



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA 5'-ECTONUCLEOTIDASA
Ó CD73 (EC 3.1.3.5) EN LÍNEAS CELULARES
TUMORALES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

LUIS ROBERTO AVILA IBARRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

ASESOR INTERNO: MA. DE LOURDES MORA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2011



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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de inmunobiología de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza bajo la dirección del Dr. Alberto Monroy García. La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de los proyectos DGAPA-PAPIIT No.IN223010 y FIS/IMSS/PROT/G09/762 y 800.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Dr. Alberto Monroy García y Dra. Ma. De Lourdes Mora García por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, así como el apoyo y toda la ayuda brindada para la realización de éste trabajo.

Al M. en C. Jorge Hernández Montes por sus enseñanzas, asesoría y atención que tuvo conmigo.

Al Dr. Benny Weiss Steider, M. en C. Hugo López Muñoz y M. en C. Yolanda Córdova Galaviz por la atinada revisión de éste trabajo, así como las observaciones y sugerencias realizadas que permitieron enriquecer al mismo.

A la SEP por la Beca Tesis de Licenciatura 2011.

DEDICATORIA

A mis padres, Saúl Avila y Yolanda Ibarra por sus grandes esfuerzos realizados.

A mis hermanos Yohaly, Gabriel y Alonso. Espero ser un ejemplo para ustedes.

A la familia Avila Islas e Ibarra Velázquez.

A mi Gaby. Gracias por acompañarme en todo momento y brindarme todo tu apoyo en las buenas y en las malas.

A mis amigos Berny, Ernesto, Moy, Lalo (2 pesos), Piojo, Rorro, Norma y Coste. Gracias por tantos momentos juntos en la carrera, sin ustedes la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A los biólogos Karina Pérez, Azucena Don, Vianey Gutiérrez, Arturo Osorio e Ivonne Titla. Gracias por todo su apoyo brindado.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunobiología.

A Dios por estar siempre conmigo y permitirme salir adelante.

**“NO LE DIGAS A DIOS QUE TIENES UN GRAN PROBLEMA,
DILE A TUS PROBLEMAS QUE TIENES UN GRAN DIOS”.**

Luis Avila, Noviembre, 2011.

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
**ABREVIATURAS.....	1-2
**RESUMEN.....	3-4
**MARCO TEÓRICO.....	5-26
Cáncer cérvico-uterino (CaCu).....	5
Nomenclatura de CaCu.....	6-7
CaCu y virus del papiloma humano (HPV).....	8
Estructura del HPV.....	10-11
Mecanismo de infección de HPV.....	11-13
Sistema inmune.....	14
Inmunidad Innata.....	14
Inmunidad adaptativa.....	14
Inmunidad humoral.....	15
Inmunidad celular.....	15
Linfocitos T.....	16
Respuesta inmune contra CaCu.....	16-17
Mecanismos de evasión inmune.....	17-19
5'- ectonucleotidasa (CD73).....	20
Generación de adenosina extracelular.....	20-21
Difusión o transporte de adenosina intracelular.....	21
Hidrólisis enzimática del ATP extracelular.....	21-23
Adenosina en la respuesta inmune.....	23-26
**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
**HIPOTESIS.....	28

CONTENIDO	Pág.
**OBJETIVOS	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
**MATERIALES Y METODOS	30-33
Cultivos celulares.....	30
Ensayo de citometría de flujo.....	31
Ensayo de actividad enzimática.....	31
Cromatografía en capa fina (CCF).....	31-32
Obtención y cultivo de linfocitos de sangre periférica (LSP).....	32
Cultivo de LSP con la adenosina producida en los cultivos de las líneas celulares.....	32
Marcaje y conteo de proliferación de linfocitos T cultivados con productos de la actividad funcional de CD73.....	33
**RESULTADOS	34-41
Expresión de CD73 en líneas celulares derivadas de tumores de CaCu.....	34-35
Actividad enzimática de CD73 en las líneas celulares de CaCu.....	34,36-38
La adenosina generada por CD73 en las líneas celulares de CaCu contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T.....	39-40
El bloqueo de los receptores para adenosina en linfocitos T disminuye la actividad supresora de adenosina producida por las células tumorales de CaCu.....	40-41
**ANALISIS DE RESULTADOS	42-47
**CONCLUSIONES	48
**PERSPECTIVAS	49
**ANEXO	50
**APÉNDICE	51
**BIBLIOGRAFÍA	52-64
**BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA	65

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

CONTENIDO	Pág.
**FIGURA 1: Proceso de alteración del epitelio cervical.....	6
**CUADRO 1: Etapas del CaCu.....	7
**FIGURA 2: Infección del HPV en el cérvix.....	8
**FIGURA 3: Representación de la estructura y genoma del HPV.....	10
**CUADRO 2: Clasificación de los tipos de HPV.....	12
**FIGURA 4: Mecanismo de infección del HPV en el cérvix.....	13
**CUADRO 3: Función de las proteínas virales del HPV.....	14
**FIGURA 5: Representación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.....	15
**FIGURA 6: Mecanismos y estrategias inmunosupresoras explotadas por los tumores....	19
**FIGURA 7: Generación de adenosina extracelular a través de hidrólisis enzimática.....	22
**FIGURA 8: Representación de la inhibición de una célula T efectora.....	24
**FIGURA 9: Papel de los receptores A2A de adenosina.....	26
**CUADRO 4: Líneas celulares utilizadas en el estudio.....	30
**FIGURA 10: Expresión de CD73 en las líneas celulares de CaCu.....	35
**FIGURA 11: Actividad enzimática de CD73 en las líneas C33A, Vibo, Caski y Siha.....	36
**FIGURA 12: Actividad enzimática de CD73 en las líneas Hela, Calo, Vipa e Inbl.....	37
**FIGURA 13: Actividad enzimática de CD73 en las líneas Rova, MS-751 y Hacat.....	38
**FIGURA 14: Efecto de la adenosina sobre la proliferación de linfocitos T.....	39
**FIGURA 15: La adenosina generada por las líneas celulares cultivadas con AMP contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T.....	40
**FIGURA 16: La cafeína disminuye el efecto inhibitorio de la adenosina generada por las líneas celulares cultivadas con AMP.....	41
**FIGURA 17: Los sobrenadantes derivados de las líneas celulares contienen concentraciones de IL-10.....	49

ABREVIATURAS

**ADA	adenosina deaminasa
**ADN	ácido desoxirribonucleico
**ADP	adenosina 5' difosfato
**AK	adenosina cinasa (del inglés <i>adenosine kinase</i>)
**AMP	adenosina 5' monofosfato
**AMPc	adenosina 5' monofosfato cíclico
**APCP	adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato
**ARN	ácido ribonucleico
**AR	receptor de adenosina (del inglés <i>adenosine receptor</i>)
**ASC	células escamosas atípicas (del inglés <i>atypical squamous cells</i>)
**ATP	adenosina 5'-trifosfato
**CaCu	cáncer cérvico-uterino
**CCF	cromatografía en capa fina
**CD39	ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1
**CD4	células T colaboradoras
**CD73	5'-ectonucleotidasa
**CD8	células T citotóxicas
**CD	grupo de diferenciación (del inglés <i>cluster of differentiation</i>)
**CIS	carcinoma cervical <i>in situ</i> (del inglés <i>cervical carcinoma in situ</i>)
**CPA	célula presentadora de antígenos
**CTL	linfocito T citotóxico (del inglés <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
**CPM	cuentas por minuto
**DC	células dendríticas (del inglés <i>dendritic cells</i>)
**EC	comisión enzimática (del inglés <i>enzyme comission</i>)
**ENT	transportadores de nucleósidos de equilibrio (del inglés <i>equilibrium of nucleoside transporters</i>)
**GPI	glicosilfosfatidilinositol (del inglés <i>glycosyl phosphatidylinositol</i>)
**HIF	factor inducible por hipoxia (del inglés <i>hypoxia inducible factor</i>)
**HPV	virus del papiloma humano (del inglés <i>human papillomavirus</i>)
**HSIL	lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (del inglés <i>high squamous intraepithelial lesions</i>)
**IFN	interferón
**IL	interleucina
**IMF	intensidad media de fluorescencia
**KD	kilodalton
**LCR	región reguladora no codificante (del inglés <i>large control region</i>)
**LSIL	lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (del inglés <i>low squamous intraepithelial lesions</i>)
**LSP	linfocitos de sangre periférica
**mAb	anticuerpo monoclonal (del inglés <i>monoclonal antibody</i>)
**MHC	complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>major histocompatibility complex</i>)

**NIC	neoplasia intraepitelial cervical
**NK	células asesinas naturales (del inglés <i>natural killer</i>)
**ORF	marco de lectura abierta (del inglés <i>open reading frame</i>)
**pb	pares de bases
**PBS	solución buffer salina de fosfatos (del inglés <i>phosphate buffered saline solution</i>)
**pRb	proteína retinoblastoma
**SFB	suero fetal de bovino
**siRN	ácido ribonucleico de silenciamiento
**SS	sustituto de suero
**TCR	receptor de célula T (del inglés <i>T cell receptor</i>)
**TGF	factor de crecimiento transformante (del inglés <i>transforming growth factor</i>)
**Th	linfocito T auxiliar (del inglés <i>T Helper</i>)
**TNF	factor de necrosis tumoral (del inglés <i>tumor necrosis factor</i>)
**Tregs	linfocitos T reguladores
**UV	luz ultravioleta

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa una de las principales causas de muerte por tumores en las mujeres mexicanas, ya que se diagnostican alrededor de 12,000 casos nuevos de cáncer invasor y mueren alrededor de 6,000 mujeres cada año. El CaCu se asocia de manera etiológica con la infección por el virus de papiloma humano (HPV) de alto riesgo en casi el 100% de los casos, por lo que se ha propuesto que la infección por HPV es una causa necesaria, aunque no la única, para el desarrollo de las neoplasias cervicales. No obstante, a pesar de la infección persistente por algún tipo de HPV de alto riesgo, el desarrollo de las neoplasias cervicales depende también de diversos factores inmersos en el microambiente celular que proveen elementos necesarios para la sobrevivencia y proliferación de las células transformadas o células tumorales, además de facilitar la evasión de la respuesta inmune adaptativa del huésped. Entre estos factores destacan: citocinas inmunosupresoras, quimiocinas, factores proangiogénicos y moléculas que inhiben la activación y función efectora de linfocitos T citotóxicos, tal como la adenosina generada a través de la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina mediado por la enzima 5'-ectonucleotidasa (CD73), vía 4 receptores específicos bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3 (ARs).

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión y la actividad funcional de la CD73 en líneas celulares tumorales derivadas de CaCu. Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de CD73 en 10 líneas celulares: C33A y Vibo (HPV-); Caski y Siha (HPV-16+); Calo, Inbl, Hela Rova y Vipa (HPV-18+) y MS-751 (HPV-45+). La actividad funcional de la enzima se determinó en cultivo celular mediante la conversión de monofosfato de adenosina (AMP) a adenosina y se visualizó mediante cromatografía en capa fina (CCF). Para analizar la capacidad inmunosupresora de la adenosina generada, linfocitos T de sangre periférica de donadores normales fueron estimulados *in vitro* con anticuerpos anti CD3-CD28 en presencia de sobrenadantes de las líneas celulares.

De acuerdo a los resultados, a excepción de Calo, las líneas celulares positivas a la infección por HPV (HPV-18+, HPV-16+ y HPV-45+) mostraron una mayor expresión de CD73 en membrana que aquellas negativas a la infección por HPV. Las líneas celulares Caski, Siha, Calo, Inbl, Hela y Vipa mostraron mayor capacidad para generar adenosina a partir de AMP. La actividad de CD73 fue parcialmente inhibida por la adición del inhibidor específico adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) en los cultivos de las líneas celulares, a excepción de Calo, Vipa e Inbl. La adenosina generada por las células tumorales cultivadas en presencia de AMP contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28. El bloqueo de los receptores para adenosina, con cafeína, inhibió la actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos T en las líneas celulares C33A, Vibo y Rova y la disminuyó en las líneas celulares Caski, Siha, Calo, Inbl, Hela, Vipa y MS-751.

Estos resultados nos permiten concluir que las líneas celulares tumorales de CaCu contribuyen a la inhibición de la proliferación de linfocitos T a través de la vía adenosinérgica mediada por la actividad funcional de CD73, constituyendo un potencial mecanismo inmunosupresor de la respuesta inmune anti-tumoral en el CaCu.

MARCO TEÓRICO

Cáncer cérvico-uterino (Cacu)

Las células cancerosas contradicen las reglas más básicas del comportamiento por las cuales se forman y mantienen los organismos pluricelulares, aprovechando todo tipo de oportunidades para hacerlo, adquiriendo la capacidad de crecimiento descontrolado a través de un proceso de múltiples pasos que implica la transformación gradual de una célula normal a una célula tumoral. Mutación e inactivación posterior de las vías que actúan para frenar la proliferación y, por el contrario, la activación de las que promueven la proliferación, son los eventos clave en el proceso de transformación. Muchas mutaciones se producen en protooncogenes y genes supresores de tumores resultando en células cancerosas (McLaughlin *et al* 2003; Alberts *et al* 2004). Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias: ellas y su progenie (1) se reproducen a pesar de las restricciones normales e (2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células formando tumores que posteriormente pueden llegar a invadir tejidos vecinos mediante un mecanismo llamado metástasis. La combinación de estas dos características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso (Alberts *et al* 2004; Chen and Fukuda, 2006). Casi todos los tejidos en el cuerpo pueden generar tumores malignos, cada uno con características únicas. Sin embargo, los procesos básicos que producen estos tumores diversos parecen ser bastante similares (Weinberg, 1996).

El término "cáncer" se refiere a más de 200 formas de la enfermedad. A nivel mundial, el cáncer es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardíacas y la Organización Mundial de la Salud predice que para 2020 habrá 20 millones de pacientes nuevos de cáncer cada año (McLaughlin *et al* 2003). El cáncer cervical o carcinoma de cuello uterino (CaCu), es la segunda causa más frecuente de muerte por neoplasias en mujeres en todo el mundo, después del cáncer de mama (Clifford *et al* 2002; Monie *et al* 2009), siendo un problema importante de salud pública, con medio millón de nuevos casos y cerca de 300.000 muertes cada año (Insinga *et al* 2009). En los países en desarrollo, CaCu a menudo es el cáncer más común en las mujeres y puede constituir hasta un 25% de todos los tipos de cáncer en la mujer (Harro *et al* 2001); en México, esta enfermedad representa la segunda causa de muerte con aproximadamente 6,000 decesos anuales (INEGI, 2010).

Nomenclatura del CaCu

El CaCu es una alteración celular que se origina en el epitelio cerca de la unión escamosa del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal (Duarte-Franco and Franco, 2004).

Inicialmente este proceso pre-invasivo está limitado al epitelio cervical y se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Este tipo de lesiones cervicales, se clasifican en NIC I, II y III (Richart, 1990) de acuerdo a la cantidad de epitelio que haya sido invadido por una población celular proliferativa e inmadura anormal. Con el tiempo puede extenderse a todo el espesor del epitelio cervical, una condición que se reconoce como carcinoma cervical *in situ* (CIS) por sus siglas en inglés. Posteriormente, la enfermedad puede llegar a ser invasora (Duarte-Franco and Franco, 2004). Este proceso puede tardar una década o más. NIC 1 corresponde a la displasia leve, NIC 2 a la displasia moderada y NIC 3 a la displasia grave y al CIS según el sistema de clasificación Reagan. En años recientes el sistema de Bethesda 2001 clasifica las lesiones según las anomalías de las células escamosas en 4 categorías diferentes: células escamosas atípicas (ASC) por sus siglas en inglés, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) por sus siglas en inglés, lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) por sus siglas en inglés y carcinoma de células escamosas. La lesión precursora del cáncer cervical se le denomina neoplasia intraepitelial cervical que equivale a LSIL mientras que HSIL equivale a NIC II y III (Figura 1).

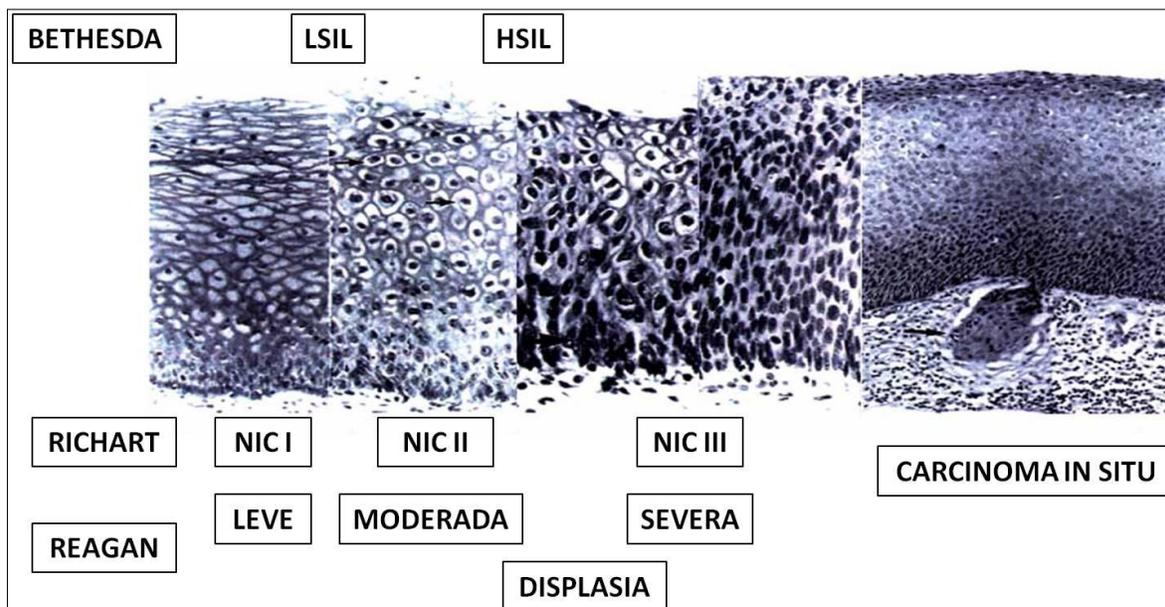


Figura 1. Se observa el proceso de alteración del epitelio cervical en sus diferentes clasificaciones, el cual se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución hasta llegar a carcinoma *in situ*. (Tomada y modificada de Cid- Arregui, 2009)

Hay dos principales tipos histológicos de cáncer invasor: los carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. La lesión invasora puede metastatizar a partes cercanas de la pelvis y ganglios linfáticos distantes y otros sitios del cuerpo (Cuadro 1). Los síntomas y signos en la mayoría de las mujeres con cáncer invasivo del cuello uterino incluyen sangrado post-coito, infecciones recurrentes de la vejiga y úlceras en el cuello uterino. Las presiones sobre los nervios y el plexo nervioso producen dolor persistente. Tan pronto se produce metástasis de ganglios linfáticos la enfermedad empeora considerablemente (Duarte-Franco, 2004).

Cuadro1. Etapas del cáncer cérvico-uterino tomado de (www.NCI/PDQ/pacientes).

Etapa	Características
0	Se encuentra en la primera capa de células que recubren el cuello del útero; y no ha invadido tejidos profundos denominada carcinoma in situ.
I	Se encuentra en el cuello uterino.
IA	Se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer; no teniendo más de 5mm de profundidad y 7 mm de ancho.
IB	El cáncer se encuentra dentro del cuello uterino.
II	El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino sin alcanzar la pared pélvica.
IIA	Cáncer se ha diseminado a dos tercios superiores de la vagina.
IIB	El cáncer se ha diseminado a dos tercios superiores de la vagina y a los tejidos en torno al útero.
III	Cáncer diseminado al tercio inferior de la vagina y tal vez haya alcanzado la pared pélvica y los ganglios linfáticos circundantes.
IIIA	Se ha diseminado al tercio inferior de la vagina.
IIIB	Se ha diseminado a la pared pélvica y es lo suficientemente grande para bloquear los uréteres. Y puede haber alcanzado a los ganglios linfáticos.
IV	El cáncer se ha diseminado a la vejiga, recto y otras partes del cuerpo.
IVA	Cáncer diseminado en a la vejiga o a la pared del recto y puede que también en los ganglios linfáticos en la pelvis.
IVB	El cáncer se ha diseminado más allá de la pelvis y ganglios linfáticos y otros lugares en el cuerpo como abdomen, hígado, tubo intestinal o pulmones.

CaCu y virus del papiloma humano (HPV)

Se estima que el 15 por ciento de todos los cánceres humanos en todo el mundo puede atribuirse a los virus, lo que representa una porción significativa de la carga global. Tanto virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) han demostrado ser capaces de causar cáncer en seres humanos (Liao, 2006). Estudios realizados en 22 países, coordinados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), identificaron al ADN del virus del papiloma humano (HPV) por sus siglas en inglés, en casi todos (99,7%) (De 1000) los casos de CaCu (Walboomers *et al* 1999). Actualmente, es reconocido por la Organización Mundial de la Salud que el desarrollo de CaCu se asocia estrechamente con la infección por HPV, demostrado por primera vez en la década de 1980 por Harold Zur Hausen, virólogo alemán, y que la infección por este virus representa la enfermedad por transmisión sexual más propagada, aunque se estima que sólo un 5 a 8% de mujeres que la padecen desarrolla CaCu (Bosch *et al* 2002; Franco, 1995). Se ha demostrado que los genomas de los HPV usualmente se integran al genoma de la célula hospedera. Esta integración se realiza en diversos sitios, algunos de ellos cercanos a oncogenes específicos o sitios frágiles, sugiriendo que este evento puede tener un papel importante en el desarrollo de los tumores cervicales (Vázquez-Ortiz *et al* 2005).

