



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**BIOMEDICINA**

**DETECCIÓN DE CD39 Y UNA ISOFORMA ALTAMENTE GLICOSILADA DE  
CD73 SOLUBLE EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER CERVICAL Y SU  
CORRELACIÓN CON LOS CONTENIDOS DE TGF-B DURANTE LA  
PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. EN C. MUÑOZ GODINEZ RICARDO**

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

**COMITÉ TUTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.**

**DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , MAYO, 2021**



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**  
**BIOMEDICINA**

**DETECCIÓN DE CD39 Y UNA ISOFORMA ALTAMENTE GLICOSILADA DE  
CD73 SOLUBLE EN PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER CERVICAL Y SU  
CORRELACIÓN CON LOS CONTENIDOS DE TGF-B DURANTE LA  
PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. EN C. MUÑOZ GODINEZ RICARDO**

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

**COMITÉ TUTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.**

**DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/421/2021

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 ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de marzo de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del estudiante MUÑOZ GODINEZ RICARDO con número de cuenta 304262014 con la tesis titulada "DETECCIÓN DE CD39 Y UNA ISOFORMA ALTAMENTE GLICOSILADA DE CD73 SOLUBLE EN EL PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER CERVICAL Y SU CORRELACIÓN CON LOS CONTENIDOS DE TGF- $\beta$  DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD", realizada bajo la dirección del DR. ALBERTO MONROY GARCÍA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ  
Vocal: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ  
Secretario: DR. BENNY WEISS STEIDER

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de mayo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX. Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

## **Agradecimientos**

1.- Principalmente agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

2.- El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES-Zaragoza. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave del proyecto: IN225519. Y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS, con los siguientes apoyos financieros: FIS/IMSS/PROT/PRIO/19/114 y CONACYT No. 240635.

También agradezco a CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.

3.- Agradezco a mi tutor principal Dr. Alberto Monroy García por el tiempo dedicado, las enseñanzas y consejos para la realización del proyecto. También agradezco a los miembros de mi comité tutor, al Dr. Benny Weiss Steider y al Dr. Juan José Montesinos Montesinos por el tiempo dedicado en cada reunión y las sugerencias para mejorar el proyecto.

## **Agradecimientos personales**

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

Al Dr. Jorge Hernández Montes por enriquecer este trabajo con cada una de sus sugerencias.

A los miembros de mi jurado al Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, Dra. Marcela Lizano Soberón y al Dr. Hugo López Muñoz por el tiempo dedicado a las correcciones de este trabajo.

A mi hermano Dr. Julian Muñoz por ayudarme tomar las muestras cervicales y sanguíneas que se usaron como control en este trabajo, gracias bro!!!

También agradezco a todos mis compañeros de laboratorio por haber hecho tan ameno el tiempo de trabajo.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>1. Cáncer</b>	<b>3</b>
<b>2. Virus de papiloma humano (VPH) y Cáncer Cérvico-uterino (CaCU)</b>	<b>5</b>
2.1. Virus de papiloma humano (VPH)	<b>5</b>
2.2. Asociación del VPH con el desarrollo del CaCU	<b>6</b>
2.3. Otros factores de riesgo para el desarrollo del CaCU	<b>8</b>
2.4. Historia natural del CaCU	<b>8</b>
<b>3. La vía adenosinérgica</b>	<b>10</b>
3.1. Las ectonucleotidasas CD39/CD73 de la vía adenosinérgica tienen un papel fisiológico importante en condiciones normales	<b>10</b>
3.2. El papel de CD39/CD73 en procesos tumorales	<b>13</b>
3.3. Vía adenosinérgica CD39 y CD73 en CaCU	<b>15</b>
<b>4. CD39 y CD73 solubles</b>	<b>16</b>
4.1. Papel clínico de CD39 y CD73 soluble	<b>18</b>
4.2. Las características moleculares de CD73 soluble entre las que destaca su glicosilación le confieren variantes isoformas bajo condiciones patológicas	<b>18</b>
<b>5. TGF-<math>\beta</math></b>	<b>20</b>
5.1 TGF- $\beta$ y la vía adenosinérgica	<b>21</b>
<b>Justificación</b>	<b>23</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>24</b>

<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>Metodología</b>	<b>26</b>
Material biológico	26
Detección y cuantificación de CD39 y CD73 soluble en PLP	27
Actividad hidrolítica de CD39 y CD73	27
Cuantificación de TGF- $\beta$	28
<i>Western Blot</i>	28
Desglicosilación enzimática	28
Tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol	29
Análisis estadístico	29
<b>Resultados</b>	<b>30</b>
Características de las mujeres participantes en el estudio	30
Análisis del contenido de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en plasmas de donadoras normales y de pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) y CaCU	33
Actividad adenosinérgica en plasmas libres de plaquetas de donadoras normales y pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cérvico-uterino utilizando nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP)	37
Detección de CD73 altamente glicosilada en plasmas libre de plaquetas de donadoras normales y pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cérvico-uterino	41
Análisis del contenido de TGF- $\beta$ en plasmas sanguíneos de donadoras normales y de pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cérvico-uterino. Además de su correlación con los contenidos de las las ectonucleotidasas CD39 y CD73	44

<b>Discusión</b>	<b>46</b>
<b>Conclusión</b>	<b>50</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>51</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>52</b>
<b>Apéndice (Artículo requisito para la obtención del grado)</b>	<b>62</b>

## Resumen

La infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es el factor principal para el desarrollo cáncer cérvico-uterino (CaCU). Recientemente, se ha propuesto a la vía adenosinérgica como un importante modulador del crecimiento tumoral, inmunosupresión y metástasis. En esta vía se hidrolizan moléculas de ATP y ADP hacia AMP a través de la ectonucleotidasa de membrana integral CD39 posteriormente, el AMP es hidrolizado hacia adenosina (Ado) por parte de una ectonucleotidasa unida a la membrana vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) llamada CD73 y la acumulación de Ado extracelular favorece el desarrollo del cáncer.

Para determinar si CD39 y CD73, que participan en la producción de adenosina inmunosupresora, están involucradas en el desarrollo de la enfermedad, en este estudio analizamos los contenidos y la actividad hidrolítica de estas ectonucleotidasas en muestras de plasmas libres de plaquetas (PLP) de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) (n=18), de alto grado (LIEAG) (n=12) y de CaCU (n=19) y los comparamos con los de donadoras normales (DN) (n=15).

Los contenidos de CD39 y CD73 en los PLP incrementaron conforme el grado de avance de la enfermedad y mostraron una correlación positiva ( $r=0.5929$ ,  $P<0.001$ ). Los PLP de pacientes con LIEAG y CaCU mostraron los mayores contenidos de CD39 (2.3 y 2.2 veces mayor, respectivamente, que el de las DN) y de CD73 (1.7 y 2.68 veces mayor, respectivamente, que el de las DN), los cuales se asociaron con alta capacidad para generar Ado a partir de la hidrólisis de ADP y AMP. La adición de POM-1 y APCP, inhibidores específicos de CD39 y CD73, respectivamente, inhibió en más de 90% la actividad ADPasa y AMPasa de los PLP. Por otra parte, un alto contenido de una isoforma de CD73 de 90 kDa se detectó en PLP de pacientes con LIEAG y CaCU. La digestión con endoglicosidasa-H y N-glicanasa generó CD73 con pesos moleculares de 90 kDa, 85 kDa, 80 kDa y 70 kDa. Además, los contenidos plasmáticos de TGF- $\beta$  en los PLP de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU correlacionaron positivamente con los de CD39 ( $r=0.4432$ ,  $P<0.001$ ) y CD73 ( $r=0.5786$ ,  $p<0.001$ ). Estos resultados sugieren que la secreción de la forma soluble de CD39 y CD73 y su asociación con el TGF- $\beta$  son factores que favorecen la progresión del CaCU a través de la generación de Ado.

## Abstract

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (RA-HPV) is the main factor for the development of cervical cancer (CaCU). Recently, the adenosynergic pathway has been proposed as an important modulator of tumor growth, immunosuppression, and metastasis. In this pathway, ATP and ADP molecules are hydrolyzed to AMP through the integral membrane ectonucleotidase CD39, subsequently, AMP is hydrolyzed to adenosine (Ado) by a membrane-bound ectonucleotidase via glycosylphosphatidylinositol (GPI) called CD73 and accumulation of extracellular Ado favors the development of cancer.

To determine if CD39 and CD73, which participate in the production of immunosuppressive adenosine, are involved in the development of the disease, in this study we analyzed the contents and the hydrolytic activity of these ectonucleotidases in samples of platelet-free plasma (PFP) from patients with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) (n = 18), high-grade (HSIL) (n = 12) and CC (n = 19) and we compared them with those of normal donors (ND) (n = 15).

The contents of CD39 and CD73 in PFP increased according to the degree of progression of the disease and a positive correlation ( $r = 0.5929$ ,  $P < 0.001$ ). The PFP of patients with HSIL and CC showed the highest contents of CD39 (2.3 and 2.2 times higher, respectively, than that of ND) and CD73 (1.7 and 2.68 times higher, respectively, than that of ND), which were associated with a high capacity to generate Ado from the hydrolysis of ADP and AMP. The addition of POM-1 and APCP, specific inhibitors of CD39 and CD73, respectively, inhibited the ADPase and AMPase activity of PFPs by more than 90%. On the other hand, a high content of a 90 kDa CD73 isoform was detected in PFP from patients with HSIL and CC. Digestion with endoglycosidase-H and N-glycanase generated CD73 with molecular weights of 90 kDa, 85 kDa, 80 kDa and 70 kDa. Furthermore, the plasma contents of TGF- $\beta$  in PFP from patients with LSIL, HSIL and CC correlated positively with those of CD39 ( $r = 0.4432$ ,  $P < 0.001$ ) and CD73 ( $r = 0.5786$ ,  $p < 0.001$ ). These results suggest that the secretion of the soluble form of CD39 and CD73 and its association with TGF- $\beta$  are factors that favor the progression of CaCU through the generation of Ado.

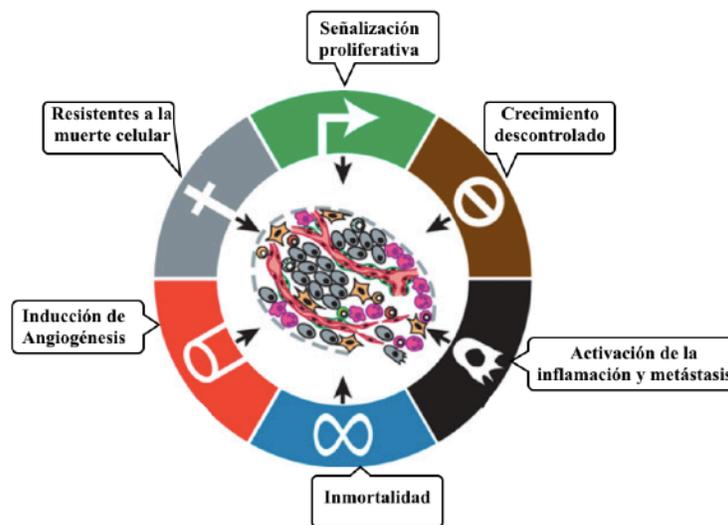
## Introducción

### 1. Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades más temidas en el mundo y tiene una persistencia y una incidencia creciente, hoy en día se estiman 18, 078, 957 nuevos casos de cáncer alrededor del mundo de los cuales la mitad llegan a defunciones (1). Una definición sencilla del cáncer es el crecimiento anormal de las células, esto debido a que los cánceres surgen de cualquier órgano o estructura corporal y están compuestos por células transformadas con una excelente capacidad proliferativa. Los cánceres explotan los mecanismos de organización multicelular, y su comprensión da lugar a difíciles problemas filosóficos (2).

Las células cancerosas continúan creciendo a menos que ocurra una de cuatro cosas: 1.- la masa cancerosa se elimina quirúrgicamente; 2.- usar quimioterapia u otro tipo de medicamentos específicos para el cáncer, como la terapia hormonal; 3.- uso de radioterapia; o 4.- las células cancerosas se encogen y desaparecen por sí solas. Este último evento, aunque extremadamente raro, puede ocurrir con algunos melanomas o algunos cánceres de riñón (1-3). Hoy en día se ha propuesto que el cáncer tiene seis características biológicas distintivas adquiridas durante múltiples pasos del desarrollo de un tumor que permiten completar el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica (Figura 1) (4). Estas características distintivas comprenden: 1.- El mantenimiento de una señal proliferativa, de varias formas alternativas como la producción de receptores de factores de crecimiento, es decir, estímulos autocrinos; mantienen la activación constitutiva de rutas de señalización que estimulan el crecimiento celular (4, 5); 2.- Crecimiento descontrolado, en donde la base radica en la evasión de genes que controlan el crecimiento celular o también llamados genes supresores de tumores como RB (Retinoblastoma) que es un regulador central de la progresión del ciclo celular (4, 6). 3.- Resistencia a las señales de muerte celular, normalmente las células cuentan con una vida media que depende del tipo celular. El número de células que componen un tejido permanecen constantes gracias a que las células que mueren se sustituyen por otras, los mecanismos específicos que dictan la muerte celular programada son genéticamente regulados, sin embargo, las células tumorales que han sufrido daños asociado con la hiperproliferación forman tumores que tienen éxito de progresar (7); 4.- Inmortalidad, en condiciones normales las células tienen un número limitado de células sucesivas y pueden entrar a un estado de senescencia, un tipo de entrada irreversible a un estado no proliferativo pero viable. En raras ocasiones como en células tumorales exhiben un número ilimitado de potencial de división, la evidencia indica que los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas están involucrados de manera central en la capacidad para la división celular ilimitada (8, 9); 5.- Inducción de angiogénesis, en un adulto la formación de nuevos vasos sanguíneos está encendida solo de forma transitoria y exclusivo a algunos procesos como la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino. Por el contrario, durante la progresión del tumor, casi siempre se activa un interruptor angiogénico y permanece encendido, lo que hace la que vasculatura normalmente inactiva produzca nuevos vasos sanguíneos (4, 10)

y; 6.- Activación de la inflamación y metástasis, la transformación de una célula normal en una célula cancerosa probablemente no sea un evento tan crítico en la génesis del cáncer; más bien es la incapacidad de las células inmunes del cuerpo para identificar y destruir las células cancerosas recién formadas cuando son pocas. El riesgo de cáncer se multiplica en aquellas personas, cuyo sistema inmunitario está suprimido debido a cualquier factor (11). Las células tumorales además tienen la capacidad de activar puntos de control de reguladores negativos en el microambiente tumoral y la secreción de citocinas solubles inmunosupresoras para el desarrollo exitoso de un tumor y su propagación metastásica (12).



**Figura 1.** Características distintivas del cáncer. Las células transformadas, adoptan una serie de características que distinguen y facilitan el desarrollo de un tumor. Dentro de todas las características del cáncer, las seis más importantes están representadas en la figura. Tomado de Hanahan, D and Weinberg, R. Cell. 2011

Entre los agentes causantes de tumores, se han propuesto a algunos tipos de virus denominados virus oncogénicos como una poderosa fuente de desarrollo tumoral a través de una variedad de mecanismos que controlan tanto la proliferación, como la maquinaria de la célula huésped por los elementos virales, sumado a la formación de un estado de inmunosupresión que facilita la aparición de tumores (13, 14). Dentro de los virus oncogénicos, el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma humano (VPH), el virus de Epstein-Barr (VEB) y el citomegalovirus (CMV) representan los agentes causales del 10-15% de cánceres humanos alrededor del mundo (15). Los mecanismos de acción por los cuales los virus oncogénicos provocan el desarrollo de un tumor se deben principalmente a que poseen diferentes oncogenes, por ejemplo, E6 y E7 en el VPH (16). Los oncogenes inhiben los mecanismos de acción de las dos principales vías superiores de tumores como p53 y

RB que controlan la respuesta celular a estímulos potencialmente oncogénicos (17). Ambas vías conducen a una detención transitoria en la división celular, posteriormente a la apoptosis o senescencia; no obstante, si un error en la señalización provoca que la célula no sufra apoptosis o senescencia también puede dar como resultado la formación de tumores (18).

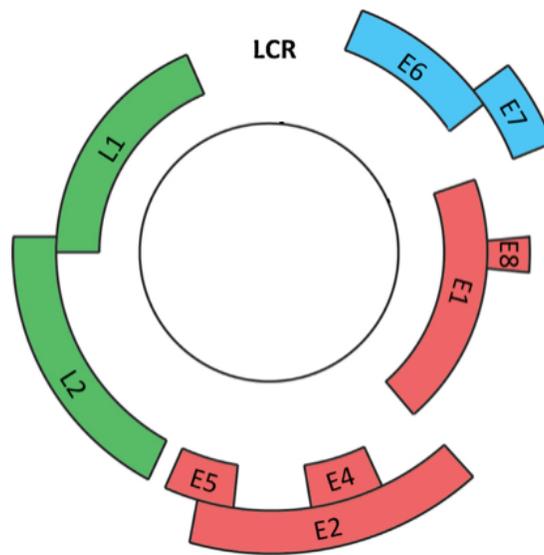
## **2. Virus de papiloma humano (VPH) y Cáncer Cérvico-uterino (CaCU)**

### **2.1 Virus del papiloma humano (VPH)**

Los virus asociados a tumores, también llamados oncovirus o virus oncogénicos pueden desencadenar el desarrollo de células cancerígenas y la formación de tumores. Dentro de los oncovirus, el virus de papiloma humano (VPH) es uno de los más destacados (19). El VPH infecta el epitelio estratificado en varios sitios anatómicos, se han identificado cerca de 200 tipos distintos de VPH de los cuales 40 infectan la mucosa genital y se clasifican como de bajo (VPH-BR) y alto riesgo (VPH-AR) si éstos se asocian con lesiones benignas o malignas, respectivamente (20, 21). Entre los VPH-AR, el VPH-16 es el más común en el mundo y es encontrado en alrededor del 50 % de los casos de mujeres con cáncer cérvico -uterino (CaCU), seguido por el VPH-18, - 45 y -31, -33, -52 y -58 entre otros (21). La infección persistente con VPH-AR es un factor causante del cáncer cérvico-uterino ya que existen evidencias donde más del 99% de las lesiones cervicales contienen secuencias virales de VPH-AR (23).

El genoma circular del VPH cuenta con 8 kb de longitud y está asociado a histonas tanto en el virión como en células infectadas, formando un patrón de nucleosomas similares al ADN celular (20, 24). El genoma del VPH contiene típicamente de seis a ocho marcos de lectura abiertos (ORF) que se designan como tempranos (E) o tardíos (L) (Figura 2) (20). Los ORF tempranos están representados como E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8. Aunque las proteínas E5, E6 y E7 son los principales agentes virales y contribuyen significativamente al potencial oncogénico del VPH-AR, por ejemplo E7 se encarga de la degradación de los miembros de la familia retinoblastoma (Rb) y a su vez regula la actividad de la familia de factores de transcripción E2F conduciendo a la proliferación desregulada de las células (25, 26).

Por otro lado los ORF tardíos, incluyen las proteínas estructurales del VPH; L1 y L2, ellos forman la cápside viral y se sintetizan exclusivamente en los queratinocitos (27). Existe también en el genoma del VPH un fragmento nombrado LCR que realiza funciones reguladoras afectando la transcripción de los genes E6 y E7. Todas las regiones LCR del VPH que han sido examinadas hasta ahora contienen sitios específicos que proporcionan al virus un tropismo particular para células epiteliales escamosas estratificadas (28).



**Figura 2.** Estructura del VPH. Tres bloques de colores representan los marcos de lectura abiertos (ORF). Donde las oncoproteínas E1, E2, E4, E5 y E8 son las iniciadoras de la división viral. Posteriormente E6 y E7 son las responsables del potencial oncogénico y finalmente las proteínas tardías L1 y L2 forman la cápside viral. También se representa la región LCR.

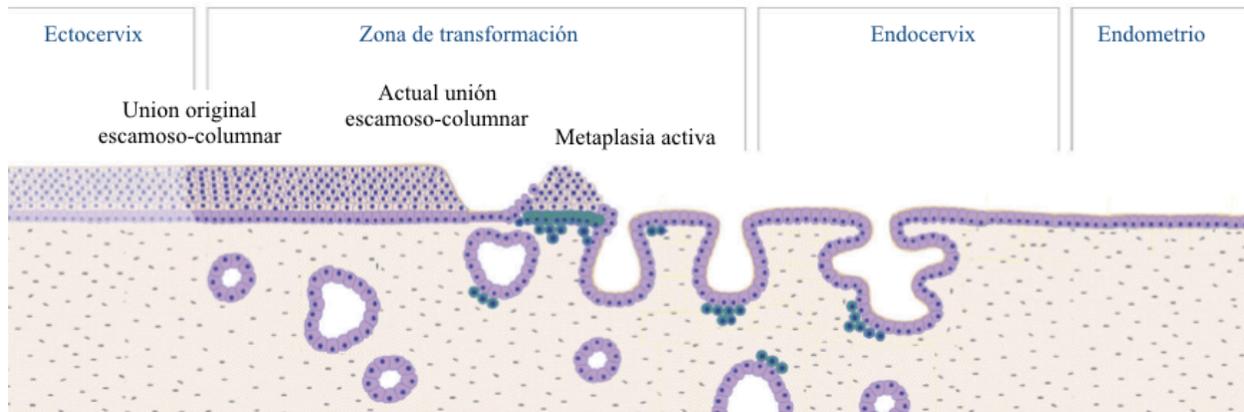
Tomado y modificado de Anacker, D. and Moody, C. Virus Research. 2017.

## 2.2 Asociación del VPH con el desarrollo de CaCU

La evidencia que relaciona las infecciones con el VPH-AR y el CaCU incluyen una gran cantidad de estudios consistentes, lo que indica que existe un papel fuerte y específico de la infección viral. Con las técnicas de amplificación de vanguardia se ha demostrado inequívocamente que, en muestras de pacientes con CaCU el ADN del VPH se ha podido detectar en 90 al 100 % de los casos (29). De los más de 35 tipos de VPH encontrados en los genitales femeninos, el VPH 16 representa entre el 50% y el 60% de los casos de CaCU en la mayoría de los países, seguidos por VPH-18: 10-20 %, VPH 45: 4-8% y VPH 31: 1-5%. Estos tipos de VPH más comunes representa el 80 % de la distribución en cáncer de células escamosas y el 94 % en adenocarcinoma (30).

Los mecanismos de acción de los VPH-AR se basan en la infección de una amplia gama de sitios epiteliales, y causan cáncer en estos sitios con diferentes frecuencias. Los sitios epiteliales donde los cánceres asociados a VPH-AR ocurren con mayor frecuencia no son por regla general los sitios de epitelios diferenciados de múltiples capas que apoyan la infección productiva, sino en sitios con una organización epitelial atípica donde la expresión génica viral puede desregularse, lo que lleva a cambios precancerosos en el fenotipo celular que con el tiempo se desarrollan cáncer de tipo invasivo (31). Los VPH-AR pueden infectar diferentes tipos de células epiteliales en el cuello uterino con consecuencias distintas. El cuello uterino consta de al menos tres tipos epiteliales distintos como el epitelio estratificado del ectocervix, el epitelio columnar del endocervix y la zona de transformación cervical, siendo esta última la más importante al riesgo de cáncer (Figura 3) (32).

La mayoría de los cánceres de cuello uterino surgen en la zona de transformación cervical que son células presentes en forma variable del epitelio columnar que se encuentra cerca de la unión columnar escamosa cervical y participan en el proceso de metaplasia, por ende la infección por VPH-AR afecta en mayor medida a células metaplásicas. Por su carácter de transición son las más vulnerables a ser afectadas. Por tanto, la neoplasia cervical puede verse como la interacción del VPH-AR y el epitelio metaplásico inmaduro (32, 33).



**Figura 3.** Composición epitelial del cuello uterino. El cuello uterino está compuesto por el epitelio estratificado convencional del ectocervix, la zona de transformación y el epitelio columnar del endocervix que se encuentra adyacente al endometrio. Se muestran células en turquesa en la zona de transformación por debajo del epitelio columnar, las cuales juegan un papel metaplásico normal. El ectocervix es un sitio donde se apoya la infección productiva del VPH-AR y los otros sitios en la zona de transformación se asocian con diferentes niveles de la expresión génica desregulada del VPH-AR donde los fenotipos moleculares observados típicamente son proteínas como E4 y E5. Tomado de: Doorbar. J and Griffin. H. Papillomavirus Research. 2019.

Es entonces, cuando a través del proceso metaplásico el VPH-AR invade al epitelio cervical, por lo general en áreas con pequeñas heridas, el VPH-AR se dirige a las células basales en proliferación activa y la mayor parte de la replicación del genoma viral ocurre después de que las células epiteliales migran fuera de la capa basal. Dado que las células epiteliales han dejado de dividirse en esta etapa, el número de copias virales aumenta enormemente por célula, al igual que su expresión génica viral. Por lo que los cambios histopatológicos típicos inducidos por la infección por el VPH-AR se presentan como lesiones de bajo grado que reflejan la replicación viral activa (34).

### **2.3 Otros factores de riesgo para desarrollar CaCU**

Los factores de riesgo claves en el desarrollo del CaCU reflejan el comportamiento sexual, el número de parejas sexuales que simplemente refleja la exposición al virus de VPH-AR.

Sin embargo, existen otros factores de riesgos descritos, como el uso prolongado de anticonceptivos orales, ya que se ha observado una clara relación dosis respuesta con duración en el uso de anticonceptivos orales (35). Otro factor de riesgo reconocido en el alto número de embarazos, las mujeres que informaron siete o más números de embarazos a término tienen un riesgo de 4 veces mayor de tener CaCU en comparación con mujeres positivas a VPH-AR que no han tenido embarazos (36).

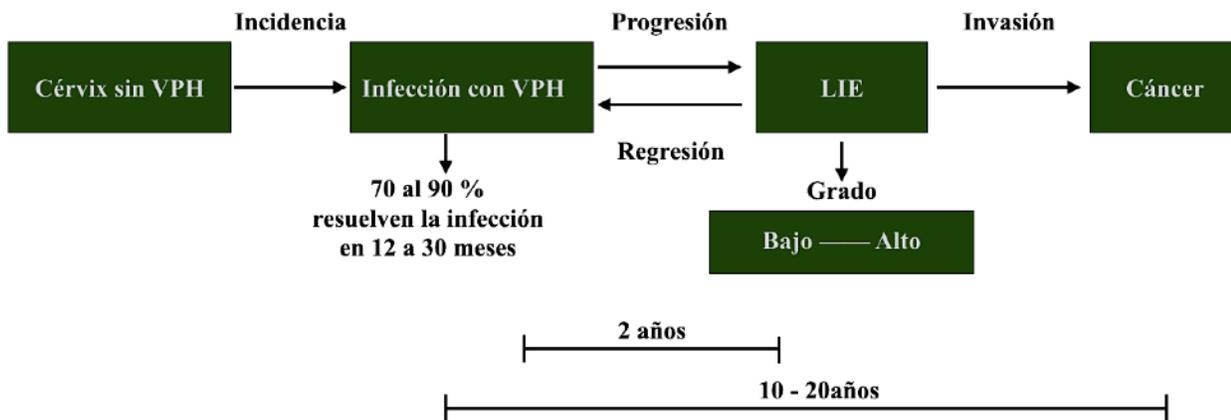
Fumar cigarrillos también representa un factor de riesgo al desarrollo del CaCU, estadísticamente se ha demostrado que el fumar se asocia con un doble riesgo significativo de desarrollar CaCU, mujeres positivas al VPH-AR con lesiones preneoplásicas en prácticamente todos los casos se tuvo evidencia del efecto del tabaco como carcinógeno (37).

La coinfección con otros tipos de virus también aumenta el riesgo al desarrollo del CaCU. La infección con virus representa una poderosa fuente para la alteración genética de células huésped. Es importante señalar que la sola infección por virus no es suficiente para el desarrollo de un tumor, dentro de los factores que contribuyen al desarrollo tumoral, la evasión del sistema inmune para poder establecer una infección prolongada representa un punto clave. Una estrategia para evadir la respuesta inmune por parte de células infectadas es la generación de moléculas inmunosupresoras, se ha observado que con la infección por virus como el CMV, VIH, VHB y VHC y el VPH existe una sobreexpresión de moléculas antiinflamatorias con efectos supresores sobre los linfocitos T citotóxicos, importantes en la defensa inmune contra las infecciones virales (38). La co-infección con otras enfermedades de transmisión sexual también puede ser un factor de riesgo importante al desarrollo del CaCU ya que los cambios inflamatorios inespecíficos también se han relacionado con el aumento de moderadores de lesiones cervicales preneoplásicas entre mujeres positivas al VPH-AR (38)

### **2.4 Historia natural del CaCU**

Entre todos los tipos de cáncer diagnosticados en el mundo, el cáncer cérvico-uterino (CaCU) es el quinto más comúnmente diagnosticado, y es la cuarta causa principal de muerte por cáncer entre las mujeres alrededor del mundo, por lo que se ha convertido en un problema de salud pública muy grande (39). Se ha descrito que la historia natural del CaCU es un proceso largo compuesto por tres etapas: incidencia, progresión e invasión (figura 4). Primero las mujeres adquieren VPH-AR a través de relaciones sexuales con una pareja infectada, por lo que la incidencia es alta alrededor de la edad del debut sexual. Sin embargo, las infecciones se resuelven y desaparecen en aproximadamente dos años en más del 90 - 97% de las personas afectadas (40, 41).

