflamación, también podría contribuir con las células tumorales en la producción de Ado para generar un microambiente inmunosupresor, de acuerdo con lo reportado en el presente estudio. Esto también puede representar un circuito de retroalimentación, por un lado, en la expansión de *F. nucleatum*

y de otros microorganismos oportunistas que proliferan en un microambiente hipóxico, y, por otro lado, creando las condiciones propicias para promover el crecimiento tumoral. En estudios recientes, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la señalización de Ado a través de los receptores A2AR y A2BR en las células tumorales de CaCu induce la expresión y secreción de TGF- $\beta$  e IL-10, que por un lado mantienen la expresión de CD73 (García-Rocha *et al.*, 2018), y por otro lado suprimen la proliferación de linfocitos citotóxicos CD4+ (López-Muñoz *et al.*, 2013) y disminuyen la expresión de moléculas HLA para evadir la respuesta inmune (Torres-Pineda *et al.*, 2020). En varios estudios se ha reportado que las concentraciones de ambas citocinas, tanto en tejidos tumorales como en plasmas de pacientes con CaCu, correlacionan con el grado de progresión de la enfermedad (Torres-Poveda *et al.*, 2014).

Bajo las premisas anteriores, tenemos el aporte relativo de *F. nucleatum* como un agente inmunosupresor que favorece indirectamente el crecimiento tumoral del CaCu. Por tanto, estos hallazgos pueden ofrecer una oportunidad para emplear a estos microorganismos como marcadores biológicos en el diagnóstico y tratamiento en las diferentes etapas de desarrollo de CaCu y también para restaurar la homeostasis cervicovaginal con el uso de, por ejemplo, probióticos o un antibiótico selectivo de tratamiento (Avilés-Jiménez, Guoqin, Torres-Poveda, Madrid-Marina, & Torres, 2017; Curty, de Carvalho, & Soares, 2020; Macklaim, Clemente, Knight, Gloor, & Reid, 2015).



### **Conclusiones**

- 1.-** *Fusobacterium nucleatum* presentó capacidad para hidrolizar de manera eficiente los nucleótidos ATP/ADP y generar altos contenidos de productos.
- 2.-** Las células tumorales de CaCu fueron capaces de generar Ado, y los metabolitos Ino e Hipoxantina, como productos de la hidrólisis del AMP contenido en los hidrolizados de ATP llevados a cabo por *F. nucleatum*.
- 3.-** En un microambiente neoplásico del cuello uterino, *F. nucleatum* podría contribuir con las células tumorales de CaCu en la generación de Ado a partir de los nucleótidos ATP y ADP, debido a la combinación de la actividad ATP/ADPasa de *F. nucleatum* y de la actividad AMPasa de CD73 expresada en las células tumorales.

### **Perspectivas**

- 1.-** Será interesante analizar si existe alguna asociación entre la presencia de *F. nucleatum* en los tejidos tumorales de CaCu con los niveles de expresión de las citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 en los tejidos de las pacientes y/o en plasma sanguíneo.
- 2.-** Realizar ensayos *in vivo* en un modelo experimental, para determinar el papel de esta bacteria en la promoción de un microambiente inmunosupresor a través de la producción de TGF- $\beta$  e IL-10 y/ disminución de moléculas del MHC.
- 3.-** Ya que se ha reportado que *F. nucleatum* se encuentra en todos los estadios del CaCu, realizar más estudios que permitan determinar si la erradicación de la bacteria con probióticos y/o

Herrera-Hernández, A. I.

antibióticos, podría aportar un beneficio en pacientes con CaCu. Esto permitiría un enfoque integral en términos clínicos para los planes de mitigación del CaCu en las pacientes.

## Referencias.

- Abu-Fanas, S. H., Drucker, D. B., Hull, P. S., Reeder, J. C., & Ganguli, L. A. (1991). Identification, and susceptibility to seven antimicrobial agents, of 61 gram-negative anaerobic rods from periodontal pockets. *Journal of Dentistry*, *19*(1), 46–50.  
[https://doi.org/10.1016/0300-5712\(91\)90038-Z](https://doi.org/10.1016/0300-5712(91)90038-Z)
- Afra, K., Laupland, K., Leal, J., Lloyd, T., & Gregson, D. (2013). Incidence, risk factors, and outcomes of *Fusobacterium* species bacteremia. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1).  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-264>
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*, *13*(12), 842–857.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3613>
- Audirac-Chalifour, A., Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Téllez-Sosa, J., Martínez-Barnetche, J., Cortina-Ceballos, B., ... Madrid-Marina, V. M. M. (2016). Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: A pilot study. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153274>
- Avilés-Jiménez, F., Guoqin, Y., Torres-Poveda, K., Madrid-Marina, V., & Torres, J. (2017). On the Search to Elucidate the Role of Microbiota in the Genesis of Cancer: The Cases of Gastrointestinal and Cervical Cancer. *Archives of Medical Research*, *48*(8), 754–765.  
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.008>

Herrera-Hernández, A. I.