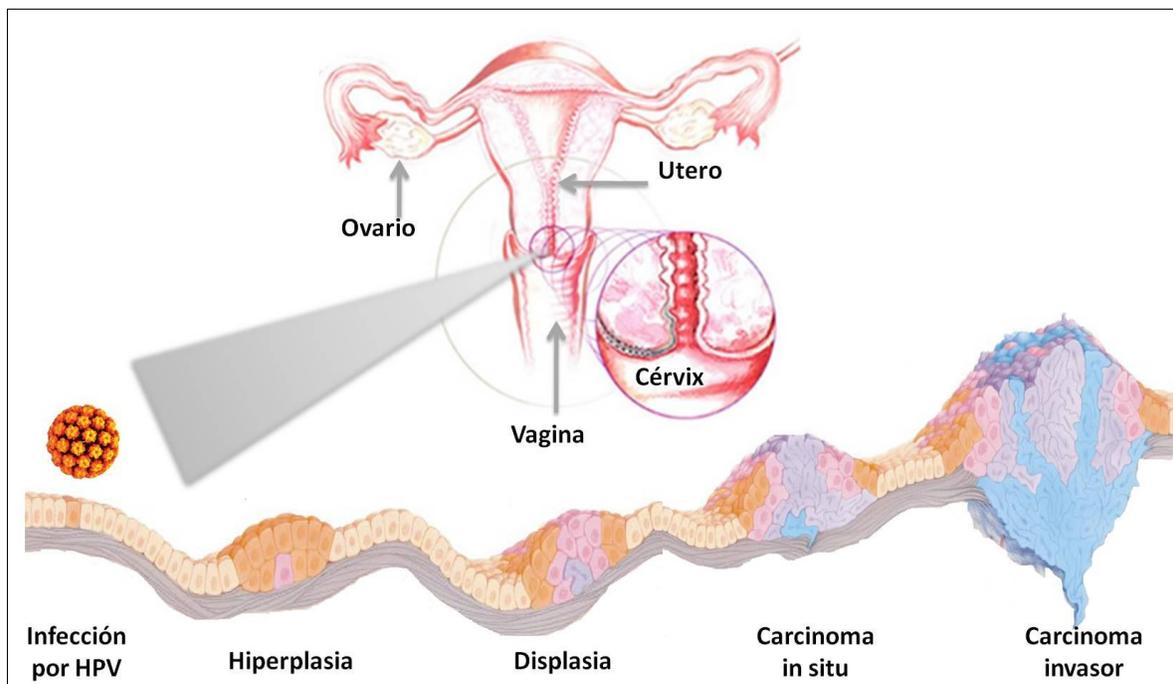


Figura 2. Infección del virus del papiloma humano (HPV) en el cérvix. Células normales aparecen de color naranja claro, células infectadas por HPV aparecen de color naranja oscuro, células que han integrado genoma de HPV de color rosa, células que han sufrido una transformación maligna de color morado y las células que han sufrido una inmortalización de color azul (Tomado y modificado de Weinberg, 1996 y www.centrodeladiversidad.org/comunidad).

Los HPV pertenecen al género *Papillomavirus* y a la familia *Papillomaviridae* (Días *et al* 2005), son ubicuos y se han detectado en una amplia variedad de animales, así como en los seres humanos (Zur Hausen, 1999). Los HPV pueden infectar a las células epiteliales basales de la piel como manos y pies o revestimiento interior de los tejidos como la mucosa de la boca, garganta, vías respiratorias, o epitelio anogenital (Figura2), (Burd, 2003; Cutts *et al* 2007).

El aislamiento y caracterización del ADN del virus del papiloma de la piel y las verrugas genitales reveló la existencia de distintos tipos de HPV. El gran número de tipos de HPV asociados a lesiones de la mucosa y la enfermedad hereditaria epidermodisplasia verruciforme confirmó posteriormente la diversidad de los virus de la familia *Papillomaviridae* (De Villiers and Gunts, 2009). Más de 200 tipos de HPV han sido reconocidos sobre la base de datos de secuencias de ADN que presentan diferencias genómicas (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009) de los cuales ochenta y cinco genotipos de HPV están bien caracterizados y otros 120 aislamientos son parcialmente caracterizados como nuevos genotipos (Zur Hausen, 1999). Un distinto tipo de HPV se asigna cuando la totalidad del genoma es clonado y la secuencia de nucleótidos completa de su gen L1 difiere de la de cualquier otro tipo por lo menos 10% (Burk *et al* 2009) o bien aquel cuyo ADN tiene menos del 90% de homología en la secuencia con cualquier tipo de HPV (Beristain, 2004).

Sobre la base de su asociación con el cáncer cervical y lesiones precursoras, los HPV se pueden agrupar a los tipos de HPV de alto riesgo y bajo riesgo (Bonnez, 2000; Bosch *et al* 1995). Los virus de bajo riesgo, que incluyen el HPV 6 y 11, por lo general causan verrugas benignas genitales (condiloma acuminado), que son crecimientos en el cuello uterino, la vagina, la vulva y el ano en las mujeres y el pene, el escroto o ano en los hombres y rara vez se asocian con tumores malignos. Por el contrario, la infección por los virus de alto riesgo, incluyendo el HPV 16, 18 y 45, se ha relacionado con el desarrollo de CaCu así como otras neoplasias genitales (Hebner and Laimins, 2006; Cutts *et al* 2007). Incluido en el grupo de alto riesgo son algunos tipos de HPV que son menos frecuentes en cáncer cervical, pero a menudo se encuentran en lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) (Cuadro 2). Algunos autores se refieren a estos tipos de HPV como de riesgo intermedio. (Burd, 2003)

TIPO DE HPV	RIESGO ONCOGÉNICO
16, 18, 45, 56	Alto riesgo
31, 33, 35, 51, 52	Riesgo intermedio
6,11, 34, 42, 43, 44	Bajo riesgo

Cuadro 2. Clasificación de algunos tipos de HPV de acuerdo al riesgo oncogénico que presentan (Muñoz, 2000; Picconi *et al* 2002; Zur Hausen, 2000)

El HPV 16 representa la mayor proporción 50%, seguido por el HPV 18 12%, el HPV 45 8% y el HPV 31 5%. En nuestro país se ha estimado que el HPV 16 se encuentra en el 50% de los casos; el HPV 18 en el 15%; los HPV'S 31, 33 y 35, en conjunto, el 12%; y otros tipos virales, en el porcentaje restante (Muñoz and Bosch 1997; Berumen *et al* 2001).

Estructura del HPV

El HPV es relativamente pequeño, sin envoltura, de 55 nanómetros (nm) de diámetro, con un genoma de ADN de doble cadena circular que contiene aproximadamente 8000 pares de bases de longitud (pb) asociado con histonas. El genoma está encapsulado en una estructura icosaédrica de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), compuesto de las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales componen el 80% y el 20% de la cápside respectivamente (Figura 3) (Burd, 2003; Hebner and Laimins, 2006). Cada capsómero de la proteína principal L1 es un pentámero de la cápside (Baker *et al* 1991, Sapp *et al* 1995). El genoma del HPV es funcionalmente dividido en tres regiones (Figura 3): la primera es una región reguladora no codificante que se encuentra entre las 400-1000 pares de bases y se ha denominado región larga de control (LCR) por sus siglas en inglés o la región reguladora superior. Esta región contiene el núcleo promotor p97, junto con secuencias potenciadoras y silenciadoras que regulan la replicación del ADN (Apt *et al* 1996) y está encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E7 (Rincón *et al* 2007) y también contiene el más alto grado de variación en el genoma viral (Apt *et al* 1996); la segunda es una región temprana, que contiene marcos de lectura abierta (ORF'S) por sus siglas en inglés, en donde se localizan los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Burk *et al* 2009) que codifican para las proteínas que están implicadas en la replicación viral y en la oncogénesis; la tercera región contiene los genes de transcripción tardía y codifican a las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside las cuales facilitan el empaquetamiento del genoma viral (Chen Z *et al* 2007).

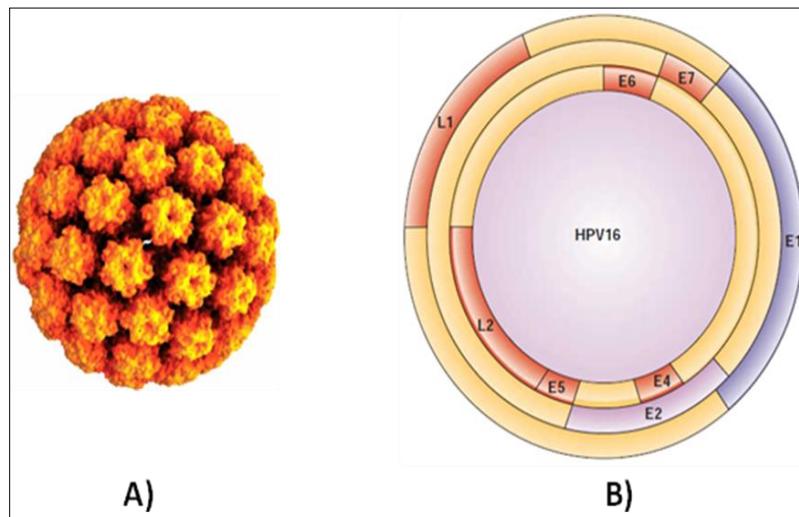


Figura 3. Representación de la A) estructura tridimensional de la cápside conformada por el ensamblaje de las proteínas L1 y L2 y B) el esquema del genoma de forma circular del virus de papiloma humano 16 (HPV16) mostrando la disposición de las proteínas no estructurales (región temprana) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Tomado de Frazer, 2004 y Cid –Arregui, 2009).

Las proteínas E1 y E2 son esenciales en la transcripción y replicación viral, E4 se une a citoqueratinas y participa en la modificación de la red del citoesqueleto, E5 afecta a los receptores celulares de los factores de crecimiento, mientras que E6 y E7 son las proteínas principales transformadoras (Di Bonito *et al* 2006) que en los tipos de HPV de alto riesgo son capaces de interactuar con proteínas reguladoras del ciclo celular, y por tanto, de inducir un estado transformado a la célula hospedera (Cuadro 3) (Galloway *et al* 1996).

Proteína	Características
E1	Codifica a una helicasa para la replicación episomal del ADN viral.
E2	Regula la expresión temprana de los genes E6 y E7, facilitando la replicación del virus.
E4	Permite el ensamblaje viral y altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus.
E5	Altera el pH endosomal y el reciclamiento de receptores de (EGF) a la superficie celular.
E6	Inactiva la función de p53 e inhibe la apoptosis.
E7	Se une a pRB y reactiva la síntesis de ADN del huésped.
L1	Constituye el 80% de la cápside (cubierta) viral.
L2	Constituye el 20% de la cápside viral.

Cuadro 3. Función de las proteínas virales del HPV (Tomado de Cid-Arregui, 2009).

Mecanismo de infección de HPV

La reproducción del HPV está íntimamente ligada al proceso de diferenciación de las células huésped. Las células escamosas del epitelio normal crecen como epitelio estratificado el cual presenta dos tipos de queratinocitos, las células madre y células de amplificación en tránsito. Las células madre se adjuntan a la de la membrana basal y mantienen una alta capacidad de autorrenovación. Después de la división de las células basales, las células hijas que se convertirán en células de amplificación en tránsito migran hacia arriba y se someten a la diferenciación terminal. Poco después de salir de la membrana basal, esas células normales salen del ciclo celular y comienzan a sintetizar queratinas de alto peso molecular que se acumulan en el estrato granuloso y en los estratos más altos del epitelio. Estas células eventualmente forman sacos llenos de queratina en la epidermis. La infección por HPV se considera que requiere de una ruptura en el epitelio estratificado, que puede ocurrir a través de microlesiones que exponen a la capa basal de la entrada del virus (Sterlinko *et al* 2009; Abdul *et al* 2009).

El ciclo de vida del HPV comienza con la infección de las células basales epiteliales que incluye la entrada a la célula huésped, manteniendo su genoma a un bajo número de copias por célula infectada, y requiriendo la expresión de E1 y E2. La segunda fase, incluye ya el primer paso hacia la transformación celular, es decir, la integración del genoma del HPV a la célula. E1 y E2 se unen al origen de replicación viral y enganchan a las ADN polimerasas celulares y otras proteínas necesarias para la replicación del ADN. El genoma viral se cree que se mantiene en 10 a 200 copias por célula en la capa basal de toda la infección. Sin embargo, este número de copias aumenta dramáticamente cuando se mueven las células infectadas a las capas superiores del epitelio. Durante esta fase de amplificación, los genomas son empaquetados en viriones infecciosos antes de su liberación. Las células infectadas son morfológicamente diferentes y se denominan coilocitos en esta etapa, con un núcleo ampliado y a menudo múltiples núcleos por célula (Figura 4). La activación del promotor dependiente de diferenciación conduce a una mayor expresión de las proteínas E1, E4 y E5, mientras que L1 y L2 se expresan en la capa superior del epitelio para facilitar su ensamblaje y la formación de viriones. Las cápsides se someten a un proceso de maduración provocada por el procesamiento proteolítico de los componentes del virión antes de la liberación de la célula. El virión que se libera puede infectar el epitelio basal o extenderse a nuevos huéspedes (Stanley, 2006).

Las oncoproteínas E6 y E7 del HPV actúan para aumentar la proliferación de las células infectadas por el HPV en el epitelio. La actividad de estas proteínas subvierte el proceso normal de diferenciación terminal, provocando un aumento en el número de células infectadas que a la larga producen viriones infecciosos. E6 y E7 estimulan la progresión del ciclo celular y ambas proteínas están asociadas con reguladores del ciclo celular. La principal función de la proteína E6 es la de unirse a la proteína supresora de tumores p53 en conjunción con la ligasa de ubiquitina celular E6AP y marcar a p53 para la degradación. Por otra parte, la asociación de E7 con los miembros de la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular ha sido bien caracterizada. Se sabe que pRb es un regulador negativo del ciclo celular que controla la entrada en la fase S al asociarse con los miembros de la familia E2F de factores de transcripción de ADN; en este sentido, E7 interrumpe esta función mediante la unión a pRb y desplazando las proteínas E2F. Por lo tanto las células entran en la fase S y activan los factores de la replicación celular, necesarios para la replicación viral. E7 también marca pRb para la degradación proteolítica por la vía de proteosomas de ubiquitina a través del proteosoma 26S (Abdul *et al* 2009).

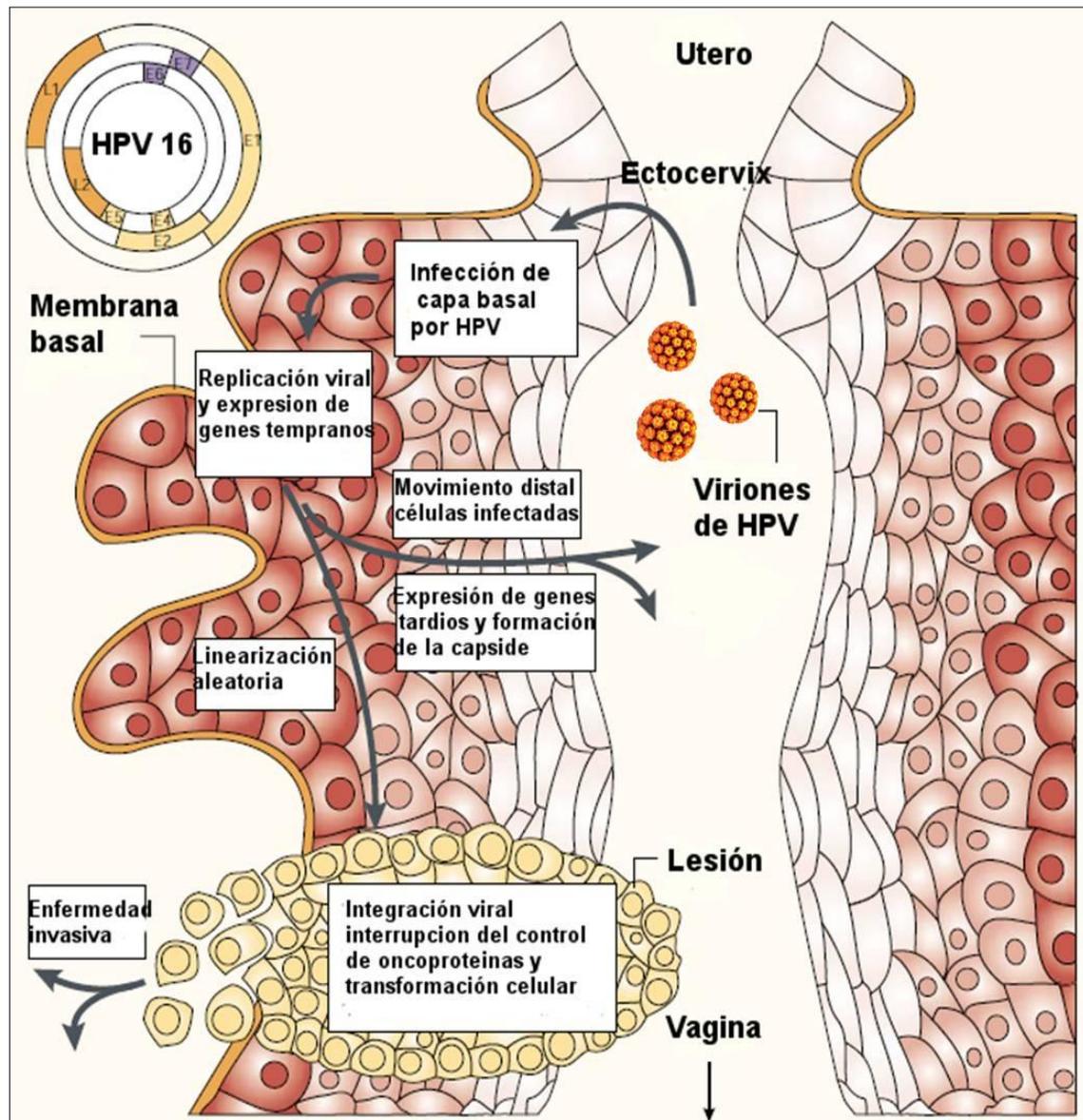


Figura 4 Imagen del mecanismo de infección del virus de papiloma humano en el cérvix, mostrando la entrada del virus a la capa basal del epitelio, así como la integración aleatoria en el genoma del hospedero y la posterior transformación celular (Tomado y modificado de Tindle, 2002).

En algunos casos, la infección viral es claramente seguida de la activación del sistema inmune y la eliminación de la infección del hospedero, sin embargo, las lesiones ocasionalmente persisten y progresan malignamente causando tumores, la falla en la eliminación del virus es atribuida a una pobre respuesta inmunológica, la cual es vital en la protección contra el HPV, y la subsecuente progresión neoplásica. (Gariglio *et al* 1992; Hilders *et al* 1994; Guzmán-Rojas *et al* 1998).

Sistema inmune

En un sentido histórico inmunidad significa protección contra la enfermedad y, más en concreto, contra una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas responsables de su ejecución constituyen el sistema inmunitario, su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas se denomina respuesta inmunitaria. La función fisiológica del sistema inmunitario consiste en la defensa contra los organismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmunitaria (Abbas *et al* 2006). El sistema inmunitario parece también cumplir un papel relevante en la inmunidad antitumoral. Sin embargo, la respuesta inmunitaria parece menos exitosa (Fainboim, 2005). Aunque se hace referencia al sistema inmunitario, debe señalarse que existen dos de ellos, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (o adquirida) mediada por una variedad de diferentes células y moléculas que colaboran para proteger al organismo (Figura 5) (Kindt, 2007; Parham, 2003).

Inmunidad innata

La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) incluye mecanismos moleculares y celulares que se montan antes de una infección y cuyo fin es prevenirla o eliminarla. Esta primera línea de defensa altamente eficaz impide la mayoría de las infecciones desde el principio o las anula en las horas que siguen a su contacto con el sistema inmunitario innato. Los elementos de reconocimiento de este sistema distinguen de manera precisa entre lo propio y lo extraño, pero no están especializados para distinguir diferencias pequeñas en las moléculas extrañas (Abbas *et al* 2006; Kindt, 2007). La inmunidad innata comprende, en primer lugar, barreras físicas y anatómicas: la piel y los epitelios de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario. Si la barrera impuesta por los epitelios a los microorganismos patógenos se supera, se establece en el organismo un foco infeccioso primario. A fin de hacerle frente, la inmunidad innata pone en marcha de inmediato un conjunto de mecanismos celulares y humorales. Entre los componentes celulares se destacan: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células natural killer (NK) por sus siglas en inglés, células dendríticas (DC) por sus siglas en inglés, mastocitos, células endoteliales. Los mecanismos humorales involucran: el sistema del complemento, las proteínas de fase aguda y los interferones (IFN) α y β (Medzhitov, 2001; Fainboim *et al* 2005).