Las mujeres que no resuelven la infección pueden llegar a progresar a lesiones clínicamente conocidos como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y se clasifican como NIC I, II y III, de acuerdo a la cantidad de epitelio que haya sido invadido, también conocidos bajo la clasificación de Bethesda como lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) para NIC I y lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) para NIC II y NIC III, este tipo de lesiones cervicales gradualmente van acentuándose hasta que en un término de entre 2 a 20 años se puede transformar en carcinoma invasor (Figura 4) (42, 43). Las infecciones de bajo grado pueden llegar a desaparecer en un periodo de dos años si los otros factores de riesgo descritos anteriormente lo permiten y el sistema inmune de las pacientes actúa de manera eficiente (44). Aunque más del 85% de las infecciones producidas por el VPH-AR se van a eliminar a lo largo del tiempo, algunas de estas infecciones no son eliminadas, lo que puede llevar a establecer una infección persistente, con un mayor riesgo de desarrollar LIEAG y CaCU. Se ha encontrado que la infección con múltiples tipos virales de VPH está asociada con persistencia (45). La duración prolongada de la infección por VPH parece estar asociada con una evasión efectiva del virus hacia la inmunidad innata; de por sí el ciclo de replicación viral es un mecanismo de evasión: la replicación del ADN viral y su liberación no causa muerte celular, ya que el queratinocito infectado ya está programado para morir de manera natural, por lo que no se disparan señales de peligro hacia el sistema inmune; esto se ve reflejado en la ausencia de inflamación por lo que el virus es invisible al huésped (46).



**Figura 4.** Historia natural del CaCU. La infección por el VPH tiene una historia natural de larga evolución, que inician clínicamente como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y se clasifican como NIC I, II y III, de acuerdo a la cantidad de epitelio que haya sido invadido, también conocidos bajo la clasificación de Bethesda como lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) para NIC I y lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) para NIC II y NIC III. Si la infección por el VPH-AR persiste, se suman factores de riesgo entre los que destaca la efectiva evasión del sistema inmune y este tipo de lesiones cervicales gradualmente van acentuándose hasta que en un término de entre 2 a 20 años se puede transformar en carcinoma invasor.

Con la efectiva evasión del sistema inmune, adicionalmente, hay una baja regulación de la expresión de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  y las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR alteran la expresión de IFNs, de genes reguladores del ciclo celular y de otros genes involucrados en la resistencia del huésped a la infección; esto le permite al virus permanecer durante largos periodos sin ser reconocido, lo cual demora la activación de la respuesta inmune adaptativa (47).

Más recientemente se ha demostrado que la vía adenosinérgica juega un papel importante en la patología del cáncer ginecológico, al aumentar moduladores inmunosupresores, además se ha propuesto a esta vía como un importante modulador del crecimiento tumoral y metástasis (48). Se ha observado en tejidos de las diferentes etapas de la historia natural del CaCU un incremento en la expresión de moléculas de la vía adenosinérgica como CD39 y CD73 conforme progresa la enfermedad (Manuscrito en preparación). Además de que la infección persistente por VPH de alto riesgo, se ha asociado a la acción conjunta de moléculas de la vía adenosinérgica y otras citocinas como TGF- $\beta$ , las cuáles se han detectado en altos niveles plasmáticos que en conjunto se cree que están participando en el desarrollo de tumor por la infección del VPH-AR (49).

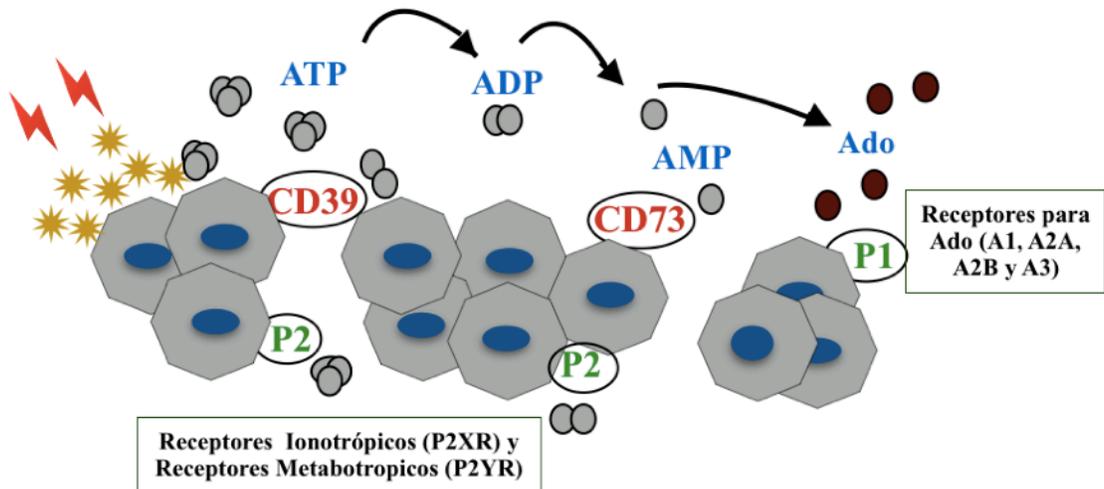
### **3. La vía adenosinérgica**

Los nucleótidos y nucleósidos extracelulares median numerosos efectos de señalización en casi todos los órganos y tejidos, la mayoría de la señalización de nucleótidos depende de interacciones funcionales entre distintos procesos que incluyen la liberación de ATP al espacio extracelular, el cual activa eventos de señalización a través de una serie de receptores selectivos de nucleótidos que compiten con ectoenzimas que hidrolizan moléculas de ATP extracelular. Por lo que la duración y magnitud de la vía adenosinérgica se rige por una red de ectoenzimas entre las que destacan CD39 y CD73 (50). En la vía adenosinérgica, se hidrolizan moléculas de ATP y ADP hacia AMP a través de la ectonucleotidasa de membrana integral CD39. Posteriormente, el AMP es hidrolizado hacia adenosina (Ado) por parte de una ectonucleotidasa unida a la membrana vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) denominada CD73 y se ha descrito que la acumulación de Ado extracelular favorece la inmunosupresión que podría ayudar al desarrollo de tumores (51).

#### **3.1 Las ectonucleotidasas CD39/CD73 de la vía adenosinérgica tienen un papel fisiológico importante en condiciones normales**

Dentro de la vía adenosinérgica, dependiendo del subtipo, comúnmente las ectonucleotidasas hidrolizan nucleótidos de ATP, ADP y AMP manteniendo un balance en las concentraciones de estos nucleótidos que cumplen con las funciones de señalización purinérgica (52). Normalmente los nucleótidos, especialmente el ATP, son secretados al espacio extracelular y circulan a través del torrente sanguíneo debido a

que cada célula de un organismo puede liberar ATP de una manera controlada a través de canales para ATP por electrodifusión, difusión facilitada por transportadores específicos de nucleótidos y exocitosis vesicular o bien de una manera descontrolada en respuesta al estrés, infección y daño celular (Figura 5) (53, 54). El ATP extracelular es considerada una potente molécula de señalización al interactuar con sus receptores, ionotrópicos P2XR (P2X1-7) o metabotrópicos acoplados a proteínas G P2YR (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14) que dependiendo de su afinidad y el evento fisiológico generan respuestas como la neurotransmisión y el control de la secreción hormonal así como su participación en la respuesta inmune (Figura 5) (55, 56). Sin embargo, los nucleótidos extracelulares como ATP y ADP son hidrolizados por la ectonucleotidasa CD39 para generar AMP, y posteriormente el AMP es hidrolizado hacia adenosina (Ado) por la ectonucleotidasa CD73 (57). La Ado juega un papel importante en el cuerpo humano, afectando muchos procesos bioquímicos al unirse a sus receptores para adenosina (RA): A1, A2A, A2B y A3 ubicados en la superficie de las células (Figura 5) (58).



**Figura 5.** Las ectoenzimas CD39 y CD73 de la vía adenosinérgica tienen un papel fisiológico importante. Normalmente en situaciones de estrés celular, daño tisular o en algunas infecciones como virus, se secretan nucleótidos de ATP al espacio extracelular. En el espacio extracelular son potentes moléculas de señalización que se acoplan a sus receptores nombrados receptores P2 que dependiendo de su afinidad y evento fisiológico controlan el daño y modulan la respuesta inmune. Sin embargo, los nucleótidos extracelulares como ATP y ADP pueden también desencadenar la vía adenosinérgica a través de la ectonucleotidasa CD39 que hidroliza las moléculas de ATP y ADP hacia AMP y posteriormente el AMP es hidrolizado hacia adenosina (Ado) por la ectonucleotidasa CD73. La Ado al acoplarse a sus receptores denominados receptores P1 juega un papel importante en muchos procesos bioquímicos que dependiendo de las concentraciones de Ado desencadenan diferentes eventos fisiológicos.

La ectonucleotidasa CD39 pertenece a la familia de las ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa) que se encuentra expresada en la superficie de muchos tipos de tejidos incluyendo bazo, timo, pulmón, células del endotelio vascular, arterias y células de la respuesta inmune (57). Se ha descrito que CD39 compite con los receptores P2 por un número limitado de nucleótidos de ATP secretados al espacio extracelular y que al hidrolizar los nucleótidos modulan la función de los propios receptores P2 (59, 60).

Uno de los eventos fisiológicos donde más se ha involucrado a CD39 es en la homeóstasis vascular, ya que CD39 es la ectonucleotidasa dominante en las células del endotelio vascular y células asociadas en donde es responsable de la regulación de los niveles de nucleótidos extracelulares y plasmáticos (61). Esta regulación de nucleótidos es crítica en la modulación de la homeóstasis vascular y la respuesta vascular a lesiones debido a que los nucleótidos extracelulares al unirse a los receptores P2 sobre las plaquetas, leucocitos y endotelio activan vías que dan como resultado la degranulación, agregación plaquetaria y por lo tanto una activación en el reclutamiento de leucocitos, por lo que CD39 al inactivar las moléculas de ATP y ADP evita el incremento en las concentraciones basales de estos nucleótidos controlando la agregación plaquetaria y el tamaño de trombo (62, 63).

Así mismo, la actividad catalítica de CD39 marca el inicio a las funciones de fisiológicas de CD73. CD73 es una ectonucleotidasa que se encuentra anclada a la membrana celular por un glicosilfosfatidilinositol (GPI) y es expresada por muchos tipos de células, entre las que se encuentran células del hígado, pulmón, cerebro, células del endotelio vascular y células de la respuesta inmune (57). Las funciones fisiológicas de CD73 probablemente difiere entre los distintos tejidos y no solo se limita a su actividad catalítica, también se ha descrito que es una proteína de adhesión celular ya que ha sido implicada en las interacciones célula - célula o célula - matriz extracelular (64). Sin embargo, la mayor importancia fisiológica de CD73 se debe a su capacidad para generar Ado a partir de moléculas de AMP, la Ado formada a su vez activa sus receptores que desencadenan múltiples respuestas fisiológicas en una amplia cantidad de tejidos (51).

Por ejemplo, la Ado es un potente neuromodulador que influye en muchas funciones del sistema nervioso central, donde se ha descrito que el aumento en la actividad neuronal da como resultado niveles elevados de Ado que a la luz de sus receptores cumplen funciones de regulación de la actividad nerviosa, controlando la liberación de neurotransmisores (65, 66). En el metabolismo del miocardio, si la tasa de consumo de energía excede la tasa de producción de energía, aumentan los niveles de Ado por la hidrólisis de ATP que da como resultado una vasodilatación coronaria, que al antagonizar los estímulos se aporta el suministro de oxígeno al miocardio para mantener la normalidad (67). En el cartílago, la Ado ayuda a mantener la homeóstasis de los condrocitos, regulando su función (68). En el sistema inmune es tal vez en donde más se puede apreciar a la Ado como una delgada línea entre las funciones activadoras o inhibitorias, ya que altas concentraciones de Ado en el microambiente celular conduce a la inhibición de las respuestas de las células del sistema inmune; es por eso, que debe existir un balance entre las concentraciones de ATP y la Ado

extracelular, debido a que la inflamación parece estar regulada de forma opuesta entre estas dos moléculas en donde el aumento de Ado inhibirá la inflamación y al mismo tiempo, los bajos niveles de ATP también tienen un efecto inhibitor sobre la respuesta inflamatoria (69, 70). De la misma forma, en todos los tejidos en donde la vía adenosinérgica tiene acción debe existir un balance entre los nucleótidos de ATP, ADP, AMP, las ectonucleotidasas CD39/CD73 y la producción de Ado para que se cumplan las funciones fisiológicas normales (52). De lo contrario el desequilibrio entre estas moléculas conducirá a procesos patológicos, tal es el caso del microambiente tumoral, en donde el estrés celular y la hipoxia conducen a una desregulación de la vía adenosinérgica resultando en una alta producción de Ado con distintos efectos en esta patología (71).

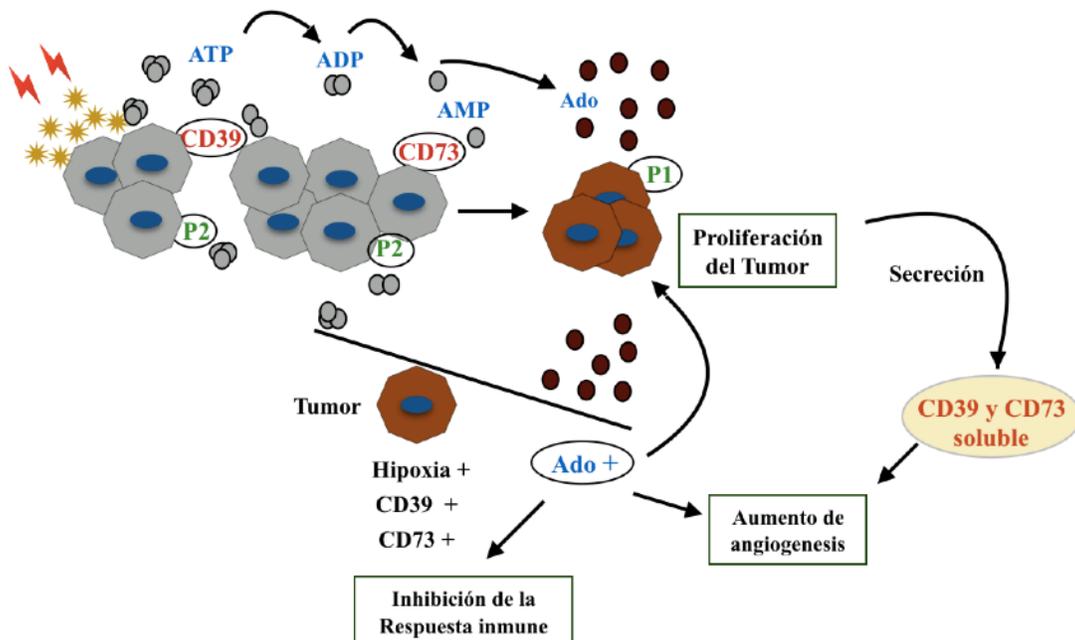
### **3.2 El papel de CD39/CD73 en procesos tumorales**

En la biología del cáncer, existen características distintivas que permiten el crecimiento tumoral y la metástasis. Entre ellas están; la capacidad que tienen las células transformadas para modificar o reprogramar el metabolismo celular gracias a su inestabilidad genómica; y la capacidad para evadir la respuesta inmunológica, en particular por los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células NK. Dentro de estas características, las ectonucleotidasas CD39 y CD73 tienen gran protagonismo (72). Sabemos que el microambiente tumoral está caracterizado por estrés celular en condiciones de hipoxia y falta de nutrientes, incrementando la muerte celular que conduce a una alta liberación de ATP al espacio extracelular, se ha descrito que altas cantidades de ATP extracelular podrían limitar directamente el crecimiento de las células tumorales (Figura 6) (73). Para evitar los efectos del ATP extracelular, las células tumorales modulan la expresión de CD39 en condiciones de hipoxia produciendo altas cantidades de esta ectonucleotidasa que gracias a su capacidad enzimática, hidroliza las moléculas de ATP al mismo tiempo se inicia el camino de la vía adenosinérgica (Figura 6) (74). Así mismo, el microambiente hipóxico también regula transcripcionalmente la expresión de CD73 y ese mecanismo de tal inducción implica al factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), el cual, en un esfuerzo para aliviar los requerimientos de oxígeno conduce a la activación transcripcional de CD39, CD73 y el receptor para Ado A2B representando una respuesta coordinada para la señalización de Ado autocrina y paracrina.

Por tanto, no es raro encontrar que en los diferentes tipos de tumor, se encuentren altamente expresadas las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Figura 5) (75, 76). Otro mecanismo que induce la expresión de CD39/CD73 es a través de la vía Wnt, que a menudo se desregula en tumores (77). Epigenéticamente CD73 está regulada negativamente por el silenciamiento transcripcional dependiente de la metilación (78).

Sea cual sea el mecanismo por el cual se regule la expresión tanto CD39 como CD73, el objetivo principal converge en incrementar la concentración de Ado en el microambiente tumoral que a su vez interactúa con sus receptores expresados en las células tumorales, células de la respuesta inmune, células del endotelio vascular, entre otras (79). Se ha descrito en células tumorales que el receptor A2B por ser de baja afinidad está involucrado en la señalización a altas concentraciones de Ado, incrementando los niveles de AMP cíclico e influyendo en la supervivencia, proliferación y migración celular (79, 80). La Ado también media la producción de VEGF por las células tumorales al interactuar con los receptores A2A y A2B de las células del endotelio vascular ejerciendo un efecto proangiogénico, mayor producción de VEGF, vasodilatación y proliferación de células endoteliales, facilitando la metástasis (Figura 6) (81).

Quizás el papel más importante de la Ado en la progresión del tumor, es que actúa como una de las moléculas inmunosupresoras más importantes del microambiente tumoral, que junto con otras moléculas como TGF- $\beta$ , sinergizan en la supresión de la respuesta inmune (Figura 6) (82). Se ha propuesto que tanto CD39 como CD73 son marcadores de las células T reguladoras (T reg) y que la acción coordinada de estas ectonucleotidasas genera Ado capaz de inhibir la función de las células T efectoras a través de su receptor A2A (82). Por ejemplo, la Ado extracelular induce pérdida de la actividad citotóxica en las células NK (84), induce la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2, que se caracterizan por la producción de citocinas antiinflamatorias, además de tener mayor expresión de las ectonucleotidasas CD39/CD73 generando un ambiente rico en Ado (85). En células dendríticas inhibe su maduración y activación (86). Por todo lo anterior, se ha propuesto que las terapias anti-CD39/anti-CD73 podrían representar una oportunidad para luchar contra el cáncer, además de tener un potencial en el valor pronóstico como biomarcadores en distintos tumores (87, 88).



**Figura 6.** Participación de las ectoenzimas CD39 y CD73 en la progresión del tumor. En el microambiente tumoral existen diferentes mecanismos, como el estrés celular y la hipoxia que conducen a la pérdida del equilibrio de las concentraciones de nucleótidos de ATP y la alta producción de Ado. Existen diferentes mecanismos en el microambiente tumoral que llevan al aumento significativo de la expresión de CD39 y CD73 lo que conduce a un desbalance en la cantidad de Ado generada en el espacio extracelular en donde actúa en diferentes niveles. En las propias células tumorales induce aumento en los niveles de AMP cíclico, influyendo en la sobrevivencia, proliferación y migración celular. En las células de la respuesta inmune inhibe tanto sus funciones efectoras como proliferativas. En células endoteliales ejerce un efecto proangiogénico, mayor producción de VEGF, vasodilatación y proliferación de células endoteliales facilitando la metástasis. Asimismo, se ha descrito que las células tumorales son capaces de secretar las formas solubles de CD39 y CD73 catalíticamente activas que viajan al torrente sanguíneo.

Recientemente se ha descrito que las ectoenzimas CD39 y CD73 al ser de importancia para el tumor son secretadas al espacio extracelular. Se han detectado las formas solubles de CD39 y CD73 catalíticamente activas en fluidos corporales como el plasma sanguíneo de pacientes con inflamación y cáncer (89, 90). Aún no es claro cómo las formas solubles de las proteínas ancladas a la membrana se liberan, pero los mecanismos plausibles incluyen la escisión por metaloproteasas y desprendimiento mediado por fosfolipasas asociadas a células (91). Independientemente del origen, la aparición de las formas solubles de CD39 y CD73 amplía el rango de acción de estas enzimas en los sitios de inflamación. Se especula que ayudan a la producción de Ado local, además de que pueden viajar en el torrente sanguíneo y tener efectos inmunosupresores, sin embargo, se desconoce el verdadero efecto de las formas solubles en cáncer.

### **3.3 Vía adenosinérgica CD39 y CD73 en CaCU**

Anteriormente hemos descrito que la efectiva evasión de la respuesta inmune tiene un papel clave en la progresión del VPH-AR hacia CaCU. Actualmente ha sido referido que este hecho puede ser aumentado por la presencia de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 dentro del microambiente tumoral. De hecho, es probable que la infección por virus oncogénicos esté regulando positivamente la expresión y la actividad enzimática de CD39 y CD73 en las células huésped como estrategia para evadir la respuesta inmune al aumentar las concentraciones de Ado durante las infecciones persistentes. Un indicio de esto se ha observado con la infección del VPH, donde se ha visto un aumento tanto de expresión como en la actividad enzimática de CD39 y CD73 en células infectadas por VPH (91). Asimismo, sobre células infectadas directamente con VPH (CaCU VPH+) se ha observado un aumento en la expresión de CD73 comparado con células no infectadas (CaCU VPH-) además de que la alta expresión de CD73 sobre las células infectadas resulta en una mayor capacidad para suprimir la proliferación, activación y actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ indicando que la adenosina generada por las células infectadas por los virus oncogénicos es un mecanismo para evadir la respuesta inmune (49).

Posiblemente la sobreexpresión de CD39 y CD73 por células tumorales de cuello uterino sea un mecanismo de protección, ya que se ha observado que el ATP extracelular en si mismo induce la activación de AMPK y un aumento de p53 con efectos citotóxicos para las células tumorales (92). El mecanismo molecular por el cual la infección por el VPH-AR este regulando la sobreexpresión de CD39 y CD73 permanece incierto, no obstante diversos estudios concuerdan con la alta expresión y actividad enzimática de CD39 y CD73 en líneas celulares de CaCU y muestras de tejido de pacientes con diferentes etapas de la enfermedad (93, 94). Sumado a ello, en tejidos de las diferentes etapas de la historia natural del CaCU se ha identificado un incremento en la expresión de CD39 y CD73 conforme progresa la enfermedad (Manuscrito en preparación). Mas aún, se ha observado alta expresión de CD39 y CD73 sobre las células tumorales y células mesenquimales provenientes de tejido con CaCU causando acumulación de adenosina en el microambiente tumoral capaz de suprimir fuertemente la función de células T citotóxicas (91, 95).

Otra forma en que la ectoenzima CD73 está participando en la progresión del CaCU es a través de circuitos de retroalimentación para la evasión inmune, de hecho CD73 es capaz de activar la producción de interleucina-10 (IL-10) a través de la generación de Ado, la cual al interactuar con el receptor A2B tiene un efecto en la baja regulación de moléculas HLA-I en células de CaCU resultando en la evasión del reconocimiento inmunológico mediado por células T citotóxicas (96). Los efectos inmunosupresores de la producción de adenosina por parte de CD73 se ven aumentados al trabajar en sinergia junto con otras citocinas anti-inflamatorias como el factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) que al mismo tiempo TGF- $\beta$  puede inducir la expresión de CD73 en células tumorales de CaCU (97). Toda la evidencia conduce a que la infección persistente del VPH-AR promueve la expresión de CD39 y CD73 incluso desde lesiones precursoras como NIC-I, además de que citocinas como el TGF- $\beta$  pueden estar ayudando al estado inmunosupresor y la propia expresión de CD39 y CD73 permitiendo la progresión del tumor (49). Sumado a esto, se ha observado que líneas celulares de CaCU son capaces de secretar CD73 de forma soluble al espacio extracelular dependiendo de las citocinas asociadas como el factor de crecimiento epidermal (EGF), IL-10 y TGF- $\beta$  (98).

#### **4.- CD39 y CD73 solubles**

Se ha reportado la forma soluble de CD39 circulando constitutivamente en el torrente sanguíneo con actividad catalítica, pero no ha sido verificada la naturaleza de esta forma soluble (99). Se sabe que CD39 puede estar incorporada en micropartículas de plasma humano y de ratón, donde puede desempeñar un papel en el intercambio de señales reguladoras entre leucocitos y células vasculares, asimismo, también se ha reportado que CD39 puede estar en exosomas liberados por diversos tipos de células cancerosas (100, 101). Es un hecho que la presencia y actividad catalítica de CD39 en plasma sanguíneo complementa la actividad nucleotidasa de la CD39 de la superficie celular, de hecho a nivel fisiológico las isoformas NTPDasas 2, 3

y 8 están presentes en nivel significativo en micropartículas circulantes y contribuyen a la actividad ectonucleotidasa en el plasma sanguíneo (102). Respecto a la forma soluble de CD73 se ha descrito que puede ser encontrada en suero y líquido sinovial. Incluso se ha estipulado que la forma soluble de CD73 en suero derive de la membrana plasmática de los hepatocitos, sin embargo la naturaleza exacta permanece indefinida (103, 104). En principio la forma soluble de CD73 podrían difundirse entre células y conferir actividad enzimática a los sitios distantes de la expresión de CD73.

Independientemente de la fuente de las ectoenzimas CD39 y CD73 solubles es evidente que existen en el torrente sanguíneo y son reguladores importantes de las concentraciones de nucleótidos de adenina vasoactivos, además de que podrían estar regulando respuestas inflamatorias y trombogénesis (105, 106). Poco se sabe sobre el mecanismo por el cual CD39 es secretado de forma soluble, sin embargo, se conoce más sobre la forma en que CD73 puede ser liberadas de forma soluble. El desprendimiento de CD73 puede ocurrir a través de la hidrólisis del anclaje de GPI por fosfolipasas endógenas como fosfolipasa C (FLC) fosfolipasa D (PLD) que rompen el ancla GPI en diferentes sitios (107). También puede ser encontrada como una variante soluble de la proteína de la forma anclada a GPI y aún con una parte GPI (89, 108). Además de las fosfolipasas endógenas, se ha observado que la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) podría generar una forma soluble de CD73, sin embargo esta forma soluble podría ser inactiva (109). Lo que conduce a la interrogante sobre ¿cuál es la diferencia entre las formas solubles de CD73 encontradas?. Esta pregunta resulta muy interesante ya que CD73 es un claro ejemplo de una molécula con variantes estructurales y modificaciones postraduccionales que le confieren distintas funciones biológicas, incluso su cinética enzimática se ve afectada por la presencia del ancla GPI ya que puede cambiar la conformación de la proteína (110).

Se ha reconocido que estas formas solubles podrían presentar ventajas inmunosupresoras: primero porque aumenta el rango de distancia de actividad enzimática y; segundo, la célula donante se podría estar protegiendo de la Ado pericelular (110). Recientemente se ha establecido que las formas solubles de CD39 y CD73 pueden aumentar ante alguna enfermedad inflamatoria, por ejemplo, los niveles de Ado aumentan significativamente en el microambiente tumoral jugando un papel importante como una molécula inmunosupresora y se sabe que la acción combinada de CD39 y CD73 son la principal fuente de la mayor parte de la Ado producida por el microambiente tumoral, así mismo, se ha descrito que las células tumorales pueden secretar las formas solubles de CD39 y CD73, las cuales pueden estar asociadas a exosomas como estrategia para mantener altas cantidades de Ado, además de que pueden estar viajando a través del torrente sanguíneo con un efecto inhibitorio tanto en la parte efectora como proliferativa de células de la respuesta inmune como linfocitos T (101, 111).

#### **4.1 Papel clínico de CD39 y CD73 soluble**

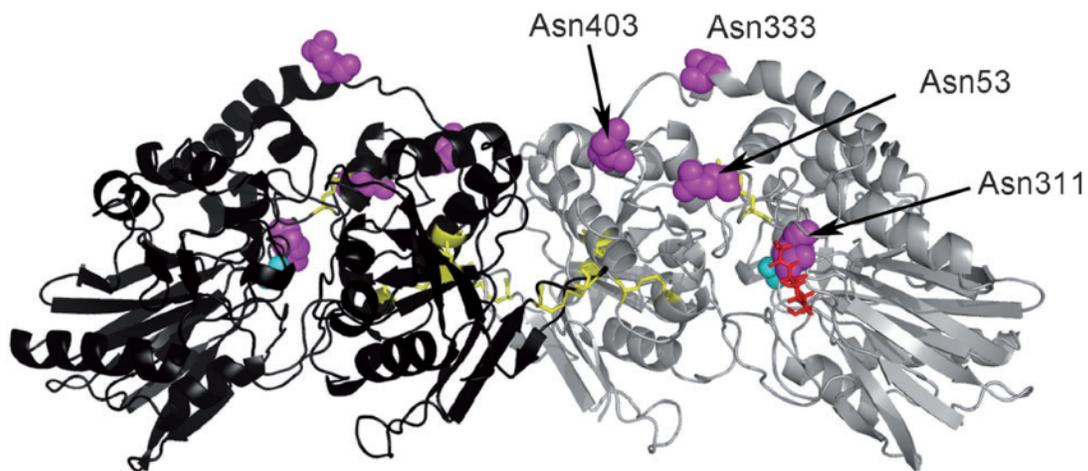
La enzimología ha adquirido un lugar destacado en la patología humana, y las investigaciones con enzimas séricas se han convertido en un requisito previo para diversas enfermedades, incluido el cáncer. La forma soluble de CD39 y CD73 que existe en el plasma sanguíneo en individuos normales se ha observado que puede aumentar ante alguna enfermedad inflamatoria (112, 113).