Bagheri, S., Saboury, A. A., & Haertlé, T. (2019). Adenosine deaminase inhibition. *International Journal of Biological Macromolecules*, *141*, 1246–1257.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.078>

Behbakht, K., Friedman, J., Heimler, I., Aroutcheva, A., Simoes, J., & Faro, S. (2002). Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: A case-control study. *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*, *10*(4), 181–186. <https://doi.org/10.1155/S1064744902000200>

Bolstad, A. I., Jensen, H. B., & Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews*, *9*(1), 55–71.

<https://doi.org/10.1128/cmr.9.1.55>

Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology and Therapeutics*, *112*(2), 358–404.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>

Brennan, C. A., & Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(3), 156–166.

<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>

Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., ... Holt, R. A. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, *22*(2), 299–306.

<https://doi.org/10.1101/gr.126516.111.Freely>

Chase, D., Goulder, A., Zenhausern, F., Monk, B., & Herbst-Kralovetz, M. (2015). The vaginal

Herrera-Hernández, A. I.

and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: A review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecologic Oncology*, *138*(1), 190–200.

<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.04.036>

Clarke, M. A., Rodriguez, A. C., Gage, J. C., Herrero, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., ...

Schiffman, M. (2012). A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infectious Diseases*, *12*(1), 33.

<https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-33>

Curty, G., de Carvalho, P. S., & Soares, M. A. (2020). The role of the cervicovaginal

microbiome on the genesis and as a biomarker of premalignant cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1).

<https://doi.org/10.3390/ijms21010222>

Dejea, C. M., Wick, E. C., M., H. E., Whitec, J. R., Welch, J. L. M., Rossetti, B. J., ... Sears, C.

L. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(51), 18321–18326.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1406199111>

Ding, Q., & Tan, K. S. (2016). The danger signal extracellular ATP is an inducer of

*Fusobacterium nucleatum* biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection*

*Microbiology*, *6*(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00155>

Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I., & Lluís, C. (1997). Cell

surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology*,

*52*(4), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00013-0)

Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Muller, C. E. (2011).



International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 1–34.  
<https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>

Gao, W., Weng, J., Gao, Y., & Chen, X. (2013). Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: A cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-271>

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- $\beta$ 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- $\beta$ 1. *Cytokine*, (8), 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.018>

Giuliani, P., Zuccarini, M., Buccella, S., Peña- Altamira, L. E., Polazzi, E., Virgil, M., ... Caciagli, F. (2016). Evidence for purine nucleoside phosphorylase (PNP) release from rat c6 glioma cells. *Journal of neurochemistry*, 141(1), 208–221.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.14004>

Greninger, A. L., Bateman, A. C., Nowowiejski, D., Fang, F. and Jerome, K. (2016). Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* AB1. Disponible en:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)

Guo, Y.-L., You, K., Qiao, J., Zhao, Y., & Geng, L. (2012). Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *International journal of STD & AIDS*, 23(8), 581–584.  
<https://doi.org/10.1258/ijsa.2012.011342>

Han, M., Cheng, X., Gao, Z., Zhao, R., & Zhang, S. (2017). Inhibition of tumor cell growth by

Herrera-Hernández, A. I.

adenine is mediated by apoptosis induction and cell cycle S phase arrest. *Oncotarget*, 8(55), 94286–94296. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21690>

Han, Y. W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology*, 23, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.013>

Hill, G. B. (1998). Preterm Birth: Associations With Genital and Possibly Oral Microflora. *Annals of Periodontology*, 3(1), 222–232. <https://doi.org/10.1902/annals.1998.3.1.222>

Hou, M., Liu, X., Wheler, J., Naing, A., Hong, D., Bodurka, D., ... Fu, S. (2014). Outcomes of Patients with Metastatic Cervical Cancer in a Phase I Clinical Trials Program, (34), 2349–2355.

Huggan, P. J., & Murdoch, D. R. (2008). Fusobacterial infections: Clinical spectrum and incidence of invasive disease. *Journal of Infection*, 57(4), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.07.016>

IACR. (2018). *Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018)*. Recuperado de <http://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>

Kasama, H., Sakamoto, Y., Kasamatsu, A., Okamoto, A., Koyama, T., Minakawa, Y., ... Uzawa, K. (2015). Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. *BMC Cancer*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1577-2>

Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., ... Garrett, W. S. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor immune microenvironment. *Cell Host Microbe*, 14(2), 207–215.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007.Fusobacterium>

Kostic, A., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., ... Meyerson, M.

(2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 292–298. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>

Lee, J. E., Lee, S., Lee, H., Song, Y. M., Lee, K., Han, M. J., ... Ko, G. P. (2013). Association of

the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063514>

Lehtinen, M., Ault, K. A., Lyytikäinen, E., Dillner, J., Garland, S. M., Ferris, D. G., ...

Paavonen, J. (2011). Chlamydia trachomatis infection and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Sexually Transmitted Infections*, 87, 372–376.