Inmunidad adaptativa

Una segunda forma de inmunidad, conocida como inmunidad adaptativa, se establece en respuesta a las infecciones y se adaptará para reconocer, eliminar y más tarde recordar al patógeno invasor. La inmunidad adaptativa se desarrolla a partir de la innata y comienza pocos días después de la infección inicial (Kindt, 2007). Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adquirida, la inmunidad humoral y la celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar

diferentes tipos de microorganismos o de sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica llamadas antígenos (Ag) (Abbas *et al* 2006).

Inmunidad humoral

En la inmunidad humoral participan moléculas presentes en la sangre, denominadas anticuerpos, que se producen a partir de células conocidas como linfocitos B. Estos anticuerpos reconocen específicamente antígenos microbianos, y los linfocitos neutralizan la infectividad de los microorganismos y dirigen su acción para su eliminación por diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas debido a que los anticuerpos secretados pueden unirse a estos microorganismos y toxinas para facilitar su eliminación (Roitt, 2004).

Inmunidad celular

En la inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, participan células llamadas linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, tales como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas. (Abbas *et al* 2006)

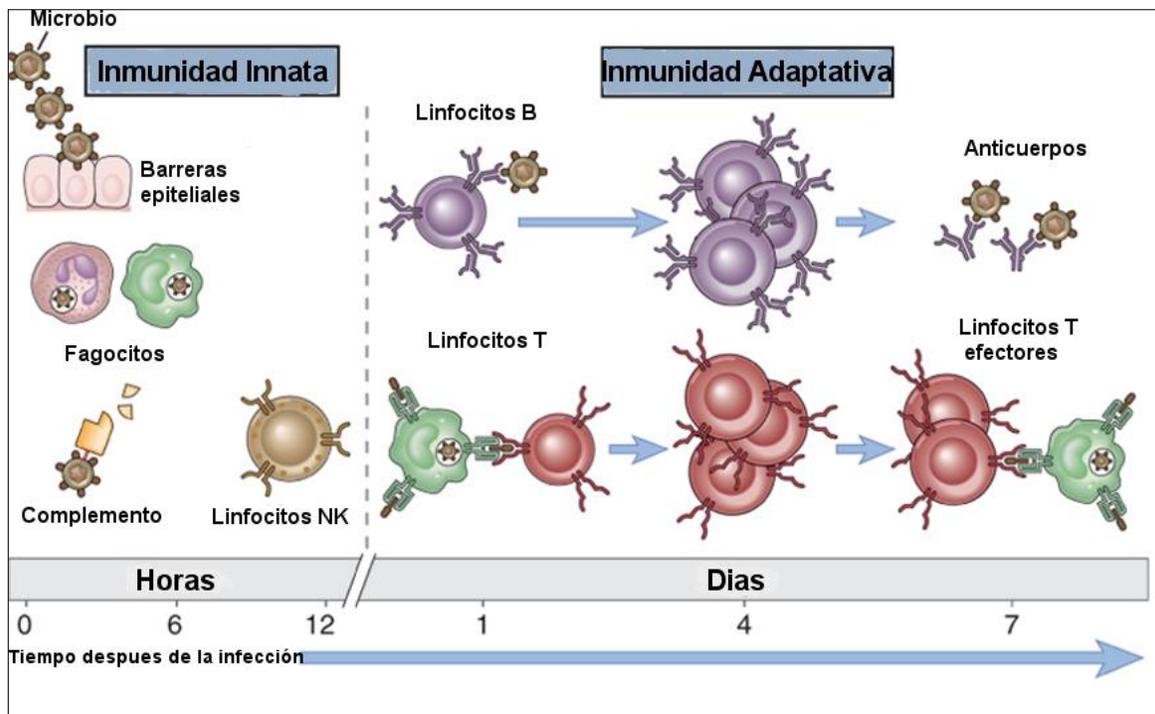


Figura 5 Representación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa en una cinética de tiempo aproximada y que puede variar entre las distintas infecciones (Tomado de Abbas *et al* 2006).

Linfocitos T

Las células T no producen anticuerpos, sus receptores de antígenos son moléculas de la membrana distintas de los anticuerpos, pero estructuralmente relacionadas con ellos. Los linfocitos T colaboradores y citotóxicos (CTL) por sus siglas en inglés, tienen una especificidad limitada para los antígenos; sólo reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) por sus siglas en inglés y que se expresan en la superficie de otras células. (Stites *et al* 2000). Los linfocitos T, células de la inmunidad celular, se subdividen en poblaciones funcionalmente diferentes, de las cuales las mejor definidas son las células T colaboradoras (CD4) y las células T citotóxicas (CD8), los linfocitos maduros expresan casi siempre una de las dos proteínas y ésta se relaciona con su función celular y con el tipo de proteína MHC que reconocen. Aproximadamente el 70% de las células T son CD4 mientras que el 25% son CD8; cerca del 4% fuera del timo son CD4- CD8-, dobles negativas y el 1% pueden ser doble positivas (Abbas *et al* 2006).

Los linfocitos T auxiliares o CD4+, reconocen péptidos presentados por moléculas MHC-II. Este reconocimiento es el estímulo inicial para su activación, además secretan proteínas llamadas citocinas que promueven la proliferación y diferenciación siendo la principal la interleucina 2 (IL-2). Se pueden distinguir dos grupos de células de las reacciones defensoras: TH1 que secretan: IL-2, IL-3, IFN γ y factor de necrosis tumoral (TNF) β y las TH2 que secretan: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y GM-CSF (Marais *et al* 1999).

Los linfocitos T citotóxicos tienen la capacidad de destruir células extrañas; presentan en su superficie moléculas CD8+ y sólo reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC-I. El linfocito T citotóxico activado produce gránulos citolíticos constituidos por enzimas proteolíticas (perforinas) para destruir células blanco (Van Leuween *et al* 1999). Por lo tanto los linfocitos CD8+ han sido considerados por muchos años las principales células efectoras contra el crecimiento de tumores (Abbas *et al* 2006).

Respuesta inmune contra CaCu

El HPV ha evolucionado conjuntamente con los humanos durante mucho tiempo y por tanto, su ciclo replicativo es muy complejo, de tal forma que puede infectar el tracto genital femenino durante varios años con un bajo perfil de expresión, lo que genera una muy pobre respuesta inmune innata (Tindle, 2002). Cuando logra establecerse, una respuesta adaptativa es más eficiente, y por eso, aunque la tasa de infección es muy alta, no todas las infecciones progresan hasta CaCu (Doorbar, 2006), debido a que el 70-90% de mujeres infectadas resuelven la infección en 12 a 30 meses (Evander *et al* 1995; Ho *et al* 1998). Sin embargo, cuando la infección es persistente y el sistema inmune está deprimido, puede darse lugar a la integración del genoma del HPV a la célula hospedera y eventualmente, al desarrollo de una neoplasia que puede derivarse hacia tumores avanzados y finalmente, hasta metástasis (Zur Hausen, 2000).

Potencialmente todas las proteínas del HPV pueden ser blancos antigénicos para generar una respuesta inmune, no obstante, de acuerdo con el ciclo biológico del virus, algunas de sus proteínas pueden quedar más accesibles al reconocimiento inmune. En las etapas tempranas de infección viral o en las etapas iniciales del desarrollo del cáncer cervical, cuando existe una amplia formación de viriones, las proteínas de la cápside (primordialmente L1) son los principales antígenos blanco accesibles para la respuesta inmune humoral y celular contra la infección por HPV (Zur Hausen, 2000), mientras que las oncoproteínas E6 y E7, que se expresan abundantemente en estadios tardíos, constituyen los principales blancos de la respuesta inmune en el cáncer cervical en etapas avanzadas (Frazer, 2004).

Mecanismos de evasión inmune

Las infecciones virales son inicialmente intracelulares y los antígenos virales escapan al alcance de los anticuerpos. El sistema inmune está involucrado en la infección primaria y en la progresión maligna de las lesiones por el HPV, en especial la respuesta inmune mediada por células (Calixto-Gómez, 2005).

En las etapas previas al cáncer invasor, como son el condiloma acuminado, las neoplasias preinvasoras y NIC, el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener el tumor localizado. Durante la regresión de las verrugas genitales se presentan infiltrados locales de células mononucleares, incluyendo CTL, NK y macrófagos que invaden la epidermis y destruyen las células neoplásicas (Calixto-Gómez, 2005). Sin embargo las células tumorales han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T anti-tumorales (Figura 6). Estos mecanismos pueden cooperar en etapas avanzadas del cáncer para limitar la capacidad del sistema inmune para frenar el tumor y la eficacia de las estrategias de inmunoterapia para erradicar con éxito las células malignas (Rabinovich *et al* 2007; Calixto-Gómez, 2005).

Dichos mecanismos incluyen: anormalidades en la presentación de antígenos como la ausencia total de la expresión de MHC-I causada por mutaciones del gen β 2-microglobulina; disminución de la expresión de MHC-I debido a la pérdida selectiva de los distintos alelos HLA (Rivoltini *et al* 2002; Hicklin *et al* 1999; Wang Z *et al* 1993; Natali *et al* 1989); presentación deficiente de los antígenos tumorales también debida a defectos en la maquinaria de procesamiento de antígenos, incluyendo las mutaciones del transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) y los componentes del inmunoproteasoma (LMP2 y LMP7) (Marincola *et al* 2000; Spiotto *et al* 2004 ;Rivoltini *et al* 2002;); defectos en la señalización de TCR como resultado de la actividad inhibitoria de la fosfatasa SHP-1 (Koneru *et al* 2005) y una disminución en la expresión de la cadena ζ de CD3 y las cinasas de tirosina p56lck y p59fyn que juegan un rol crítico en eventos de señalización que conducen a la activación de células T (Khong and Restifo, 2002; Mizoguchi *et al* 1992); secreción de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β que inhibe proliferación, activación y diferenciación de

células T (Li *et al* 2006), células NK también pueden suprimir la eficacia de las respuestas de linfocitos T citotóxicos a través de mecanismos relacionados con la producción de IL-13 y TGF- β (Teraben *et al* 2000), IL-10 que afecta la funcionalidad de CD (Gerlini *et al* 2004) y protege a las células tumorales de citotoxicidad mediada por CTL (Kurte *et al* 2004), prostaglandina E2 (PGE2) (Akasaki *et al* 2004), y sialomucinas (Agrawal *et al* 1998); señales coestimuladoras negativas como CTLA-4 que disminuye la respuesta antitumoral (Sotomayor *et al* 1999; Van Elsas *et al* 1999; Phan *et al* 2003) interacciones entre el receptor de muerte programada-1 (PD-1) y el ligando de muerte programada -1 (PD-L1) (Blank *et al* 2005) inhibiendo la activación de células T (López *et al* 2005); expresión de ligandos de receptores de muerte (por ejemplo, FasL, TRAIL), así como el ligando RCAS1 induciendo la detención del ciclo celular y la apoptosis de las células T activadas (Nakashima *et al* 1999); mecanismos de participación de los gangliósidos e interacciones CD70-CD27 que pueden inducir la muerte de las células T (Chahlavi *et al* 2005); interacciones de proteoglicanos como la galectina-1 que inhibe las funciones de las células T efectoras mediante la inducción de apoptosis de las células T (Perillo *et al* 1995), la sensibilización de las células T a la muerte celular inducida por FasL (Matarrese *et al* 2004), el bloqueo de señalización de TCR (Chung *et al* 2000), la supresión de Th1 y la secreción de citocinas proinflamatorias (Rabinovich *et al* 1999); células T reguladoras (Tregs) que están bajo la influencia de la quimiocina CCL22 para suprimir respuestas de células T (Sakaguchi , 2004).

Otro mecanismo inmunosupresor, recientemente propuesto, es la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular la cual está presente en concentraciones inmunosupresivas dentro del microambiente de tumores sólidos y puede por lo tanto ser un factor importante en la evasión inmune por las células tumorales (Blay *et al* 1997). La generación de adenosina extracelular implica la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina, y está regulada por la etapa terminal enzimática catalizada por la 5' ecto-nucleotidasa (CD73) (Thompson *et al* 2004).

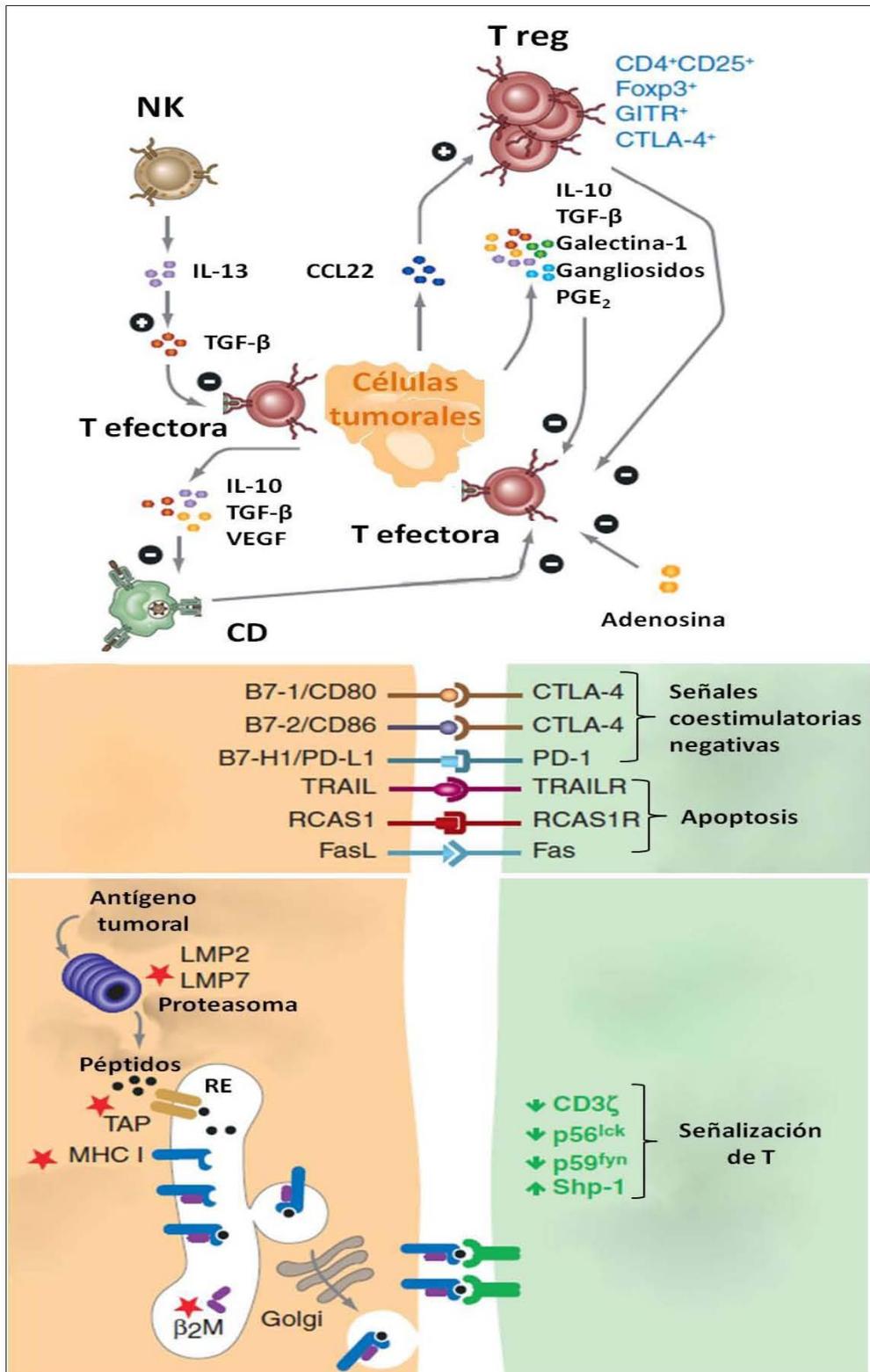


Figura 6 Mecanismos y estrategias inmunosupresoras explotadas por los tumores para evadir las respuestas inmunes (Ver texto). Tomado y modificado de Rabinovich *et al* 2007 y Abbas *et al* 2006).

5' -ectonucleotidasa (CD73)

CD73 conocida como una 5'-ectonucleotidasa (EC.3.1.3.5) es una glicoproteína anclada a membrana de 70 Kilodaltones (kDa) vinculada a proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) por sus siglas en inglés, encontrada en varios tejidos (Colgan *et al* 2006). Fue originalmente definida como un antígeno de diferenciación de los linfocitos y se expresa en muchos tipos de células incluyendo los subgrupos de linfocitos, las células endoteliales y las células epiteliales (Resta *et al* 1998).

Se ha reportado que CD73 actúa como una molécula de señalización de cooperación en los linfocitos T y como una molécula de adhesión que se requiere para la unión de linfocitos al endotelio (Massaia *et al* 1990; Dianzani *et al* 1993; Resta and Thompson, 1997). Está vinculada con el control de una variedad de respuestas fisiológicas, incluyendo transporte de fluidos e iones epiteliales, el acondicionamiento isquémico, lesión de los tejidos, la función plaquetaria, fuga vascular, función de barrera vascular, restricción de la migración de linfocitos a los ganglios linfáticos, estimulación de la hidratación de la mucosa (Colgan *et al* 2006; Thompson *et al* 2004; Lennon *et al* 1998; Takedachi *et al* 2008; Madara *et al* 1993). También se ha demostrado que participa en interacciones célula-célula y célula-matriz, está implicada en la resistencia a las drogas y la promoción de tumores (Airas *et al* 1995), suprime las respuestas pro-inflamatorias en células endoteliales humanas (Grünwald and Ridley, 2010), se expresa ampliamente en muchas líneas celulares tumorales y está regulada en diversos carcinomas, incluidos los de colon, pulmón, páncreas y ovario (Spychala, 2000); y el aumento de los niveles de expresión se asocia con neovascularización tumoral, invasión, migración, adhesión y metástasis, y con menor tiempo de supervivencia en los pacientes con cáncer de mama (Wang *et al* 2008).

Recientemente, se cree que las acciones biológicas de CD73 son una consecuencia (al menos en gran parte) de la actividad enzimática fosfohidrolítica regulada de nucleótidos extracelulares, hidrolizando nucleótidos monofosfatos hacia nucleosidos bioactivos intermedios. CD73 unido a superficie metaboliza adenosina 5'-monofosfato (AMP) a adenosina (Colgan *et al* 2006; Zhang, 2010).

Generación de adenosina extracelular

La adenosina está implicada en una amplia variedad de funciones biológicas básicas, incluyendo la biosíntesis de nucleótidos o de metabolismo energético celular. En el exterior de la célula, sirve principalmente como una molécula de señalización. Sin embargo durante condiciones de estrés celular (inflamación, lesión, isquemia e hipoxia aguda), se deriva esta molécula que se acumula en el espacio extracelular (Haskó *et al* 2008; Eltzschig, 2010). Recientemente se ha propuesto que la protección de tumores de las células T antitumorales es debido a la inmunosupresión por la vía adenosinérgica mediante la producción de adenosina extracelular la cual está presente en células cancerosas y constituye un importante mecanismo de escape inmune en tumores (Sitkovsky *et al* 2008; Pellegatti *et al* 2008).

La generación de adenosina extracelular ha sido ampliamente implicada como una respuesta adaptativa a la hipoxia y esta puede ser producida como consecuencia de: a) la difusión o el transporte de adenosina intracelular o b) debido a la hidrólisis enzimática del ATP extracelular (Sitkovsky *et al* 2008).

Difusión o transporte de adenosina intracelular

El principal mecanismo responsable de la rápida disminución de los niveles de adenosina es la captación de adenosina extracelular al compartimento intracelular, seguido por un rápido metabolismo intracelular a través de la desaminación a inosina por la adenosina deaminasa (ADA) o por la fosforilación para formar AMP, catalizada por la adenosina cinasa (AK) por sus siglas en inglés (Morote-Garcia *et al* 2008; Eltzhig *et al* 2006 a); Van Linden and Eltzhig 2007). Sin embargo la hipoxia tisular local que sigue al daño de las células endoteliales y la microcirculación y la interrupción normal de la sangre y el suministro de oxígeno se asocia con a) disminución de la adenosina 5'-trifosfato (ATP) intracelular b) incremento de la adenosina 5'-monofosfato (AMP) intracelular c) inhibición de adenosina cinasa d) acumulación de adenosina intracelular y (e) subsecuente transporte o difusión de adenosina intracelular y acumulación de adenosina en el espacio extracelular (Zhang, 2010; Sitkovsky *et al* 2008). La adenosina puede atravesar la membrana celular a través de los transportadores de nucleósidos de concentración o de equilibrio. Transportadores de nucleósidos de equilibrio (ENT) por sus siglas en inglés 1 y 2 son funcionalmente los transportadores de adenosina más relevantes (Eltzhig *et al* 2005; Loffler *et al* 2007). ENT representan canales que permiten que la adenosina cruce libremente la membrana celular después de un gradiente de concentración. En condiciones fisiológicas, las diferencias entre las concentraciones de adenosina intra o extracelular son muy pequeñas (Loffler *et al* 2007). El flujo de salida de adenosina se observa en lesión tisular, necrosis e isquemia, y por tanto, puede ser una fuente importante de este nucleósido extracelular en tumores sólidos (Zhang, 2010; Sitkovsky *et al* 2008).