Hoy en día se ha propuesto que la actividad de la forma soluble de CD73 al ingreso hospitalario tiene valor pronóstico para predecir el desarrollo de la pancreatitis aguda en donde se observa que la concentración de la forma soluble de CD73 disminuye junto con la gravedad de la enfermedad (114). Asimismo, la forma soluble de CD73 podría ser un mediador interesante tanto en la sepsis como en la lesión renal aguda, en donde se ha observado que en comparación con la población normal, los niveles de CD73 soluble podrían aumentar en pacientes con lesión renal aguda y sepsis, sin embargo estos resultados aún no son útiles para predecir el desarrollo o mortalidad en pacientes con estas patologías (115). En el contexto tumoral se ha observado que los niveles de CD73 soluble medidos en suero están incrementados en pacientes con cáncer de ovario y colorrectal, sugiriendo un papel potencial como blanco terapéutico (116). Por ejemplo se ha reconocido que CD73 soluble podría utilizarse como un biomarcador serológico con valor pronóstico en pacientes con melanoma metastásico, debido a que altos niveles de la actividad enzimática de CD73 soluble se asociaron significativamente con una pobre supervivencia (117). En el plasma de paciente con cáncer de próstata se ha observado una hidrólisis elevada de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) demostrando una alta actividad de tanto CD39 como de CD73 soluble, siendo la actividad AMPasa la más destacada (118). En conjunto, estos datos sugieren que la hidrólisis de nucleótidos en el torrente sanguíneo es llevado en gran parte por las ectoenzimas CD39 y CD73 solubles, que de manera coordinada producen Ado en el torrente sanguíneo favoreciendo la progresión tumoral y preparando nichos premetastásicos contribuyendo a un ambiente inmunosupresor.

#### **4.2 Las características moleculares de CD73 soluble entre las que destaca su glicosilación le confieren variantes isoformas bajo condiciones patológicas**

Debido a que CD73 es responsable de la mayor producción de Ado extracelular, varios grupos de trabajo han puesto mayor atención en sus características bioquímicas y estructurales. La ecto-5'-nucleotidasa, o CD73, es codificada por el gen NT5E y su forma madura posee 523 residuos de aminoácidos que pueden sufrir modificaciones postraduccionales. Es una enzima dimérica con masa molecular que va de los 60-80 kDa, expresándose en la cara exterior de la membrana plasmática.

La forma madura de CD73 está glicosilada y unida a una membrana plasmática por un ancla C-terminal de glicosilfosfatidilinositol (GPI) lo que le confiere variedad de propiedades funcionales como señalización, agrupación en balsas lipídicas y polaridad. El análisis de ADNc de la estructura primaria de CD73 revela 4 sitios potenciales de glicosilación que pueden tener mezclas complejas de glicanos (Figura 7). La glicosilación de CD73 es muy importante y puede cambiar en procesos patológicos, por ejemplo, se han encontrado 13 isoformas de CD73 donde las diferencias pueden estar relacionadas con diferentes contenidos en ácido siálico, también las lectinas se unen a CD73 e inhiben su actividad en varios grados dependiendo del tipo celular (118). Se sabe que existe heterogeneidad de CD73 de una célula a otra de la misma especie lo que se puede explicar con la presencia de varios azúcares ya que análisis en la estructura primaria de la cadena de carbohidratos clarifican el grado de heterogeneidad en la glicosilación de CD73. Además está reportado que el estado de glicosilación es la causa más probable de la discrepancia en el peso molecular de CD73 (118-119). Por otra parte, se ha reportado la estructura de CD73 soluble por cristalografía en donde se revela que también contiene cuatro sitios potenciales de glicosilación (Asn53, Asn311, Asn333 y Asn403) en donde la unión de diferentes lectinas varía significativamente. También se sugiere que puede tener altos residuos de manosa, además de una estructura central fucosilada con grupos de glucosamina y ácido siálico (Figura 7) (120).



**Figura 7.-** Representación de la estructura tridimensional del dímero de CD73 soluble. Se muestran dos subunidades en negro y gris unidos por puentes disulfuro en amarillo, también se observan 4 sitios potenciales de glicosilación (Asn) en morado. Estos sitios potenciales de glicosilación son muy importantes, ya que le confieren mayor heterogeneidad a la molécula, además de que está reportado que el estado de glicosilación es la causa más probable de la discrepancia en el peso molecular de CD73 y que puede cambiar su actividad en algunos procesos patológicos. La molécula de CD73 también cuenta con iones de Zn en azul en su sitio activo, además se observan dos sitios c-terminal de unión a GPI.

Tomado de Heuts. D. Scrutton. N. et al. ChemBioChem. 2012.

Hoy en día existe un creciente interés en conocer las características moleculares de CD73, debido a que puede sufrir cambios en condiciones patológicas. De hecho en adenocarcinoma de colon existen evidencias que indican que la ectonucleotidasa CD73 secretada por las células tumorales es distinta a la secretada por células normales, existiendo una relación entre el aumento de la actividad y los niveles de CD73 con el aumento de la tumorigenicidad y diferenciación de células. Esta diferencia radica en el grado de glicosilación, así mismo, cuando CD73 pierde glicosilación se puede observar una banda de 72 a 59 kDa y una pérdida del 80% de su actividad enzimática (121). En pacientes con colestasis se han encontrado dos formas de CD73 en suero: una forma que parece estar naturalmente en la bilis y el hígado (CD73L) y una forma que parece ser de la mitad del tamaño molecular (CD73S), la cual está incrementada en pacientes con colestasis (122). En la distrofia muscular se ha descrito que el grado de la actividad de la ectoenzima CD73 incrementa con la distrofia muscular, se ha observado que existe una forma activa y una forma inactiva en órganos con distrofia muscular, sumado a esto, encontraron una forma con 72 kDa y otra con 62 kDa gracias a que la de 72 kDa esta mayormente glicosilada, sin embargo, la de 62 kDa muestra menos actividad enzimática. Ambas formas activas e inactivas provienen del mismo RNAm pero se generan por un procesamiento diferente posterior a la traducción (123, 124). En hígado de rata, dos dímeros de la ectonucleotidasa CD73 fueron encontrados, uno con actividad enzimática y otro sin actividad (125). Sumado a lo anterior, existen evidencias genómicas sobre una variante del gen que codifica a CD73 que se genera en cáncer hepatocelular que origina una isoforma de CD73 más corta denominada CD73S con carencia de actividad enzimática por pérdida de glicosilación pero que forma complejos con la CD73 normal y promueve la degradación de ésta a través del proteosoma. Se cree que la función potencial de CD73S puede ser limitar las funciones antiproliferativas y proapoptóticas de la Ado generada por la CD73 normal (126). Sumados estos hallazgos, comprueban el alto dinamismo de CD73 y que pueden existir variaciones dependiendo de las condiciones fisiopatológicas.

## **5.- TGF- $\beta$**

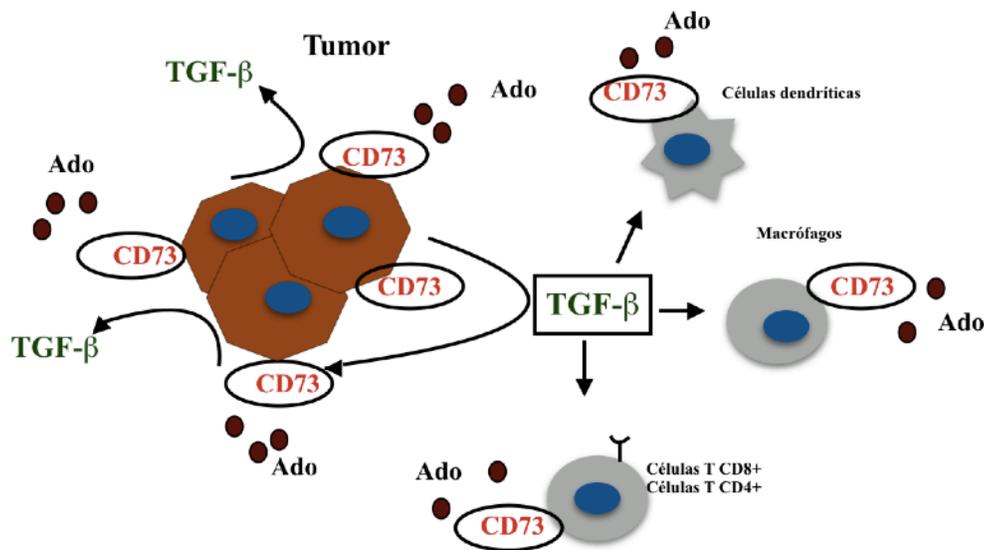
El factor beta de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) es un regulador bifuncional que inhibe o estimula numerosas funciones celulares que incluyen proliferación, apoptosis, diferenciación y migración. El TGF- $\beta$  es sintetizado por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales (127, 128). TGF- $\beta$ , puede actuar como un mitógeno indirecto sobre células mesenquimales o como estimulador de la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Sin embargo, es también un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoideas y mieloides. Los efectos autocrinos y paracrinos de TGF- $\beta$  pueden modificarse mediante la matriz extracelular, las células vecinas y otras citocinas, dependiendo del contexto fisiopatológico (129).

Por ejemplo, resulta interesante que su efecto inhibitor *in vitro* esté ausente en muchas líneas celulares tumorales como carcinoma epidermoide, células de cáncer de mama y carcinoma de pulmón, donde están alterados los mecanismos de regulación celular inducidos por el TGF- $\beta$  (130-132). Dentro del microambiente tumoral se ha observado que TGF- $\beta$  en las primeras etapas del cáncer exhibe efectos supresores de tumores al inhibir la progresión del ciclo celular y promover la apoptosis. Sin embargo, en las últimas etapas, el TGF- $\beta$  ejerce efectos promotores del tumor, aumentando la invasividad del tumor y la metástasis. Además, la vía de señalización de TGF- $\beta$  se comunica con otras vías de señalización de forma sinérgica o antagonista y regula las funciones celulares, dado el papel fundamental del TGF- $\beta$  en la progresión del tumor, esta vía es un objetivo atractivo para la terapia del cáncer (133, 134). Dentro del contexto inmune, TGF- $\beta$  también desempeña un papel importante. Actúa como una potente citocina inmunosupresora tanto en la diferenciación como en la proliferación celular. Controla la inmunidad adaptativa promoviendo directamente la expansión de las linfocitos T reguladoras, por ejemplo, en combinación con interleucina-6 (IL-6) es esencial para la producción de linfocitos T cooperadores que expresan IL-17 (TH17) un tipo de linfocitos proinflamatorios encargados de eliminar patógenos (135). Pero también TGF- $\beta$  actúa inhibiendo la generación y función de los linfocitos T efectoras y las células dendríticas presentadoras de antígenos. El TGF- $\beta$  controla de manera similar el sistema inmunológico innato inhibiendo las células asesinas naturales (NK) y regulando el comportamiento complejo de los macrófagos y neutrófilos, formando así una red de entradas reguladoras inmunitarias negativas (136).

## 5.1 TGF- $\beta$ y la vía adenosinérgica

El TGF- $\beta$  afecta muchos tipos de células dentro del sistema inmunológico y desempeña un papel crucial en la homeostasis inmunitaria. De igual forma, los nucleótidos extracelulares como el ATP y sus derivados regulan algunas respuestas inmunes. De hecho, el TGF- $\beta$  junto con los nucleótidos extracelulares basados en Ado trabajan en sinergia potenciando respuestas inmunes, es por eso que existe una íntima relación entre el TGF- $\beta$  y las ectoenzimas CD39 y CD73 responsables de la mayor concentración de Ado extracelular (137, 138). Existen suficientes evidencias que indican que tanto TGF- $\beta$  como las ectoenzimas CD39 y CD73 se están regulando mutuamente. Por ejemplo, se ha demostrado en células HK-2 (túbulo proximal de riñón humano) que la adición de TGF- $\beta$  da como resultado una activación completa del gen NT5E que codifica CD73, al parecer la vía genética que lleva a la activación del gen NT5E por el TGF- $\beta$  es conducido por la fosforilación de Smad 2/ 3, resultando en el aumento en los niveles y actividad AMPasa de CD73 por la señalización del TGF- $\beta$  (139). CD73 también es regulado positivamente por TGF- $\beta$  en linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, células dendríticas y macrófagos, lo que proporciona un mecanismo de amplificación para la generación de Ado en microambientes tisulares (140).

Bajo contextos tumorales también se ha observado que TGF- $\beta$  y la Ado generada por CD73 actúan de forma sinérgica. De hecho el anticuerpo neutralizante anti-CD73 mejora la respuesta inmune mediada por células T efectoras antitumorales. Sin embargo, el medio tumoral rico en TGF- $\beta$  mantiene la expresión de CD73 principalmente en células T CD8+ en varios modelos tumorales (141). De igual forma, la señalización de TGF- $\beta$  media la maduración de células supresoras derivadas de mieloides con altos niveles de expresión de CD39 y CD73 en la superficie celular y capacidad para generar Ado, contribuyendo así a los efectos inmunosupresores, proangiogénicos y promotores de tumores (142). Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que en pacientes con neoplasias cervicales de bajo grado e infección persistente por VPH-AR, la mayor expresión de CD73 en las células cervicales se asoció con mayores niveles plasmáticos de TGF- $\beta$  en relación a las de donadoras sanas (49). Asimismo, reportamos que existe un bucle de retroalimentación en células de CaCU que favorece la actividad inmunosupresora a través de la producción de TGF- $\beta$  y Ado, así como la actividad autocrina de TGF- $\beta$  y la expresión de CD73 (143). Sumado a esto, también existe evidencia de que la participación de células mesenquimales en el microambiente tumoral aumenta la expresión de CD73 en células tumorales de CaCU y su capacidad de producir Ado además de correlacionarse positivamente con un aumento de la expresión de TGF- $\beta$  (144). Todos estos hallazgos dan evidencia de la íntima relación de la vía adenosinérgica con el TGF- $\beta$  para inducir ambientes inmunosupresores y favorecer un microambiente tumoral (Figura 8).



**Figura 8.** TGF- $\beta$  y la vía adenosinérgica mantienen una retroalimentación positiva en el microambiente tumoral. Bajo el microambiente tumoral se observa que TGF- $\beta$  favorece la alta expresión CD73 sobre células tumorales y algunas células de la respuesta inmune como macrófagos, células dendríticas, células T CD8+ y células T CD4 +. Además de potenciar la actividad AMPasa produciendo altas concentraciones de adenosina. Se observa que CD73 también induce una mayor producción de TGF- $\beta$  por parte de las células tumorales, manteniendo una regulación autocrina de TGF- $\beta$  y la expresión de CD73 con efectos inmunosupresores que mantienen la progresión del tumor.

## **Justificación**

Hasta el momento no hay reportes de la concentración y actividad catalítica de CD39 y CD73 en el plasma de pacientes en distintas etapas de la historia natural del CaCU. Por esto y en base a los antecedentes anteriores, decidimos examinar cómo se encuentran los contenidos de CD39 y CD73 y la actividad funcional de estas enzimas en plasmas de donadoras sin infección por VPH y en pacientes con diferentes etapas de desarrollo de CaCU (LIEBG, LIEAG y CaCU). Además, decidimos averiguar si existe alguna correlación de los contenidos de CD39 y CD73 y las concentraciones de TGF- $\beta$  plasmáticas en los plasmas de estos pacientes y si existe la presencia de alguna isoforma de CD73 con diferente patrón de glicosilación en los plasmas de pacientes con etapas avanzadas de CaCU. Lo cuál podría ser importante para considerar a estas ectonucleotidasas plasmáticas como biomarcadores predictivos en la progresión del CaCU.

## Hipótesis

En estudios recientes hemos encontrado que la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 incrementa en tejidos tumorales de pacientes con CaCU en relación con el grado de avance de la enfermedad, también se ha reportado que los niveles de TGF- $\beta$  incrementan con la gravedad de las lesiones cervicales. Por otro lado, tenemos evidencia que células tumorales de CaCU liberan cantidades importantes de estas ectonucleotidasas cuando son cultivadas *in vitro*. Por tanto, se espera que la actividad adenosinérgica de plasmas de pacientes con CaCU incremente conforme el grado de progresión de la enfermedad y ésta se relacione con los contenidos de CD39, CD73 y de TGF- $\beta$ .

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Analizar el contenido y la actividad enzimática de CD39 y CD73 en plasmas de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU y su correlación con los contenidos de TGF- $\beta$ .

### **Objetivos Particulares**

- 1.- Analizar el contenido de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en plasmas de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU.
- 2.- Determinar la actividad adenosinérgica de plasmas sanguíneos de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU utilizando nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP).
- 3.- Determinar la presencia de CD73 altamente glicosilada en plasmas sanguíneos de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU.
- 4.- Analizar los contenidos de TGF- $\beta$  en plasmas sanguíneos de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU.
- 5.- Determinar si existe correlación entre los contenidos de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 con el contenido plasmático de TGF- $\beta$  de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU.

## Metodología

### Material biológico

Las muestras biológicas fueron obtenidas de mujeres que asistieron a programas de detección temprana en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y al servicio de ginecología del Hospital de Oncología, CMN SXXI del IMSS, Ciudad de México, México, entre abril de 2016 y mayo de 2018, después de obtener el consentimiento informado avalado por el Comité Local de Bioética. Las mujeres sin lesiones cervicales fueron diagnosticadas por citología convencional (tinción de Papanicolaou) y por colposcopia. En los casos de lesiones precancerosas o cáncer cervical, el diagnóstico se confirmó por histopatología.

Las citologías y las biopsias fueron analizadas por los patólogos de cada clínica y clasificadas de acuerdo al Sistema Bethesda 2001 (145) como: Negativo para Lesión Intraepitelial o Malignidad (NLIM); Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado I, II y III (NIC-I, NIC-II y NIC-III); y Cáncer Cervical Invasivo (CaCU). Para el análisis de los datos, las lesiones se agruparon de acuerdo con la clasificación de la lesión intraepitelial escamosa (LIE) como LIE de bajo grado (LIEBG, correspondiente a la clasificación histológica de NIC-I), y LIE de alto grado (LIEAG, correspondiente a la clasificación histológica de NIC-II y NIC-III). Las muestras diagnosticadas como CaCU formaron el último grupo.

Las muestras cervicales de mujeres diagnosticadas con NLIM se recolectaron durante los exámenes ginecológicos con un citocepillo (Cytobrush®, STERYLMEDICAL Co., Yangon, Myanmar) y luego se colocaron en medio de transporte (Preserv-Solución de Cyt; Hologic, Bedford, MA) para almacenarse a 4°C hasta la extracción del ADN. Posteriormente fueron analizadas por PCR convencional de una sola ronda para descartar la presencia de HPV, utilizando los cebadores MY09 / MY11 (146), las mujeres que fueron consistentemente negativas para las pruebas clínicas y moleculares se consideraron como donadoras normales (DN). Como control positivo se utilizó ADN de la línea celular HeLa (HPV-18+), como se reportó previamente (147).

Las muestras cervicales de mujeres diagnosticadas como LIE o CaCU fueron sometidas para análisis molecular por PCR, utilizando el LINEAR ARRAY® HPV kit (Roche Diagnostics, CA, EE. UU.), para el genotipado de entre 37 tipos principales de VPH que infectan la región anogenital (VPH-6, -11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83 y 84). En cada muestra, el gen de beta globina humana se amplificó como control interno. Después de la reacción de hibridación, las tiras se leyeron visualmente utilizando una guía de referencia. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de sangre periférica utilizadas en este estudio fueron obtenidas de 15 DN; 18 con LIEBG; 12 con LIEAG; y 19 con CaCU (Tablas 1 y 2), las cuales fueron colectadas en tubos vacutainer con anticoagulante ACD (Becton Dickinson, USA) y se centrifugaron a  $385 \times g$  durante 10 minutos para obtener los plasmas. Posteriormente, los plasmas sanguíneos se centrifugaron a  $2422 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  para separar las plaquetas, como se reportó previamente (95). Los plasmas libres de plaquetas (PLP) fueron utilizados para la detección y cuantificación de CD39 y CD73 soluble.

### **Detección y cuantificación de CD39 y CD73 soluble en PLP**

La detección de CD39 y CD73 en los PLP se realizó mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Los datos fueron interpolados en curvas tipo utilizando diferentes concentraciones (1-35 ng/ml) de enzimas recombinantes humanas (rhCD39 y rhCD73, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluidas en PBS. Los PLP fueron diluidos con PBS, la detección de CD39 en los PLP se hizo a una dilución de 1: 40 000, y la de CD73 a una dilución de 1: 25 000. Muestras de 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes diluciones fueron colocadas por triplicado en placas para ELISA/RIA de 96 pozos de fondo plano (Corning Inc., USA). Las placas se incubaron durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y luego durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . A continuación, las placas se lavaron con una solución de lavado (PBS 0.1 % Tween-20) y luego se incubaron con una solución de bloqueo (2% BSA w/v en PBS 0.1% Tween-20) durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ . Una vez que se lavaron las placas, los anticuerpos anti-CD39 o anti-CD73 (Novus Biologicals, USA) fueron adicionados a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo e incubados 2 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las placas fueron lavadas seis veces e incubadas con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón o anti-conejo IgG unidos a fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una dilución 1:500 en solución de bloqueo e incubados 2 h a  $37^\circ\text{C}$  y después de 8 lavados se adicionó el sustrato para la fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluido en dietanolamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) al 10% (pH 9,8). Finalmente la lectura se realizó a una longitud de onda de 405 nm utilizando un lector de placas para ELISA.

### **Actividad hidrolítica de CD39 y CD73 soluble**

Para determinar la actividad hidrolítica de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 contenidas en los PLP, 5 $\mu\text{L}$  de cada PLP fueron incubadas en presencia de difosfato de adenosina (ADP) o monofosfato de adenosina (AMP) a una concentración final de 5mM. Después de 72 h de incubación se evaluó la producción de Ado. Para inhibir la actividad enzimática de CD39 y CD73 se adicionaron los inhibidores específicos polioxotungstato de sodio (POM-1, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) y adenosina 5'-( $\alpha$ ,  $\beta$ -metileno) difosfato (APCP, Sigma-Aldrich), respectivamente, a una concentración final de 5mM, como se describió previamente (148). El volumen total de cada reacción fue de 100  $\mu\text{L}$ .

La cantidad de Ado producida por cada muestra incubada con ATP o AMP se evaluó a través de cromatografía en capa fina y posteriormente para cuantificar la Ado generada se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento, aplicando 25  $\mu$ L de cada reacción a un cromatógrafo (UPLC Acquity, Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.), utilizando una fase móvil compuesta de acetonitrilo al 0,5%, metanol al 5% y acetato de sodio al 94,5% (0.25 M y pH 6.3). Antes de la lectura, las muestras se filtraron en filtros Amicon de 3000 Daltons (Millipore Corporación, EE. UU.). Se preparó una curva estándar de Ado para evaluar el contenido de Ado en las diferentes muestras usando Empower 3 (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.).

### **Cuantificación de TGF- $\beta$ 1**

Para cuantificar el contenido de TGF- $\beta$ 1 en muestras de PLP, se utilizó el kit de ELISA Quantikine TGF- $\beta$ 1 humano (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

### ***Western Blot***

Para analizar la presencia de CD73, muestras de 3 $\mu$ l de cada PLP o de 20ng de CD73 contenidos en los PLP (con base a la curva tipo de rhCD73) fueron tratadas con solución amortiguadora de Laemmli y analizado por SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran 0.2  $\mu$ m), la cual fue incubada con solución de bloqueo (TBS 0.1% Tween-20 y BSA al 5%) durante 60 min a temperatura ambiente. La membrana se lavó 2 veces con solución de lavado (TBS 0.1% Tween-20) y posteriormente se incubó con anticuerpos anti-CD73 (Novus Biologicals, USA) a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 5 °C. Después de 5 lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (HRP goat anti-Rabbit) a una dilución 1:1500 con solución de bloqueo durante 1 h. Después de 5 lavados la presencia de CD73 en la membrana fue revelada en un ChemiDoc (Life Science Research Bio-Rad, USA) utilizando el sustrato Chemiluminescent Peroxidase (Sigma-Aldrich, USA).

### **Desglicosilación enzimática**

Para desglicosilar a CD73 contenido en las muestras de PFP, fueron incubadas durante 5 min a 37°C en presencia de 1.5  $\mu$ l de una solución desnaturalizante (1M de  $\beta$ -mercaptoetanol y 2% de SDS). Posteriormente se adicionaron las enzimas endoglicanasa-H (Genzyme, Co. USA) y N-glicanasa (Genzyme, Co. USA) a una concentración final de 0.05U/ml y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Posteriormente los productos de la digestión enzimática fueron analizados mediante *Western blot* utilizando anti-CD73 como se describió anteriormente.

### **Tratamiento con Fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol**

Con base a las cuantificaciones obtenidas por ELISA, se colocaron 20 ng de proteína de CD73 de las muestras plasmáticas de las diferentes etapas (DN, LIEBG, LIEAG y CaCU) en tubos eppendorf. Se adicionó a las muestras plasmáticas 40  $\mu$ l de 0.1 M HEPES–NaOH a pH 7.65. También se agregó 10  $\mu$ l de 0.8 % de desoxicolato de sodio y se adicionó la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) (Derivada de *Bacillus cereus*, Invitrogen, USA,) 20  $\mu$ l 1nM en BSA al 0.1%. Se dejó incubando la reacción durante 90 minutos a 37 °C, posteriormente el producto de la reacción se separó del sustrato de PI con 20  $\mu$ l de Triton X-100 y se centrifugaron a 12000 xg durante 1 minuto. Se recuperó la fase superior se mezcló con 20  $\mu$ l de Tris-HCl 50mM. Posteriormente los productos de la digestión enzimática se utilizaron para hacer ensayos de *Western blot*.

### **Análisis estadístico**

Todos los datos numéricos se presentan como el valor medio  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes. Las comparaciones y correlaciones fueron evaluados por análisis estadístico multivariado utilizando GraphPad Prism versión 7 (La Jolla, CA, EE. UU.).

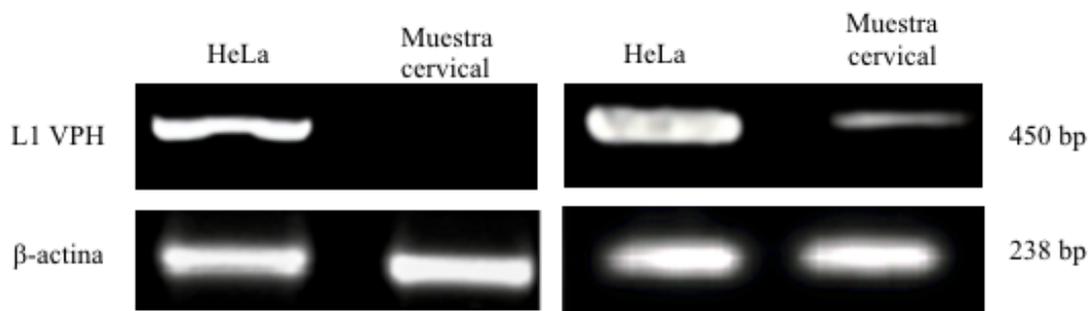
## Resultados

### Características de las mujeres participantes en el estudio

El presente estudio se llevó a cabo con 64 muestras cervicales y de sangre periférica de mujeres que asistieron a programas de detección temprana del cáncer en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No 4 del IMSS, y al servicio de ginecología del Hospital de Oncología, CMN SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Ciudad de México, México. De acuerdo al análisis citológico e histopatológico, 15 muestras correspondieron a mujeres sin VPH (DN) (Tabla 1), 18 con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), 12 con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y 19 con cáncer cervical (CaCU) (Tabla 2). Todas las muestras y datos clínicos de las participantes se tomaron después de obtener el consentimiento informado, de acuerdo los requerimientos de ética y confidencialidad relacionados con la toma de muestras de humanos en las instituciones involucradas. Para descartar la presencia de infección por VPH en las muestras de mujeres NLIM, a partir de las muestras cervicales se obtuvo ADN para realizar el análisis molecular por PCR utilizando oligonucleótidos consenso MY09 y MY11 que amplifican un fragmento conservado de 450 pb del gen que codifica para la proteína L1 de los diferentes genotipos de HPV. Como control positivo se utilizó ADN de la línea celular HeLa (HPV-18+) (Figura 1). Se analizaron 19 muestras cervicales de mujeres NLIM, de las cuales 15 fueron negativas para la infección por HPV, las cuales fueron incluidas en el estudio como DN. La edad promedio de las DN fue de 31.2 (rango de 22-41) años (Tabla 1); el de mujeres con LIEAG de 32.7 (rango 21-43) años, las de LIEAG de 36.6 (rango 27-46) años, y las de CaCU de 47.68 (rango 35-62) años (Tabla 2). El número promedio de parejas sexuales y embarazos en las DN fue de 2.2 (rango de 1-4) y 1 (rango 0-3), respectivamente (Tabla 1). Mientras que en las pacientes con LIEBG fue de 2.44 (rango 1-4) y 1.88 (rango 1-4), respectivamente; en las pacientes con LIEAG de 3.3 (rango 2-5) y 3.5 (rango 2-5), respectivamente; y en las pacientes con CaCU de 2.68 (rango 2-4) y 4.2 (rango 3-6), respectivamente (Tabla 2). Todas las muestras cervicales de pacientes con LIE fueron positivas a HR-HPV. Los genotipos más frecuentes fueron: HPV-16 (22/49, 44%), HPV-45 y HPV-52 (7/49, 14%), HPV-18 y HPV-33 (6/49, 12%) y HPV-53(3/49, 6%) (Tabla 2). Asimismo, 25/49 pacientes presentaron co-infección con 2 o más genotipos de HPV, de los cuales: 8/18 (44.4%) fueron en pacientes con LIEBG; 7/12 (58%) en pacientes con LIEAG ; y 10/19 (52.6%) en pacientes con CaCU. Es importante mencionar que las pacientes con LIEAG y CaCU también exhibieron significativamente un mayor número de parejas sexuales (promedios 3.3 y 3.5) y embarazos (promedios 3.5 y 4.2), respectivamente, que los de DN, cuyos promedios fueron 2.26 y 1.13, respectivamente, (Tabla 3).