<https://doi.org/10.1136/sti.2010.044354>

Liu, P., Liu, Y., Wang, J., Guo, Y., Zhang, Y., & Xiao, S. (2014). Detection of *Fusobacterium*

nucleatum and fadA adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation. *PLoS ONE*, 9(1), 3–7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085280>

Lizano-soberón, M., Carrillo Garcia, A., & Contreras Paredes, A. . (2009). Infección por virus

del Papiloma Humano: Natural y Carcinogénesis. *Instituto Nacional de Cancerología*, 4, 205–216. Recuperado de

<http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementod/documentosPortada/1272302572.pdf>

López-Muñoz, H., Escobar-Sánchez, M. L., López-Marure, R., Lascurain-Ledesma, R., Zenteno,

E., Hernández-Vazquez, J. M. V., ... Sánchez-Sánchez, L. (2013). Cervical cancer cells induce apoptosis in TCD4+ lymphocytes through the secretion of TGF- $\beta$ . *Archives of*

Herrera-Hernández, A. I.

*Gynecology and Obstetrics*, 287(4), 755–763. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2621-y>

Macklaim, J. M., Clemente, J. C., Knight, R., Gloor, G. B., & Reid, G. (2015). Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26, 27799. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27799>

Madrid-Marina, V., & Torres-Poveda, K. (2018). La importancia de la microbiota cervicovaginal en cáncer cervicouterino. *Mensaje Bioquímico*, 42, 57–63.

Marrazzo, J. M., & Hillier, S. L. (2013). Bacterial Vaginosis. En *Sexually Transmitted Diseases* (pp. 463–498). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391059-2.00018-8>

Mora-García, M. de 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(4651627), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/4651627>

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. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874917301363?via%3Dihub>

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V, ... International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*, 348(6), 518–527.

Herrera-Hernández, A. I.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>

Nikbakht Dastjerdi, M., Valiani, A., Mardani, M., & Zamani Ra Rani, M. (2016). Adenosine A1 receptor modifies P53 expression and apoptosis in breast cancer cell line MCF-7. *Bratisl Med J*, 117(4), 241–246. <https://doi.org/10.4149/BLL>

Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., ... Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(suppl. 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>

Regateiro, F. S., Howie, D., Nolan, K. F., Agorogiannis, E. I., Greaves, D. R., Cobbold, S. P., & Waldmann, H. (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *European journal of immunology*, 41(10), 2955–2965.

Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, 2(2), 409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>

Rubinstein, M. R., Xiaowei, W., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han., Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*, 14(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012.Fusobacterium>

Sears, L. C., & Garrett, W. S. (2014). Microbes, Microbiota and Colon Cancer. *Cell Host Microbe*, 15(3), 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007.Microbes>

Segata, N., Haake, S., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., ... Izard, J. (2012).

Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology*, 13(6), R42.

<https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r42>

Shannon, B., Yi, T. J., Perusini, S., Gajer, P., Ma, B., Humphrys, M. S., ... Tan, K. S. (2014).

Inflammatory responses in the female genital tract. *Genome Research*, 42(1), 965–976.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.019.Cervicovaginal>

Signat, B., Roques, C., Poulet, P., & Duffaut, D. (2011). Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 13(2), 25–36.

Sitkovsky, M. V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., ... Thiel, M.

(2004). Physiological Control of Immune Response and Inflammatory Tissue Damage by Hypoxia-Inducible Factors and Adenosine A2A Receptors. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 657–682. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731>

Smith, B. C., McAndrew, T., Chen, Z., Harari, A., Barris, D. M., Viswanathan, S., ... Burk, R.

D. (2012). The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040425>

Torres-Pineda, D. B., Mora-García, M. de L., García-Rocha, R., Hernández-Montes, J., Weiss-

Steider, B., Montesinos-Montesinos, J. J., ... Monroy-García, A. (2020). Adenosine augments the production of IL-10 in cervical cancer cells through interaction with the A2B adenosine receptor, resulting in protection against the activity of cytotoxic T cells. *Cytokine*, 130(160), 155082. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155082>

Torres-Poveda, K. (2014). Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(4), 753.

<https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.753>

Vriend, H. J., Bogaards, J. A., van Bergen, J. E. A. M., Brink, A. A. T. P., van den Broek, I. V. F., Hoebe, C. J. P. A., ... Medical Microbiological Laboratories and the CSI group. (2015). Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without *Chlamydia trachomatis* co-infection. *Cancer Medicine*, 4(10), 1589–1598. <https://doi.org/10.1002/cam4.496>

Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., ... Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F)

Young, A., Mittal, D., Stannard, K., Yong, M., Teng, M. W. L., Allard, B., ... Smyth, M. J. (2014). Co-blockade of immune checkpoints and adenosine A2A receptor suppresses metastasis Arabella. *OncoImmunology*, 3(10), e958952-1-e958952-3. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.958952>

Zheng, H., & Ding, M. (2018). The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Medicine*, 7(10), 5217–5236. <https://doi.org/10.1002/cam4.1501>

Zhu, H., Luo, H., Shen, Z., Hu, X., Sun, L., & Zhu, X. (2016). Transforming growth factor- $\beta$ 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer. *Tumor Biology*, 37(6), 7075–7083. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5028-8>

Zimmermann, H., Zebisch, M., & Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*, 8(3), 437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302->

Herrera-Hernández, A. I.

012-9309-4