Hidrólisis enzimática del ATP extracelular

En la hidrólisis enzimática de ATP extracelular, la generación de adenosina extracelular por hipoxia es provocado por la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1 (CD39) y 5' ectonucleotidasa (CD73) que representa una importante vía de generación de adenosina extracelular (Kobie *et al* 2006). La generación de adenosina a través de este proceso ha sido reportado en células T reguladoras, células dendríticas foliculares y células epiteliales entre otras (Decking *et al* 1997; Synnestvedt *et al* 2002; Kobie *et al* 2006; Deaglio *et al* 2007 y Resta *et al* 1998). Este proceso se produce en una reacción de tres pasos:

Como primer paso, varios tipos de células liberan nucleótidos intracelulares almacenados, particularmente en forma de ATP y ADP (Eltzhig, 2009). Es importante señalar que los niveles intracelulares de ATP son muy altos (5-8 mmolar) y la liberación de nucleótidos desde fuentes intracelulares puede ocurrir durante el daño celular o la muerte

(lisis, necrosis, apoptosis, etc.) (Chen Y *et al* 2006). Plaquetas activadas las cuales liberan ADP desde vesículas intracelulares almacenadas a través de la liberación granular proporcionan una fuente adicional de nucleótidos extracelulares (Weissmuller *et al* 2008).

Como segundo paso CD39, ENTPD1 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1) (EC 3.6.1.5) hidroliza ATP y ADP a sus respectivos nucleótidos (Robson *et al* 2005). Esta ectonucleotidasa fue descrita por primera vez como un marcador de activación de linfocitos B y se expresa en NK, monocitos, DC y subconjuntos de células T activadas. (Dwyer *et al* 2007). Como tercer y último paso de generación de adenosina extracelular la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5) hidroliza nucleótidos de monofosfato extracelulares hacia nucleósidos intermedios bioactivos, metabolizando AMP hacia adenosina (Figura 7) (Colgan *et al* 2006; Resta y Thompson, 1997).

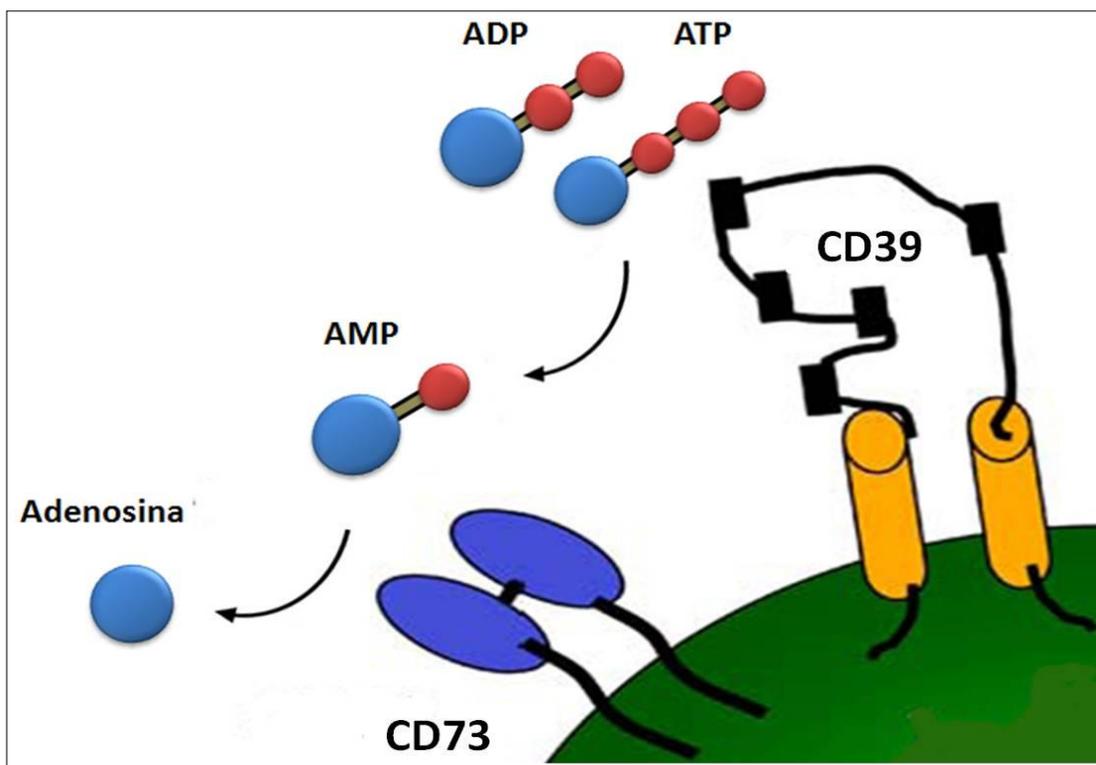


Figura 7 Representación de generación de adenosina extracelular a través de hidrólisis enzimática. En la imagen se presenta la actividad de CD39 y CD73 para dar lugar a la adenosina mediante la degradación de nucleótidos extracelulares. (Tomado y modificado de Dwyer, 2007 y Khakh y Busnstock, 2010).

Se ha demostrado que células epiteliales tumorales de ratones expresan CD39 y CD73 y que algunas células tumorales, por ejemplo, de melanoma pueden producir adenosina. Es importante resaltar que CD73 es significativamente aumentada en los tejidos cancerosos acompañada de una alta actividad enzimática, lo que puede mediar en la producción de adenosina extracelular (Zhang, 2010; Sychala, 2000). Por lo tanto las células tumorales contribuyen a los elevados niveles de la adenosina en el microambiente tumoral a través de la actividad enzimática de CD73 y sus altos niveles de expresión en el

tumor probablemente sean inducidos en el microambiente tumoral local. El factor inducible por hipoxia (HIF-1) por sus siglas en inglés, también contribuye a la progresión tumoral y la metástasis ya que es uno de los reguladores maestros que orquestan la respuesta celular a la hipoxia. Es un heterodímero compuesto que expresa una subunidad inducible α y una constitutiva β (Giaccia *et al* 2003; Semenza, 2003). Análisis inmunohistoquímicos han demostrado que HIF-1 α está presente en altos niveles en los tumores humanos en comparación de tejidos normales (Zhong *et al* 1999).

Se ha reportado que la expresión de CD73 es regulada por el factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α en células epiteliales (Synnestvedt *et al* 2002). Por lo tanto, CD73 inducida por HIF-1 α en orden secuencial puede convertir AMP en adenosina, que conduce a niveles elevados de adenosina extracelular en el tumor (Zhang, 2010; Sitkovsky *et al* 2008). Por otra parte se ha demostrado que (HIF)-1 α inhibe AK impidiendo la refosforilación hacia AMP llevando a niveles elevados de adenosina intracelular (Morote-Garcia *et al* 2008), que como se mencionó anteriormente es transportada hacia el espacio extracelular.

Adenosina en la respuesta inmune

Las funciones específicas inmunosupresoras de la adenosina incluyen inhibición potencial de una serie de respuestas de células T como: regulación de CD25, secreción de IL-2 y citocinas proinflamatorias como el interferón- γ y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), inducción de moléculas efectoras citolíticas como perforinas y el ligando Fas, adhesión de los linfocitos asesinos a las células tumorales, exocitosis de gránulos por los linfocitos T citotóxicos, además puede suprimir células NK, e inhibe la proliferación de células T (Hoskin *et al* 2008).

La adenosina extracelular induce sus potentes efectos inmunosupresores vía 4 receptores (ARs) por sus siglas en inglés, específicos bien caracterizados: A1, A2A, A2B y A3 (Fredholm *et al* 2001; Linden *et al* 2001). Los ARs tienen siete dominios transmembrana que abarcan y se acoplan a proteínas de unión GTP intracelulares (Proteínas G), utilizando AMP cíclico intracelular (AMPc) como segundo mensajero (Haskó *et al* 2008). El receptor A1 de alta afinidad y el receptor A3 de baja afinidad están acoplados a proteínas Gi. Los receptores A2 se subdividen en A2A de alta afinidad y A2B de baja afinidad los cuales están acoplados a proteínas Gs incrementando AMPc. (Linden, 2001; Thiel *et al* 2003; Sitkovsky, 2003, 2008).

Los ARs ejercen efectos sobre respuestas de células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, neutrofilos, mastocitos y linfocitos. Además de regular la función de los linfocitos indirectamente mediante la estimulación de ARs en las células inmunes innatas como las células dendríticas, la adenosina también puede afectar directamente respuestas de los linfocitos mediante la unión y la activación de estos receptores. A2A son los receptores de adenosina dominantes en el dictado de respuestas de los linfocitos (Haskó *et al* 2008). Los receptores A2A y A2B, se encuentran dispuestos predominantemente en la membrana de linfocitos T citotóxicos CD8+, y son

los responsables para ejercer un efecto regulador sobre estas células efectoras (Lappas *et al* 2005; Huang *et al* 1997; Koshiba *et al* 1997).

Es conocido que el receptor A2A de alta afinidad a adenosina, tiene un papel crítico en la protección del tejido normal contra la inflamación (Sullivan and Linden 1998; Linden 2001; Jacobson and Gao, 2006). Sin embargo, se ha propuesto que el receptor A2A dispuesto en la membrana de los linfocitos T, protege a los tumores de la actividad antitumoral por estas células efectoras en un microambiente rico en adenosina (Otha *et al* 2006). La señalización vía el receptor A2A en las células T resulta en la inhibición de la activación y de la expresión del receptor del linfocito T y muchas otras funciones efectoras (Figura 8), incluyendo proliferación mediante la inhibición de IL-2, expansión y la secreción de citocinas importantes con función antitumoral como IFN- γ , TNF- α e IL-4 (Sevigny *et al* 2007; Sitkovsky and Ohta, 2005; Otha *et al* 2006; Mirabet *et al* 1999). También regulan el aumento de la expresión de moléculas coestimulantes negativas tales como CTLA4 y PD1, así como de la disminución de la molécula coestimuladora CD-40L (Sevigny *et al* 2007), como consecuencia de la elevada producción de AMPc mediante la estimulación de la adenilato ciclasa.

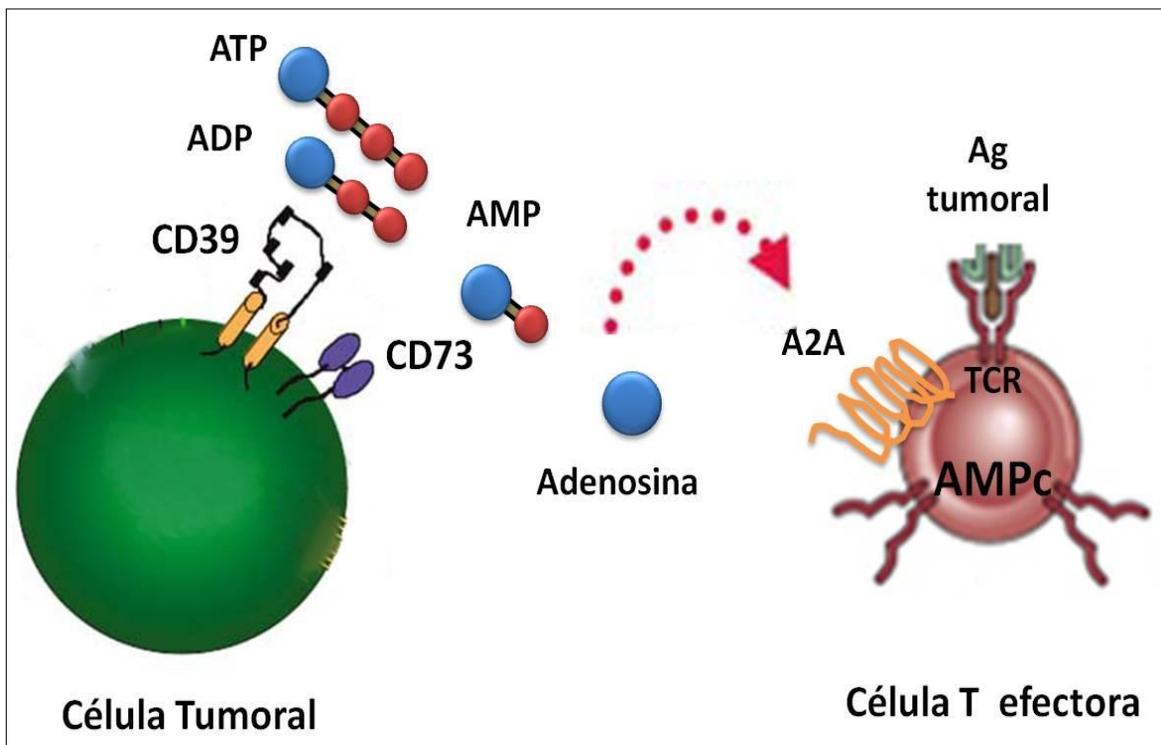


Figura 8 Representación de la inhibición de una célula T efectora mediante el incremento del AMPc por la señalización del receptor A2A de la adenosina la cual es generada a partir de hidrólisis enzimática de CD39 y CD73 ancladas en la superficie de una célula tumoral (Tomado y modificado de Sitkovsky *et al* 2008; Zhang, 2010).

También se ha demostrado en un modelo de ratón que la adenosina, a través de el receptor A3, puede interferir con el reconocimiento de las células tumorales y la actividad citolítica de los linfocitos citotóxicos que bajo condiciones de activación están regulados por estos receptores y pueden contribuir a los efectos provocados por la adenosina (Gessi *et al* 2004).

Dadas las propiedades inmunosupresoras fuertes de la adenosina y su concentración alta en los tumores sólidos, es razonable inferir que la adenosina puede constituir una parte importante de la llamada "barrera inmunológica" que conduce a un fracaso en la respuesta inmune antitumoral. Recientemente se han ideado algunos sistemas para contrarrestar el efecto inmunosupresor de adenosina en tumores, por ejemplo la actividad de la 5'-nucleotidasa puede ser inhibida por una variedad de análogos de nucleótidos di- y tri-fosfatos. Los análogos del nucleótido ADP son más potentes que los de ATP (Naito, 1985). El análogo de ADP, adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) es un inhibidor relativamente selectivo de la enzima 5'-ectonucleotidasa (Sowa *et al* 2010; Zimmermann, 1992) y ha sido probado con éxito en modelos de tumores (Zhang, 2010).

Por otro lado se ha empleado el uso de antagonistas del receptor A2A como la cafeína, lo que ha permitido la reactivación de la actividad funcional de linfocitos T efectores y la disminución del tamaño tumoral (Ohta *et al* 2006). Los antagonistas de los receptores de adenosina, incluida la cafeína, mejoran la inhibición del crecimiento tumoral por los linfocitos T, permitiendo una reducción de la metástasis y previenen la angiogenia tumoral (Figura 9). La cafeína puede bloquear de forma dependiente de la dosis los efectos del autoicoide adenosina, incluidos los que se producen en las células cancerosas que también tienen receptores de adenosina. Por el momento los receptores de adenosina de las células cancerosas no se han considerado una diana para el desarrollo de fármacos anticancerosos. Sin embargo, hay evidencias de que los receptores de adenosina de las células del sistema inmunitario pueden ser una buena diana terapéutica al menos en ciertos tipos de cáncer (Franco *et al* 2008), lo cual sugiere que el uso de antagonistas del receptor A2A y/o el bloqueo de la generación de adenosina a través de la inhibición de la ectoenzima CD73, puede ser de gran relevancia para revertir el efecto inmunosupresor en el microambiente tumoral.

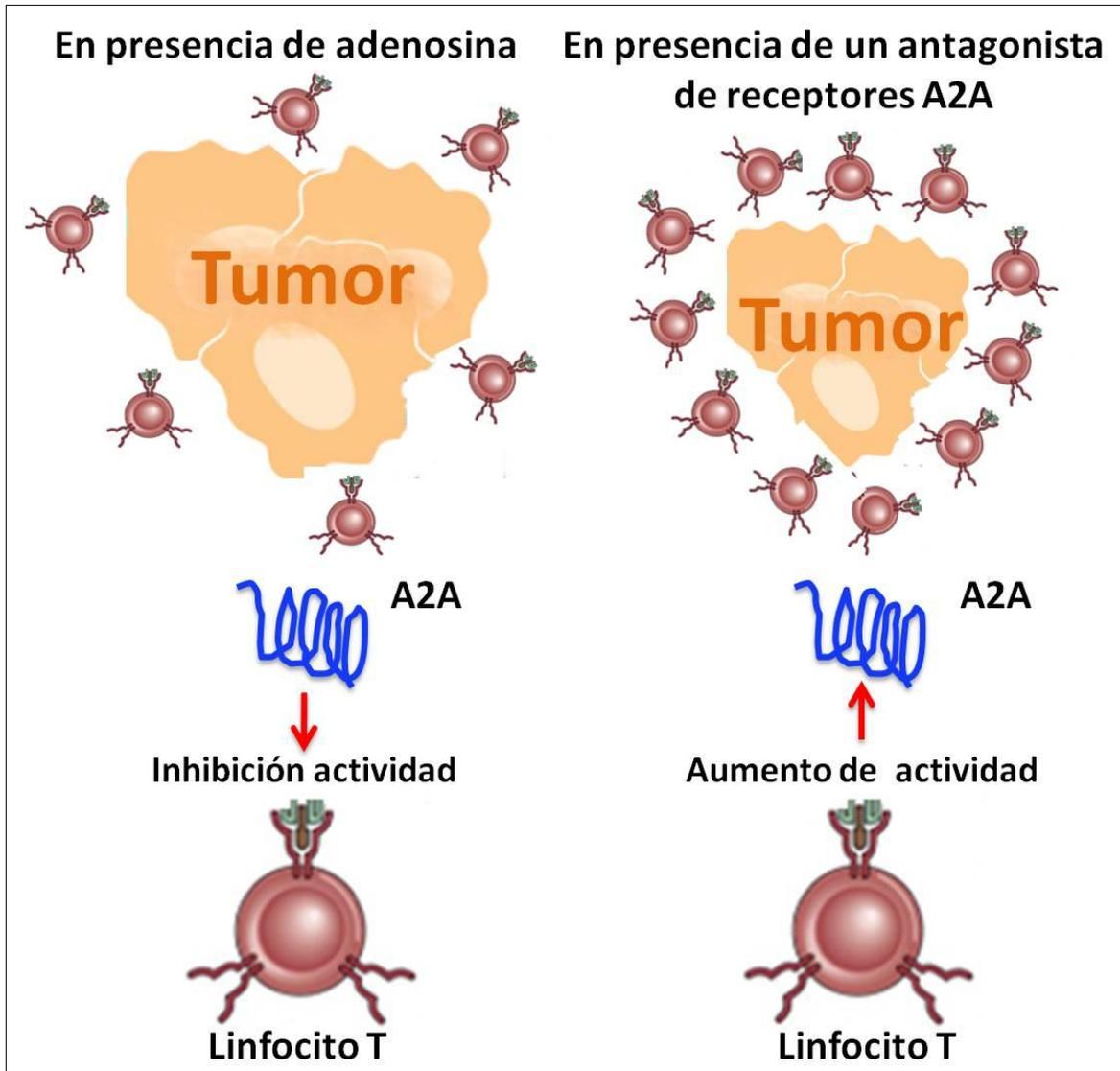


Figura 9. Papel de los receptores A2A de adenosina en los efectos antitumorales de los linfocitos T. Imagen de un tumor desarrollado con producción de adenosina activando los receptores A2A de adenosina en linfocitos, lo cual implica una inhibición de su actividad antitumoral (izq). Bloqueo de los receptores A2A con un antagonista, los linfocitos T tendrían más capacidad antitumoral (der) (Tomado y modificado de Franco *et al* 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por tumores malignos entre las mujeres de todo el mundo con medio millón de nuevos casos y cerca de 300.000 muertes cada año y en México es una de las principales causas de muerte y cada año se diagnostican alrededor de 12,000 casos nuevos de CaCu invasor (INEGI, 2010; Muñoz *et al* 2002). Actualmente, es el primer cáncer reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es cercano al 100% atribuible a la infección por el virus de papiloma humano (HPV) (Bosch *et al* 2002), siendo la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo (Herman and Baylin, 2003). La persistencia de la infección por HPV de alto riesgo y la deficiente respuesta inmune para eliminar a las células infectadas en sus etapas iniciales juega un papel muy importante (Bellone *et al* 2009). Se ha reportado que durante el desarrollo de la neoplasia cervical, varios factores inmunosupresores pueden intervenir para evitar la respuesta inmune celular de manera eficiente, ya que las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectoros de células T anti-tumorales (Tindle, 2002). Un mecanismo inmunosupresor recientemente propuesto es la vía adenosinérgica, el cual a través de la fosfohidrólisis de nucleótidos intermedios de adenina mediado por la enzima 5'-ectonucleotidasa (CD73), produce adenosina extracelular cuya función es la de inhibir varios mecanismos que conducen a la activación y a la función efectora de linfocitos T citotóxicos (Blay *et al* 1997; Thompson *et al* 2004; Ohta *et al* 2006). A través de análisis inmunohistoquímicos, nuestro grupo de trabajo ha detectado la presencia de la molécula CD73 en membrana y citoplasma de células malignas distribuidas en cortes histológicos de tejidos tumorales de CaCu de diferentes estadios clínicos, por lo que nos permitió sugerir que la vía adenosinérgica, a través de CD73 y la liberación de adenosina (potente factor anti-inflamatorio), pudiera ser un mecanismo de inmunosupresión utilizado por las células tumorales. Por tal motivo, en el presente trabajo de investigación, empleamos líneas celulares derivadas de tumores de CaCu para analizar la presencia y la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5). La identificación de la vía adenosinérgica y su actividad funcional en células tumorales de CaCu resulta de gran importancia en este tipo de tumor, puesto que constituye un mecanismo de supresión inmunológica contra células efectoras del sistema inmune. Por lo que será importante enfocar estudios para establecer nuevos protocolos de inmunoterapia hacia este tipo de cáncer.