**Tabla 1:** Datos clínicos de donadoras normales

Número de muestra cervical	Tipos de VPH	Edad (años)	Número de parejas sexuales	Número de partos
1	-	26	2	2
2	-	31	4	0
3	-	27	2	1
4	-	21	1	1
5	-	37	2	2
6	-	28	3	0
7	-	32	2	1
8	-	26	1	0
9	-	41	3	3
10	-	25	4	0
11	-	31	2	0
12	-	22	1	0
13	-	29	2	0
14	-	41	3	2
15	-	39	2	3
Promedios	-	31.2.	2.26	1



**Figura 1.** Detección del gen L1 de HPV en muestras cervicales de mujeres NLIM. La expresión del gene L1 en las muestras cervicales fue realizado por PCR como se describe en la Sección 2. Se muestra la ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de L1 en muestras de mujeres NLIM. Como control positivo se utilizó ADN de la línea celular HeLa (HPV-18+). La expresión del gen de la β-actina en todas las muestras se utilizó como control interno. El tamaño del fragmento (pb) de cada gen está indicado.

**Tabla 2.** Datos clínicos de las pacientes con diferentes etapas de CaCU

Diagnostico	Número de muestra cervical	Tipo de VPH	Edad (años)	Número de parejas sexuales	Número de embarazos
LIEBG	1	61, 58	29	3	3
LIEBG	2	53	33	2	1
LIEBG	3	16,52,33,35,58	27	2	4
LIEBG	4	71,33	40	3	2
LIEBG	5	54	37	3	1
LIEBG	6	67	32	1	1
LIEBG	7	16	36	3	3
LIEBG	8	33	27	2	1
LIEBG	9	66	42	1	1
LIEBG	10	73,83	39	2	2
LIEBG	11	84	25	1	1
LIEBG	12	89	28	3	3
LIEBG	13	59, 66, 73	45	4	2
LIEBG	14	59	34	3	1
LIEBG	15	40,52,53,66,70	31	1	2
LIEBG	16	53	33	2	1
LIEBG	17	83	39	2	2
LIEBG	18	16	43	3	2
Promedios	-	-	32.7	2.44	1.88
LIEAG	1	16	32	3	4
LIEAG	2	52,51	31	2	3
LIEAG	3	45,33	42	3	2
LIEAG	4	16	38	4	3
LIEAG	5	56,66	40	1	4
LIEAG	6	16, 39	32	3	3
LIEAG	7	18	36	2	2
LIEAG	8	16	29	3	1
LIEAG	9	16,45	35	4	2
LIEAG	10	18,52,45,33	26	3	3
LIEAG	11	18,53	39	2	1
LIEAG	12	16	44	2	2
Promedios	-	-	36.5	3.3	3.5
CaCU	1	45,84	35	2	4
CaCU	2	33	38	3	3
CaCU	3	16	42	4	5
CaCU	4	16	52	2	3
CaCU	5	16,52	3	2	2
CaCU	6	31	48	2	2
CaCU	7	69,71,81,84	50	4	4
CaCU	8	39,68	37	3	3
CaCU	9	16	41	2	2
CaCU	10	16,18	55	3	5
CaCU	11	16	46	2	3
CaCU	12	45	39	3	2
CaCU	13	45,72	54	4	2
CaCU	14	16,62	29	3	1
CaCU	15	16, 18, 52	38	2	3
CaCU	16	16	42	3	2
CaCU	17	18, 45	48	1	3
CaCU	18	16	43	5	2
CaCU	19	16, 52	36	3	3
Promedios	-	-	47.68	2.68	4.2

**Tabla 3.** Relación entre datos clínicos de donadoras normales y pacientes con diferentes anomalías cervicales escamosas

Datos clínicos	DN	Pacientes			
		LIEBG	LIEAG	CaCU	P values
Edad (años)	31.26±5.86	32.77±6.94	36.5±6.11 <sup>a</sup>	47.68±7.08 <sup>b, c, d</sup>	a<0.03 vs S/VPH b<0.0001 vs S/VPH c<0.0001 vs LIEBG d<0.0001 vs LIEAG
Número de parejas sexuales	2.26±0.96	2.44±0.7	3.3±0.88 <sup>e, f</sup>	2.6±0.75 <sup>g</sup>	e<0.006 vs S/VPH f<0.005 vs LIEBG g<0.03 vs LIEAG
Número de embarazos	1.13±0.2	1.88±0.83 <sup>h</sup>	3.5±1 <sup>i, j</sup>	4.2±1.1 <sup>k, l</sup>	h<0.01 vs S/VPH i<0.0001 vs S/VPH j<0.0001 vs LIEBG k<0.0001 vs S/VPH l<0.001 vs LIEBG

DN: Donadoras normales

LIEBG: Lesión intraepitelial de bajo grado

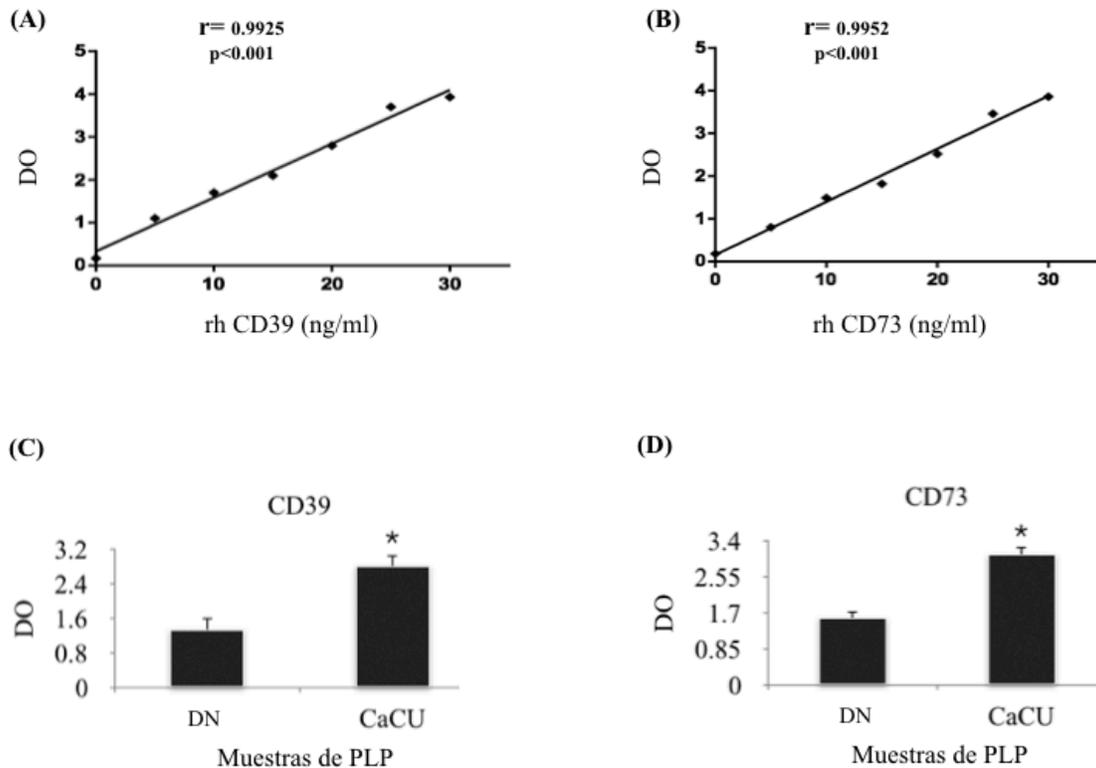
LIEAG: Lesión intraepitelial de alto grado

CaCU: Cáncer cervical -uterino

Los valores P fueron calculados usando la prueba de rango con signo de Wilcoxon y la prueba de t student

### **Análisis del contenido de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en plasmas de donadoras normales y de pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) y CaCU**

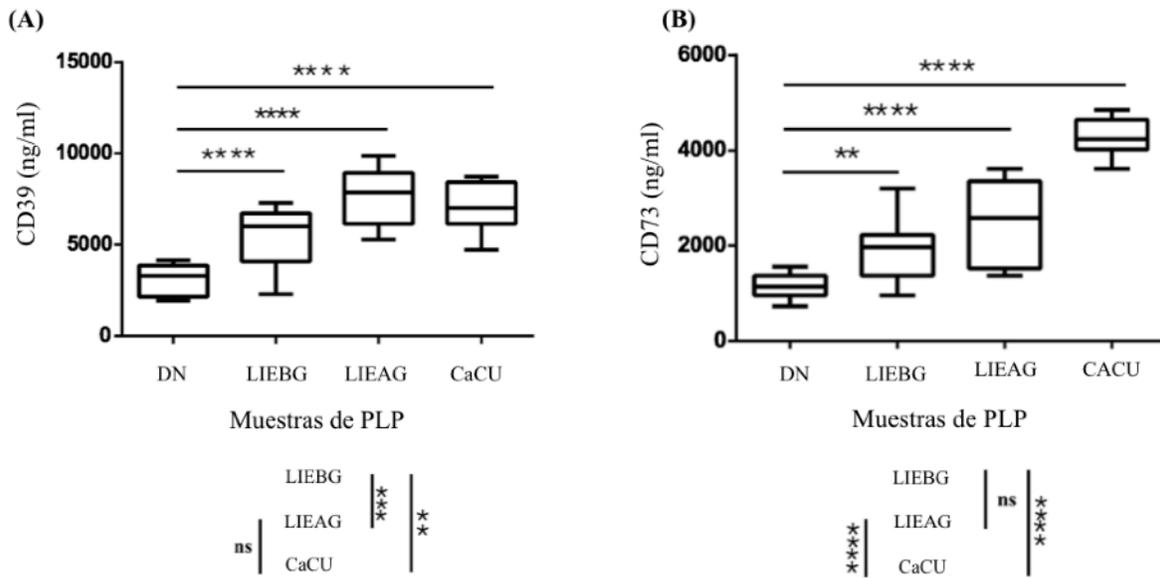
Para determinar el contenido de CD39 y CD73 soluble en los PLP, se establecieron curvas tipo con rhCD39 (Fig. 2A) y rhCD73 (Fig. 2B) utilizando concentraciones de 5-30 ng/mL de cada proteína recombinante. Basándonos en los datos de las curvas de calibración de las proteínas recombinantes de CD39 y CD73, se realizaron ensayos de ELISA con varias diluciones de plasmas sanguíneos de DN y de pacientes con CaCU para interpolar los valores obtenidos. Empleando un grupo pequeño de muestras (n=5) de PLP de DN y CaCU se encontró que a las diluciones de PLP de 1:40000 y 1:25000 se pudieron detectar diferencias significativas en los contenidos de CD39 y CD73, respectivamente, entre las muestras analizadas (Figura 2 C y D).



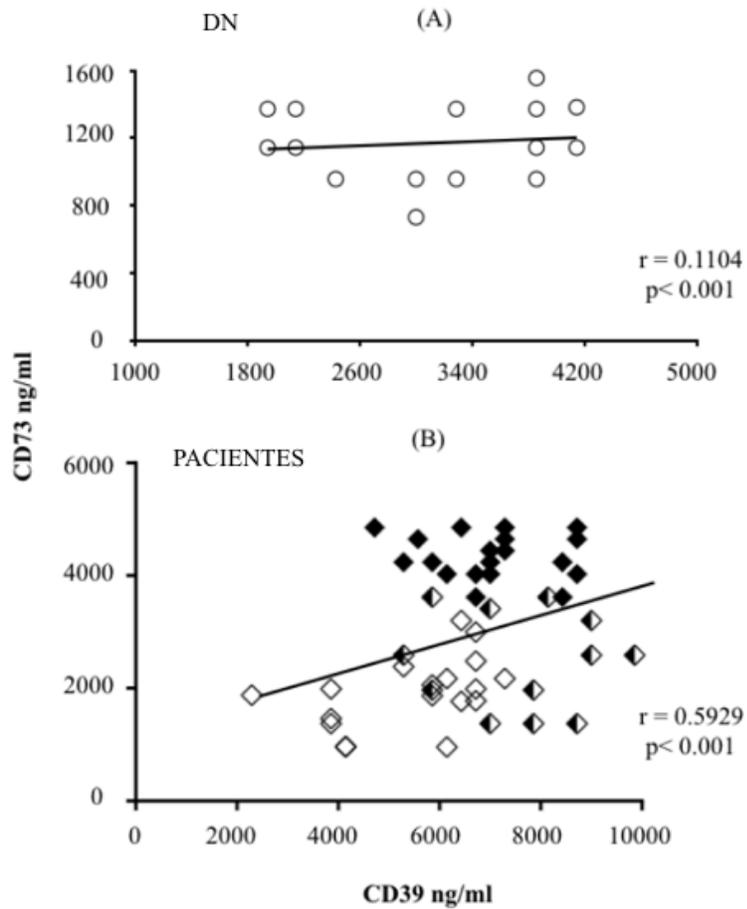
**Figura 2.** Curvas tipo para CD39 y CD73 soluble. Las curvas tipo para CD39 y CD73 soluble, se establecieron mediante la técnica de ELISA utilizando diferentes concentraciones (5-30 ng/mL) de las proteínas recombinantes humanas CD39 (rhCD39) (A) y CD73 (rhCD73) (B), cuya correlación con la absorbancia (DO) fue ( $r=0.9925$ ,  $P<0.001$ ) y ( $r=0.9952$ ,  $P<0.001$ ), respectivamente. La detección de CD39 y CD73 en los PLP de donadoras normales (DN) y pacientes con CaCU (CaCU) se realizó a las diluciones 1:40 000 y 1:25 000, respectivamente (C y D).

Por lo anterior descrito, para llevar a cabo la detección de CD39 y CD73 los PLP de las DN y de mujeres con LIEBG, LIEAG o CaCU se diluyeron con PBS en proporción 1:40 000 y 1:25 000, respectivamente. Las cantidades de CD39 y CD73 soluble en los PLP incrementaron conforme el grado de avance de la enfermedad. Las pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU mostraron cantidades significativamente más altas de CD39 (promedios,  $6459 \pm 1232$  ng/mL,  $8333 \pm 1440$  ng/mL y  $7728 \pm 1198$  ng/mL), respectivamente, que las DN cuyo promedio fue de  $3839 \pm 824$  ng/mL) (Figura 3A). La proporción de CD39 en los PLP de las pacientes con LIEAG y CaCU, quienes mostraron los contenidos más altos de CD39, fue de 2.3 y 2.2 veces mayor, respectivamente, en relación al contenido de CD39 de las DN (Figura 2A). Por otra parte, las pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU, también mostraron cantidades significativamente mayores de CD73 en los PLP (promedios,  $2638 \pm 630$  ng/mL,  $3181 \pm 863$  ng/mL y  $5053 \pm 396$  ng/mL), respectivamente, que el de las DN, quienes mostraron un promedio de  $1880 \pm 228$  ng/mL (Figura 3B).

La proporción de CD73 en los PLP de las pacientes con LIEAG y CaCU, quienes mostraron los contenidos más altos de CD73, fue de 1.7 y 2.68 veces mayor, respectivamente, en relación al contenido de CD73 de las DN (Figura 3B). Por otra parte, a diferencia de las DN, quienes mostraron baja correlación entre los contenidos de CD39 y CD73 en los PLP ( $r=0.1104$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 4A), nosotros encontramos una correlación positiva de los contenidos de estas ectonucleotidasas en los PFP de las pacientes con LSIL, HSIL y CC ( $r=0.5929$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 4B).



**Figura 3.** Contenidos de CD39 y CD73 en las muestras de PLP de DN y pacientes. Para la detección de CD39 y CD73, los PLP de las DN y de las pacientes se diluyeron con PBS en proporción 1:40 000 y 1:25 000, respectivamente. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Se muestran los promedios  $\pm$  SEM de las concentraciones de CD39 (A) y CD73 (B) soluble detectado en los PLP de las DN y de las pacientes. Las diferencias significativas se indican como: \* ( $p<0.05$ ), \*\* ( $p<0.001$ ) y \*\*\* ( $p<0,0001$ ). ns, no significativo.



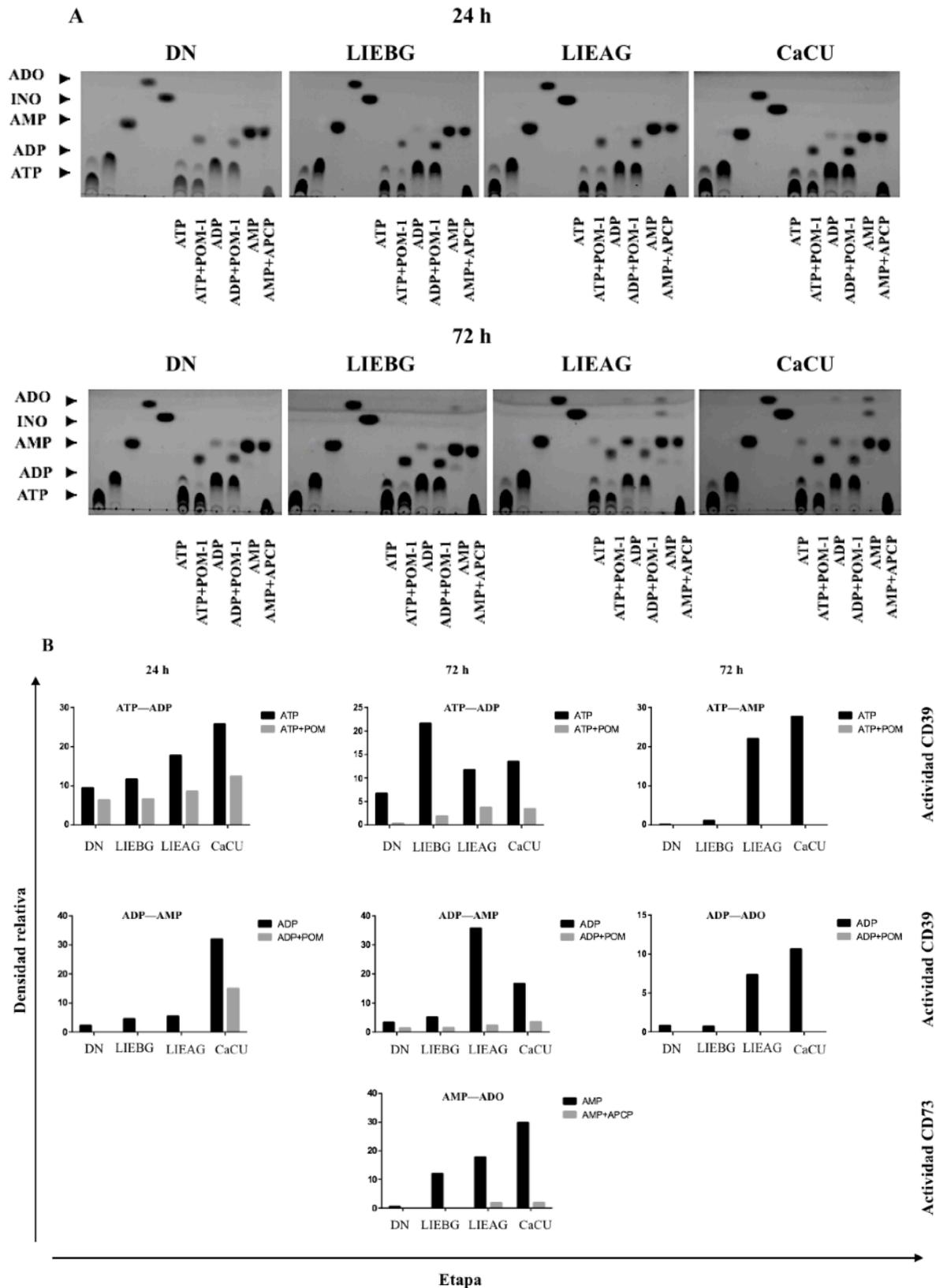
**Figura 4.** Correlación entre el contenido de CD39 y CD73 en PLP de DN y pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU. Se muestra la correlación ( $r$ ) entre los contenidos de CD39 y CD73 para los PLP de DN (A) (círculos abiertos), ( $r = 0.1104$ ,  $P < 0.001$ ); y para las pacientes con LIEBG (diamantes en blanco), LIEAG (diamantes en blanco y negro) y CaCU (diamantes negros) (B), ( $r=0.5929$ ,  $p<0.001$ ).

## **Actividad adenosinérgica en plasmas libres de plaquetas de donadoras normales y pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cérvico-uterino utilizando nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP)**

Con la finalidad de analizar la actividad adenosinérgica de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 detectadas en los PLP de las DN y pacientes con LIEBG, LIEAG y con CaCU, se incubaron alícuotas de 5µl de plasma con 45µl de los nucleótidos ATP o ADP (5mM) para determinar la actividad de CD39 o de AMP (5mM) para determinar la actividad de CD73. Para inhibir específicamente la actividad catalítica de CD39 se adicionó POM-1 (5mM), mientras que APCP (5mM) se utilizó para inhibir la actividad de CD73.

Los productos de cada reacción fueron visualizados en cromatografía en capa fina (Figura 5A). La actividad catalítica de CD39 en las muestras de plasmas sanguíneos de los pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU se pudo detectar a través de la hidrólisis de ATP y generación de ADP y AMP a partir de las primeras 24 h de incubación, principalmente en las muestras de pacientes con LIEAG y CaCU. No obstante, la generación de adenosina a partir de la hidrólisis de ATP se pudo detectar a partir de las 72 h en las muestras plasmáticas de estas pacientes.

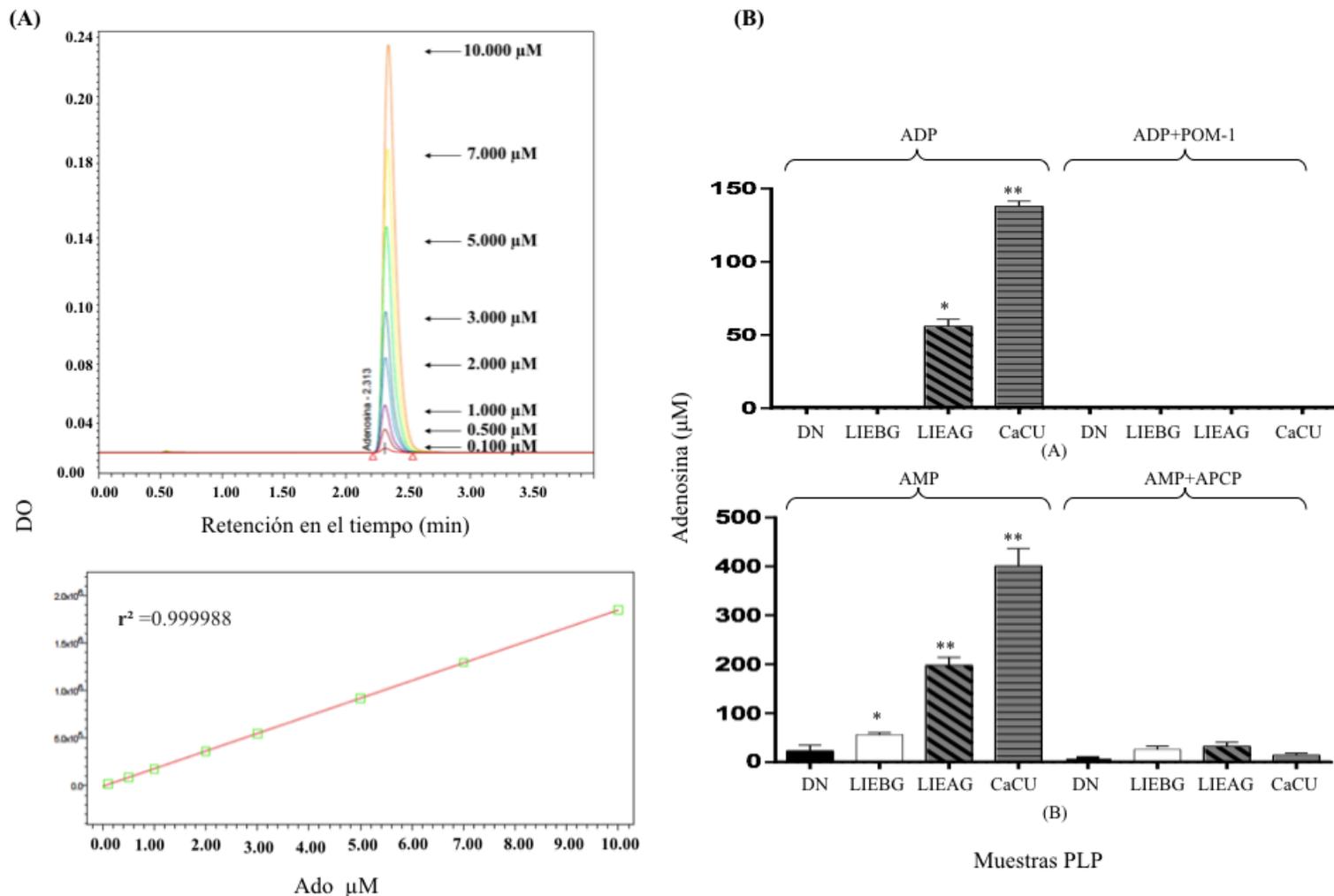
En el caso de los plasmas de las DN la actividad catalítica de CD39 fue detectable después de 72 h de incubación con ADP. En todos los casos, la adición de POM-1 inhibió la generación de ADP y AMP cuando los plasmas fueron incubados en presencia de ATP y ADP, respectivamente. Por otra parte, la actividad catalítica de CD73 presente en las muestras plasmáticas de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU pudo detectarse a partir de las 72 h de incubación en presencia de AMP, mientras que las obtenidas de DN no mostraron actividad detectable. En todos los casos se observó que la adición de APCP inhibió la actividad catalítica de CD73 (figura 5B).



**Figura 5.** Actividad enzimática de CD39 y CD73 en muestras de PLP. La actividad catalítica de CD39 presente en los plasmas de las pacientes se realizó en presencia de 5mM ATP y ADP; y la de CD73 en presencia de 5mM de AMP. La actividad catalítica de CD39 y CD73 fue inhibida mediante la adición de 5mM de POM-1 (inhibidor específico de CD39) o de APCP (inhibidor específico de CD73). La generación de AMP y ADO fue visualizada durante 72 h mediante cromatografía en capa fina. Los nucleótidos (ATP,

ADP, AMP) y el nucleósido adenosina (Ado), a una concentración de 5mM, fueron utilizados como marcadores referentes.

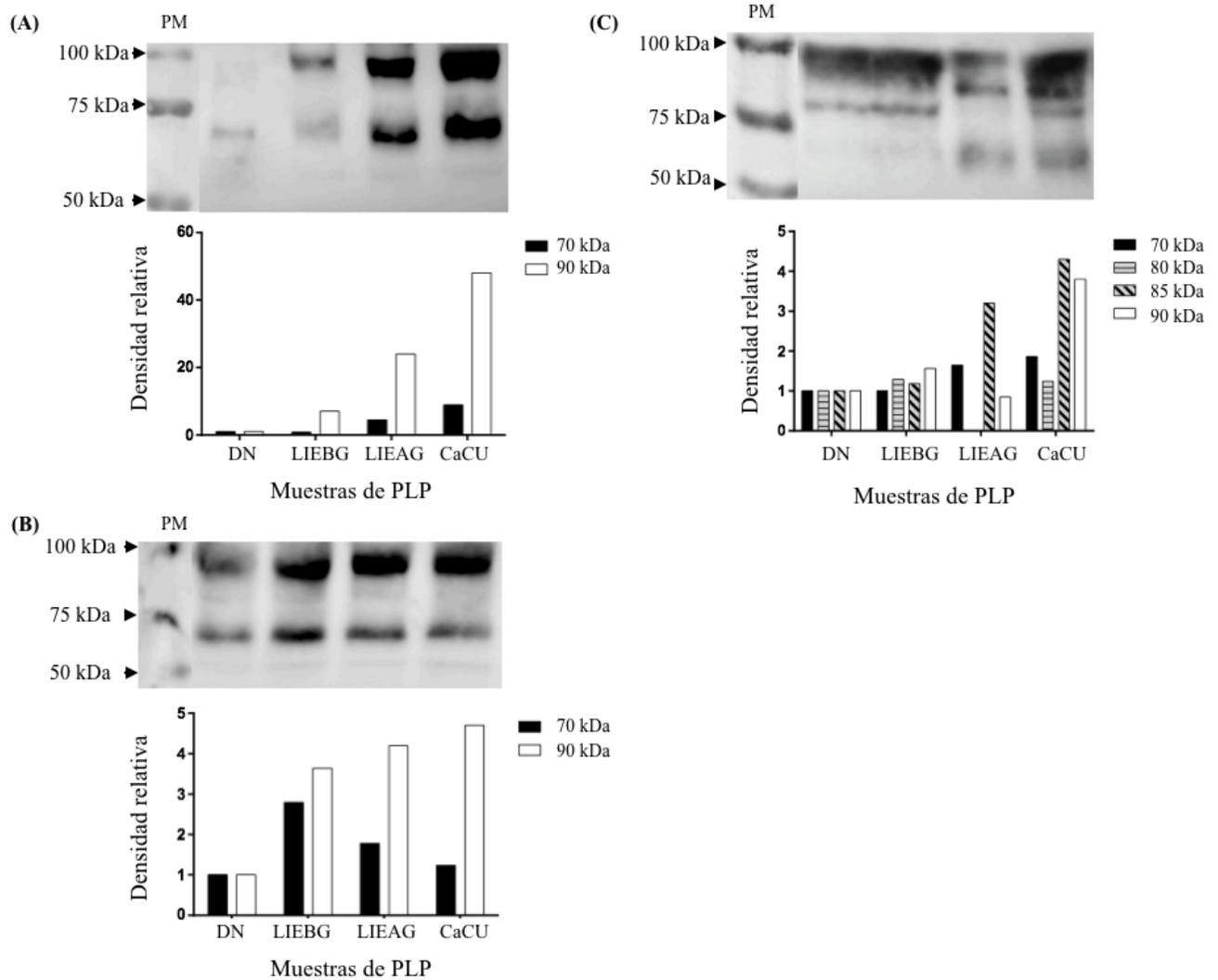
Con la finalidad de cuantificar los contenidos de adenosina generados por la actividad catalítica de las nucleotidasas CD39 y CD73 presentes en las muestras de PLP de DN y pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU, muestras de 5µl de cada PLP fueron incubadas en presencia de 5mM de ADP o AMP (volumen total 50µl) y en presencia o ausencia de POM-1 o APCP, inhibidores específicos de CD39 y CD73, respectivamente. Alícuotas de cada reacción fueron tomadas al inicio y después de 72h de incubación para evaluar la producción de Ado a través de UPLC. Utilizando diferentes concentraciones (0.1µM -10µM) de adenosina sintética como estándares de referencia (Fig 6A), notablemente se observó que los PLP derivados de pacientes con LIEAG y CaCU generaron cantidades significativamente mayores de Ado en relación a los PLP de DN y LIEBG. El promedio de la concentración de Ado producida por los PLP de los DN al incubarse en presencia de ADP y AMP fue de 0 y 12.63±2.3 µM, respectivamente (Figura 6B), y el de las muestras de PLP de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU fue de: 0 y 53.9± 7.88; 52.1±1.3 y 202.9±13.10; y 143.2±7.01 y 401.3±22.7 µM, respectivamente (Figuras 6B). De manera interesante, la adición de 5 mM de POM-I o APCP, disminuyó la capacidad de los PLP para hidrolizar ADP y AMP en más del 90% en todos los casos (Figura 6B).



**Figura 6.** Adenosina generada por CD39 y CD73 en PLP. Alícuotas de 5 $\mu$ l de PLP de DN (barras negras), pacientes con LIEBG (barras blancas), LIEAG (líneas diagonales) y CaCU (líneas horizontales) fueron incubadas en presencia de 5mM de ADP o AMP (volumen total 50 $\mu$ l) y en presencia o ausencia de POM-1 o APCP, inhibidores específicos de CD39 y CD73, respectivamente. A) La adenosina producida por la hidrólisis de los nucleótidos fue cuantificada después de 72h mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC), utilizando concentraciones estándar de Ado sintética (superior). Se muestra una relación lineal representativa entre la concentración de Ado y la densidad óptica (DO) (inferior). B) Se muestra la cantidad de Ado producida durante la incubación de los PLP con ADP (superior) o AMP (inferior) y en presencia o ausencia de POM-1 o APCP, respectivamente. Las diferencias en los contenidos de Ado fueron analizadas por una prueba de ANOVA de dos vías. \*, indica diferencias significativas ( $P < 0.01$ ); \*\*, indica diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ). Los datos representan tres experimentos independientes.

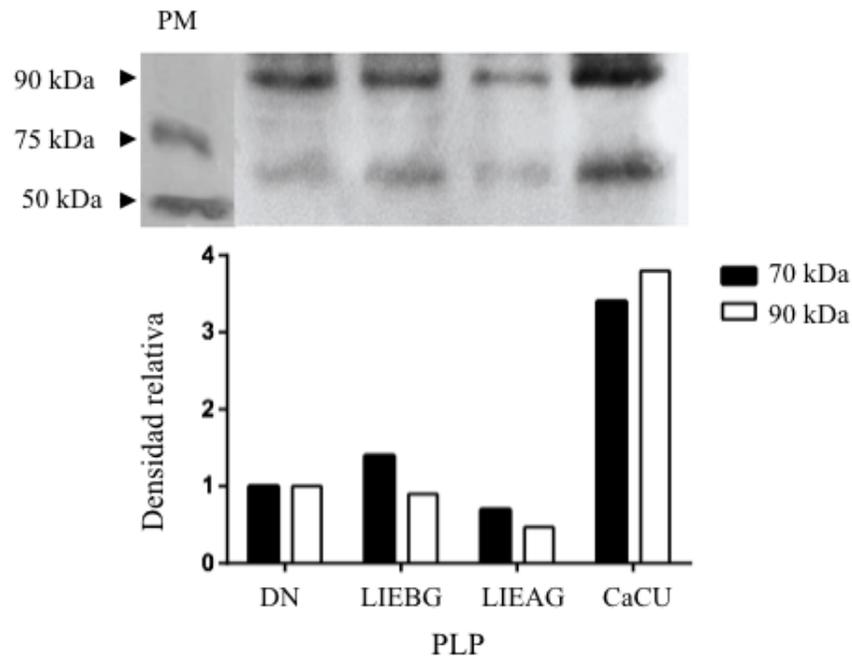
## **Detección de CD73 altamente glicosilada en plasmas libre de plaquetas de donadoras normales y pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cérvico-uterino**

Se ha reportado que la secuencia de CD73 contiene cuatro motivos de N-glicosilación y que cambios en la glicosilación en uno o más de estos sitios puede alterar su actividad AMPasa [33]. Para averiguar si la fuerte actividad hidrolítica de CD73 detectada en los PLP de pacientes con LIEAG y CaCU se relacionaba con el grado de glicosilación, muestras de 3 $\mu$ l de PLP (Figura 7A) o de 20ng de CD73 contenidos en los PLP (Figura 7B) fueron analizadas por *Western blot* empleando anticuerpos anti-CD73. Dos bandas con pesos aproximadamente de 70 kDa y 90 kDa fueron reveladas. De manera interesante, la densidad de la banda de 90 kDa detectada en los PLP incrementó en relación al grado de evolución de la enfermedad (Figuras 7A y 7B). Cuando se analizaron volúmenes iguales de PLP, se encontró que la banda de 70 kDa mostró mayor densidad en los PLP de pacientes con LIEAG y CaCU respecto a las de LIEBG y DN (Figura 7A). Por otra parte, al utilizar la misma cantidad de CD73 (20ng), la densidad de la banda de 70 kDa fue similar en las muestras de PIP, sin embargo, de manera notable se detectó un mayor contenido de las bandas de 90 kDa en las muestras de los pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU en relación a las de DN (Figura 7B). Para averiguar si la banda de 90 kDa correspondía a una isoforma de CD73 altamente glicosilada, muestras de 20ng de CD73 contenido en los PLP fueron sujetas a desglicosilación utilizando las enzimas endoglicosidasa-H y N-glicanasa. La digestión enzimática de las muestras de PLP con estas enzimas, dio por resultado productos de 90, 85, 80 y 70 kDa a través del análisis por *Western blot* utilizando anticuerpos anti-CD73 (Figura 7C). Las muestras de pacientes con CaCU mostraron bandas correspondientes a estos 4 productos. Notoriamente las muestras de pacientes con LIEAG y CaCU presentaron un producto de 85 kDa, el cual no fue detectado en las muestras de pacientes con LIEBG y DN, mientras que un producto de 80 kDa fue detectado en las muestras de LIEBG y DN (Figura 7C). Estos resultados sugieren que la mayor capacidad hidrolítica de CD73 detectada en los PLP de pacientes con LIEAG y CaCU pueda estar relacionada con un mayor contenido de una isoforma de CD73 altamente glicosilada.



**Figura 7.** Detección de CD73 en PLP de DN y pacientes. Muestras de 3 $\mu$ l de PLP (A) o de 20ng de CD73 contenidos en las PLP (B) de DN y de pacientes fueron analizadas por *Western blot* empleando anticuerpos anti-CD73. La densidad de las bandas de 70 kDa (barras negras) y 90 kDa (barras blancas) detectadas en las muestras de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU relativa de las de DN (normalizadas a un valor de 1) es mostrada. C) Muestras de 20ng de CD73 contenidos en los PLP fueron sujetas a desglicosilación utilizando las enzimas endoglicosidasa-H y N-glicanasa. La densidad de las bandas de 70 kDa (barras negras), 80 kDa (barras con líneas horizontales), 85 kDa (barras con diagonales) y 90 kDa (barras blancas) detectadas en las muestras de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU relativa de las de DN (normalizadas a un valor de 1) es mostrada. Un ensayo representativo de tres independientes es mostrado.

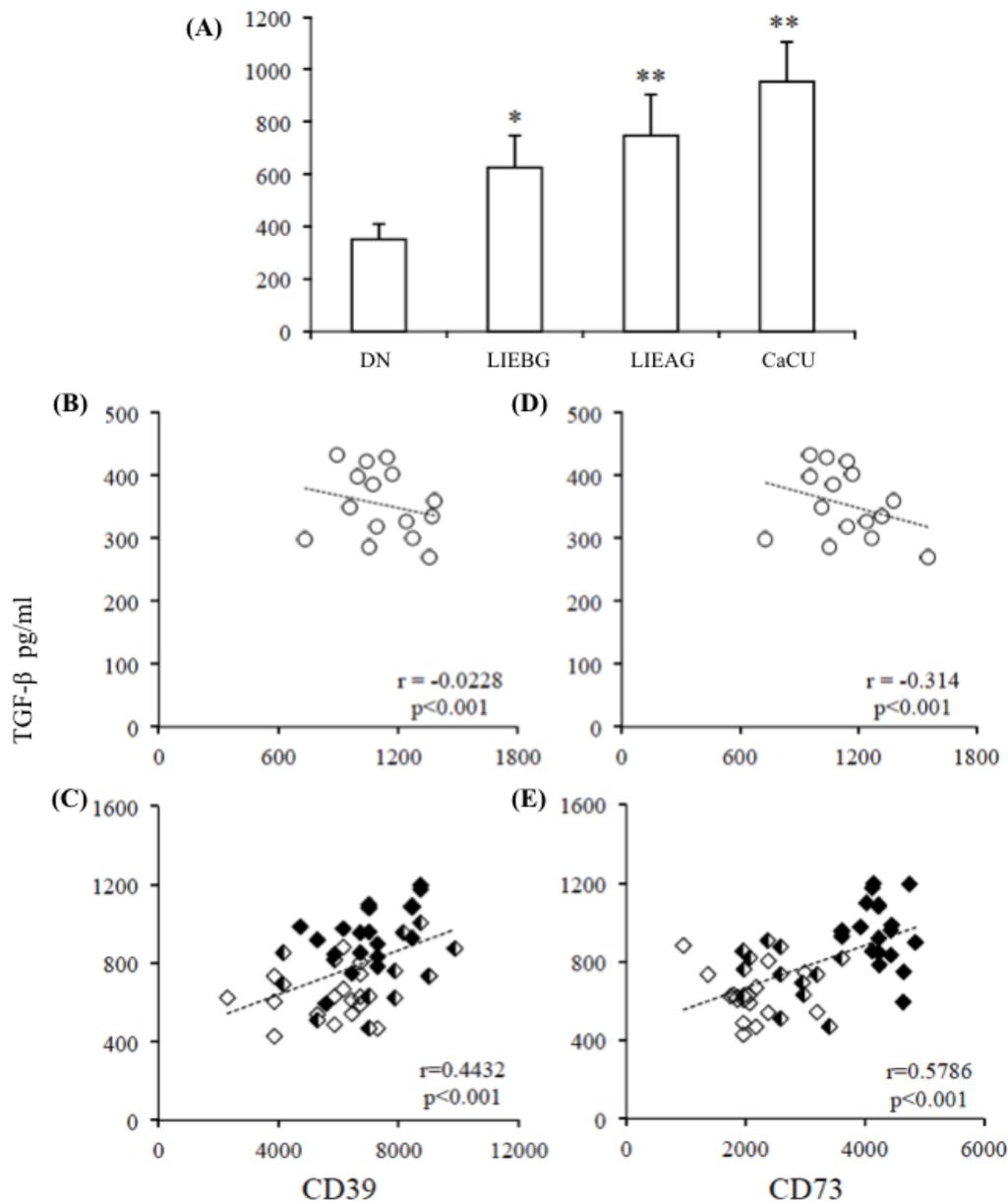
Por otra parte, con la finalidad de descartar si la banda de proteína de 90 kDa detectada en mayor proporción en los plasmas de las pacientes con LIEAG y CaCU correspondía a la proteína CD73 anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), las muestras de los diferentes plasmas fueron incubadas con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), la cual se sabe escinde la parte lipídica (GPI) de la ectoenzima CD73 (89). Después del tratamiento con PI-PLC, todas las muestras presentaron las bandas de 70 y 90 kDa, como previamente fue detectado (Figura 7B); sin embargo, además de mantenerse un alto contenido de la banda de 90 kDa, también se observó un incremento en el tamaño de la banda correspondiente a 70 kDa en las muestras de pacientes con CaCU en relación a la de DN, LIBG y LIEAG (figura 8), lo cual hace sugerir que además de la presencia de isoformas de CD73 altamente glicosiladas, una cantidad importante de CD73 contenida en las muestras plasmáticas de pacientes con CaCU con peso de 90 kDa esté asociada a GPI.



**Fig 8.** Escisión del GPI de la ectonucleotidasa CD73 de muestras plasmáticas de mujeres con diferentes etapas de desarrollo de CaCU. Cantidades equivalentes de CD73 (20ng) fueron sometidas a la digestión enzimática con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) y el producto de la digestión se corrió en un gel de acrilamida al 10%, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpo anti-CD73. Las bandas fueron analizadas por densitometría y los valores de densidad relativa determinada por pixeles de cada banda son mostrados en gráficos de barras.

## **Análisis del contenido de TGF- $\beta$ en plasmas sanguíneos de donadoras normales y de pacientes con lesión intraepitelial de bajo grado, lesión intraepitelial de alto grado y cáncer cérvico-uterino. Además de su correlación con los contenidos de las las ectonucleotidasas CD39 y CD73**

Se ha sugerido que TGF- $\beta$  juega un papel importante en promover la infección por VPH y la supresión local en neoplasias asociadas a VPH (149). Asimismo, se ha reportado que los niveles de TGF- $\beta$  incrementan con la gravedad de las lesiones cervicales y la fuerte expresión de esta citocina se ha asociado con pobre supervivencia en pacientes con CaCU (143, 160). Por otro lado, nosotros reportamos recientemente que en pacientes con neoplasias cervicales de bajo grado e infección persistente por AR-VPH, la mayor expresión de CD73 en las células cervicales se asoció con mayores niveles plasmáticos de TGF- $\beta$  en relación a las de DN (49). Asimismo, reportamos que TGF- $\beta$  es importante para inducir y mantener la expresión de CD73 en las células tumorales de CaCU (143). Por tanto, se procedió a analizar los niveles de esta citocina en los PLP de pacientes con LIEBG, LIEAG, CaCU y compararla con los de DN. Nosotros observamos que los pacientes con LIEAG y CaCU, quienes mostraron los mayores contenidos de CD39 y CD73, también mostraron los niveles más altos de TGF- $\beta$ . El promedio de la concentración de TGF- $\beta$  contenida en los PLP de DN fue de  $350\pm 61$  pg/ml, mientras que el de LIEBG, LIEAG y CaCU fue de  $634\pm 122$ ,  $749\pm 155$  y  $954\pm 152$  pg/ml, respectivamente (Figura 9A). Además, nosotros encontramos una correlación positiva entre las concentraciones de TGF- $\beta$  con CD39 o con CD73, en los PLP de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU,  $r=0.4432/P<0.001$ (Figura 9C) y  $r=0.5786/p<0.001$ (Figura 9E), respectivamente. Mientras que en los PLP de las DN fueron  $r=0.2647/p<0.001$  (Figura 9B) y  $r=0.2502/p<0.001$  (Figura 9D), respectivamente.



**Figura 9.** Contenido de TGF- $\beta$  en muestras de PLP de DN y pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU y su correlación con el contenido de CD39 y CD73. A) Se muestra el contenido de TGF- $\beta$ 1 en muestras de PLP derivadas de DN y de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, y se muestran los promedios  $\pm$  SEM. \*, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ); \*\*, indica diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) en la concentración de TGF- $\beta$ 1 relacionada con la de los DN. La correlación ( $r$ ) entre los contenidos de TGF- $\beta$ 1 y CD39 o CD73 en los PLP de DN fue de  $r = -0.0228/p < 0.001$  (B) y  $r = -0.314/p < 0.001$  (D), respectivamente. Mientras que para los pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU, fue de  $r = 0.4432/P < 0.001$ (C) y  $r = 0.5786/p < 0.001$  (E), respectivamente. Los contenidos de TGF- $\beta$ 1 con CD39 o CD73 están indicados en las muestras de PLP de DN (círculos blancos), pacientes con LIEBG (diamantes blancos), LIEAG (diamantes blancos y negros) y CaCU (diamantes negros).

## Discusión

En los últimos 10 años la investigación en cáncer ha establecido un enfoque especial en el papel que juegan las ectoenzimas productoras de Ado, CD39 y CD73, sobre la inmunomodulación y la evasión de la respuesta inmune antitumoral. De hecho, la inhibición de la vía adenosinérgica en el microambiente tumoral se ha propuesto como una alternativa indispensable en la terapia oncológica (151, 152). Sin embargo, existen grandes lagunas en el conocimiento que impiden el desarrollo de terapias eficaces basadas en Ado, como es la consideración de rutas redundantes que controlan los niveles de ATP y adenosina. En este sentido, conocer los contenidos y la actividad de ectoenzimas circulantes en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer podrían ser de utilidad como biomarcadores de la progresión de la enfermedad y para establecer estrategias terapéuticas (153).

Nuestro grupo de trabajo reportó recientemente una mayor expresión de CD39 y CD73 en células obtenidas de muestras cervicales de pacientes con NIC-1 positivos a la infección por VPH-16, en comparación con las células de muestras de pacientes con NIC-1 negativos a VPH-16 y donadoras sanas, la cual correlacionó con la presencia de mayores contenidos de CD39 y CD73 soluble en moco cervical con capacidad para producir Ado mediante la hidrólisis de ATP y AMP (49). No obstante, para conocer si la actividad adenosinérgica se asocia con el grado de avance de la enfermedad, en este estudio analizamos los contenidos y la actividad de CD39 y CD73 en muestras plasmáticas de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU, y los comparamos con aquellos de DN. De manera interesante, encontramos que los contenidos de CD39 y CD73 en las muestras plasmáticas incrementaron conforme el grado de avance de la enfermedad. Los de pacientes con LIEAG y CaCU mostraron un contenido de CD39 de 2.3 y 2.2 veces mayor, respectivamente, que el de las DN; y un contenido de CD73 de 1.7 y 2.68 veces mayor, respectivamente, que el de las DN. Los contenidos de CD39 y CD73 en las muestras plasmáticas de estas pacientes, se asociaron con alta capacidad para generar Ado a partir de la hidrólisis de ADP y AMP. Notablemente, la actividad ADPasa y AMPasa se redujo por la adición de POM-1 y APCP, inhibidores específicos de CD39 y CD73, respectivamente, sugiriendo que durante el desarrollo del CaCU se promueve la alteración del metabolismo de nucleótidos para generar niveles incrementados de Ado circulante a través de la actividad de estas ectonucleotidasas. La actividad ATPasa/ADPasa y AMPasa mediada por CD39 y CD73, respectivamente, en fluidos corporales de pacientes con enfermedades inflamatorias y cáncer, se ha reportado recientemente (112, 113). En el contexto de cáncer, la expresión y actividad incrementada de CD39 y CD73, ya sea en tejidos y/o en fluidos biológicos, puede dar lugar a altos niveles de Ado que suprimen potentemente la respuesta inmune antitumoral mediada por células T promoviendo la progresión tumoral a través de la estimulación de ARs (154, 155). De hecho, recientemente se reportó que los niveles elevados de CD73 en suero en pacientes con melanoma metastásico disminuyeron la efectividad de la inmunoterapia basada en nivolumab (117).

El aumento en los niveles de CD73 soluble encontrado en muestras de pacientes con LIEAG y CaCU en nuestro estudio, es consistente con estudios previos donde reportaron incremento en la actividad hidrolítica de AMP en el plasma de pacientes con cáncer avanzado (89).

De manera interesante, la mayor actividad AMPasa encontrada en las muestras plasmáticas de las pacientes con LIEAG y CaCU también se asoció con un alto contenido de una proteína de 90 kDa altamente glicosilada, revelada por ensayos de *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-CD73. CD73 es una proteína que tiene cuatro motivos consenso de N-glicosilación: <sup>53</sup>NAS, <sup>311</sup>NSS, <sup>333</sup>NYS y <sup>403</sup>NGT, y cambios en la glicosilación en uno o más de estos sitios puede alterar la actividad hidrolítica de CD73 debido a que tres de ellos (N311 / N333 /N403) se encuentran en el dominio catalítico C-terminal de la molécula (156). Varios estudios han mostrado que en estados patológicos la proteína CD73 puede sufrir cambios postraduccionales, generándose diferentes isoformas con propiedades catalíticamente distintas. Por ejemplo, el incremento de la actividad AMPasa en distrofia muscular se ha asociado con mayor contenido de una forma activa de CD73 de 72 kDa en relación a una forma inactiva de CD73 de 62 kDa (123). Por otro lado, en carcinoma hepatocelular se ha reportado que la glicosilación alterada de CD73 se asocia con actividad AMPasa atenuada, debido a la mayor producción de una isoforma con 50aa más corta que la proteína completa (126). Nosotros encontramos que la digestión enzimática de las muestras plasmáticas usando endoglicosidasa-H y N-glicanasa, dio por resultado productos de 90, 85, 80 y 70 kDa los cuales fueron observados principalmente en las muestras de pacientes con LIEAG y CaCU, sugiriendo que el mayor grado de glicosilación de CD73 en los plasmas de estos pacientes esté asociado con una mayor capacidad AMPasa. Además, los altos contenidos de CD39 y de CD73 altamente glicosilada en las muestras plasmáticas de estos pacientes, sugiere que ambas ectonucleotidasas actúan de manera coordinada para generar un ambiente inmunosupresor a través de la generación de Ado, como se ha propuesto en otros tipos de cáncer (118). Asimismo, se sabe que CD73 está anclada a la membrana plasmática por un GPI y que puede ser encontrada unida a la membrana como una forma sensible a la fosfolipasa C, unida a la membrana de forma resistente a la fosforosa C y como una variante soluble a la membrana que se deriva de la forma anclada a GPI (89). Nosotros investigamos si la banda de proteína de 90 kDa detectada en mayor proporción en los plasmas de las pacientes con LIEAG y CaCU correspondía a la proteína CD73 anclada a GPI como la CD73 soluble encontrada de placenta humana que contenía mioinositol, una parte del anclaje GPI vinculado a la proteína después del desprendimiento (108). Al incubar las muestras de los diferentes plasmas con PI-PLC para escindir la parte lipídica de la ectoenzima CD73 encontramos que se observó un incremento notable en la banda de CD73 correspondiente a 70 kDa en las muestras de pacientes con CaCU en relación a la de las DN, LIEBG y LIEAG lo cual podría sugerir que una importante cantidad de CD73 contenida en las muestras plasmáticas de pacientes con CaCU con peso de 90 kDa esté asociada a GPI.

No obstante, dado que la palmitoilación de inositol resulta en la resistencia a la hidrólisis por PI-PLC, sería interesante analizar en estudios posteriores si el sitio de unión de CD73 con GPI pueda ser hidrolizado por otra enzima, tal como la fosfolipasa D (157).

Se sabe que TGF- $\beta$  aumenta los niveles de CD39 y CD73 en células T activadas y células mieloides supresoras (142). La expresión de TGF- $\beta$ 1 en CaCU se ha relacionado directamente con el grado de progresión de la enfermedad (49) y a la expresión de oncogenes E6 y E7 de VPH de alto riesgo, los cuales inducen la activación del promotor de TGF- $\beta$ 1 humano mediante el reconocimiento de la secuencia Sp1 (158). Nosotros previamente reportamos que células tumorales de CaCU infectadas con VPH de alto riesgo producen constitutivamente TGF- $\beta$ , el cual es importante para inducir y mantener la expresión de CD73. Asimismo, demostramos que la Ado generada por la actividad enzimática de CD73 indujo la producción de TGF- $\beta$  en células tumorales interactuando con A2AR y A2BR, lo que sugiere una importante conexión entre la vía adenosinérgica y la producción de TGF- $\beta$  en células infectadas con VPH (49). En este estudio encontramos un contenido significativamente mayor de TGF- $\beta$  en las muestras plasmáticas de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU respecto a las DN. De hecho, se observó una correlación positiva entre los contenidos de TGF- $\beta$  de estos pacientes con los contenidos de CD39 y CD73 detectados en las muestras plasmáticas de estos pacientes. Además, observamos que los pacientes con LIEAG y CaCU, quienes presentaron los mayores contenidos plasmáticos de TGF- $\beta$  y de las nucleotidasas CD39 y CD73, mostraron el mayor número de parejas sexuales (promedios 3.3 y 2.6) y embarazos (promedios 3.5 y 4.2), que las donadoras DN, cuyos promedios fueron 2.2 y 1.1, respectivamente. Es importante mencionar que también se observó alta correlación el número de parejas sexuales y CD39 y el número de embarazos con la expresión de CD39 y CD73 en los pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU (Tabla 4). Lo cual concuerda con reportes previos en donde se establece que una gran cantidad de parejas sexuales y embarazos son los principales factores de riesgo asociados con la infección persistente por VPH de alto riesgo y el desarrollo de displasia cervical y CaCU (159, 160).

TABLA 4. Análisis de correlación de los datos clínicos de DN y pacientes con SIL con los contenidos plasmáticos de CD39 y CD73

Nucleotidasa	Donadoras normales			Pacientes con SIL			Valores de p
	Edad (años)	Número de parejas sexuales	Número de embarazos	Edad (años)	Número de parejas sexuales	Número de embarazos	
CD39	-0.06017	-0.2257	0.0721	0.1308	<sup>a</sup> 0.3312	<sup>b</sup> 0.3512	a<0.0201 b<0.0134
CD73	0.3028	0.2277	0.2284	<sup>c</sup> 0.5868	0.1542	<sup>d</sup> 0.6387	c<0.0001 d<0.0001

Se muestran los valores r de Pearson.

Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la producción de TGF- $\beta$ , asociada con la infección persistente por VPH-AR, pueden ser factores importantes para inducir y mantener la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 durante el desarrollo del CaCU.

Considerando el papel importante que tiene la vía adenosinérgica en la supresión de la respuesta inmune antitumoral a través de la generación de Ado, y que la presencia de altas concentraciones de nucleótidos extracelulares en el microambiente tumoral de CaCU parecen interferir en la regulación, proliferación, diferenciación y apoptosis de células cancerosas del cuello uterino (50), entonces, la determinación de los contenidos y de la actividad de CD39 y CD73 en plasmas de pacientes con CaCU podría ser una herramienta valiosa como biomarcador de progresión de la enfermedad y para dirigir la elección del tratamiento clínico en estos pacientes.

## **Conclusión**

En este estudio, damos evidencia, por primera vez, que los contenidos de las ectoenucleotidasas CD39 y CD73 solubles en PLP de pacientes con diferentes etapas del desarrollo de CaCU correlacionaron positivamente con la progresión de la enfermedad y se asocian con mayor capacidad para generar Ado a partir de la hidrólisis de ADP y AMP. Además la mayor actividad AMPasa encontrada en los PLP de las pacientes con LIEAG y CaCU se asoció con un alto contenido de una isoforma de CD73 altamente glicosilada de 90 kDa. En adición, los niveles de TGF- $\beta$  en los PLP de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU fueron significativamente mayores a los de DN, y mostraron una correlación positiva con los contenidos de CD39 y CD73. Estos resultados sugieren que la producción de TGF- $\beta$ , asociada con la infección persistente por HR-HPV, la cual está presente en más del 99% de los casos de CaCU son factores que promueven la expresión de CD39 y CD73 para favorecer la progresión del CaCU a través de la generación de Ado.

## Perspectivas

- \* Incrementar el número de muestras de PLP de pacientes con las diferentes etapas del desarrollo del CaCU para poder considerar las ectoenzimas CD39 y CD73 como marcadores moleculares predictivos de severidad en la historia natural del CaCU.
- \* Determinar si la pérdida de glicosilación de la isoforma de CD73 de 90 kDa conduce a una pérdida de actividad enzimática
- \* Clarificar el patrón de glicosilación de CD73 plasmática con glicanasas específicas en las diferentes etapas del desarrollo del CaCU
- \* Incrementar el número de muestras de PLP de pacientes con las diferentes etapas del desarrollo del CaCU para corroborar la correlación con los contenidos plasmáticos de CD39 y CD73
- \* Dilucidar el origen de CD39 y CD73 en plasma sanguíneo de pacientes en etapas avanzadas

## Referencias Bibliográficas

- 1.- International Agency for Research on Cancer. World Source: Globocan 2018.
- 2.- Roy P, Saikia B. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016; 53: 441-2.
- 3.- Hausman. D. Whats is cancer?. *Perspect Boil Med*. 2019. 778-784.
- 4.- Hanahan. D and Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*. 2011. 646:674.
- 5.- Lemmon, M and Schlessinger. J. Cell signaling by receptor tyrosin kinases. 2010 *Cell* 141, 1117–1134.
- 6.- Burkhart. D and Sage. J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008. 8. 671–682.
- 7.- Lowe. S, Cepero. E, and Evan. G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2014. 432, 307–315.
- 8.- Calcinotto. A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury *Physiol*. 2019. 1047-1078.
- 9.- Blasco. M. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet*. 2005. 6, 611–622.
- 10.- Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol Lett*. 2018. 687-702.
- 11.- Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. *The Cancer Atlas*. American Cancer Society. 2006.
- 12.- Rabinovich G, Gabrilovich D, Sotomayor E. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007. 25:267-96.
- 13.- Hanahan, D. Weinberg, R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. 4. 646-74.
- 14.- Schiller. J, Lowy. D. Virus infection and human cancer: an overview. *Recent Results Cancer Res*. 2014. 193:1-10.
- 15.- Parkin. DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006. 118: 3030–3044.
- 16.- Ciesielska. U, Nowińska. K, Podhorska-Okolów. M, Dzięgiel. P. The Role of Human Papillomavirus in the Malignant Transformation of Cervix Epithelial Cells and the Importance of Vaccination Against This Virus. *Adv Clin Exp Med*. 2012. 21. 235–244.
- 17.- Martin. D, Gutkind. J. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*. 2009. 27, S31–S42.
- 18.- Campisi. J. Cancer and ageing: rival demons?. *Nature Reviews Cancer*. 2003. 3: 339–349.
- 19.-Carrasco. L, Almendral del Rio. J. *Virus patógenos*. Hélice, 2006.
- 20.- Anacker, D. and Moody, C. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. *Virus Research*. 2017. 41-49.
- 21.- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E.M., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79.