HIPÓTESIS

Se sabe que en las etapas previas al cáncer invasor, el sistema inmunológico aún es capaz de combatir y promover la regresión o mantener el tumor localizado. Sin embargo las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o suprimir los mecanismos efectores de células T anti-tumorales. Recientemente se ha demostrado que la vía adenosinérgica, caracterizada por la producción de adenosina, a través de la degradación de nucleótidos extracelulares como AMP, catalizados por la ectoenzima CD73, es un nuevo mecanismo de inmunosupresión en tumores. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha evidenciado la presencia de CD73 en células tumorales en cortes histológicos de tumores con diferentes estadios clínicos de cáncer cérvico uterino. En consecuencia, se espera que líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino expresen la molécula 5'-ectonucleotidasa ó CD73 (EC 3.1.3.5) y tengan actividad funcional para generar adenosina, un potente agente inmunosupresor de linfocitos T.

OBJETIVOS

Objetivo general

**Analizar la expresión y la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 en líneas celulares tumorales derivadas de CaCu.

Objetivos particulares

**Analizar la expresión de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 en líneas celulares tumorales derivadas de CaCu.

**Analizar la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73 en líneas celulares tumorales derivadas de CaCu.

**Evaluar la inhibición de la actividad funcional de 5'-ectonucleotidasa ó CD73 en líneas celulares tumorales derivadas de CaCu.

**Analizar la capacidad inmunosupresora de las líneas celulares tumorales derivadas de CaCu mediante la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasa ó CD73.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

En el presente trabajo se emplearon 10 líneas celulares tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino (Cacu) (Cuadro 4). Cinco líneas celulares presentaron positividad para la infección por virus de papiloma humano (HPV) tipo 18, dos para HPV-16; una para HPV-45 y dos fueron negativas para cualquier tipo de HPV. Además se contó con la línea celular Hacat de queratinocitos humanos, negativa a la infección por HPV, la cual fue empleada como control.

LÍNEA CELULAR	CARACTERÍSTICAS
Hela	Carcinoma epiteloide (Adenocarcinoma). (HPV 18)
Inbl	Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizado; estadio clínico IVB. (HPV 18)
Calo	Carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizado; estadio clínico IIB. (HPV 18)
Rova	Carcinoma de células escamosas; estadio clínico IIB. (HPV 18)
Vipa	Carcinoma IIA .(HPV18)
Caski	Carcinoma epidermoide cervical metastásico. (HPV 16)
Siha	Carcinoma escamoso de cérvix. (HPV 16)
MS-751	Carcinoma de cérvix. (HPV 45)
C33A	Carcinoma de cérvix. (HPV negativo)
Vibo	Carcinoma de cérvix (HPV negativo)
Hacat	Queratinocitos humanos, negativa a la infección por HPV

Cuadro 4. Líneas celulares utilizadas en el estudio.

Las líneas celulares fueron mantenidas bajo condiciones de cultivo, empleando medio de cultivo RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies) al 10%, antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomycin 100ug/mL), mantenidas bajo condiciones de esterilidad y reguladas a temperatura constante de 37 °C en una incubadora (Forma Scientific) con 5% de CO² y un ambiente de humedad saturante.

Ensayo de citometría de flujo

Para determinar la expresión de CD73 en la membrana celular de las diferentes líneas celulares derivadas de CaCu, se empleó un análisis de citometría de flujo. Brevemente, un total de 5×10^5 células resuspendidas en PBS suplementado al 2% con SFB fueron colocadas en viales a 4° C por 30 min, en obscuridad con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD73-PE, de acuerdo a las cantidades sugeridas por el proveedor (Beckton Dickinson). Las células fueron también teñidas con un isotipo control IgG2a-PE (Caltag Laboratories). Después de 2 lavados con PBS-SFB, las células marcadas fueron analizadas mediante un citómetro de flujo FACS- Calibur (BD Biosciences), contando un mínimo de 10,000 eventos.

Ensayo de actividad enzimática

Con la finalidad de evaluar la actividad enzimática de las moléculas CD73 en las líneas celulares de CaCu, se estableció un ensayo *in vitro* para convertir Adenosina Monofosfato (AMP) a Adenosina. Para ello, 10×10^6 células viables de cada una de las líneas celulares fueron depositadas por duplicado en placas de 96 pozos de fondo cóncavo estériles con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado al 10% con sustituto de suero (SS) (Invitrogen USA). En uno de los pozos se colocó Adenosina 5'-monofosfato (AMP) (Sigma, Life science) a una concentración final de 5mg/mL, mientras que en el segundo pozo las células fueron preincubadas durante 15 minutos con 5mg/mL del inhibidor de CD73, adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) (Sigma-Aldrich), y posteriormente se adicionó el sustrato AMP a una concentración final de 2.5mg/mL, el volumen final de reacción fue de 200 μ L. Después de la adición del sustrato, las células fueron resuspendidas e inmediatamente se tomó una alícuota de 1 μ L (Tiempo cero) y las células fueron incubadas a 37°C, humedad saturante y 5% de CO². A partir de ese momento y en cada hora de incubación (1-8 hrs) fueron tomadas muestras de 1 μ L de la suspensión celular. Todos los sobrenadantes de las líneas celulares fueron almacenados a -20°C en tubos eppendorff para ser usados posteriormente.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Para analizar la conversión de AMP a Adenosina, se utilizó un ensayo de cromatografía en capa fina (CCF), para ello, los sobrenadantes obtenidos del cultivo de las líneas celulares con AMP tomados en los diferentes tiempos (1-8hrs), fueron colocados sobre laminillas de CCF fluorescentes de poliéster conteniendo silica gel (Sigma USA) (3x8cm). Después de 30 minutos las laminillas fueron colocadas verticalmente en una cámara de elución conteniendo 2mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol: alcohol isoamílico:etoxietanol:amoníaco:agua (9:6:18:9:15). La fase móvil se dejó correr durante 1 h y posteriormente las laminillas fueron retiradas de la cámara de elución para su secado a temperatura ambiente. Se emplearon como controles 1 μ L de una solución de Adenosina 5'-monofosfato y de Adenosina 99% (Ado) (Sigma, Life science) a una concentración de 5mg/mL. Finalmente los compuestos AMP y

Adenosina fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV).

Obtención y cultivo de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP)

Con la finalidad de obtener células mononucleares de sangre periférica para evaluar la capacidad inmunosupresora de adenosina en la proliferación de linfocitos, se tomaron 10-15 mL de sangre periférica de un donador sano mediante punción en la vena de un brazo empleando tubos vacutainer con anticoagulante (ACD) (Becton, Dickinson, USA). En condiciones de esterilidad la muestra de sangre fue procesada y centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma (fase superior) del paquete celular (fase inferior). Con ayuda de una pipeta serológica fue retirado el plasma y colocado en otro tubo para eliminar las proteínas de complemento mediante baño maría a temperatura de 56°C durante 30 minutos. La fase inferior conteniendo el paquete celular, fue trasvasada a un tubo Falcon de 50 mL para lavar las células con solución buffer salina de fosfatos (PBS). Después de dos lavados, el paquete celular se diluyó con igual volumen de PBS y la mezcla se adicionó a otro tubo Falcon que contenía 10 mL de Ficoll (Linfograde Microlab, Mex) con una densidad de 1.077 g/mL. Posteriormente el tubo fue centrifugado durante 30 minutos a 1000 rpm. A continuación, la banda blanca, conteniendo a los linfocitos, situada en la interfase, fue retirada lentamente del gradiente y los linfocitos finalmente fueron resuspendidos con medio ISCOVES'S modificado con 10% de Suero Autólogo libre de complemento, 4mM de L-glutamina, 1 mM de Piruvato de Sodio, 20 uM de 2-Mercaptoetanol y una mezcla de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, USA), además de antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomina 100µg/mL).

Cultivo de LSP con la adenosina producida en los cultivos de las líneas celulares.

Los LSP obtenidos por Ficoll fueron sembrados por triplicado a una concentración de 50,000/100 µl conteniendo diluciones de los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares con AMP, aproximadamente a una concentración final de 10 µg/mL tomando como base que la concentración inicial de AMP fue de 2.5mg/mL. Para inducir la proliferación de los linfocitos T se adicionaron perlas conteniendo anti-CD3/CD28 (Dyanbeads, Invitrogen USA) en una proporción 1:10, perlas:LSP. Por otro lado, con la finalidad de evaluar de manera simultánea el bloqueo del efecto inmunosupresor de adenosina sobre la proliferación de LSP, se adicionó cafeína (J.K Baker,USA), un agente bloqueador de los receptores para adenosina (A2A, A2B, A1, A3) en los linfocitos T, a una concentración final de 300 µM. LSP sembrados en presencia de perlas co-estimuladoras (control positivo de proliferación), con medio solo, con AMP, con Adenosina, con cafeína y con adenosina-cafeína fueron sembrados de manera independiente para establecer los controles correspondientes.

Marcaje y conteo de proliferación de linfocitos T cultivados con productos de la actividad funcional de CD73

Después de 72 hrs de cultivo, los linfocitos T fueron marcados con 1 μ Ci de timidina tritiada [3 H] (Dupont, USA) por cada pozo y se dejaron en cultivo por 24 hrs más. La placa de 96 pozos fue almacenada a -70°C con la finalidad de detener la proliferación de linfocitos. Las células fueron cosechadas con ayuda de una cosechadora de células (marca Brandel modelo MH-12 USA) y la incorporación de [3 H] en los linfocitos T fue determinada con ayuda de un contador de centelleo automático (Beckman modelo LS 6,500 USA). Finalmente se determinó el porcentaje de inhibición en la proliferación inducido por cada uno de los sobrenadantes empleando la siguiente fórmula:

$\% \text{inhibición} = 1 - ((\text{cpm de los linfocitos cultivados con sobrenadantes} / \text{cpm de los linfocitos cultivados con perlas anti- CD3/CD28})) \times 100$

Análisis estadístico

Para verificar las diferencias significativas ($P < 0.05$) los $\% \text{inhibición}$ se analizaron utilizando la prueba t de Student.

RESULTADOS

Expresión de CD73 en líneas celulares derivadas de tumores de cáncer cérvico-uterino.

La expresión de la molécula CD73 en la membrana de las líneas celulares fue detectada con ayuda del anticuerpo monoclonal anti-CD73-PE (histograma marcado con línea negra) mientras que las células marcadas con anticuerpo isotipo control (histograma en color rojo) fueron tomadas como referencia (Figura 10). Las líneas celulares mostraron gran variabilidad en la expresión de CD73 en membrana celular, encontrándose valores desde 1.75 a 10.65 de intensidad media de fluorescencia (IMF). La línea celular negativa a HPV, C33A no expresó la molécula CD73, mientras que las líneas celulares Vibo (HPV-) y Calo (HPV-18+) casi no la presentaron, mostrando valores de 3.75 y 3.5 de IMFs, respectivamente. Las líneas celulares Hela, Rova, Inbl y Vipa (HPV-18+); Caski y Siha (HPV-16+) y MS-751 (HPV-45+) presentaron valores de CD73 superiores a 5 de IMF. La línea celular Hacat empleada como control de referencia no fue incluida en los histogramas ya que no puede considerarse como un control normal. En este caso no se dispuso de una estirpe epitelial normal de cuello uterino.

Actividad enzimática de CD73 en las líneas celulares de CaCu.

Se sabe que la acción biológica de CD73 es la hidrólisis de nucleótidos monofosfatos como el AMP hacia nucleósidos bioactivos intermedios como lo es la adenosina. La actividad enzimática de 1×10^7 células de cada una de las líneas celulares derivadas de CaCu en presencia de 2.5 mg de AMP y de un inhibidor de CD73 (adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato, APCP) fue analizado en una cinética de 8 horas de incubación. Como se esperaba, la actividad enzimática de CD73 se asoció estrechamente con su expresión en la membrana celular. Las líneas celulares negativas a la infección por HPV, C33A y Vibo, así como las líneas celulares Rova y MS-751 positivas a HPV-18 y HPV-45 respectivamente, mostraron actividad enzimática de CD73 muy baja, ya que sólo una pequeña fracción de AMP fue convertida a adenosina durante la cinética de cultivo (Figuras 11-13). La conversión completa de AMP a adenosina fue observada de manera diferencial en 7 de las 10 líneas celulares de CaCu: Caski en más de 4hrs y Siha en 8 hrs (Figura 11); Hela, Calo y Vipa a partir de la segunda hora, mientras que en Inbl, la conversión de AMP a adenosina fue inmediata (Figura 12); finalmente la línea celular Hacat mostró un tiempo de conversión de 6 horas (Figura 13). Por otra parte, la actividad de CD73 fue parcialmente inhibida por la adición del inhibidor específico APCP en la mayoría de los cultivos de las líneas celulares, no obstante el inhibidor fue incapaz de inhibir la actividad enzimática de CD73 en las líneas celulares Calo, Vipa e Inbl (Figura 12).

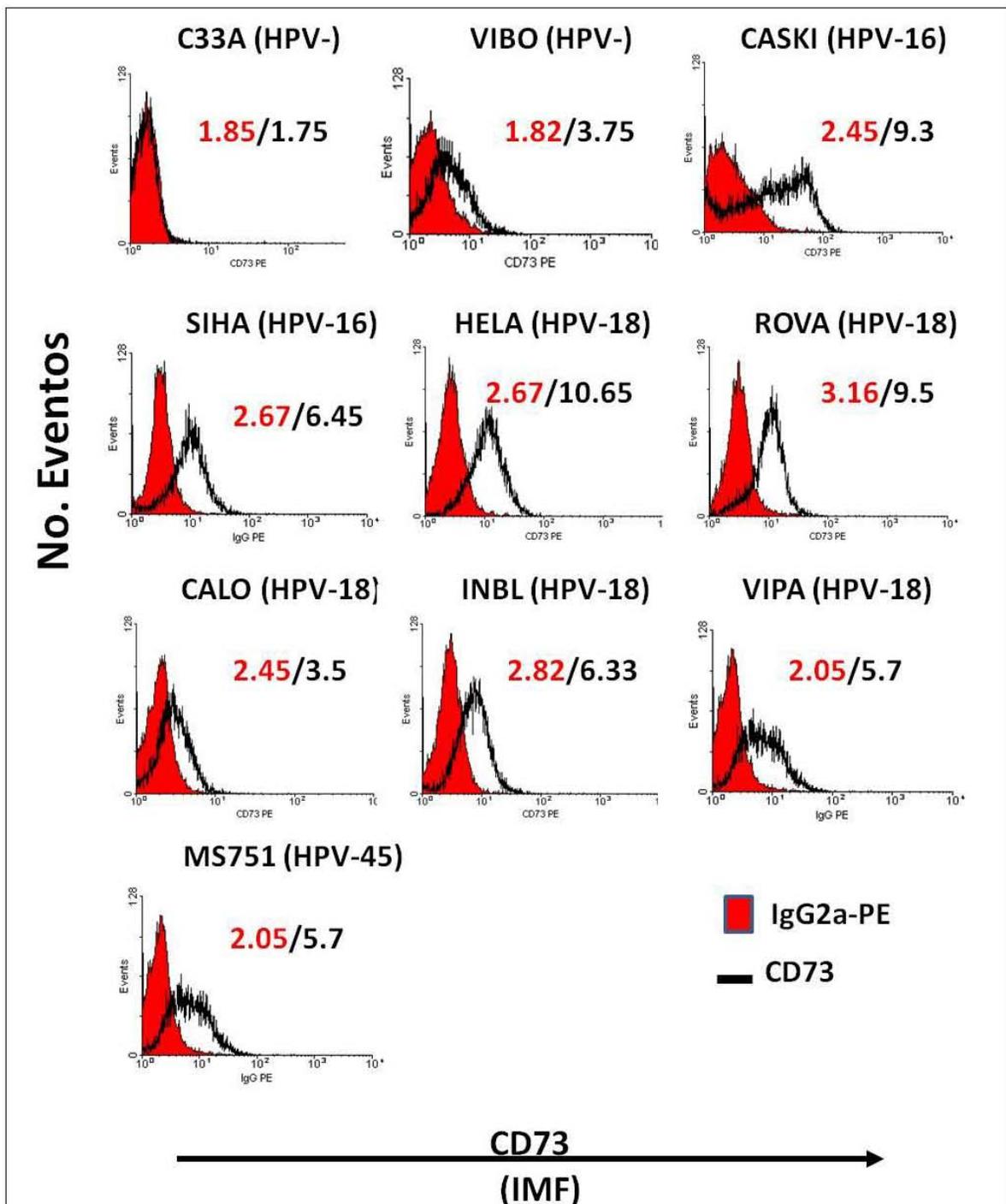


FIGURA 10. Expresión de CD73 en las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células marcadas con isotipo control (histogramas en rojo) y en aquellas positivas a CD73 (histogramas marcados en línea negra).

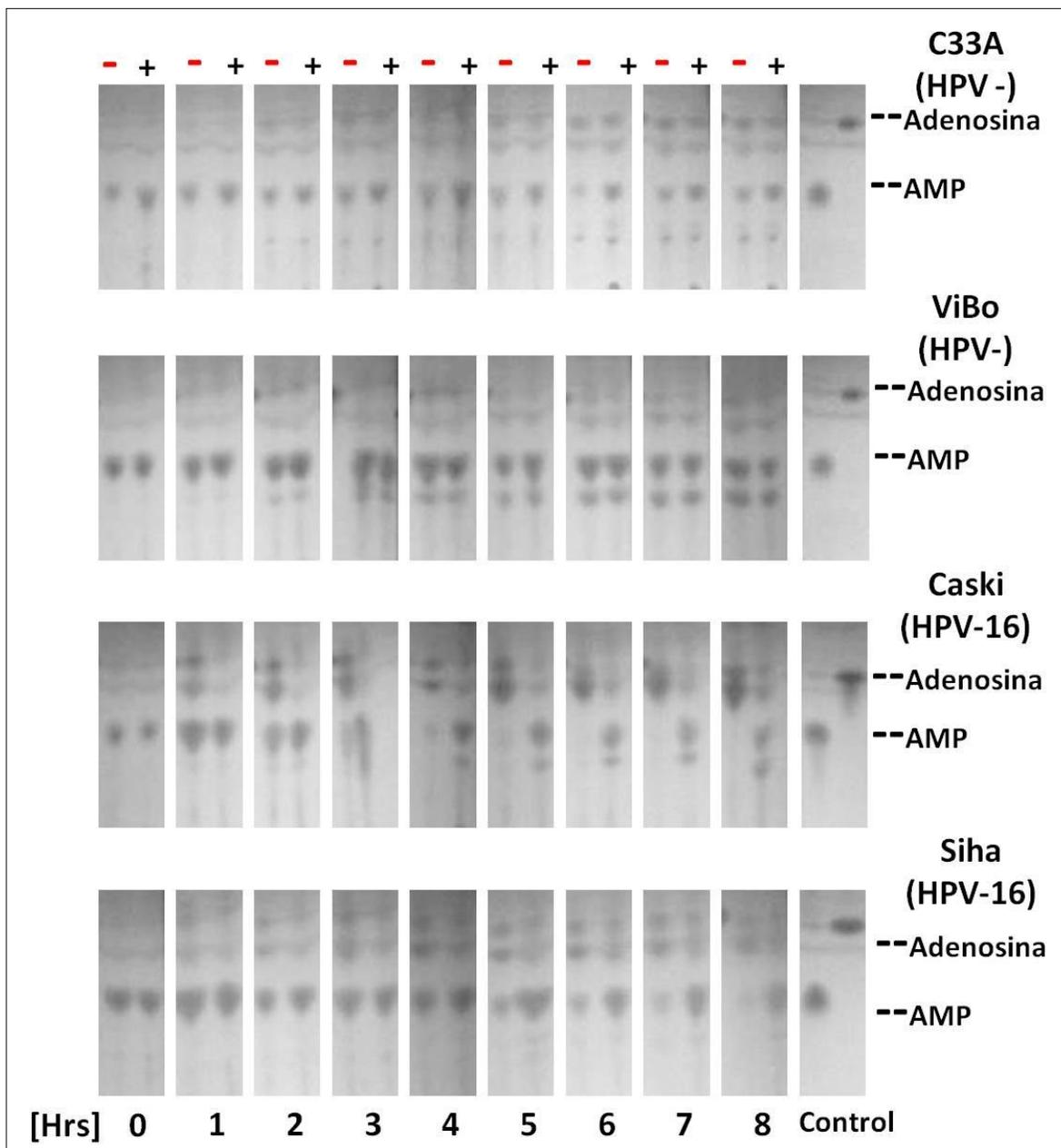


Figura 11. Actividad enzimática de CD73 en las líneas celulares C33A, Vibo (negativas a la detección de HPV) Caski y SiHa (positivas a la detección de HPV-16), fue determinada al cultivar 1×10^7 células con 2.5mg/mL de AMP en ausencia (-) o en presencia (+) del inhibidor APCP de CD73. La conversión de AMP a Adenosina fue analizada cada hora a través de cromatografía en capa fina y revelada mediante rayos UV.