- 22.- Munoz. N, Bosch. F, de Sanjose. S, Herrero. R, Castellsague. X, Shah. K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J. & International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003. 348 (6): 518-527.
- 23.- Walboomers J, Jacobs M, Manos M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. 1999. *J Pathol* 189:12–19.
- 24.- Stunkel, W, Bernard, H.U.. The chromatin structure of the long controlregion of human papillomavirus type 16 represses viral oncoproteinexpression. *J. Virol*. 1999. 73, 1918–1930.
- 25.- Hu. D, Zhou. J, Wang. F, Shi. H, Li. Y and Li. B. HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. *Gynecologic oncology*. 2015.
- 26.- Ciesielska. U, Nowinska. K, Podhorska. M, Dziegiel. P. The Role of Human Papillomavirus in the Malignant Transformation of Cervix Epithelial Cells and the Importance of Vaccination Against This Virus. *Adv Clin Exp Med*. 2012. 21, 2, 235–244.
- 27.- Schmitt M, Pawlita M: The HPV transcriptome in HPV 16 positive cell lines. *Mol Cell Probes* 2011. 25, 108–113.
- 28.- Mistry N, Simonsson M, Evander M: Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal origin. *Virol J*. 2007, 12- 27.
- 29.- Bosch. F and de Sanjosé. S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease Markers*. 2007. 213–227.
- 30.- Castellsague. X, Diaz. M, de Sanjose. S, N. Munoz, R. Herrero, S. Franceschi, R.W. Peeling, R. Ashley, J.S. Smith, P.J. Snijders, C.J. Meijer and F.X. Bosch, Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention, *J Natl Cancer Inst*. 2006. 303–315.
31. N. Egawa, K. Egawa, H. Griffin, J. Doorbar, Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015. 3863–3890.
- 32.- Doorbar. J and Griffin. H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research*. 2019. 176–179.
- 33.- Cox. J. Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1995. 9; 1-37.
34. Chia-ching. J, Wang. M, Joel. M and Palefsky. M. Human Papillomavirus (HPV) Infections and the Importance of HPV Vaccination. *Curr Epidemiol Rep*. 2015. 2 101–109.
- 35.- Castellsague. X and Munoz. N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003. 20–28.
- 36.- IARC. IARC Monographs. Tobacco Smoking and Tobacco Smoke. 2002. vol 38.
- 37.- McLaughlin-Drubin. M and Munger. K. Viruses Associated with Human Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1782(3): 127–150.
- 38.- Smith, J, Herrero. R, Bosetti. C, Munoz. N, Bosch. F, Eluf-Neto. J, Castellsague. F, C.J. Meijer, A.J. van Den Brule, S. Franceschi and R. Ashley, Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer, *J Natl Cancer Inst*. 2002. 1604–1613.

- 39.-Globocan. Global cáncer Observatory.International Agency for Research on cancer. 2021.
- 40.- Gravitt. P. The Known unknowns of VPH natural history. *Journal Clin Invest.* 2011. 121: 4593–4599.
- 41.- Woodman CB, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001. 357.1831–1836.
- 42.- Richart, R. Amodified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1990. 75;131-133.
- 43.- Vivar, Nicolás. Sistema Bethesda: citología cérvico-vaginal. Boletín No 1. Agosto, 2006.
- 44.- Munoz N, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004. 190; 2077–2087.
- 45.- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003. 348; 518–527
- 46.- Molano. M. War into Immune System and Infection by HPV. *REV COLOMB CANCEROL.* 2009. 13(2):67-68.
- 47.- Denny. L, Franceschi. S, de Sanjosé. S, Heard. I, Moscicki. A and Palefsky. J. Human Papillomavirus, Human Immunodeficiency Virus and Immunosuppression. *Vaccine.* 2012. F168– F174.
- 48.- A. Bahreyni, S. S. Samani, E. Ghorbani et al., “Adenosine: an endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer,” *Cellular Physiology*, vol. 233, no. 4, pp. 2715–2722, 2018.
- 49.- Mora, M. Lopez, S. Gutiérrez, V. García, R. Weiss, B. Hernandez, J. Sánchez, H. Ávila, L. Don, C. Muñoz, R. Torres, D. Chacón, R. Vallejo, L. Pérez, S and Monroy, A. 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.
- 50.- Yegutkin. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014. 49(6): 473–497.
- 51.- Samsel, M. Dzierzbicka, K. Trzonkowski, P. Adenosine, its analogues and conjugates. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013; 67: 1189-1203.
- 52.- Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto nucleotidases. 2012. *Purinergic Signal* 8:437–502.
- 53.- Dou, L. Chen, Y. Cowan, P. Chen, P. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. *Clinical Immunology.* 2017. 1521-6616.
- 54.- Yegutkin, G. Samburski, S. Jalkanen, S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *The FASEB Journal.* 2003. 1328-1330.
- 55.-. Yegutkin G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica.* 2008. 673–694.

- 56.- Cekic, C and Linden, J. Purinergic regulation of the immune system. *Nature reviews immunology*. 2016. 177:199.
- 57.-Yegutkin, G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2014. 473-497.
- 58.- Samsel, M. Dzierzbicka, K. Trzonkowski, P. Adenosine, its analogues and conjugates. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013; 67: 1189-1203.
- 59.- Robson, S. Sevigny, J and Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*. 2006. 2:409–430.
- 60.- Alvarado C, Harden TK, Boyer JL. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol*. 2005. 67:114–122.
- 61.- Yegutkin, G. Henttinen, T. Jalkanen, S. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J*. 2001. 15, 251–260.
- 62.- Kanthi, Y. Sutton, N. Pinsky, D. CD39: Interface Between Vascular Thrombosis and Inflammation. *Curr Atheroscler Rep*. 2014.16:425.
- 63- Atkinson, B. Dwyer, K. Enjyoji, K. Robson, S. Ecto-nucleotidases of the CD39/ NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2006. 217–222.
- 64.- Zimmermann, H. 5'-Nucleotidasa: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J*. 1992. 285, 345-365.
- 65.- Boison, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 ; 8(1): 2–7.
- 66.- Boison, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 February ; 8(1): 2–7.
- 67- Haskó, G. Antonioli, L. Cronstein, B. Adenosine metabolism, immunity and joint health. *Biochemical pharmacology*. 2018. 02.002.
- 68.- Borowiec, A. Lechward, K. Tkacz-Stachowska, K and Składanowski, A. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica*. 2006, 269–278.
- 69.-Samiul, M. Costales, M. Cavanaugh, C and Williams, K. Extracellular Adenosine Generation in the Regulation of Pro-Inflammatory Responses and Pathogen Colonization. *Biomolecules*. 2015.5.775:792.
- 70.- Faas, M. Sàrez, T. De Vos, p. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017. 9:19.
- 71.- Young, A. Mittal, D. Stagg, J and Smyth, M. Targeting cancer-derived adenosine new therapeutic approaches. *American Associations for Cancer Research*. 2014. 879:888.
- 72.- Hanahan, D. Weinberg, R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. 4;144(5):646-74.

- 73.- Feng, L. Sun, X. Csizmadia, E. Han, L. Bian, S. Murakami, T. Wang, X. Robson, S. Wu, Y. Vascular CD39/ENTPD1 Directly Promotes Tumor Cell Growth by Scavenging Extracellular Adenosine Triphosphate. *Neoplasia*. 2011. 206:216.
- 74.- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT et al. Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: Role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. 2003. *J Exp Med* 198: 783–796.
- 75.- Synnestvedt, K. Furuta, G. Comerford, K. Louis, N. Karhausen, J. Eltzschig, H. Hansen, K. Thompson, L. Colgan, S. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002. 110:993–1002.
- 76.- Young, A. Mittal, D. Stagg, J. Smyth, M. Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches. *American Association for Cancer Research*. 2014. 2159-8290.
- 77.- J. Spychala and J. Kitajewski. Wnt and  $\beta$ -catenin signaling target the expression of ecto-5-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Experimental Cell Research*. 2004. 296: 99–108, 2004.
- 78.- H.Wang, S. Lee, C. Lo Nigro et al. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *British Journal of Cancer*. 2012. 1446–1452, 2012.
- 79.- Gao, Z. Dong, K. Zhang, H. The roles of CD73 in cancer. *BioMed Research International*. 2014.
- 80.- de Andrade Mello P, Coutinho-Silva R and Savio LEB. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor–Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front. Immunol*. 2017. 8:1526.
- 81.- Zatta, A. Matherne, G. Headrick, J. Adenosine receptor-mediated coronary vascular protection in postischemic mouse heart. *Life Sciences*. 2006. 2426– 2437.
- 82.- Ghiringhelli, F. Bruchard, M. Chalmin, F. Rébé, C. Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunoescape. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.
- 83.- Deaglio, S. Dwyer, K. Gao, W. Friedman, D. Usheva, A. Erat, A. Chen, J. Enjyoji, K. Linden, J. Oukka, M. Kuchroo, V. Strom, T. Robson, S. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*. 2007 1257–1265.
- 84.- Ohta, A., Ohta, A., Madasu, M., Kini, R., Subramanian, M., Goel, N. and Sitkovsky, M. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J. Immunol*. 2009 5487–5493.
- 85.- Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LFI, Filho AZ, Moreira JCF, et al. (2012) Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'-Nucleotidase. *PLoS ONE* 7(2): e31205.
- 86.- Wilson, J. Ross, W. Agbai, O. Frazier, R. Figler, R. Rieger, J. Linden, J. Ernst, P. The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J. Immunol*. 2009. 182, 4616–4623.

- 87.- Bastid, J., Regairaz, A., Bonnefoy, N., Dejou, C., Giustiniani, J., Laheurte, C., Cochaud, S., Laprevotte, E., Brentano, E., Hemon, P., Gros, L., Bec, N., Larroque, C., Alberici, G., Bensussan, A., Eliaou, J. Inhibition of CD39 Enzymatic Function at the Surface of Tumor Cells Alleviates Their Immunosuppressive Activity. *Cancer Immunol Res.* 2015. 254:265.
- 88.- Antonioli, L., Yegutkin, G., Pacher, P., Blandizzi, C., Haskó, G. Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities. *Trends in cancer.* 2016.
- 89.- E. Schneider, A., Rissiek, R., Winzer, B., Puig, B., Rissiek, F., Haag, H., Mittrucker, T., Magnus, and E. Tolosa. Generation and Function of Non-cell-bound CD73 in Inflammation. *Frontiers in Immunology.* 2019. vol. 10, no. 1729, pp 1-8.
- 90.- Jiang, Z., Wu, Y., Robson, S. et al. Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. *Purinergic Signalling.* 2014. 10:611–618.
- 91.- Mora, M., Ávila, L., García, R., Weiss, B., Hernández, J., Don, C., Gutiérrez, V., Titla, I., Fuentes, M., Monroy, A., Jave, L., Chacón, L., Vallejo, L., Pérez, S., Monroy, A. Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular Immunology.* 2017. 46–55.
- 92.- de Andrade, P. and Buffon, A. et al. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. *MBoC.* 2014. 25; 2905-2918.
- 93.- Avila, LR. Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina) como mecanismo inmunosupresor en células tumorales en cáncer de cérvical -uterino. 2014. Tesis. UNAM.
- 94.- Torres, DB. Análisis de la expresión de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) en tumores de cáncer de cuello uterino. 2015. Tesis UNAM.
- 95.- Mora, M d L, García, R and Monroy, A. et al. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions. *J Transl Med.* 2016. 14:302.
- 96.- Torres, D., Monroy, A. et al. 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.* 2020. 4;130:155082.
- 97.- Avila, L., Monroy, A. et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Normal Cervix and Cervical Cancer Tumors Increase CD73 Expression in Cervical Cancer Cells Through TGF- $\beta$ 1 Production. *Stem Cell Dev.* 2019. 1;28(7):477-488.
- 98.- Molina G. Efecto de TGF-B, INF-B, EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino. 2019. Tesis maestría. UNAM.
- 99.- Yegutkin GG, Samburski SS, Mortensen SP, Jalkanen S, Gonzalez-Alonso J (2007) Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol* 579:553–564.
- 100.- Banz Y, Beldi G, Wu Y, Atkinson B, Usheva A, Robson SC (2008) CD39 is incorporated into plasma microparticles where it maintains functional properties and impacts endothelial activation. *Brit J Haematol* 142:627–637.
- 101.- Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z (2011) Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol* 187:676–683.

- 102.- Gordon. Z, Wu. Y, Robson. S. et al. Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. *Purinergic Signalling*. 2012. 10:611-618.
- 103.- Sunderman FW Jr (1990) The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Annu Clin Lab Sci* 20:123–139
- 104.- Chuang NN, Newby AC, Luzio JP (1984) Characterization of different molecular forms of 5'-nucleotidase in normal serum and in serum from cholestatic patients and bile-duct-ligated rats. *Biochem J* 224:689–695
- 105.- Coade. S and Pearson J. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res*. 1989. 65:531-537.
- 106.- Banz. Y, Beldi. G, Wu. Y, Atkinson. B, Usheva. A and Robson. S. CD39 is incorporated into plasma microparticles where it maintains functional properties and impacts endothelial activation. *British Journal of Haematology*. 2008. 142, 627–637.
- 107.- Shak S, Davitz MA, Wolinsky ML, Nussenzweig V, Turner MJ, Gurnett A. Partial characterization of the cross-reacting determinant, a carbohydrate epitope shared by decay accelerating factor and the variant surface glycoprotein of the African *Trypanosoma brucei*. *J Immunol*. 1988. 140:2046–50.
- 108.- Klemens MR, Sherman WR, Holmberg NJ, Ruedi JM, Low MG, Thompson LF. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun*. (1990) 172:1371–7. doi: 10.1016/0006-291X(90)91601-N.
- 109.- Zhang W, Zhou S, Liu G, Kong F, Chen S, Yan H. Multiple steps determine CD73 shedding from RPE: lipid raft localization, ARA1 interaction, and MMP-9 up-regulation. *Purinergic Signal*. (2018) 14:443–57. doi: 10.1007/s11302-018-9628-1.
- 110.- Lehto. M and Sharon. F. Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. *Biochem. J*. 1998. 332: 101-109.
- 111.- Goueli. S and Hsiao. K. Monitoring and characterizing soluble and membrane-bound ectonucleotidases CD73 and CD39. *Plos One*. 2019. 25:14.
- 112.- Patel. P, Rawal. G, Balar. D. Combined use of serum enzyme levels as tumor markers in cervical carcinoma patients. *Tumour Biol*. 1994. 15; 45-51.
- 113.- Yegutkin GG: Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783:673–694.
- 114.- Makisimov. M. et al. Early Prediction of Persistent Organ Failure by Soluble CD73 in Patients With Acute Pancreatitis. *Crit Care Med*. 2014. 42:2556–2564.
- 115.- Vaara. S, Pettila. V. et al. Soluble CD73 in Critically Ill Septic Patients – Data from the Prospective FINNAKI Study. *Plos One*. 2016. 1-14.
- 116.- Huang. Q, Sachsenmeier. K. et al. Levels and Enzyme Activity of CD73 in Primary Samples From Cancer Patients. *ResearchGate*. 2015.
- 117.- Morello. S, Ascierto. A. et al. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *J Transl Med*. 2017. 15(1):244.

- 118.- Zimmermann. H. 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 1992. 285: 345-365.
- 119.- M. R. Klemens, W. R. Sherman, N. J. Holmberg, J. M. Ruedi, M. G. Low, L. F. Thompson. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, 172, 1371–1377.
- 120.- Heuts. D. Scrutton. N. et al. Crystal Structure of a Soluble Form of Human CD73 with Ecto-5'-Nucleotidase Activity. *ChemBioChem.* 2012. 13: 2384-2391.
- 121.- Navarro. J, Olmo. N, Turnay. J, López. T and Lizarbe. A. Ecto-5'-nucleotidase from a human colon adenocarcinoma cell line. Correlation between enzyme activity and levels in intact cells. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1998. 187: 121–131, 1998.
- 122.- Chuang. N, Newby. A and Luzio. P. Characterization of different molecular forms of 5'-nucleotidase in normal serum and in serum from cholestatic patients and bile-duct-ligated rats. *Biochem. J.* 1984. 224, 689-695.
- 123.- Morete. J, García. M, Campoy. F, Vidal. C, Muñoz. E. Active and inactive ecto-5'-nucleotidase variants in liver of control and dystrophic Lama2dy mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* . 2004. 422–433.
- 124.- Morete. J, Sánchez. L, Campoy. F, Vidal. C, Muñoz. E. The increased ecto-5'-nucleotidase activity in muscle, heart and liver of laminin  $\alpha$ 2-deficient mice is not caused by an elevation in the mRNA content. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2006. 1092–1101.
- 125.- Bailyes. E, Soos. M, Jackson. P, Newby. A, Siddle. K, Luzio. J. The existence and properties of two dimers of rat liver ecto-5'-nucleotidase. *Biochem. J.* 1984. 221. 369:377.
- 126.- Snider. N, Altshuler. P, Wan. S, Welling. T, Cavalcoli. J, Omary. M. Alternative splicing of human NT5E in cirrhosis and hepatocellular carcinoma produces a negative regulator of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Molecular Biology of the cell.* 2014.
- 127.- Steigerwalt RW, Rundhaug JE, Nettesheim P. Transformed rat tracheal epithelial cells exhibit alterations in transforming growth factor-beta secretion and responsiveness. *Mol Carcin* 1992;5:32-40.
- 128.- Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factor and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990;187:467-523.
- 129.- Clark. D. and Coker. R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998. 30: 3; 293-298.
- 130.- Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, Scott RE, Moses HL. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res* 1986;46:2068-2071.
- 131.- Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders FC, Kasid A, Derynck R *et al.* Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987; 48:417-428.
- 132.- Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB. Type beta transforming growth factor is the primary differentiation inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2438-2442.
- 133.- Syed V. TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. *J Cell Biochem.* 2016. 6; 1279-1287.

- 134.- Xie. F, Ling. L, Van Dam. H, Zhou. F and Zhang. L. TGF- $\beta$  signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2018. 1;50(1):121-132.
- 135.- Morikawa. M, Derynck. R and Miyazono. K. TGF-b and the TGF-b Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016. 8:a021873.
- 136.- Battle. E and Massague. J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019. 16; 50(4): 924–940.
- 137.-Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. and Flavell, R. A., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006. 24: 99–14.
- 138.- Frederico S. Regateiro, Duncan Howie, Kathleen F. Nolan, Eleftherios I. Agorogiannis, David R. Greaves, Stephen P. Cobbold and Herman Waldmann. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-b. *J Immunol.* 2011. 41: 2955-2965.
- 139.- Cappelli. C. San Martín. R. The TGF- $\beta$  profibrotic cascade targets ecto-5'-nucleotidase gene in proximal tubule epithelial cells and is a traceable marker of progressive diabetic kidney disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020. 1;1866(7):165796.
- 140.- Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, Waldmann H. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur J Immunol.* 2011.41(10):2955-65.
- 141.- Chen S. Zhang. B. et al. CD73 expression on effector T cells sustained by TGF- $\beta$  facilitates tumor resistance to anti-4-1BB/CD137 therapy. *Nat Commun.* 2019. 11;10:150.
- 142.- Ryzhov. S. Novitskiy. S. Role of TGF- $\beta$  signaling in generation of CD39+CD73+ myeloid cells in tumors. *J Immunol.* 2014. 15;93. 3155-3164.
- 143.- García. R, Monroy. A, Hernández. J, Weiss. B, Gutierrez. V, Del Carmen. M, Avila. L, Don. C, Torres. D and Mora, M. 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.* 2019. 71:79.
- 144.- Ávila-Ibarra LR, Mora-García ML, García-Rocha R, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Montesinos JJ, Lizano Soberon M, García-López P, López CAD, Torres-Pineda DB, Chacón-Salinas R, Vallejo-Castillo L, Pérez-Tapia SM, Monroy-García A. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Normal Cervix and Cervical Cancer Tumors Increase CD73 Expression in Cervical Cancer Cells Through TGF- $\beta$ 1 Production. *Stem Cells Dev.* 2019 Apr 1;28(7):477-488.
- 145.- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCRbased method. *JAMA.* 1991. 265:472±477.
- 146.- M. L. Mora-García, L. R. Ávila-Ibarra, R. García-Rocha et al., “Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway,” *Cellular Immunology.* 2017. vol. 320, pp. 46–55.

- 147.- Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225–30.
- 148.- Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Muller CE, Strater N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure* 2012. 20:2161-2173.
- 149.- I. V. Iancu, A. Botezatu, C. D. Goia-Rusanu et al., “TGF-beta signalling pathway factors in HPV-induced cervical lesions,” *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, vol. 69, no. 3, pp. 113–118, 2010.
- 150.- H. Zhu, H. Luo, Z. Shen, X. Hu, L. Sun, and X. Zhu, Transforming growth factor- $\beta$ 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer, *Tumour Biology*, vol. 37, no. 6, pp. 7075–7083, 2016.
- 151.- Y. Huang, Z. Gu, Y. Fan et al., “Inhibition of the adenosinergic pathway: the indispensable part of oncological therapy in the future,” *Purinergic Signal*, vol. 15, no. 1, pp. 53–67, 2019.
- 152.- S. Arab and J. Hadjati, “Adenosine blockage in tumor microenvironment and improvement of cancer immunotherapy,” *Immune Network*, vol. 19, no. 4, pp. 1–19, 2019.
- 153.- S. Morello, R. Turiello, G. Madonna, A. Pinto, P. Ascierio, and M. Capone, “Enzyme activity of circulating CD73 in human serum,” *Methods in Enzymology*, vol. 629, pp. 257–267, 2019.
- 154.- Y. Huang, Z. Gu, Y. Fan et al., “Inhibition of the adenosinergic pathway: the indispensable part of oncological therapy in the future,” *Purinergic Signal*, vol. 15, no. 1, pp. 53–67, 2019.
- 154.- S. Arab and J. Hadjati, “Adenosine blockage in tumor microenvironment and improvement of cancer immunotherapy,” *Immune Network*, vol. 19, no. 4, pp. 1–19, 2019.
- 156.- T. Jiang, X. Xu, M. Qiao et al., “Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers,” *BMC Cancer*. 2018. vol. 18, no. 267, pp. 1–10.
- 157.- W. L. Roberts, J.J. Myher, A. Kuksis, M.G. Low, TL Rosenberry. “Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C”. *J Biol Chem*. 1988. Vol. 35, no. 263, pp. 18766–75.
- 158.- A. Giuliano, M. Papenfuss, A. Schneider, M. Nour, and K. Hatch, “Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 8, no. 7, pp. 615–620, 1999.
- 159.- E. Smith, S. Johnson, D. Jiang et al., “The association between pregnancy and human papilloma virus prevalence,” *Cancer Detection and Prevention*, vol. 15, no. 5, pp. 397–402, 1991.
- 160.- M. Pfaffenzeller, M. Franciosi, A. Cardoso, “ Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical cancer,” *Purinergic Signal*, vol. 16, no. 1, pp. 123-135, 2020.

Research Article

## Detection of CD39 and a Highly Glycosylated Isoform of Soluble CD73 in the Plasma of Patients with Cervical Cancer: Correlation with Disease Progression

Ricardo Muñoz-Godínez <sup>1,2</sup> María de Lourdes Mora-García <sup>3</sup> Benny Weiss-Steider <sup>3</sup>  
Juan José Montesinos-Montesinos <sup>4</sup> Adriana del Carmen Aguilar-Lemarroy <sup>5</sup>  
Rosario García-Rocha <sup>3</sup> Jorge Hernández-Montes <sup>3</sup> Christian Azucena Don-López <sup>3</sup>  
Luis Roberto Ávila-Ibarra <sup>1,3</sup> Daniela Berenice Torres-Pineda <sup>1</sup>  
Gabriela Molina-Castillo <sup>3</sup> Rommel Chacón-Salinas <sup>6,7</sup> Luis Vallejo-Castillo <sup>6,8</sup>  
Sonia Mayra Pérez-Tapia <sup>6,7,9</sup> and Alberto Monroy-García <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Cáncer, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

<sup>2</sup>Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunobiología, UIDCC-UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM, Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup>Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

<sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica de Occidente División de Inmunología Sierra Mojada, No. 800, Col. Independencia, C.P. 44340 Guadalajara, Jalisco, Mexico

<sup>6</sup>Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mexico

<sup>7</sup>Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, ENCB-IPN, Ciudad de México, Mexico

<sup>8</sup>Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN), Ciudad de México, Mexico

<sup>9</sup>Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I + D + i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDI-FarBiotec-CONACyT), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to María de Lourdes Mora-García; [lulumora@yahoo.com](mailto:lulumora@yahoo.com) and Alberto Monroy-García; [albertomon@yahoo.com](mailto:albertomon@yahoo.com)

Received 18 June 2020; Revised 2 November 2020; Accepted 9 November 2020; Published 7 December 2020

Academic Editor: Giuseppe Valacchi

Copyright © 2020 Ricardo Muñoz-Godínez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is the main factor in the development of cervical cancer (CC). The presence of immunosuppressive factors plays an important role in the development of this type of cancer. To determine whether CD39 and CD73, which participate in the production of immunosuppressive adenosine (Ado), are involved in the progression of CC, we compared the concentrations and hydrolytic activity of these ectonucleotidases in platelet-free plasma (PF) samples between patients with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs) ( $n = 18$ ), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs) ( $n = 12$ ), and CC ( $n = 19$ ) and normal donors (NDs) ( $n = 15$ ). The concentrations of CD39 and CD73 in PF increased with disease progression ( $r = 0.5929$ ,  $p < 0.001$ ). The PF of patients with HSILs or CC showed the highest concentrations of CD39 (2.3 and 2.2 times that of the NDs, respectively) and CD73 (1.7 and 2.68 times that of the NDs, respectively), which were associated with a high capacity to generate Ado from the hydrolysis of adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP). The addition of POM-1 and APCP, specific inhibitors of CD39 and CD73, respectively,

inhibited the ADPase and AMPase activity of PFP by more than 90%. A high level of the 90 kD isoform of CD73 was detected in the PFP of patients with HSILs or CC. Digestion with endoglycosidase H and N-glycanase generated CD73 with weights of approximately 90 kD, 85 kD, 80 kD, and 70 kD. In addition, the levels of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in the PFPs of patients with LSIL, HSIL and CC positively correlated with those of CD39 ( $r=0.4432$ ,  $p<0.001$ ) and CD73 ( $r=0.5786$ ,  $p<0.001$ ). These results suggest that persistent infection by HR-HPV and the concomitant production of TGF- $\beta$  promote the expression of CD39 and CD73 to favor CC progression through Ado generation.

## 1. Introduction

Cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women and represents a major public health problem worldwide because more than 500,000 new cases and approximately 250,000 deaths are reported each year, more than 80% of which occur in developing countries [1]. Persistent infection by high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is the main factor in the development of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs), which can progress to high-grade lesions (HSILs) and eventually to CC [2]. To date, more than 200 HPV genotypes have been identified, and HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, and HPV-58, which are considered HR-HPVs, are associated with anogenital cancer [3, 4]. Although the immune response against HPV antigens eliminates most infections and precursor lesions, some women exposed to HR-HPV will develop cancer, suggesting that other risk factors may be involved [5]. A growing number of studies have suggested that immunoregulation may play an important role in the development of CC. Recently, the adenosinergic pathway has been proposed to play an important role in essential signaling related to tumor growth, immunosuppression, and metastasis in cancer [6, 7]. In this pathway, the nucleotides adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) increase to high concentrations greater than  $50\ \mu\text{M}$  in response to stress signals, such as hypoxia, damage, and inflammation in the tumor microenvironment (TME), and are hydrolyzed by the ectoenzyme CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, ENTPD1; EC 3.6.1.5) to AMP and subsequently to adenosine (Ado) by the activity of 5'-ectonucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) [8, 9]. Most Ado extracellular signaling activities are mediated by four receptor subtypes (adenosine receptors (ARs): A1R, A2AR, A2BR, and A3R) coupled to G proteins in the target cell membrane [10, 11]. In the TME, high concentrations of Ado ( $10\text{--}100\ \mu\text{M}$ ) are generated through adenosinergic activity and exert important effects on the host, such as an immunosuppressive effect on CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTLs), NK cells, B cells, and dendritic cells by interacting with the high-affinity A2AR [12]. In addition, Ado can promote tumor growth by inducing the proliferation, invasion, and metastasis of tumor cells, mainly through its interaction with A1R, A2AR, and A2BR [13]. Upregulation of CD39 and CD73 in several types of tumors has been associated with a poor clinical prognosis [14, 15]. In addition, extracellular vesicles derived from squamous cell carcinoma of the head and neck [16], prostate cancer [17], neuroblastoma [18], and other types of neoplastic cells [19, 20] can generate an immunosuppressive environment through the generation of Ado from ATP hydrolysis.

Likewise, the presence of high levels of CD73 in the plasma of cancer patients has been correlated with advanced stages of the disease [21–24], suggesting that extracellular adenosinergic activity may play an important role in the pathophysiology of cancer.

Recently, we provided evidence that cells obtained from cervical samples of patients with low-grade intraepithelial neoplasms (CINI) positive for HPV-16 showed higher concentrations of CD39 and CD73 than cells from samples of patients with CINI negative for HPV-16 and from normal donors (NDs). The solubilized cervical mucus of these patients also showed higher concentrations of soluble CD39 and CD73, which was associated with a greater capacity to produce Ado through the hydrolysis of ATP and AMP [25].

To determine whether CD39 and CD73 are involved in the development of CC, we analyzed the concentrations and hydrolytic activity of these ectonucleotidases in plasma samples from patients with LSILs, HSILs, or CC. For comparison, ND plasma samples were also analyzed.