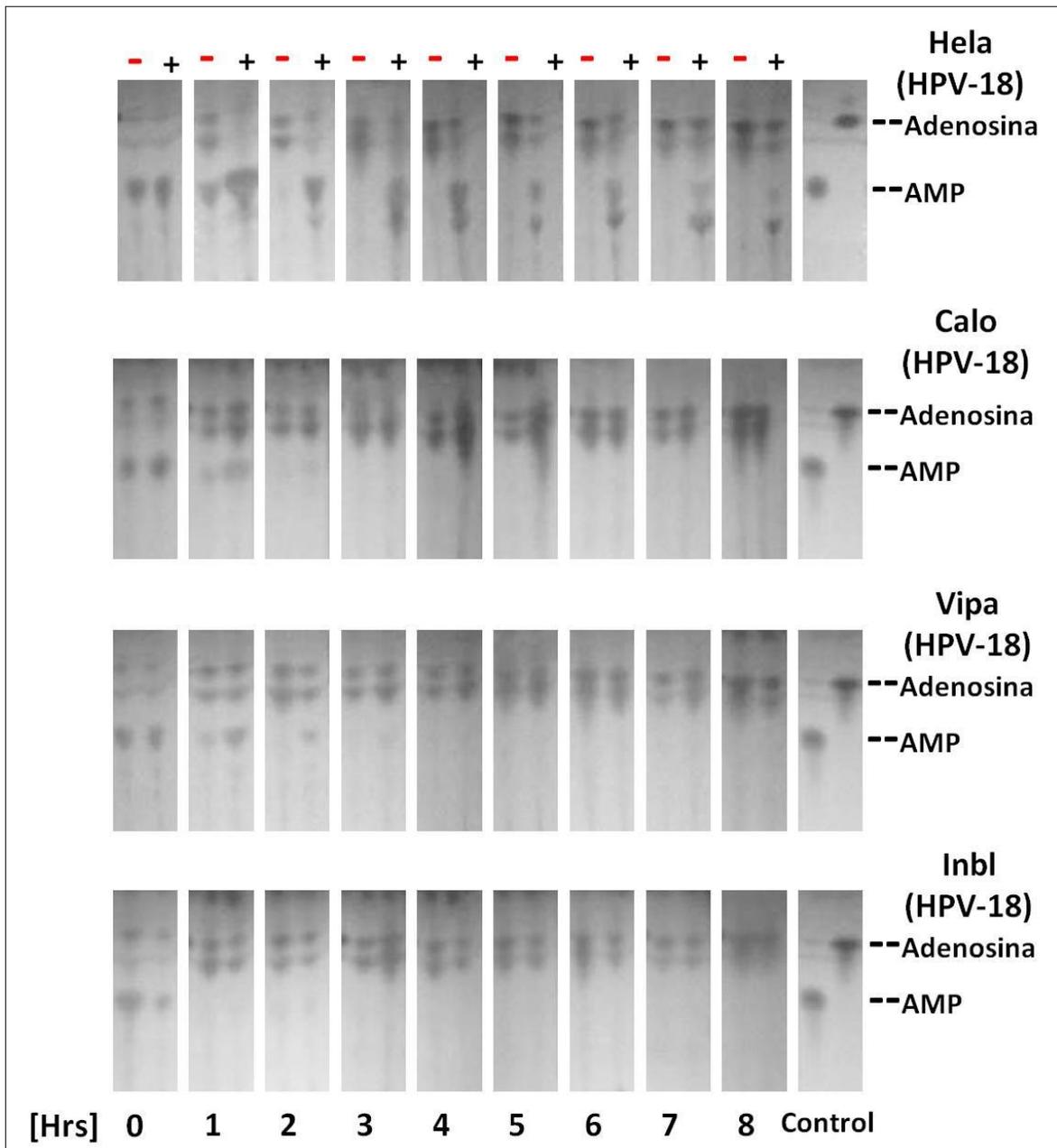


Figura 12. Actividad enzimática de CD73 en las líneas celulares HeLa, Calo, Vipa e Inbl (positivas a HPV-18) fue determinada al cultivar 1×10^7 células con 2.5mg/mL de AMP en ausencia (-) o en presencia (+) del inhibidor APCP de CD73. La conversión de AMP a Adenosina fue analizada cada hora a través de cromatografía en capa fina y revelada mediante rayos UV.

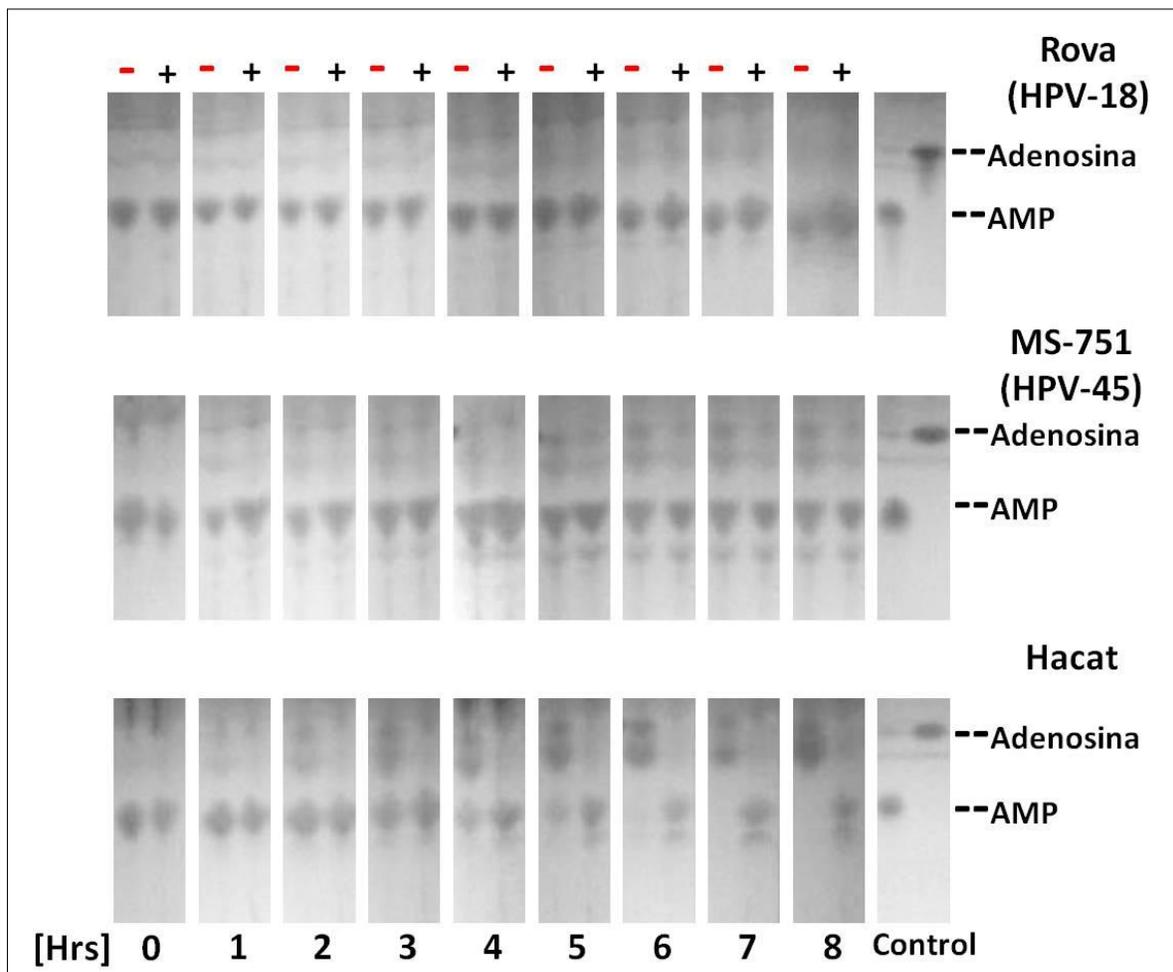


Figura 13. Actividad enzimática de CD73 en las líneas celulares Rova (positiva a HPV-18), MS-751 (positiva a HPV-45) y Hacat (control negativo de HPV) fue determinada al cultivar 1×10^7 células con 2.5mg/mL de AMP en ausencia (-) o en presencia (+) del inhibidor APCP de CD73. La conversión de AMP a Adenosina fue analizada cada hora a través de cromatografía en capa fina y revelada mediante rayos UV.

La adenosina generada por CD73 en las líneas celulares tumorales de Cacu contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T.

Inicialmente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de adenosina pura (Sigma, USA) sobre la proliferación de linfocitos T de sangre periférica de donadores normales cultivados en presencia de perlas (Dynabeads, Invitrogen, USA) conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28. Como se puede observar en la figura 14, a la concentración de 20 μM la adenosina inhibió notablemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica.

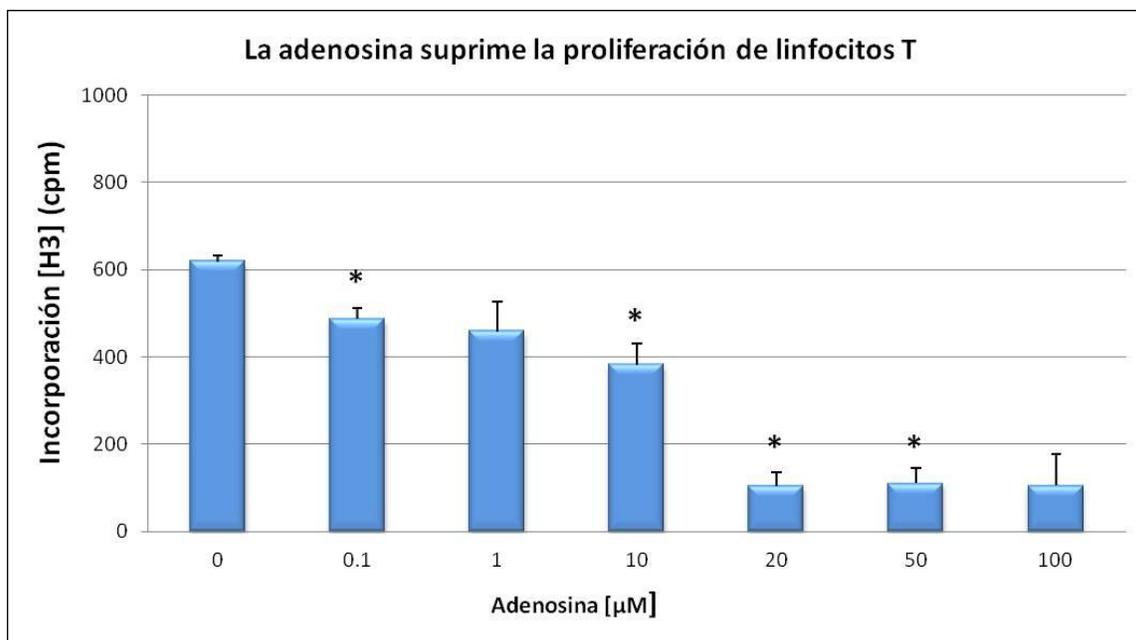


Figura 14. Efecto de diferentes dosis de adenosina sobre la proliferación de linfocitos T de sangre periférica (LSP) de donadores normales. LSP fueron estimulados con perlas conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28 (Dynabeads, Invitrogen, USA) en proporción 1:20 y cultivados en presencia de diferentes concentraciones de adenosina. Después de 72 hrs de cultivo, los linfocitos fueron marcados con timidina tritiada $1\mu\text{Ci}$ y después de 18 hrs fueron cosechados y cuantificados en un contador de centelleo, los resultados se muestran en cuentas por minuto (cpm). * $P < 0.05$ con respecto al control.

Considerando que la adenosina generada en los cultivos de las líneas celulares en presencia de AMP deriva esencialmente de este compuesto, y que algunas de las líneas tal como Inbl, Calo y Vipa convirtieron completamente el sustrato AMP (2.5mg/mL) en adenosina (aprox 2.5mg/mL), se llevaron a cabo cultivos de 96 hrs de LSP estimulados con perlas en presencia de diluciones 1:200 de cada uno de los sobrenadantes obtenidos del cultivo previo de las líneas celulares con AMP. Como era de esperarse, los sobrenadantes derivados las líneas celulares con mayor actividad enzimática de CD73 y positivas a la infección por HPV tipo 16 y 18 (Caski, Siha, Hela, Calo, Vipa e Inbl) inhibieron en mayor proporción la proliferación de LSP (30-60% de inhibición) (Figura 15, barras azules) comparado con el casi 100% de inhibición obtenida al adicionar 20 μM de adenosina pura

(Figura 15, barra roja). Mientras que la inhibición obtenida por la adición de los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares con menor actividad de CD73 (C33, Vibo, Rova, MS-751 y Hacat) fue menor al 15%. En todos los casos, los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las líneas celulares con AMP y en presencia del inhibidor (APCP) de CD73, mostraron una ligera disminución en la actividad inhibitoria de dichos sobrenadantes, comparada con la observada con los sobrenadantes de las células a las cuales no se les adicionó el inhibidor de CD73 (Figura 15, barras amarillas).

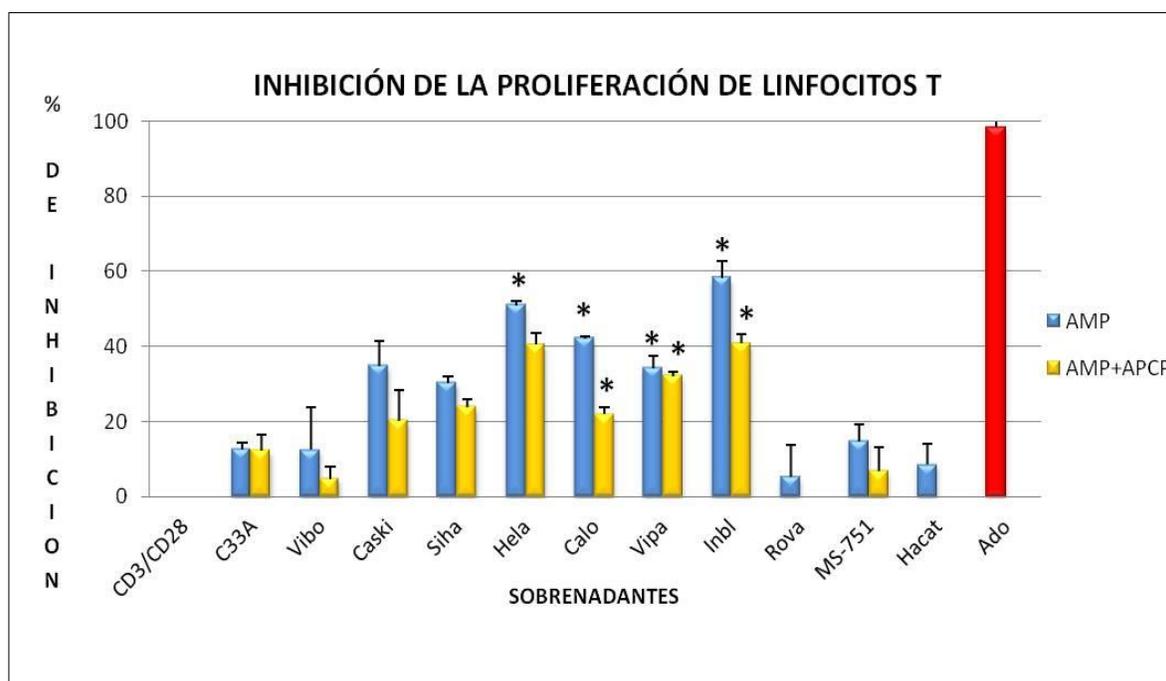


Figura 15. La adenosina generada por las líneas celulares cultivadas con monofosfato de adenosina (AMP) contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T. Linfocitos T de sangre periférica de donadores normales estimulados con perlas coestimuladoras (conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28), fueron cultivados en presencia de sobrenadantes obtenidos del cultivo de las líneas celulares con AMP, en ausencia (barras azules) o en presencia del inhibidor de CD73, adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP), (barras amarillas). Después de cuatro días de cultivo se determinó el porcentaje de inhibición de la proliferación. * $P < 0.05$ con respecto al control.

El bloqueo de los receptores para adenosina en linfocitos T disminuye la actividad supresora de adenosina producida en las líneas celulares de CaCu.

Tomando en cuenta que la unión de adenosina a los receptores de alta (A1, A2A) o baja afinidad (A2B y A3) puede ser bloqueado por la cafeína, un antagonista de los receptores de adenosina, linfocitos T de sangre periférica de donadores normales fueron cultivados en presencia de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las líneas celulares, en presencia de cafeína a una concentración de 300 μ M (suficiente para bloquear todos los receptores de adenosina (Góngora-Alfaro *et al* 2005).

La actividad supresora de la adenosina contenida en los sobrenadantes de las líneas celulares que mostraron menor actividad de CD73, fue completamente inhibida en presencia de cafeína, mientras que la actividad supresora de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las líneas celulares que mostraron mayor actividad enzimática de CD73 (Caski, Siha, Vipa, Calo e Inbl) fue disminuida en aproximadamente un 50%, aún en sobrenadantes de cultivos celulares en presencia del inhibidor APCP (Figura 16), comparado con el 35% de disminución de la inhibición con adenosina pura y cafeína (Figura 16, barra amarilla). Lo cual sugiere fuertemente que la generación de adenosina a través de la vía adenosinérgica en las células tumorales de cáncer cérvico-uterino, puede ser un factor importante en la supresión de la respuesta inmune antitumoral.

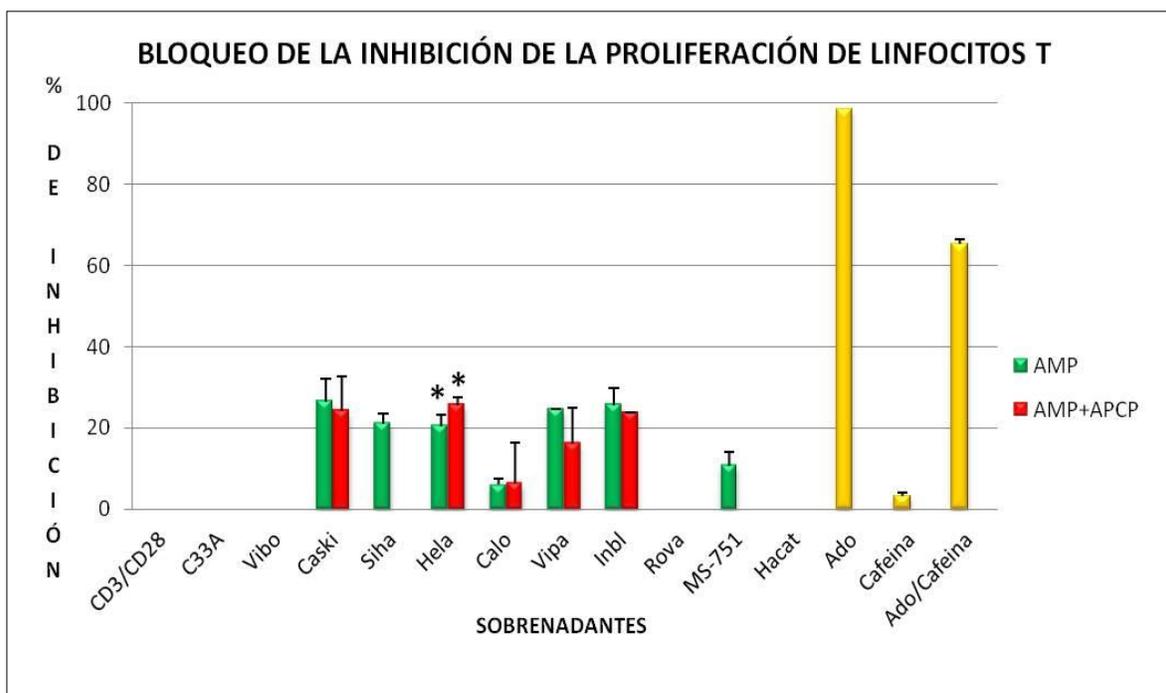


Figura 16. La cafeína disminuye el efecto inhibitorio de la adenosina generada por las líneas celulares cultivadas con monofosfato de adenosina (AMP). Linfocitos T de sangre periférica de donadores normales estimulados con perlas coestimuladoras (conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28), fueron cultivados con sobrenadantes de las líneas celulares cultivadas previamente con AMP, en ausencia (barras verdes) o en presencia del inhibidor de CD73, adenosina 5'- α -metileno difosfato (APCP), (barras rojas). A los cultivos celulares se adicionó cafeína, un antagonista de la adenosina. Después de cuatro días de cultivo se determinó el porcentaje de inhibición de la proliferación de los linfocitos T. * $P < 0.05$ con respecto al control.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos, juega un papel determinante en la eliminación de células infectadas por virus y células tumorales (Delgado *et al* 2008; Wang X *et al* 2008). No obstante, durante la progresión del tumor la deficiencia en la respuesta inmune puede darse como consecuencia de la activación de múltiples mecanismos inmunosupresores que en conjunto generan un microambiente de tolerancia que conduce a la evasión de la respuesta inmune (Rabinovich *et al* 2007; Turley *et al* 2008). Dentro de los mecanismos inmunosupresores destacan: la producción de citocinas inmunosupresivas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Li *et al* 2006), interleucina 10 (IL-10), IL-13 (Teraben *et al* 2000; Gerlini *et al* 2004), y pequeñas moléculas inhibitorias como la prostaglandina E2 (PGE2) (Akasaki *et al* 2004) y la adenosina extracelular regulada por la enzima 5'-ectonucleotidasa (CD73). La molécula CD73 es una glicoproteína anclada en la membrana de las células de varios tejidos y su principal actividad funcional es catalizar adenosina 5'-monofosfato (AMP) a adenosina (Hoskin *et al* 2008). Estudios recientes sugieren que la función de CD73 en tumores está implicada en la resistencia a las drogas, la promoción, control, crecimiento y progresión tumoral, metástasis y alteración de la respuesta inmune anti-tumoral (Airas *et al* 1995; Stagg *et al* 2010; Jin *et al* 2010; Wang L *et al* 2011). Por tanto, el análisis de la expresión, de la actividad funcional de CD73 en células tumorales y su papel en la supresión de la respuesta inmune resulta relevante para el establecimiento de nuevas estrategias de terapia antitumoral.

En el presente trabajo de investigación se analizó la expresión y actividad funcional de CD73 en 10 líneas celulares derivadas de tumores de cáncer cérvico uterino: C33A y Vibo (HPV-); Caski y Siha (HPV-16+) y Calo, Inbl, Hela y Rova (HPV-18+) y MS-751(HPV45+). De acuerdo a los resultados obtenidos en este modelo experimental *in vitro*, se encontró que: a) a excepción de Calo (HPV-18+) las líneas celulares positivas a la infección por HPV (HPV-18+, HPV-16+ y HPV-45+) mostraron una mayor expresión de CD73 en membrana que aquellas negativas a la infección por HPV; b) la capacidad de las líneas celulares para generar adenosina a partir de AMP se asoció con la expresión de CD73 en la membrana en 5/8 líneas celulares HPV+; c) la actividad de CD73 fue parcialmente inhibida por la adición del inhibidor específico adenosina 5'- $\alpha\beta$ -metileno difosfato (APCP) en la mayoría de los cultivos de las líneas celulares, a excepción de Calo, Vipa e Inbl; d) la adenosina generada por las células tumorales cultivadas en presencia de AMP contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28; finalmente e) el bloqueo de los receptores para adenosina (con cafeína), inhibió la actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos T en las líneas celulares C33A, Vibo y Rova y la disminuyó en las líneas celulares Caski, Siha, Calo, Inbl, Hela, Vipa y MS-751.

La expresión y actividad funcional de CD73 ha sido evaluada en diferentes tipos tumorales incluyendo: cáncer de mama (Spychala *et al* 2004; Wang *et al* 2008), de esófago (Fukuda *et al* 2004), de próstata (Hastie *et al* 2005), de ovario (Cho *et al* 2006), de

tiroides (Kondo *et al* 2006), de vejiga (Stella *et al* 2009), melanoma (Sadej *et al* 2006), leucemia (Mikhailov *et al* 2008) y glioma (Bavaresco *et al* 2008) y los resultados han sido diversos. Por ejemplo, en un análisis específico de Western blot y Northern blot en 9 líneas celulares de cáncer de mama humano, se reveló una alta expresión de CD73 en los niveles de ARN mensajero (ARNm) y proteínas en cinco de seis líneas celulares negativas al receptor de estrógeno (ER-), mientras que en tres líneas positivas al receptor de estrógeno (ER+) mostraron una expresión muy baja o no detectable de la molécula (Spsychala *et al* 2004). Más recientemente, se demostró mediante citometría de flujo la presencia de CD73 en la superficie de una gran variedad de células tumorales. Mikhailov y colaboradores (2008) revelaron una alta expresión de CD73 (3672 de intensidad media de fluorescencia (IMF)) en células leucémicas multiresistentes a drogas. En otro reporte, las células de cáncer de mama de ratón 4T1.2 y E0771, en contraste con una variante no metastásica de 4T1.2 (67NR), expresaron altos niveles de CD73 (Stagg *et al* 2010). Otro estudio adicional ha mostrado que CD73 está regulada en los tejidos cancerosos y se expresa ampliamente en muchas líneas celulares de una gran variedad de tumores (Jin *et al* 2010). En el caso particular de nuestro trabajo de investigación, empleando un análisis de citometría de flujo se pudo detectar que la expresión de CD73 en membrana fue relativamente baja (1-11 IMF), de manera interesante se encontró que la mayor expresión de CD73 (IMF mayor a 5) se encontró en 7 de 8 líneas celulares de CaCu positivas a la infección por HPV, en contraste, las líneas celulares negativas a la infección por HPV y Calo (HPV-18+) mostraron una menor IMF (IMF <4) (Figura 10), sugiriendo que la presencia del virus en estas líneas celulares pudiera tener alguna asociación con la expresión de CD73. En este respecto, el aumento de la expresión de CD73 en células infectadas por virus fue sugerido a principios de la década pasada, al analizar la expresión de CD73 en células endoteliales infectadas *in vitro* por citomegalovirus (CMV) (Kas-Deelen *et al* 2001). Aunque no está claramente establecido cómo la infección viral aumenta la expresión de CD73, se ha demostrado que las citocinas producidas por las células infectadas por virus, tal como el interferón- α (IFN- α), inducen la expresión de CD73 en el endotelio *in vitro* e *in vivo* (Niemelä *et al* 2004), lo cual sería interesante de evaluar en las líneas celulares de CaCu.

Por otra parte, se ha reportado que la expresión de la molécula CD73 es significativamente aumentada en la membrana de las células tumorales y además acompañada de una alta actividad funcional y consecuentemente una mayor producción de adenosina extracelular (Zhang, 2010). Por ejemplo en el trabajo realizado por Spsychala y colaboradores (2004), donde dilucidaron la presencia de CD73 en líneas celulares de cáncer de mama humano, observaron una correlación de los niveles de proteína con la actividad funcional a través de cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que las líneas celulares (ER-) MDA-MB-231 y BT-549 que expresaron más altos niveles de CD73, produjeron más adenosina en comparación con las líneas (ER+). Asimismo en la línea celular de glioma U138MG se demostró una asociación entre la expresión de CD73, evaluada por RT-PCR, con la actividad funcional a diferentes confluencias de células incubadas con AMP (Bavaresco *et al* 2008). En otros trabajos, la actividad enzimática de CD73 en células endoteliales de cordón umbilical humano

(HUVEC'S) fue silenciada mediante el uso de ARN de interferencia (siRNAs) o inducida mediante el cultivo de estas células con IFN- α (Niemelä *et al* 2004; Grünewald y Ridley, 2010). En nuestro estudio, al evaluar la actividad funcional de CD73 en las diferentes líneas celulares, pudimos detectar mediante CCF la generación de adenosina a partir de AMP, la cual tuvo mayor actividad en la mayoría de las líneas celulares (HPV+), particularmente en las líneas HPV-18+, Hela, Calo, Vipa e Inbl (Figura 12). De hecho estas líneas celulares fueron quienes convirtieron AMP a Adenosina en los tiempos más cortos (<2 hrs). Aunque no puede establecerse una directa correlación entre la expresión de CD73 y la producción de adenosina en las células infectadas por HPV, debido a que la línea MS-751 mostró muy baja capacidad para generar adenosina a partir de AMP. De manera interesante la línea celular Rova no mostro actividad de CD73 posiblemente debido a que la enzima en esta línea celular pudiera tener algún cambio puntual que le impida tener esa función enzimática, la cual de acuerdo a nuestro sistema no pudo ser evidenciada. Por otro lado, también se ha reportado que células con capacidad inmunosupresora como son los linfocitos T reguladores, además de expresar moléculas de la vía adenosinérgica CD39/CD73, también expresan receptores de alta afinidad para adenosina, sin embargo para evitar ser afectados, los Tregs también expresan otra molécula implicada en la regulación de adenosina, como lo es Adenosina Deaminasa (ADA), la cual convierte adenosina a inosina que sigue otra vía metabólica intracelular para la síntesis de nucleótidos (Van Linden y Eltzschig 2007). Esta vía también ha sido reportada en células tumorales para controlar los niveles de adenosina (Vanoni *et al* 2004). En ensayos realizados por nuestro grupo de investigación se ha observado que las células tumorales de CaCu también expresan receptores de alta afinidad para adenosina y que el cultivo de las células tumorales en presencia de adenosina pura no afecta ni la proliferación ni su viabilidad aún en concentraciones altas 500 μ g/mL, sugiriendo que estas células pudieran tener otra vía de conversión de adenosina para evitar ser afectadas. En nuestros ensayos de cromatografía en capa fina (Figuras 11-13) se pudo observar que debajo de las bandas que corren a la altura del marcador de adenosina también corrieron bandas de un peso similar y en la misma proporción, lo cual será importante analizar en estudios posteriores para corroborar si éstas corresponden a inosina y si las líneas celulares también muestran alta actividad de ADA, lo que nos daría una idea más clara sobre la actividad de la vía adenosinérgica en estas células malignas. Finalmente la línea celular Hacat empleada como control mostró un tiempo de conversión de 6 horas, posiblemente por que es una línea celular queratinosítica inmortalizada(Boukamp *et al* 1988), por lo que hubiese sido ideal emplear una estirpe celular de epitelio normal de cuello uterino, sin embargo no se dispuso de esta.

La actividad funcional de CD73 en células tumorales a través de la generación de adenosina, ha sido evaluada *in vitro* y en modelos experimentales *in vivo* empleando anticuerpos monoclonales (mAb) como el anti-CD73 (TY/23) ó inhibidores selectivos de CD73 como el adenilmetileno difosfato (AMPCP) y APCP (Madara *et al* 1993; Kitakaze *et al* 1994; Spychala *et al* 2004; Mikhailov *et al* 2008; Stagg *et al* 2010). El inhibidor APCP, ha sido probado con éxito en diferentes modelos tumorales disminuyendo el crecimiento tumoral en ratones (Synnestvedt *et al* 2002; Thompson *et al* 2004; Eltzschig *et al* 2004;

Cho *et al* 2006; Stagg *et al* 2010; Jin *et al* 2010; Wang L *et al* 2011). En otros reportes se ha mostrado que el uso del inhibidor APCP en el cultivo de células tumorales SKOV-3 (derivada de adenocarcinoma de ovario humano) y U251 (derivada de glioblastoma), disminuyó significativamente el consumo de AMP hacia adenosina (Cho *et al* 2006). En resultados recientes Stagg y colaboradores (2010) mostraron que en las estirpes celulares provenientes de cáncer de mama de ratón 4T1.2 tratadas con AMP, se inhibió significativamente la generación de adenosina extracelular por tratamiento con el inhibidor APCP. En nuestro trabajo se encontró que en la mayoría de los cultivos de las líneas celulares la actividad de la molécula CD73 fue parcialmente bloqueada por la adición del inhibidor específico APCP. En el caso particular de las líneas Calo, Vipa e Inbl la inhibición de CD73 por APCP fue prácticamente nula, ya que a las primeras horas el sustrato AMP fue convertido rápidamente a adenosina, probablemente por que este es empleado como un inhibidor reversible competitivo para unirse al sitio activo de la enzima CD73, con una estructura parecida a la de AMP, además únicamente se evaluó la capacidad de inhibir cuando APCP se adicionó en cantidades equivalentes al AMP, y también debe considerarse que la cantidad de células en cultivo fue muy elevada (1×10^7). Por lo que sería interesante evaluar el efecto inhibitorio al adicionar mayor proporción de APCP al de AMP.

La adenosina al interactuar con receptores de alta afinidad (A2A) dispuestos en la membrana de los linfocitos T inhibe fuertemente su proliferación aún cuando son estimulados con anticuerpos o mitógenos. Por ejemplo, en un estudio en donde se aislaron linfocitos T de bazo de ratones C57BL/6 y éstos fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 e IL-2, la adición de adenosina inhibió a manera de dosis respuesta la proliferación de células T a muy bajas concentraciones (a partir de $0.1 \mu\text{M}$), tanto en poblaciones CD8+, CD4 (Th1) y CD4 (Th2) (Kobie *et al* 2006; Hoskin *et al* 2008). En nuestro trabajo de investigación encontramos factores solubles secretados por las células tumorales en el cultivo, tal como la adenosina generada a través de la vía adenosinérgica, así como la IL-10, una citocina encontrada en líneas celulares de carcinoma con una variedad de efectos inhibitorios que incluyen la inhibición de la proliferación de células T colaborando en la evasión de la respuesta inmune (Matsuda *et al* 1994), la cual fue evaluada mediante la técnica de ELISA (Anexo 1, Figura 17). Encontramos que concentraciones importantes en diluciones (1:200) de los sobrenadantes de las líneas celulares de CaCu, a concentraciones $\leq 20 \mu\text{M}$ tomando como base el hecho de que líneas como Inbl convirtieron totalmente $100 \mu\text{L}$ de una solución de 2.5mg/mL de AMP a adenosina, fueron capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T inducida por perlas coestimuladoras conteniendo anticuerpos anti-CD3/CD28. En estos ensayos, la mayor inhibición de la proliferación correspondió de manera directa al adicionar los sobrenadantes derivados de las líneas celulares con mayor expresión y actividad enzimática de CD73 en las células positivas a la infección por HPV tipo 16 y 18. De manera interesante los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las líneas celulares con AMP y en presencia de APCP (inhibidor específico de CD73) mostraron disminución en la actividad inhibitoria de dichos sobrenadantes, lo que apoya fuertemente la sugerencia de que estas células malignas, a través de la expresión de CD73, son capaces de generar

adenosina, y que a través de ella se pueda ejercer un efecto inmunosupresor de la respuesta inmune, tomando en consideración que una muestra de cada uno de estos sobrenadantes fue corrida en las placas de CCF (Figuras 11-13), lográndose evidenciar la presencia de adenosina, al compararse con adenosina pura sintética corrida al mismo tiempo. Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por el grupo de Jin y colaboradores (2010), quienes encontraron que en sobrenadantes de líneas celulares de cáncer de ovario de ratón, ID8 con actividad y expresión sobrerregulada de CD73, previamente tratadas con AMP suprimieron la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ inducida por anti-CD3; en contraste a nuestro trabajo, encontraron que el AMP no inhibe la proliferación de linfocitos T en presencia de APCP indicando que el AMP por sí mismo no tiene actividad inmunosupresora. En nuestro estudio, el hecho de haber encontrado inhibición en la proliferación de linfocitos al emplear sobrenadantes de los cultivos de las células tumorales con AMP y en presencia de APCP, probablemente se deba a que estos sobrenadantes fueron colectados después de 8 horas de incubación, tiempo en el cual se pudo haber generado adenosina aun en presencia de APCP.

Por otro lado se ha demostrado que la actividad supresora de la adenosina puede ser bloqueada por el empleo de antagonistas específicos para sus receptores, derogando la supresión de la proliferación de células T inducida por adenosina *in vitro* y disminuyendo la progresión y crecimiento tumoral *in vivo* (Otha *et al* 2006; Jin *et al* 2010; Wang L *et al* 2011). En el trabajo de Jin y colaboradores (2010) en un estudio realizado con células cultivadas *in vitro* se encontró que los sobrenadantes de células de ovario tratadas con AMP fueron añadidos a cultivos de células T con o sin la presencia del antagonista SCH58261 (específico para A2A); el bloqueo del receptor con este antagonista significativamente inhibió la supresión de la proliferación de células T inducida por adenosina. Aunado a ello, se ha demostrado que la cafeína tiene un efecto similar al antagonista SCH58261 ya que mejora la inhibición del crecimiento tumoral por los linfocitos T, permitiendo una reducción de las metástasis y previniendo la angiogenia tumoral (Franco *et al* 2008). Con base en estos datos, Otha y colaboradores (2006) realizaron una estrategia de inmunoterapia del cáncer para prevenir la inhibición de los linfocitos T antitumorales en el entorno del cáncer primario y de las metástasis, bloqueando selectivamente los receptores A2A de los linfocitos T, mediante el uso de antagonistas como la cafeína, un antagonista de los receptores A2A. En nuestro estudio, la actividad supresora de la adenosina contenida en los sobrenadantes de las líneas celulares C33A, Vibo y Rova las cuales mostraron menor actividad de CD73 para generar adenosina, fue completamente inhibida en presencia de cafeína, mientras que la actividad supresora de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las líneas celulares que mostraron mayor actividad enzimática de CD73 (Caski, Siha, Vipa, Calo e Inbl) fue disminuida en aproximadamente un 50%, aún en sobrenadantes de cultivos celulares en presencia de APCP. El no haber encontrado una mayor disminución de la inhibición de la proliferación de linfocitos al adicionar cafeína, probablemente se deba a la presencia de otros factores solubles secretados por las células tumorales en el cultivo, tal como la IL-10 la cual fue encontrada en concentraciones importantes en los sobrenadantes derivados

de las líneas celulares a las cuales se les adicionó AMP para analizar la actividad funcional de CD73 para generar adenosina.

Finalmente tomando en consideración los resultados obtenidos de manera general, el presente trabajo de investigación revela por primera vez la expresión y actividad funcional de CD73 en células tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino, así como la capacidad de generar adenosina y su función supresora de la proliferación de linfocitos T, lo cual es de gran trascendencia para considerar a CD73 como un marcador importante de inmunosupresión en este tipo tumoral y establecer nuevos protocolos de intervención inmune para contrarrestar el desarrollo tumoral.

CONCLUSIONES

**A excepción de C33A, las líneas celulares tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino Vibo (HPV-); Caski y Siha (HPV-16+) y Calo, Inbl, Hela, Vipa y Rova (HPV-18+), y MS-751(HPV45+) mostraron la molécula CD73 en membrana celular.

**A excepción de Calo, las líneas celulares positivas a la infección por HPV (HPV-18+, HPV-16+ y HPV-45+) mostraron mayor expresión de CD73 en membrana que aquellas negativas a la infección por HPV.

**Las líneas celulares Caski, Siha, Calo, Inbl, Hela y Vipa mostraron mayor capacidad para generar adenosina a partir de AMP.

**A excepción de Calo, Vipa e Inbl, la actividad funcional de CD73 fue parcialmente inhibida por APCP, un inhibidor específico, en las líneas celulares derivadas de CaCu.

**La adenosina generada por las células tumorales cultivadas en presencia de AMP contribuye a la inhibición de la proliferación de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28.

**El bloqueo de los receptores para adenosina con cafeína, inhibió la actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos T en las líneas celulares C33A, Vibo y Rova y la disminuyó en las líneas celulares Caski, Siha, Calo, Inbl, Hela, Vipa y MS-751.

PERSPECTIVAS

De acuerdo a nuestros resultados obtenidos, CD73 expresada en la mayoría de las líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino (CaCu), contribuye a la generación de adenosina extracelular a través de su actividad funcional y además es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T. Este fenómeno puede repercutir de manera importante en el crecimiento tumoral y en la evasión de la respuesta inmune antitumoral, por tanto sería de gran importancia:

**Determinar cómo se da la expresión de CD73 en los tumores de CaCu a través de la historia natural de la enfermedad.

**Determinar los factores que regulan la expresión de CD73 en líneas celulares de CaCu.

**Inhibir la expresión de CD73 empleando ARN de interferencia o de silenciamiento (siRNA).

**Evaluar el papel de CD73 en el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo*.

**Finalmente, se plantea determinar la expresión de otras moléculas implicadas en la regulación de adenosina como la adenosina deaminasa (ADA) en células de CaCu.

ANEXOS

Anexo 1

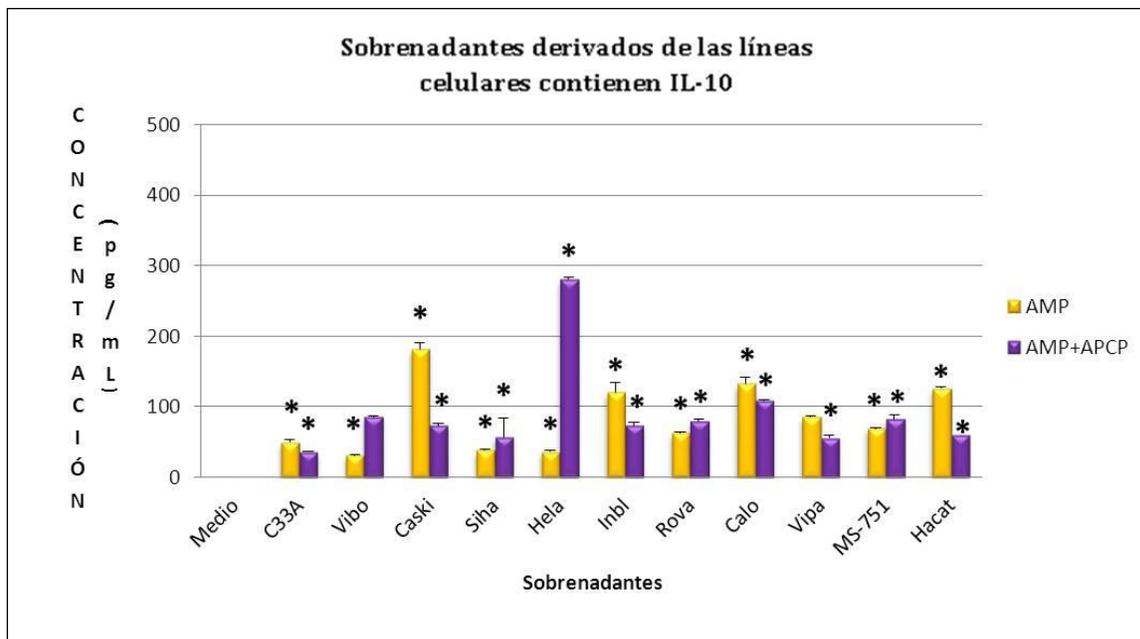


Figura 17. Los sobrenadantes derivados de las líneas celulares a las cuales se les adicionó monofosfato de adenosina (AMP) para analizar la actividad funcional de CD73 para generar adenosina contienen concentraciones importantes de Interleucina-10 (IL-10). La presencia de la citocina en cada uno de los sobrenadantes fue evaluada mediante la técnica de ELISA (Apéndice 1), los resultados se muestran en pg/mL. * $P < 0.05$ con respecto al control.