## 2. Methods

**2.1. Biological Material.** Biological samples were obtained from women who attended early detection programs at the Gynecology and Obstetrics Hospital No. 4 of the Mexican Social Security Institute (*Instituto Mexicano del Seguro Social* (IMSS)), the gynecology service of the Oncology Hospital of CMN SXXI of the IMSS, Mexico City, Mexico, and the Western National Medical Center (CMNO-IMSS) in Guadalajara, Jalisco, Mexico, between April 2016 and May 2018 after signing the informed consent form endorsed by the local bioethics committee. Women without cervical lesions were diagnosed by conventional cytology (Papanicolaou stain) and colposcopy. In cases of precancerous lesions or CC, the diagnosis was confirmed by histopathology. The cytologies and biopsies were analyzed by the pathologists of each clinic and were classified according to the Bethesda System 2001 [26] as follows: negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM); cervical intraepithelial neoplasia grades I, II, and III (CINI, CINII, and CINIII, respectively); and invasive CC. To analyze the data, the lesions were grouped according to the classification of the squamous intraepithelial lesion (SIL), either low-grade SIL (LSIL, corresponding to the histological classification of CINI) or high-grade SIL (HSIL, corresponding to the histological classification of CINII and CINIII). Samples diagnosed as CC constituted the last group.

Cervical samples from women diagnosed with NILM were collected during gynecological examinations with a cytobrush (Cytobrush®, STERYLMEDICAL Co., Yangon, Myanmar) and then placed in transport medium (PreservCyt Solution; Hologic, Bedford, MA) to be stored at 4°C until

DNA extraction. The samples were analyzed by conventional single-round polymerase chain reaction (PCR) to rule out the presence of HPV using the MY09/MY11 primers [27]; women who were consistently negative in clinical and molecular tests were considered NDs. As a positive control, DNA from the HeLa cell line (HPV-18<sup>+</sup>) was used as previously reported [28].

The cervical samples of women diagnosed with SILs or CC were subjected to molecular analysis by PCR using the LINEAR ARRAY® HPV kit (Roche Diagnostics, CA, USA) for genotyping of the 37 main types of HPV that infect the anogenital region (HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55 (HPV-44 subtype), HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-61, HPV-62, HPV-64 (HPV-34 subtype), HPV-66, HPV-67, HPV-68, HPV-69, HPV-70, HPV-71, HPV-72, HPV-73 (MM9), HPV-81, HPV-82 (MM4), HPV-83 (MM7), HPV-84 (MM8), IS39 (HPV-84 variant), and HPV-89 (CP6108)). In each sample, the human beta-globin gene was amplified as an internal control. After the hybridization reaction, the strips were visually read against a reference guide. All procedures followed the manufacturer's instructions.

The peripheral blood samples used in this study were obtained from 15 NDs, 18 patients with LSILs, 12 patients with HSILs, and 19 patients with CC (Tables 1 and 2). The samples were collected in vacutainer tubes with an ACD anticoagulant (Becton Dickinson, USA) and centrifuged at  $385 \times g$  for 10 min to isolate the plasma. The blood plasma was centrifuged at  $2422 \times g$  for 10 min at 4°C to separate platelets as previously reported [29]. Soluble CD39 and CD73 were quantified in platelet-free plasma (PFP).

**2.2. Detection and Quantification of Soluble CD39 and CD73 in PFP.** CD39 and CD73 were detected in PFP by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data were interpolated in type curves using different concentrations (1-35 ng/ml) of human recombinant enzymes (rhCD39 and rhCD73, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluted in phosphate-buffered saline (PBS). PFP was diluted with PBS, and CD39 was detected in PFP diluted to 1:40,000 and CD73 to 1:25,000. Samples of 100  $\mu$ l of the different dilutions were placed in triplicate in 96-well flat-bottomed ELISA/radioimmunoassay plates (Corning Inc., USA). The plates were incubated for 1 h at 37°C and then overnight at 4°C. The plates were washed with a washing solution (PBS 0.1% Tween-20) and then incubated with a blocking solution (2% BSA *w/v* in PBS 0.1% Tween-20) for 2 h at 37°C. After washing, an anti-CD39 or anti-CD73 antibody (Novus Biologicals, USA) was added at a 1:1000 dilution in blocking solution and incubated for 2 h at 37°C. The plates were washed six times and incubated with the secondary goat anti-mouse or anti-rabbit IgG bound to alkaline phosphatase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a 1:500 dilution in blocking solution and incubated for 2 h at 37°C. After eight washes, the substrate for alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in diethanolamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to

TABLE 1: Clinical data of normal donors.

Cervical sample number	HPV genotypes	Age (years)	Number of sexual partners	Number of pregnancies
1	—	32	2	2
2	—	31	4	0
3	—	27	2	1
4	—	28	1	1
5	—	37	2	2
6	—	28	3	0
7	—	32	2	1
8	—	26	1	0
9	—	41	3	3
10	—	25	4	0
11	—	31	2	0
12	—	22	1	0
13	—	29	2	0
14	—	41	3	2
15	—	39	2	3
Averages	—	31.2	2.26	1

10% (pH 9.8). Finally, the reading was performed at a wavelength of 405 nm in an ELISA plate reader.

**2.3. Hydrolytic Activity of Soluble CD39 and CD73.** To determine the hydrolytic activity of CD39 and CD73 ectonucleotidases contained in the PFP, 5  $\mu$ l of each PFP sample was incubated in the presence of ADP or AMP at a final concentration of 5 mM. After 72 h of incubation, Ado production was evaluated. To inhibit the enzymatic activity of CD39 and CD73, the specific inhibitors polyoxotungstate sodium (POM-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphate (APCP, Sigma-Aldrich), respectively, were used at a final concentration of 5 mM, as previously described [30]. The total volume of each reaction was 100  $\mu$ l. The amount of Ado produced by each sample incubated with ATP or AMP was evaluated through ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) after applying 25  $\mu$ l of each reaction to a chromatograph (UPLC Acquity, Waters Corporation, Milford, MA, USA) using a mobile phase composed of 0.5% acetonitrile, 5% methanol, and 94.5% sodium acetate (0.25 M and pH 6.3). Before reading, the samples were filtered through 3000 D Amicon filters (Millipore Corporation, USA). A standard Ado curve was prepared in Empower 3 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) to evaluate the Ado concentrations in the different samples.

**2.4. Quantification of TGF- $\beta$ 1.** To quantify the TGF- $\beta$ 1 in PFP samples, the Quantikine human TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (R&D Systems) was used according to the manufacturer's protocol.

**2.5. Western Blot.** To analyze the presence of CD73, samples of 3  $\mu$ l of each PFP or 20 ng of CD73 contained in the PFP (based on the rhCD73 type curve) were treated with Laemmli

TABLE 2: Clinical data of patients with different cervical squamous cell abnormalities.

Cervical sample number	HPV genotypes	Age (years)	Number of sexual partners	Number of pregnancies
LSIL				
1	16, 58, 61	36	2	1
2	53	29	2	2
3	16, 33, 35, 52, 58	43	3	2
4	33, 71	32	3	2
5	16, 54	25	3	3
6	67	39	3	3
7	16	28	4	2
8	16, 33	43	2	4
9	66	27	3	2
10	73, 83	28	2	2
11	84	29	3	2
12	89	31	1	2
13	59, 66, 73	21	2	1
14	59	34	2	1
15	40, 52, 53, 66, 70	24	2	1
16	53	40	3	2
17	83	41	2	1
18	16	40	2	1
Averages	—	32.7	2.44	1.88
HSIL				
1	16	36	5	3
2	51, 52	29	3	4
3	45, 33	37	4	3
4	16	42	2	4
5	56, 66	44	3	2
6	16, 39	41	3	5
7	18	39	4	3
8	16	46	2	5
9	16, 45	33	3	2
10	18, 33, 45, 52	27	3	4
11	18, 53	30	4	4
12	16	34	4	3
Averages	—	36.5	3.3	3.5
SCC				
1	45, 84	42	3	4
2	33	53	2	3
3	16	39	4	4
4	16	49	2	5
5	16, 52	57	2	6
6	31	48	4	3
7	69, 71, 81, 84	62	3	4

TABLE 2: Continued.

Cervical sample number	HPV genotypes	Age (years)	Number of sexual partners	Number of pregnancies
8	39, 68	53	2	2
9	16	45	4	4
10	16, 18	38	3	5
11	16	46	3	6
12	45	40	2	5
13	45, 72	42	2	6
14	16, 62	52	2	4
15	16, 18, 52	51	3	3
16	16	35	2	4
17	18, 45	49	3	3
18	16	55	2	5
19	16, 52	50	3	4
Averages	—	47.68	2.68	4.2

buffer and analyzed by 10% sodium dodecyl sulfate- (SDS-) polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Protran, 0.2  $\mu\text{m}$ ), which was incubated with blocking solution (TBS 0.1% Tween-20 and 5% BSA) for 60 min at room temperature. The membrane was washed twice with washing solution (TBS 0.1% Tween-20) and then incubated with anti-CD73 (Novus Biologicals, USA) at a 1:1000 dilution in blocking solution overnight at 5°C. After five washes, the membrane was incubated with the secondary antibody (HRP goat anti-rabbit) at a 1:1500 dilution with blocking solution for 1 h. After five washes, the presence of CD73 in the membrane was revealed in ChemiDoc (Life Science Research Bio-Rad, USA) using the Chemiluminescent Peroxidase Substrate (Sigma-Aldrich, USA).

**2.6. Enzymatic Deglycosylation.** To deglycosylate CD73 contained in PFP samples, these samples were incubated for 5 min at 37°C in the presence of 1.5  $\mu\text{l}$  of a denaturing solution (1 M  $\beta$ -mercaptoethanol and 2% SDS). Next, the endoglycanase H (Genzyme, Co., USA) and N-glycanase (Genzyme, Co., USA) enzymes were added to a final concentration of 0.05 U/ml and incubated for 18 h at 37°C. Last, the products of enzymatic digestion were analyzed by Western blot using the anti-CD73 antibody as described above.

**2.7. Statistical Analysis.** All numerical data are presented as the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. The comparisons and correlations were evaluated by multivariate statistical analysis with GraphPad Prism version 7 (La Jolla, CA, USA).

### 3. Results

**3.1. Characteristics of the Participants.** The present study was carried out with 64 cervical and peripheral blood samples from women who attended early cancer detection programs at the Gynecology and Obstetrics Hospital No. 4 of the IMSS

TABLE 3: Correlations between clinical data of NDs and patients with different cervical squamous cell abnormalities.

The clinical data	ND	LSIL	Patients HSIL	SCC	<i>p</i> values
Age (years)	31.26 ± 5.86	32.77 ± 6.94	36.5 ± 6.11 <sup>a</sup>	47.68 ± 7.08 <sup>b,c,d</sup>	a < 0.03 vs. ND b < 0.0001 vs. ND c < 0.0001 vs. LSIL d < 0.0001 vs. HSIL
Number of sexual partners	2.26 ± 0.96	2.44 ± 0.7	3.3 ± 0.88 <sup>e,f</sup>	2.6 ± 0.75 <sup>g</sup>	e < 0.006 vs. ND f < 0.005 vs. LSIL g < 0.03 vs. HSIL
Number of pregnancies	1.13 ± 0.2	1.88 ± 0.83 <sup>h</sup>	3.5 ± 1 <sup>i,j</sup>	4.2 ± 1.1 <sup>k,l</sup>	h < 0.01 vs. ND i < 0.0001 vs. ND j < 0.0001 vs. LSIL k < 0.0001 vs. ND l < 0.001 vs. LSIL

ND: normal donor; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion; SCC: squamous cell carcinoma. *p* values were calculated using the Wilcoxon signed-rank test and Student's *t*-test.

and the gynecology service of the Oncology Hospital of CMN SXXI of the IMSS, Mexico City, Mexico, and the Western National Medical Center (CMNO-IMSS) in Guadalajara, Jalisco, Mexico. According to the cytological and histopathological analysis, 15 samples came from ND women (Table 1), 18 LSIL patients, 12 HSIL patients, and 19 CC patients (Table 2). All samples and clinical data of the participants were taken after obtaining informed consent according to ethical requirements and confidentiality related to the sampling of humans in the institutions involved.

To rule out the presence of HPV infection in the samples of NILM women, DNA was obtained from the cervical samples for molecular analysis by PCR using the consensus oligonucleotides MY09 and MY11, which amplify a conserved fragment of 450 bp of the gene coding the L1 protein of the different HPV genotypes. As a positive control, DNA from the HeLa cell line (HPV-18<sup>+</sup>) was used (Supplementary Figure 1). Nineteen cervical samples from NILM women were analyzed, 15 of which were negative for HPV infection and were included in the study as ND samples. The average age of the NDs was 31.2 (range 22-41) years (Table 1), that of women with LSILs was 32.7 (range 21-43) years, that of women with HSILs was 36.5 (range 27-46) years, and that of women with CC was 47.68 (range 35-62) years (Table 2). The average numbers of sexual partners and pregnancies in the ND group were 2.26 (range 1-4) and 1 (range 0-3), respectively (Table 1). In patients with LSILs, the average numbers were 2.44 (range 1-4) and 1.88 (range 1-4), respectively; in patients with HSILs, the average numbers were 3.3 (range 2-5) and 3.5 (range 2-5), respectively; and in patients with CC, the average numbers were 2.68 (range 2-4) and 4.2 (range 3-6), respectively (Table 2). All cervical samples from patients with SILs were positive for HR-HPV. The most frequent genotypes were HPV-16 (22/49, 44%), HPV-45 and HPV-52 (7/49, 14%), HPV-18 and HPV-33 (6/49, 12%), and HPV-53 (3/49, 6%) (Table 2). Likewise, 25/49 patients had coinfection with two or more HPV genotypes, 8/18 (44.4%) of which were in patients with LSILs, 7/12 (58%) were in patients with HSILs, and 10/19

(52.6%) were in patients with CC. Patients with HSILs or CC also reported significantly greater numbers of sexual partners (averages of 3.3 and 2.6, respectively) and pregnancies (3.5 and 4.2, respectively) than NDs, whose averages were 2.26 and 1.13, respectively (Table 3).

**3.2. PFP Samples from Patients with HSILs or CC Are High in Soluble CD39 and CD73.** To measure soluble CD39 and CD73 in the PFP, rhCD39 curves (Figure 1(a)) and rhCD73 curves (Figure 1(c)) were established using concentrations of 5-30 ng/ml of each recombinant protein. To detect CD39 and CD73, the PFP of the NDs and of the women with LSILs, HSILs, or CC were diluted with PBS at ratios of 1:40,000 and 1:25,000, respectively. The amounts of soluble CD39 and CD73 in the PFP increased according to the degree of disease progression. Patients with LSILs, HSILs, and CC showed significantly more CD39 (averages, 6459 ± 1232 ng/ml, 8333 ± 1440 ng/ml, and 7728 ± 1198 ng/ml, respectively) than the NDs, whose average was 3839 ± 824 ng/ml (Figure 1(b)). The CD39 concentration in the PFP of patients with HSILs or CC, who showed the highest CD39, was 2.3 and 2.2 times that of the ND group, respectively (Figure 1(b)). Patients with LSILs, HSILs, or CC also showed significantly higher amounts of CD73 in the PFP (averages, 2638 ± 630 ng/ml, 3181 ± 863 ng/ml, and 5053 ± 396 ng/ml, respectively) than NDs who showed an average of 1880 ± 228 ng/ml (Figure 1(d)). The CD73 concentration in the PFP of patients with HSILs or CC, who showed the highest CD73, was 1.7 and 2.68 times that of the ND group, respectively (Figure 1(d)). Unlike NDs, who showed a low correlation between the levels of CD39 and CD73 in PFP ( $r = 0.1104$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2(a)), the LSIL, HSIL, and CC groups had a positive correlation between the concentrations of these ectonucleotidases in PFP ( $r = 0.5929$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2(b)).

**3.3. PFP Samples from Patients with HSILs and CC Show a High Capacity to Generate Ado through Hydrolysis of ADP and AMP.** To analyze the hydrolytic activity of the CD39

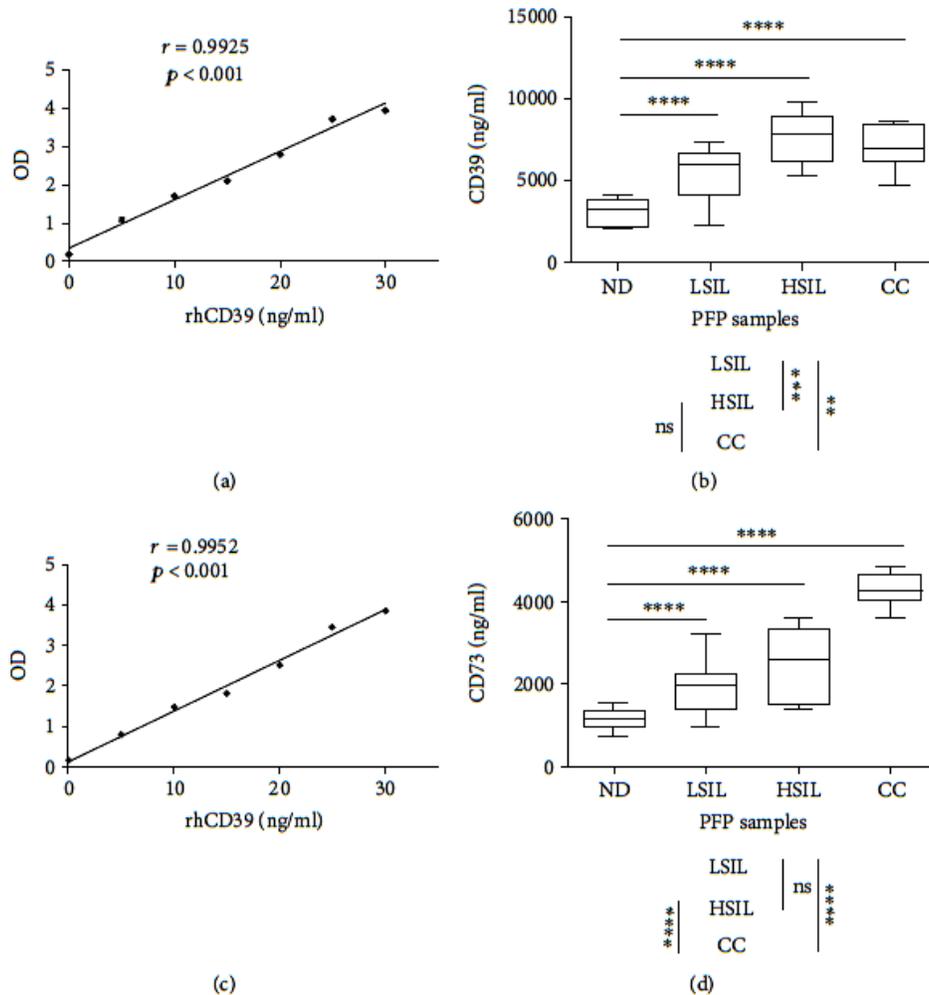


FIGURE 1: CD39 and CD73 concentrations in PFP samples from NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC. The type curves for soluble CD39 and CD73 were established by ELISA using different concentrations (5–30 ng/ml) of human recombinant proteins CD39 (rhCD39) (a) and CD73 (rhCD73) (c), whose correlations with absorbance (optical density) were  $r = 0.9925$  ( $p < 0.001$ ) and  $r = 0.9952$  ( $p < 0.001$ ), respectively. For the detection of CD39 and CD73, the PFP samples of the NDs and women with LSILs, HSILs, or CC were diluted with PBS at ratios of 1:40,000 and 1:25,000, respectively. The data are representative of three independent experiments. The means  $\pm$  SEMs of the concentrations of soluble CD39 (b) and CD73 (d) detected in the PFP of the NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC are shown. Significant differences are indicated by \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ). ns: not significant.

and CD73 ectonucleotidases contained in the PFP samples from NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC, samples of 5  $\mu$ l of each PFP were incubated in the presence of 5 mM ADP or AMP (total volume 100  $\mu$ l) and in the presence or absence of POM-1 or APCP, specific inhibitors of CD39 and CD73, respectively. Aliquots of each reaction were taken at the beginning and after 72 h of incubation to evaluate Ado production through UPLC. Using different concentrations (0.1–10  $\mu$ M) of synthetic Ado as reference standards (Figure 3(a)), we found that the PFP derived from patients with HSIL or CC generated significantly higher amounts of Ado than the PFP of NDs or LSIL patients. The average Ado concentration produced by the ND PFP when incubated in the presence of ADP or AMP was 0 or 12.63  $\pm$  2.3  $\mu$ M, respectively (Figure 3(b)), and that of the patient groups was 0 or 53.9  $\pm$  7.88 (LSIL), 52.1  $\pm$  1.3 or 202.9  $\pm$  13.10 (HSIL), and 143.2  $\pm$  7.01 or 401.3  $\pm$  22.7  $\mu$ M (CC), respec-

tively (Figure 3(b)). Interestingly, the addition of 5 mM POM-1 or APCP decreased the ability of PFP to hydrolyze ADP and AMP by more than 90% in all cases (Figure 3(b)).

**3.4. The PFP of Patients with HSILs or CC Contains Highly Glycosylated CD73.** CD73 has four N-glycosylation motifs, and changes in glycosylation at one or more of these sites can alter its AMPase activity [31]. To determine whether the strong hydrolytic activity of CD73 detected in the PFP of patients with HSILs or CC was related to the degree of glycosylation, samples of 3  $\mu$ l of PFP (Figure 4(a)) or 20 ng of CD73 contained in the PFP (Figure 4(b)) were analyzed by Western blot using anti-CD73 antibodies. Two bands with weights of 70 kD and 90 kD approximately were revealed. Interestingly, the density of the 90 kD band detected in the PFP increased with disease progression (Figures 4(a) and 4(b)). Likewise, the 70 kD band showed higher density in

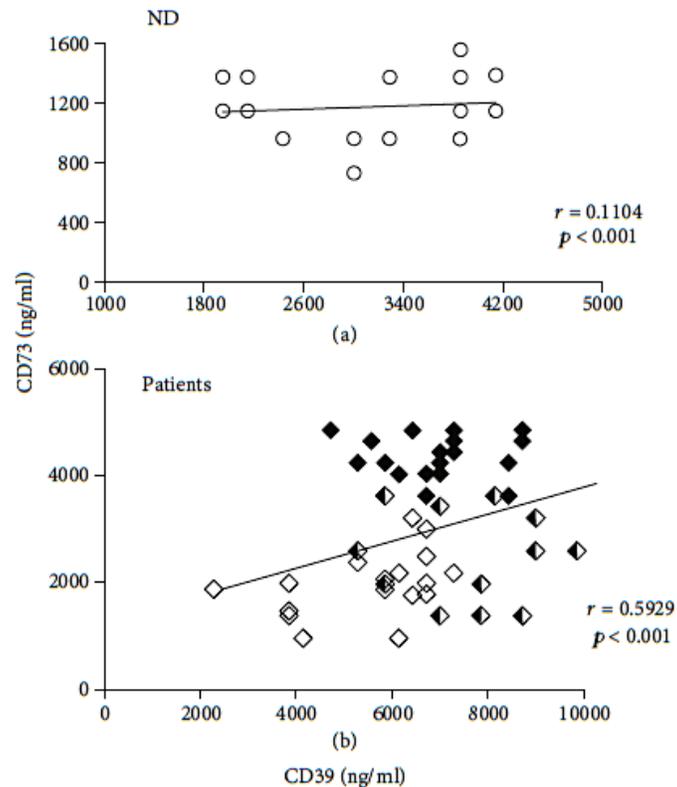


FIGURE 2: Correlations between the concentrations of CD39 and CD73 in the PFP of NDs and in the PFP of patients (LSILs, HSILs, and CC together). The correlations ( $r$ ) between the concentrations of CD39 and CD73 in the ND PFP samples (open circles) are shown ( $r = 0.1104$ ,  $p < 0.001$ ) (a), as well as the correlations for patients with LSILs (white diamonds), HSILs (black and white diamonds), and CC (black diamonds) (b) ( $r = 0.5929$ ,  $p < 0.001$ ).

the PFP of patients with HSILs or CC than in that of the LSIL or ND groups when equal volumes of PFP were analyzed (Figure 4(a)). On the other hand, when using the same amount of CD73 (20 ng), the density of the 70 kD band was similar between the PFP samples. However, a greater density of the 90 kD band was noted in the samples of the patients with LSILs, HSILs, or CC than in the ND samples (Figure 4(b)). To determine whether the 90 kD band corresponded to a highly glycosylated CD73 isoform, 20 ng samples of CD73 contained in the PFP were subjected to deglycosylation using the endoglycosidase H and N-glycanase enzymes. Enzymatic digestion of PFP samples with these enzymes resulted in products of approximately 90, 85, 80, and 70 kD according to Western blot analysis with the anti-CD73 antibody (Figure 4(c)). Samples from patients with CC showed bands corresponding to these four products. Notably, the samples of patients with HSILs and CC presented an 85 kD product, which was not detected in the samples of patients with LSILs or NDs, while an 80 kD product was detected in the samples of LSIL patients and NDs (Figure 4(c)). These results suggest that the greater hydrolytic capacity of CD73 detected in the PFP of patients with HSILs or CC may be related to a higher concentration of a highly glycosylated CD73 isoform.

### 3.5. The PFP of Patients with HSILs or CC Has Higher TGF- $\beta$ than the PFP of Patients with LSILs and NDs. TGF- $\beta$ plays an

important role in promoting HPV infection and local suppression in HPV-associated neoplasms [32]. Likewise, the levels of TGF- $\beta$  increase with the severity of cervical lesions, and the strong expression of this cytokine has been associated with poor survival in patients with CC [33, 34]. On the other hand, we recently reported that in patients with low-grade cervical neoplasms and persistent infection by HR-HPV, the highest level of expression of CD73 in cervical cells was associated with higher plasma TGF- $\beta$  in relation to that found in NDs [25]. Likewise, we reported that TGF- $\beta$  is important in inducing and maintaining the expression of CD73 in CC tumor cells [35]. Therefore, we proceeded to analyze the levels of this cytokine in the PFP of patients with LSILs, HSILs, or CC and compare these values with the ND value. We observed that patients with HSILs and CC, who showed the highest levels of CD39 and CD73, also showed the highest levels of TGF- $\beta$ . The average concentration of TGF- $\beta$  contained in the ND PFP was  $350 \pm 61$  pg/ml, while that of LSIL, HSIL, and CC was  $634 \pm 122$ ,  $749 \pm 155$ , and  $954 \pm 152$  pg/ml, respectively (Figure 5(a)). In addition, we found a positive correlation between the concentrations of TGF- $\beta$  with CD39 or CD73, in the PFP of patients with LSIL, HSIL, or CC ( $r = 0.4432$ ,  $p < 0.001$  (Figure 5(c)) and  $r = 0.5786$ ,  $p < 0.001$  (Figure 5(e)), respectively). In the PFP of the ND groups, the correlations were  $r = 0.2647$  ( $p < 0.001$ ) (Figure 5(b)) and  $r = 0.2502$  ( $p < 0.001$ ) (Figure 5(d)), respectively.

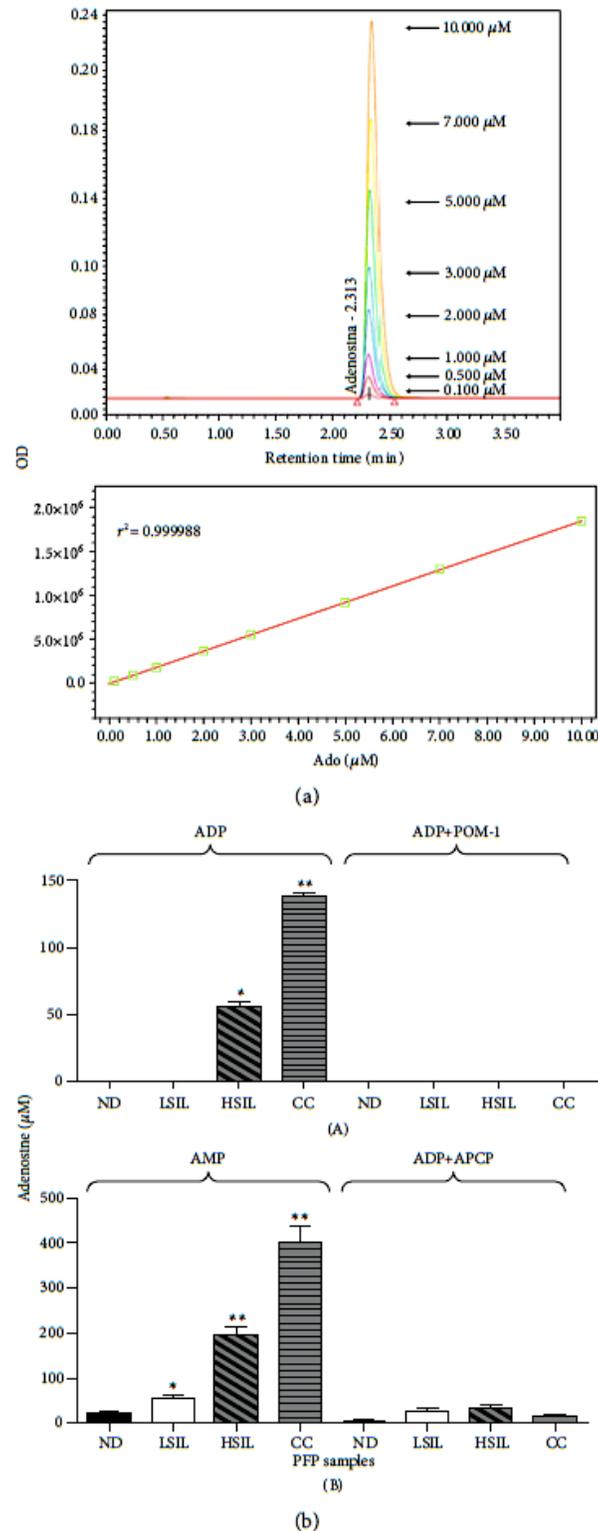


FIGURE 3: Catalytic activity of CD39 and CD73 in PFP of NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC. Aliquots of  $5 \mu\text{l}$  of PFP from NDs (black bars), patients with LSILs (white bars), patients with HSILs (diagonal lines), and patients with CC (horizontal lines) were incubated in the presence of  $5 \text{ mM}$  ADP or AMP (total volume  $100 \mu\text{l}$ ) and in the presence or absence of POM-1 or APCP, specific inhibitors of CD39 and CD73, respectively. (a) The Ado produced by hydrolysis of the nucleotides was quantified after 72h by UPLC using standard concentrations of synthetic Ado (upper). A representative linear relationship between the Ado concentration and the optical density is shown (lower). (b) The amount of Ado produced during the incubation of PFP with ADP (upper) or AMP (lower) and in the presence or absence of POM-1 or APCP is shown. Differences in Ado concentrations were analyzed by two-way ANOVA. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$ . The data represent three independent experiments.

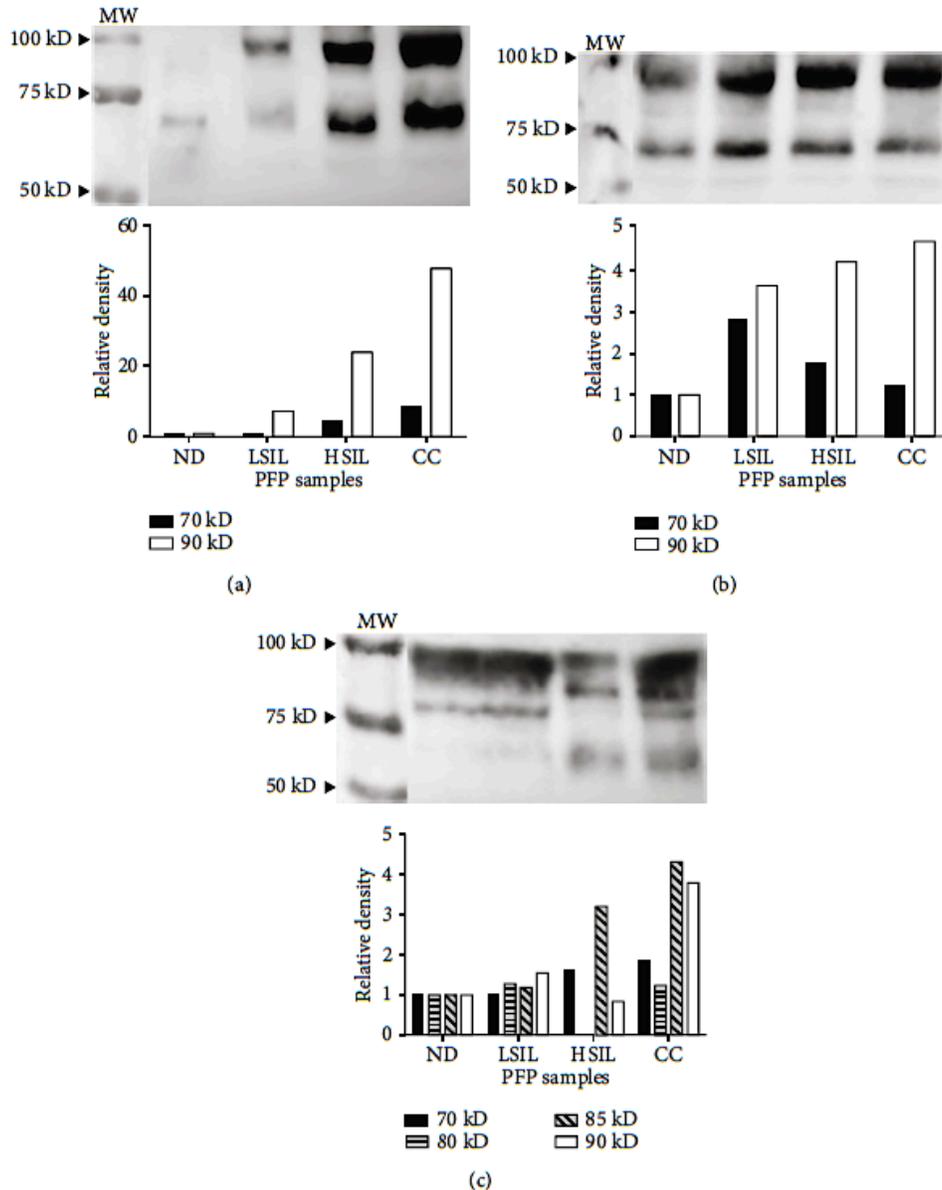


FIGURE 4: Detection of CD73 in the PFP of NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC. Samples of 3  $\mu$ l of PFP (a) or 20 ng of CD73 contained in the PFP (b) of the ND, LSIL, HSIL, and CC groups were analyzed by Western blot using the anti-CD73 antibody. The densities of the 70 kD (black bars) and 90 kD (white bars) bands detected in the samples of patients with LSILs, HSILs, or CC relative to those of NDs (set to 1) are shown. (c) Twenty-nanogram samples of CD73 contained in PFP were subjected to deglycosylation using the enzymes endoglycosidase H and N-glycanase. The densities of the 70 kD (black bars), 80 kD (bars with horizontal lines), 85 kD (bars with diagonals), and 90 kD (white bars) bands detected in the LSIL, HSIL, and CC samples relative to the ND samples (set to 1) are shown. MW: molecular weight. A representative test of three independent tests is shown.

#### 4. Discussion

In the last 10 years, cancer research has especially focused on the role played by Ado-, CD39-, and CD73-producing ectoenzymes in immunomodulation and evasion of the antitumor immune response. In fact, inhibition of the adenosinergic pathway in the tumor microenvironment has been proposed as an indispensable alternative in oncological therapy [36, 37]. However, large gaps in knowledge prevent the development of effective Ado-based therapies, such as the roles of redundant pathways that control ATP and Ado

levels. Thus, the concentrations and activity of circulating ectoenzymes in the bloodstream of cancer patients may be useful as biomarkers of disease progression and to devise therapeutic strategies [38].

Our working group recently reported higher expression levels of CD39 and CD73 in cells obtained from cervical samples of patients with CINI positive for HPV-16 than in cells from HPV-16-negative samples and ND samples, which correlated with the presence of higher levels of CD39 and soluble CD73 in cervical mucus with the capacity to produce Ado through hydrolysis of ATP and AMP [25]. However, to

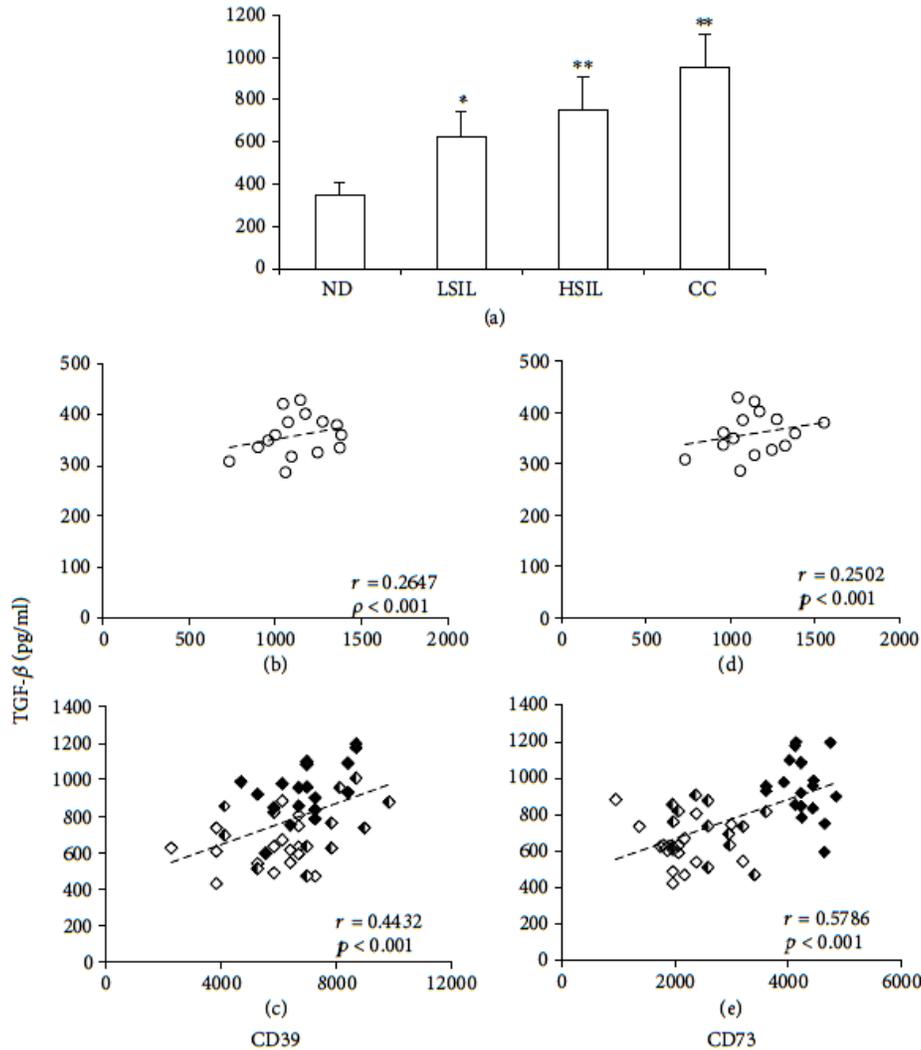


FIGURE 5: TGF- $\beta$  concentrations in PFP samples from NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC and their correlations with the concentrations of CD39 and CD73. (a) The TGF- $\beta$ 1 content is shown in PFP samples taken from NDs and patients with LSILs, HSILs, or CC. The data are representative of three independent experiments, and the means  $\pm$  SEMs are shown. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  for the concentration of TGF- $\beta$ 1 in a patient group relative to the ND group. The correlations ( $r$ ) between the levels of TGF- $\beta$ 1 and CD39 or CD73 in the PFP of NDs were  $r = 0.2647$  ( $p < 0.001$ ) (b) and  $r = 0.2502$  ( $p < 0.001$ ) (d), respectively. For patients with LSILs, HSILs, or CC, the correlations were  $r = 0.4432$  ( $p < 0.001$ ) (c) and  $r = 0.5786$  ( $p < 0.001$ ) (e), respectively. The coordinates of the TGF- $\beta$ 1 concentration with the CD39 or CD73 concentration are indicated by white circles in the ND group, white diamonds in the LSIL group, white and black diamonds in the HSIL group, and black diamonds in the CC group.

determine whether adenosinergic activity is associated with the degree of disease progression, here, we analyzed the concentrations and activity of CD39 and CD73 in the PFP of patients with LSILs, HSILs, or CC and compared them with those of NDs. Interestingly, we found that the concentrations of CD39 and CD73 in PFP increased with the degree of disease progression. The PFP of patients with HSILs or CC showed a CD39 content 2.3 and 2.2 times that of the NDs, respectively, and a CD73 content 1.7 and 2.68 times that of the NDs. The concentrations of CD39 and CD73 in the PFP of these patients were associated with a high capacity to generate Ado from the hydrolysis of ADP and AMP. ADPase and AMPase activities were reduced by the addition of POM-1 and APCP, specific inhibitors of CD39 and CD73,

respectively, suggesting that during the development of CC, alteration of nucleotide metabolism is promoted to generate increased levels of circulating Ado through the activity of these ectonucleotidases. ATPase/ADPase and AMPase activities mediated by CD39 and CD73, respectively, in the body fluids of patients with inflammatory diseases and cancer have been recently reported [39, 40]. In the context of cancer, increased expression and activity of CD39 and CD73 in tissues and/or biological fluids can lead to high levels of Ado that potentially suppress the T cell-mediated antitumor immune response and promote tumor progression through stimulation of ARs [7, 41]. In fact, higher serum CD73 in patients with metastatic melanoma has been associated with lower effectiveness of nivolumab-based immunotherapy [24].

TABLE 4: Correlation analysis of the clinical data of normal donors and patients with SIL and the plasmatic contents of the nucleotidases CD39 and CD73.

Nucleotidase	Normal donors			SIL patients			<i>p</i> values
	Age (years)	Number of sexual partners	Number of pregnancies	Age (years)	Number of sexual partners	Number of pregnancies	
CD39	-0.06017	-0.2257	0.0721	0.1308	0.3312 <sup>a</sup>	0.3512 <sup>b</sup>	a < 0.0201 b < 0.0134
CD73	0.3028	0.2277	0.2284	0.5868 <sup>c</sup>	0.1542	0.6387 <sup>d</sup>	c < 0.0001 d < 0.0001

Values of Pearson's coefficient (*r*) are shown.

The increase in soluble CD73 found in PFP samples from patients with HSILs or CC in our study is consistent with reports of increased hydrolytic activity of AMP in the plasma of patients with advanced cancer [22, 42]. Interestingly, the increased AMPase activity found in the PFP of patients with HSILs or CC was also associated with a high concentration of a highly glycosylated 90 kD protein as revealed by Western blot assays using the anti-CD73 antibody. CD73 has four consensus N-glycosylation motifs, <sup>53</sup>NAS, <sup>311</sup>NSS, <sup>333</sup>NYS, and <sup>403</sup>NGT, and changes in glycosylation in one or more of these sites can alter the hydrolytic activity of CD73 because the three of them (N311, N333, and N403) are found in the C-terminal catalytic domain of the molecule [31]. In pathological states, the CD73 protein can undergo posttranslational changes, generating different isoforms with catalytically different properties. For example, the increase in AMPase activity in muscular dystrophy has been associated with a higher concentration of an active form of CD73 (72 kD) than an inactive form (62 kD) [43]. On the other hand, in hepatocellular carcinoma, altered CD73 glycosylation is associated with attenuated AMPase activity due to greater production of an isoform that is 50 amino acids shorter than the complete protein [44, 45]. We found that enzymatic digestion of the PFP samples using endoglycosidase H and N-glycanase resulted in products of 90, 85, 80, and 70 kD, which were observed mainly in the PFP samples of patients with HSILs or CC, suggesting that the highest degree of CD73 glycosylation in the plasma of these patients was associated with a higher AMPase capacity. In addition, the high level of CD39 and high glycosylation of CD73 in the PFP of these patients suggest that both ectonucleotidases act in a coordinated manner to generate an immunosuppressive environment through the generation of Ado, as has been proposed in other cancers [22, 42]. TGF- $\beta$  increases the levels of CD39 and CD73 in activated T cells and myeloid suppressor cells [13]. The expression of TGF- $\beta$ 1 in CC has been directly correlated with the degree of disease progression [34] and with the expression of the HR-HPV E6 and E7 oncogenes, which induce activation of the human TGF- $\beta$ 1 promoter by recognizing the Sp1 sequence [46]. We previously reported that CC tumor cells infected with HR-HPV constitutively produce TGF- $\beta$ , which is important for inducing and maintaining CD73 expression. We also demonstrated that Ado generated by the enzymatic activity of CD73 induced the production of TGF- $\beta$  in tumor cells by interacting with A2AR and A2BR, suggesting an important connection between the adenosinergic pathway and the production

of TGF- $\beta$  in cells infected with HPV [35]. In this study, we found a significantly higher level of TGF- $\beta$  in the PFP of patients with LSILs, HSILs, or CC than in that of NDs. In fact, a positive correlation was observed between the TGF- $\beta$  concentration of these patients and the CD39 and CD73 concentrations detected in PFP. In addition, we observed that patients with HSILs or CC, who presented the highest plasma concentrations of TGF- $\beta$ , CD39, and CD73, showed the highest numbers of sexual partners (averages of 3.3 and 2.6, respectively) and pregnancies (averages of 3.5 and 4.2, respectively) in contrast to numbers of 2.2 and 1.1, respectively, in the ND group. A strong correlation was also observed between the number of sexual partners and CD39, as well as between the number of pregnancies and the expression of CD39 and CD73, in patients with LSILs, HSILs, or CC (Table 4), which is consistent with previous reports stating that more sexual partners and pregnancies are the main risk factors associated with persistent infection by HR-HPV and the development of cervical dysplasia and CC [47, 48].

Therefore, the results obtained in this study suggest that the production of TGF- $\beta$  associated with persistent infection by HR-HPV may be an important factor inducing and maintaining the expression of the CD39 and CD73 ectonucleotidases during the development of CC. Considering the important role of the adenosinergic pathway in the suppression of the antitumor immune response through Ado generation [13] and that the presence of high concentrations of extracellular nucleotides in the TME of CC seems to interfere with the regulation, proliferation, differentiation, and apoptosis of cancer cells of the cervix [49], the concentrations and activity of CD39 and CD73 in the plasma of patients with CC may be valuable biomarkers of disease progression and may direct the choice of clinical treatment for these patients.

## 5. Conclusions

This study provides the first evidence that the concentrations of the PFP-soluble CD39 and CD73 ectonucleotidases in patients in different stages of CC development positively correlated with disease progression and the capacity to generate Ado from the hydrolysis of ADP and AMP. The greater AMPase activity found in the PFP of patients with HSILs or CC was associated with a high concentration of a highly glycosylated 90 kD CD73 isoform. The level of TGF- $\beta$  in the PFP of patients with LSILs, HSILs, or CC was significantly higher than that of NDs and showed positive correlations with the levels of CD39 and CD73. These results suggest that

the production of TGF- $\beta$  associated with persistent infection by HR-HPV, which is present in more than 99% of CC cases [1, 50], is a factor that promotes the expression of CD39 and CD73 to favor CC progression through Ado generation.

## Abbreviations

Ado:	Adenosine
ADP:	Adenosine diphosphate
AMP:	Adenosine monophosphate
APCP:	5'-( $\alpha,\beta$ -Methylene) diphosphate
ARs (A1R, A2AR, A2BR, and A3R):	Adenosine receptors
ATP:	Adenosine triphosphate
CC:	Cervical cancer
CD39:	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1
CD73:	5'-Nucleotidase
CINI, CINII, and CINIII:	Cervical intraepithelial neoplasia grades I, II, and III, respectively
CTL:	Cytotoxic T lymphocyte
HR-HPV:	High-risk human papillomavirus
HSIL:	High-grade squamous intraepithelial lesion
LSIL:	Low-grade squamous intraepithelial lesion
NDs:	Normal donors
NILM:	Negative for intraepithelial lesion or malignancy
PCR:	Polymerase chain reaction
PFp:	Platelet-free plasma
POM-1:	Sodium polyoxotungstate
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor- $\beta$
UPLC:	Ultra-high-performance liquid chromatography.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Authors' Contributions

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important content, and all authors approved the final version to be submitted for publication. AMG had full access to all of the data and ensured the accuracy of the data analysis. RMG, MLMG, and AMG were responsible for the study concept and design. ACAL, RGR, JHM, CHADL, LRAI, DBTP, GMC, RCHS, LVC, and SMPT were responsible for data acquisition. RMG, AMG, MLMG, JJMM, and BWS were responsible for the analysis and interpretation of the data.

## Acknowledgments

The present study was carried out with the following funding: Mexican Social Security Institute (Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)) Grants FIS-G14/1314 and FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/114, National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)) Grant No. 240635 to AMG and Grant No. SALUD-2016-1-272793 to JJMM, and DGAPA-PAPIIT Grant No. IN225519 to MLMG. We also appreciate the support given to M. en C. Ricardo Muñoz Godínez for Doctorate Scholarship No. 288691 from CONACyT. Finally, the authors thank the "Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+ D+ i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDIFarBiotec-CONACyT)" for facilitating the use of the UPLC system.

## Supplementary Materials

Supplementary Figure 1: detection of the HPV L1 gene in cervical samples from NILM women. Expression of the L1 gene in cervical samples was detected by PCR as described in Section 2. The absence (left) or presence (right) of L1 is shown in samples from NILM women. As a positive control, DNA from the HeLa cell line (HPV-18<sup>+</sup>) was used. The expression of the  $\beta$ -actin gene in all samples was used as an internal control. The size of the fragment (bp) of each gene is indicated. (*Supplementary Materials*)

## References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [2] C. Woodman, S. Collins, and L. Young, "The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues," *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 11–22, 2007.
- [3] IARC Working Group, "Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens," *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans/World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, vol. 100, pp. 1–441, 2012.
- [4] N. Muñoz, F. X. Bosch, S. de Sanjosé et al., "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 6, pp. 518–527, 2003.
- [5] J. Westrich, C. Warren, and D. Pyeon, "Evasion of host immune defenses by human papillomavirus," *Virus Research*, vol. 231, no. 2, pp. 21–33, 2017.
- [6] A. Bertrand, M. Turcotte, and J. Stagg, "CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, 8 pages, 2012.
- [7] D. Boison and G. G. Yegutkin, "Adenosine metabolism: emerging Concepts for cancer therapy," *Cancer Cell*, vol. 36, no. 6, pp. 582–596, 2019.

- [8] S. Robson, J. Sévigny, and H. Zimmermann, "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance," *Purinergic Signal*, vol. 2, no. 2, pp. 409–430, 2006.
- [9] H. Zimmermann, M. Zebisch, and N. Sträter, "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases," *Purinergic Signal*, vol. 8, no. 3, pp. 437–502, 2012.
- [10] F. Di Virgilio and F. Purines, "Purines, Purinergic receptors, and cancer," *Cancer Research*, vol. 72, no. 21, pp. 5441–5447, 2012.
- [11] J. Linden, "MOLECULAR APPROACH TO ADENOSINERGIC RECEPTORS: receptor-mediated mechanisms of tissue protection," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 41, no. 1, pp. 775–787, 2001.
- [12] L. Antonioli, M. Fornai, C. Blandizzi, P. Pacher, and G. Haskó, "Adenosine signaling and the immune system: when a lot could be too much," *Immunology Letters*, vol. 205, pp. 9–15, 2019.
- [13] D. Vijayan, A. Young, M. Teng, and M. Smyth, "Targeting immunosuppressive adenosine in cancer," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 17, no. 12, pp. 709–724, 2017.
- [14] B. Allard, M. Longhi, S. Robson, and J. Stagg, "The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets," *Immunological Reviews*, vol. 276, no. 1, pp. 121–144, 2017.
- [15] X.-Y. Cai, X.-C. Ni, Y. Yi et al., "Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection," *Medicine (Baltimore)*, vol. 95, no. 40, pp. 1–8, 2016.
- [16] M. Theodoraki, T. Hoffmann, E. Jackson, and T. Whiteside, "Exosomes in HNSCC plasma as surrogate markers of tumour progression and immune competence," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 194, no. 1, pp. 67–78, 2018.
- [17] J. Salimu, J. Webber, M. Gurney, S. Al-Taei, A. Clayton, and Z. Tabi, "Dominant immunosuppression of dendritic cell function by prostate-cancer derived exosomes," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [18] F. Morandi, D. Marimpietri, A. Horenstein, M. Corrias, and F. Malavasi, "Microvesicles expressing adenosinergic ectoenzymes and their potential role in modulating bone marrow infiltration by neuroblastoma cells," *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 5, pp. 1–17, 2019.
- [19] N. Syn, L. Wang, G. Sethi, J. Thiery, and B. Goh, "Exosome-mediated metastasis: from epithelial-mesenchymal transition to escape from immunosurveillance," *Trends Pharmacol*, vol. 37, no. 7, pp. 606–617, 2016.
- [20] A. Clayton, S. al-Taei, J. Webber, M. Mason, and Z. Tabi, "Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 2, pp. 676–683, 2011.
- [21] P. Engroff, V. Sgnaolin, A. Azambujab, F. Violab, A. Battastinic, and F. Morrone, "Increased 5 nucleotidase activity in the blood serum of brain tumor patients," *Vittalle*, vol. 28, pp. 103–110, 2016.
- [22] C. F. F. Gardani, A. R. Cappellari, J. B. de Souza et al., "Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in blood plasma of prostate cancer patients," *Purinergic Signalling*, vol. 15, no. 1, pp. 95–105, 2019.
- [23] H. Lal, L. Kumar, G. Kohli, A. Sharma, and H. Goel, "Serum enzymes in head and neck cancer IV: 5-nucleotidase," *The Journal of Laryngology and Otology*, vol. 103, no. 2, pp. 200–202, 1989.
- [24] S. Morello, M. Capone, C. Sorrentino et al., "Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab," *Journal of Translational Medicine*, vol. 15, no. 244, pp. 1–9, 2017.
- [25] M. de Lourdes Mora-García, S. López-Cisneros, V. Gutiérrez-Serrano et al., "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*, vol. 2019, 13 pages, 2019.
- [26] D. Solomon, D. Davey, R. Kurman et al., "The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology," *JAMA*, vol. 287, no. 16, pp. 2114–2119, 2002.
- [27] H. Bauer, Y. Ting, C. Greer et al., "Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method," *JAMA*, vol. 265, no. 4, pp. 472–477, 1991.
- [28] M. L. Mora-García, L. R. Ávila-Ibarra, R. García-Rocha et al., "Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway," *Cellular Immunology*, vol. 320, pp. 46–55, 2017.
- [29] C. Pilla, T. Emanuelli, S. S. Frassetto, A. M. O. Battastini, R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis, "ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets," *Platelets*, vol. 7, pp. 225–230, 2009.
- [30] M. de Lourdes Mora-García, R. García-Rocha, O. Morales-Ramírez et al., "Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions," *Journal of Translational Medicine*, vol. 14, no. 1, p. 302, 2016.
- [31] K. Knapp, M. Zebisch, J. Pippel, A. el-Tayeb, C. E. Müller, and N. Sträter, "Crystal Structure of the Human Ecto-5'-Nucleotidase (CD73): Insights into the Regulation of Purinergic Signaling," *Structure*, vol. 20, no. 12, pp. 2161–2173, 2012.
- [32] K. Torres-Poveda, M. Bahena-Román, C. Madrid-González et al., "Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia," *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 5, no. 4, pp. 753–763, 2014.
- [33] I. V. Iancu, A. Botezatu, C. D. Goia-Rusanu et al., "TGF-beta signalling pathway factors in HPV-induced cervical lesions," *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, vol. 69, no. 3, pp. 113–118, 2010.
- [34] H. Zhu, H. Luo, Z. Shen, X. Hu, L. Sun, and X. Zhu, "Transforming growth factor- $\beta$ 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer," *Tumour Biology*, vol. 37, no. 6, pp. 7075–7083, 2016.
- [35] R. García-Rocha, A. Monroy-García, J. Hernández-Montes et al., "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*, vol. 118, pp. 71–79, 2019.
- [36] Y. Huang, Z. Gu, Y. Fan et al., "Inhibition of the adenosinergic pathway: the indispensable part of oncological therapy in the future," *Purinergic Signal*, vol. 15, no. 1, pp. 53–67, 2019.
- [37] S. Arab and J. Hadjati, "Adenosine blockage in tumor microenvironment and improvement of cancer immunotherapy," *Immune Network*, vol. 19, no. 4, pp. 1–19, 2019.
- [38] S. Morello, R. Turiello, G. Madonna, A. Pinto, P. Ascierto, and M. Capone, "Enzyme activity of circulating CD73 in human serum," *Methods in Enzymology*, vol. 629, pp. 257–267, 2019.
- [39] E. Schneider, A. Rissiek, R. Winzer et al., "Generation and function of non-cell-bound CD73 in inflammation," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. 1729, pp. 1–8, 2019.

- [40] F. Morandi, D. Marimpietri, A. L. Horenstein et al., "Microvesicles released from multiple myeloma cells are equipped with ectoenzymes belonging to canonical and non-canonical adenosinergic pathways and produce adenosine from ATP and NAD," *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 7, pp. 1–12, 2018.
- [41] T. Jiang, X. Xu, M. Qiao et al., "Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 267, pp. 1–10, 2018.
- [42] Q. Huang, N. Durham, E. Sult et al., *Levels and enzyme activity of CD73 in primary samples from cancer patients*, Research Gate, 2015.
- [43] J. Morete, M. García, F. Campoy, C. Vidal, and E. Muñoz, "Active and inactive ecto-5'-nucleotidase variants in liver of control and dystrophic Lama2dy mice," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 36, no. 6, pp. 422–433, 2004.
- [44] K. P. Alcedo, A. Guerrero, V. Basrur et al., "Tumor-selective altered glycosylation and functional attenuation of CD73 in human hepatocellular carcinoma," *Hepatology Communications*, vol. 3, no. 10, pp. 1400–1414, 2019.
- [45] N. Snider, P. Altshuler, S. Wan, T. Welling, J. Cavalcoli, and M. Omary, "Alternative splicing of human NT5E in cirrhosis and hepatocellular carcinoma produces a negative regulator of ecto-5'-nucleotidase (CD73)," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 25, no. 25, pp. 4024–4033, 2014.
- [46] O. Peralta-Zaragoza, V. Bermúdez-Morales, L. Gutiérrez-Xicotencatl, J. Alcocer-González, F. Recillas-Targa, and V. Madrid-Marina, "E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human transforming growth factor $\beta$ 1 promoter throughout Sp1 recognition sequence," *Viral Immunology*, vol. 19, no. 3, pp. 468–480, 2006.
- [47] A. Giuliano, M. Papenfuss, A. Schneider, M. Nour, and K. Hatch, "Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 8, no. 7, pp. 615–620, 1999.
- [48] E. Smith, S. Johnson, D. Jiang et al., "The association between pregnancy and human papilloma virus prevalence," *Cancer Detection and Prevention*, vol. 15, no. 5, pp. 397–402, 1991.
- [49] M. Pfaffenzeller, M. Franciosi, and A. Cardoso, "Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical cancer," *Purinergic Signal*, vol. 16, no. 1, pp. 123–135, 2020.
- [50] J. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos et al., "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide," *The Journal of Pathology*, vol. 189, no. 1, pp. 12–19, 1999.