APÉNDICES

Apéndice 1

Técnica de ELISA

Para determinar la presencia de Interleucina-10 (IL-10) por medio de la técnica de *Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas* (ELISA) se utilizaron placas de fondo plano de 96 pozos (Costar USA), se estandarizó una curva patrón con el kit de ELISA de acuerdo a las concentraciones sugeridas por el proveedor (PeproTech) (0, 32, 65, 125, 250, 500, 1000 y 2000 pg/mL), con 100 µl/pozo por triplicado de cada concentración de la curva. Se diluyó el anticuerpo de captura con PBS a una concentración de 1 µg/mL. Inmediatamente se añadieron 100 µl a cada pozo de ELISA y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con Buffer de lavado (0.5 % Tween 20 en PBS), se bloqueó con Buffer de bloqueo (1% BSA en PBS) con 300 µl por pozo, se incubó a temperatura ambiente durante 1hr. Pasado este tiempo, se lavaron las placas 2 veces con Buffer de lavado (previamente se prepararon los sobrenadantes de las líneas celulares a las cuales se les adicionó monofosfato de adenosina (AMP) para analizar la actividad funcional de CD73 para generar adenosina en diluciones 1:200) y a cada pozo se le agregaron 100 µl de cada una de ellas, se colocaron por triplicado en las placas y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 2hrs. Una vez hecho esto se realizaron 4 lavados con Buffer de lavado y se adicionó el anticuerpo secundario rabbit anti-hIL-10 a una concentración de 0.5 µg/mL, se incubaron durante 2hrs a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron 4 veces con Buffer de lavado, y se agregaron 100 µl por pozo de Avidina-HRP conjugada y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con Buffer de lavado y se añadieron 100 µl de substrato líquido (ABTS) (Sigma USA), se incubaron a temperatura ambiente hasta visualizar color. Finalmente se leyeron en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices), a una longitud de onda de 405-605 nm, fueron monitoreadas en intervalos de 5 min por aproximadamente 35 min y se analizaron los resultados de cada uno de los sobrenadantes de las líneas celulares.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abbas, Lichtman A. (2006). *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª edición. Editorial Elsevier. Madrid. pp. 189-193.
- **Abdul N, Brown C and Gaston K. (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1700 – 1717.
- **Agrawal B, Krantz M, Reddish M and Longenecker B. (1998). Cancer-associated MUC1mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat. Med.* 4:43–49.
- **Airas L, Hellman J and Salmi M. (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* 182:1603–1608.
- **Akasaki Y, Liu G, Chung N, Ehtesham M, Black K, Yu J. (2004). Induction of a CD4+T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J. Immunol.* 173:4352–4359.
- **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2004). *Biología molecular de la célula*. 4ª edición. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 1313-1316.
- **Apt D, Watts R, Suske G, and Bernard U. (1996). High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transcription correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 224:281–291.
- **Baker T, Newcomb W, Olson N, Cowser L, Olson C, and Brown J. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J.* 60:1445–1456.
- **Bavaresco L, et al. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* 319:61–68.
- **Bellone S, El-Sahwi K, Cocco E, Casagrande F, Cargnelutti M, Palmieri M, Bignotti E, Romani C, Silasi D, Azodi M., Schwartz P, Rutherford T, Pecorelli S, Santin A. (2009). Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Virus-Like Particle L1-Specific CD8 Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) Are Equally Effective as E7-Specific CD8 CTLs in Killing Autologous HPV-16-Positive Tumor Cells in Cervical Cancer Patients: Implications for L1 Dendritic Cell-Based Therapeutic Vaccines. *Journal of virology.* 83: 6779–6789.
- **Beristain A. (2004). Identificación de péptidos antigénicos de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo HPV-16 y HPV-18, específicos para los alelos de histocompatibilidad HLA-A2 y HLA-B35 de pacientes con cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura, FES Zaragoza UNAM.

- **Berumen J, Unger E, Casas L and Figueroa P. (2001). Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum Pathol.* 26: 676-681.
- **Blank C, Gajewski T and Mackensen A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 54:307–314.
- **Blay J, White T and Hoskin D. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res.* 57:2602–2605.
- **Bonnez W, and Reichman R. (2000). Papillomaviruses,. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa. pp. 1630–1640.
- **Bosch F, Lorinc Z, Muñoz N, Meijer C, and Shah K. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 55:244-265.
- **Bosch F, Manos M, Munoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J, Schiffman M, Moreno V, Kurman R, Shah K and International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:796–802.
- **Boukamp P, Petrussevska R, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A and Fusenig N. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology.* 106: 761-771.
- **Burd E. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* 16 (1): 1-17.
- **Burk R, Chen Z and Van Doorslaer K. (2009). Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 12:281–290.
- **Chahlavi A, Rayman P, Richmond A, Biswas K and Zhang R. (2005). Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res.* 65:5428–5438.
- **Chen S and Fukuda M. (2006). Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis. *Methods Enzymol.* 416:71-80.
- **Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel P, Junger W. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 314:1792–1795.
- **Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, and Burk R. (2007). Human Papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology.* 360(2): 447–453.

- **Cho S, et al. (2006). In vitro evaluation of adenosine 5'-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism. *J Nucl Med.* 47:837–845.
- **Chung C, Patel V, Moran M, Lewis L and Miceli M. (2000). Galectin-1 induces partial TCR ζ -chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 165:3722–3729.
- **Cid-Arregui A. (2009). Therapeutic Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *The Open Virology Journal.* 3: 67-83
- **Clifford G, Smith J, Plummer M, Muñoz N and Franceschi S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer.* 88: 63–73.
- **Colgan S, Eltzschig H, Eckle T and Thompson L. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling.* 2: 351–360.
- **Cutts F, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, De Sanjose S, Garnett G, Edmunds WJ, Claeys P, Goldenthal KL, Harper DM and Markowitz L. (2007). Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization.* 85 (9): 719-726.
- **De Villiers E and Gunst K. (2009). Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *Journal of General Virology.* 90: 1999–2004.
- **Deaglio S, Dwyer K, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V, Strom T and Robson S. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 204: 1257–1265.
- **Decking U, Schlieper G, Kroll K and Schrader J. (1997). Hypoxia induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res.* 81: 154–164.
- **Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Accardi L, Donà M, Branca M, Costa S, Mariani L, Agarossi A, Ciotti M, Syrjänen K and Giorgi C. (2006). Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infectious Agents and Cancer.* 1: 1-9
- **Dianzani U, Redoglia V, Bragardo M. (1993). Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 151:3961–3970.
- **Dias D, Van Doren J, Schlottmann S, Kelly S, Puchalski D, Ruiz W, Boerckel P, Kessler J, Antonello J, Green T, Brown M, Smith J, Chirmule N, Barr E, Jansen K and Esser M. (2005). Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 12(8): 959–969.

- **Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science*. 110: 525-541.
- **Duarte-Franco E and Franco E. (2004). Cancer of the Uterine Cervix. *BMC Women's Health*. 4:S13.
- **Dwyer K, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom T and Robson S. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 3:171–180.
- **Eltzschig H a), Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P, Odegard KC, Laussen PC, Thompson LF, Colgan S. (2006). Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: The role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood*. 108:1602–1610.
- **Eltzschig H, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton K, Daniels D, Schonfeld C, Loffler M, Reyes G, Duszenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman K, Coe I and Colgan S. (2005). HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med*. 202:1493–14505.
- **Eltzschig H. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. (2010). *Anesthesiology*. 111 (4): 904–915.
- **Evander M, Frazer I, Payne E, Qi Y, Hengst K and McMillan N. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol*. 71:2449-2456.
- **Fainboim L, Geffner J. (2005). Introducción a la inmunología humana. 5ta edición. Ed Medica Panamericana. Argentina. pp. 484.
- **Franco E. (1995). Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst*. 87:779–780.
- **Franco R. (2008). Café y cáncer. *Med Clin*. 131 (16):633-635.
- **Frazer H. (2004). Prevention of Cervical Cancer through Papillomavirus Vaccination. *Nature Immune*. 4: 46-54.
- **Fredholm B, Ijzerman A, Jacobson K, Klotz K and Linden J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev*. 53: 527–5522.
- **Fukuda K, et al. (2004). Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer*. 91:1543–1550.
- **Galloway D and McDugall J. (1996). The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Sem. Cancer Biol*. 7: 309-315.

- **Gariglio P, Rangel L. (1992). Virus and cancer Review Spanish. *Salud Publica Mex.* 34(3):308-317.
- **Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N and Nestle F. (2004). Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am. J. Pathol.* 165:1853–63.
- **Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Avitabile A, Gavioli R, Fortini C, Leung E, Mac Lennan S, and Borea P.(2003). Expression of A3 Adenosine Receptors in Human Lymphocytes: Up-Regulation in T Cell Activation. *Mol Pharm.* 65 (3):711-719.
- **Giaccia A, Siim B, and Johnson R. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2:803–811.
- **Grünewald K and Ridley A. (2010). CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *Journal of Inflammation.* 7:10
- **Guzman-Rojas L, Alcocer-Gonzalez J, Madrid-Marina V.(1998) Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cancer. Review Spanish. *Salud Publica Mex.* 40(1):38-46.
- **Harro C, Pang Y, Roden R , Hildesheim A, Wang Z, Reynolds M, Mast T, Robinson R, Murphy B, Karron R, Dillner J, Schiller J, and Lowy D. (2001). Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:284–292.
- **Haskó G, Linden J, Cronstein B, and Pacher P. (2008). Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 7(9): 759–770.
- **Hastie C, et al. (2005) Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells. *Oncogene.* 24:5905–5913.
- **Hebner C and Laimins L. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16: 83–97.
- **Herman J and Baylin S. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 349: 2042-2054.
- **Hicklin D, Marincola F and Ferrone S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today.* 5:178–186
- **Hilders C, Ras L, Van Eendenburg J, Nooyen Y, Fleuren G.(1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 15:57(6):805-813.
- **Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chang C and Buró R. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 7: 423-428.

- **Hoskin D, Mader J, Furlong S, Conrad D and Blay J. (2008). Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells [Review]. *Int J Oncol.* 32:527–535.
- **Huang S, Koshiba M, Apasov S and Sitkovsky M. (1997). Role of A2a adenosine receptor-mediated signaling in inhibition of T cell activation and expansion. *Blood.* 90: 1600–1610.
- **Insinga R, Dasbach E, and Elbasha E. (2009). Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infectious Diseases.* 9 (119): 1471-2334.
- **Jacobson K and Gao Z. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 247–264.
- **Jin D, Fan J, Wang L, Thompson L, Liu A, Daniel B, Shin T, Curiel T and Zhang B. (2010). CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *American Association for Cancer Research.* 6: 2245–2255.
- **Kas-Deelen A, Bakker W, Olinga P. (2001). Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5' nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Lett.* 491: 21Y5.
- **Khong H and Restifo N. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* 3:999–1005.
- **Kindt T, Goldsby, R, Osborne B. (2007). *Inmunología de Kuby.* 6ª edición. Editorial McGraw-Hill. Mexico. pp 15-20.
- **Kobayashi, S., Zimmermann, H., and Millhorn, D.E. 2000. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J. Neurochem.* 74:621–632.
- **Kobie J, Shah P, Yang L, Rebhahn J, Fowell D and Mosmann T. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosinemonophosphate to adenosine. *J Immunol.* 177: 6780–6786.
- **Kondo T, Nakazawa T, Murata S and Katoh R. (2006). Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. *Histopathology.* 48:612–614.
- **Koneru M, Schaer D, Monu N, Ayala A and Frey A. (2005). Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J. Immunol.* 174:1830–1840.
- **Koshiba M, Kojima H, Huang S, Apasov S, Sitkovsky M. (1997). Memory of extracellular adenosine/A2a purinergic receptor mediated signalling in murine T cells. *J Biol Chem.* 272:25881–25889.

- **Kurte M, Lopez M, Aguirre A, Escobar A and Aguillon J. (2004). A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and transporter associated with antigen processing 1/2 in human melanoma cells. *J. Immunol.* 173:1731–1737.
- **Lappas C, Rieger J and Linden J. (2005). A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 174:1073-80.
- **Lennon P, Taylor C, Stahl G, Colgan S. (1998). Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med.* 188: 1433–1443.
- **Li M, Wan Y, Sanjabi S, Robertson A, Flavell R. (2006). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24:99–146.
- **Liao J. (2006). Viruses and Human Cancer. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 79:115-122
- **Linden J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 775–787.
- **Loffler M, Morote-Garcia J, Eltzschig S, Coe I and Eltzschig H. (2007). Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1004–1013.
- **Lopez M, Adris S, Bravo A, Chernajovsky Y and Podhajcer O. (2005). IL-12 and IL-10 expression synergize to induce the immune-mediated eradication of established colon and mammary tumors and lung metastasis. *J. Immunol.* 175:5885–94.
- **Madara J, et al. (1993). 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest.* 91:2320–2325.
- **Marais D, Passmore J, Maclean J, Rose R and Williamson A. (1999). A recombinant human papillomavirus (HPV) type 16 L1-vaccinia virus murine challenge models demonstrate cell-mediated immunity against HPV virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 80: 2471-2475.
- **Marincola F, Jaffee E, Hicklin D and Ferrone S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* 74:181–273
- **Massaia M, Perrin L, Bianchi A. (1990). Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J Immunol.* 145:1664–1674.
- **Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco G and Toscano M. (2004). Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding and fission. *J. Biol. Chem.* 280:6969–6985.

- **Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang S, Masucci M, and Kiessling R. (1994). Interleukin 10 Pretreatment Protects Target Cells from Tumor- and Allo-specific Cytotoxic T Cells and Downregulates HLA Class I Expression. *J. Exp. Med.* 180: 2371-2376.
- **McLaughlin F, Finn P, and La Thangue N. (2003). The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. Elsevier Science. 8 (17): 793-802.
- **McLaughlin-Drubin E and Münger K. (2009). Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res.* 143(2): 195–208.
- **Medzhitov R. (2001). Toll-like receptor and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1 (2): 135 145.
- **Mikhailov A, et al. (2008). CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol.* 181:464–475.
- **Mizoguchi H, O’Shea J, Longo D, Loeffler C, McVicar D and Ochoa A. (1992). Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science.* 258:1795–1798.
- **Monie A, Tsen S, Hung C, and Wu T. (2009). Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 8 (9): 1221–1235.
- **Morote-Garcia J, Rosenberger P, Kuhlicke J and Eltzschig H. (2008) HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood.* 111:5571–5580.
- **Muñoz N and Bosch F. (1997). Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud pública de México.* 39: 274-282.
- **Muñoz N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 19:1-5.
- **Nakashima M, Sonoda K and Watanabe T. (1999). Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med.* 5:938–942.
- **Natali P, Nicotra M, Bigotti A, Ventura I and Marcenaro L. (1989). Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6719–6723.
- **Niemela J, Henttinen T, Yegutkin G. (2004). IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: A mechanism mediated by CD73 (ecto-5’-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol.* 172:1646Y53.

- **Ohta A, Gorelik E, Prasad S. (2006) A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:13132-13137.
- **Parham P. (2003). Innate Immunity: The unsung heroes. *Nature*. 423 (6935): 20.
- **Pellegatti P, Raffaghello Z, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, and Di Virgilio F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*. 3(7):e2599.
- **Perillo N, Pace K, Seilhamer J and Baum L. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 378:736–739.
- **Phan G, Yang J, Sherry R, Hwu P and Topalian S. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:8372–8377.
- **Picconi M, Gronda J, Alonio L, Fichero L, Miranda S, Barcena M and Teyssie A. (2002). Virus de Papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de Cáncer de cuello uterino, tipos virales y variantes de HPV-16. *Medicina Argentina*. 3: 209-220.
- **Rabinovich G, Daly G, Dreja H, Tailor H and Riera C. (1999). Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med*. 190:385–398.
- **Rabinovich G, Gabrilovich D and Sotomayor E. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 25:267–296.
- **Resta R and Thompson L. (1997). T cell signalling through CD73. *Cell Signal*. 9:131–139.
- **Resta R, Yamashita Y, Thompson L. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*. 161: 95–109.
- **Richart R. (1990). A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*. 75(1):131-133.
- **Rincón L, Pareja L, Jaramillo S, Aristizábal B. (2007). Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: Una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 58(3): 202-212.
- **Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C and Novellino L. (2002). Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte–tumor cell interaction. *Immunol Rev*. 188:97–113.
- **Robson S, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K and Enjyoji K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost*. 31: 217–233.
- **Roitt I. (2004). Inmunología fundamentos. 7ª edición. Editorial medica panamericana. Madrid. pp. 43-70.

- **Sadej R, Spychala J, Skladanowski A. (2006). Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25:1119–1123.
- **Sakaguchi S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22:531–562.
- **Sapp M, Volpers C, Muller M, and Streck R. (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76:2407–2412.
- **Semenza G. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3:721–732.
- **Sevigny C, et al. (2007). Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* 178:4240–4249.
- **Sitkovsky M, Kjaergaard J, Lukashev D and Ohta A. (2008). Hypoxia adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res*. 14:5947–52.
- **Sitkovsky M, Lukashev D, Deaglio S, Dwyer K, Robson S and Ohta A. (2008). Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells. *Br J Pharmacol*. 153:S457-64.
- **Sitkovsky M, Ohta A. (2005). The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?. *Trends Immunol.* 26:299-304.
- **Sitkovsky M. (2003). Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol*. 65: 493–501.
- **Sotomayor E, Borrello I, Tubb E, Allison J and Levitsky H. (1999). In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:11476–11481.
- **Sowa N, Taylor-Blake B, and Zylka J. (2010). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits nociception by hydrolyzing AMP to adenosine in nociceptive circuits. *J Neurosci*. 30(6): 2235–2244.
- **Spitto M, Rowley D and Schreiber H. (2004). Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat. Med*. 10:294–298.
- **Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue L, Jin A and Mitchell B. (2004). Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 10:708–717.
- **Spychala J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*. 87:161–173.

**Stagg J, Divisekeraa U, McLaughlina N, Sharkeya J, Pommeyb,c S, Denoyerd D, Dwyer K, and Smytha M. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Pnas*. 107: 1547–1552.

**Stanley M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 24S1:S1/16-S1/22.

**Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbacha L, Fernandes P, Wink M, Azambuja A, Barrios C, Bueno F, and OliveiraA. (2009). Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol*. 10.1016/j.urolonc.2009.01.035.

**Sterlinko H, Bergant M and Banks L. (2009). Human papillomavirus infection, cancer and therapy. *Indian J Med Res*. 130: 277-285

**Stites A, Terr A and Parslow T. (2000). Inmunología básica y clínica. 9a edición. Editorial el manual moderno. México. pp. 200-250.

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

**Takedachi M, et al. (2008) CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. *J Immunol* 180:6288–6296.

**Teraben M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H and Watson C. (2000). NK T cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol*. 1:515–20.

**Thiel M, Caldwell C and Sitkovsky M. (2003). The critical role of adenosine A (2A) receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect*. 5: 515–526.

**Thompson L, Eltzschig H, Ibla J, Van De Wiele C, Resta R, Morote-Garcia J and Colgan S. (2004). Crucial Role for Ecto-5-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia. *J. Exp. Med*. 200 (11): 1395–1405.

**Tindle R. (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Rev*. 2:1-7.

**Turley E, Veisoh M, Radisky D, Bissell M. 2008. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol*. 5: 280-290.

**Van Elsas A, Hurwitz A and Allison J. (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces

rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* 190:355–366.

**Van Leeuwen J, Samelson L. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol.* 11(3):242-8.

**Van Linden A, Eltzschig HK. (2007). Role of pulmonary adenosine during hypoxia: Extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert Opin Biol Ther.* 7:1437–1447.

**Vázquez-Ortíz G, Piña-Sánchez P, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, Alvarado I, Cruz F, Hernández D, Pérez-Plascencia C, Salcedo M. (2005). Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados. *Rev Invest Clin.* 57 (3): 434-441.

**Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, and Munoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.

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

**Wang L, Fan J, Thompson L, Zhang Y, Shin T, Curiel T and Zhang B. (2011). CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest.* 121(6):2371–2382.

**Wang Z, Cao Y, Albino A, Zeff R, Houghton A and Ferrone S. (1993). Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J. Clin. Invest.* 91:684–92.

**Weinberg R. (1996). How Cancer Arises An explosion of research is uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer—and suggesting new therapies. *Scientific American.* 62-70

**Weissmuller T, Campbell E, Rosenberger P, Scully M, Beck P, Furuta G and Colgan S. (2008). PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases. *J Clin Invest.* 118:3682–3692.

**Zhang B. (2010). CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 70 (16):6407–6411.

**Zhong H, De Marzo A, Laughner E, Lim M, Hilton D, Zagzag D, Buechler P, Isaacs W, Semenza G, and Simons J. (1999). Overexpression of hypoxia inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59:5830–5835.

**Zimmerman H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 285: 345-365.

**Zur Hausen H . (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst.* 92:690-698.

**Zur Hausen H. (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physician.* 111:581–587.

BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA

**INEGI (2010). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx.

**www.centrodeladiversidad.org/comunidad.

**www.NCI/PDQ/pacientes.