



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto de TGF- β , IFN- β , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MOLINA CASTILLO GABRIELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María de Lourdes Mora García.
FES Zaragoza, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Benny Weiss Steider.
FES Zaragoza, UNAM
Dr. Juan José Montesinos Montesinos.
Instituto Mexicano del Seguro Social.

CIUDAD DE MÉXICO

Mayo, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto de TGF- β , IFN- β , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MOLINA CASTILLO GABRIELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María de Lourdes Mora García.
FES Zaragoza, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Benny Weiss Steider.
FES Zaragoza, UNAM
Dr. Juan José Montesinos Montesinos.
Instituto Mexicano del Seguro Social.

CIUDAD DE MÉXICO

Mayo, 2019



OFICIO CPCB/459/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero del 2019, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **MOLINA CASTILLO GABRIELA** con número de cuenta **308198481** con la tesis titulada "Efecto de TGF- β , IFN- γ , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino" realizada bajo la dirección de la Tutora Principal: **DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Secretario: DR. BENNY WEISS STEIDER
Suplente: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de abril de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos Institucionales.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por enriquecer mi formación profesional.

A la beca CONACyT No. 776284. Investigación realizada gracias

Investigación realizada gracias al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave IN225519: Estudio funcional de la vía CD73-Adenosina en la tumorigenicidad de células iniciadoras del cáncer en un modelo de células tumorales de cáncer cérvico-uterino similares a células troncales y al Fondo de Investigación en Salud-IMSS (Proyectos 1314, 1383 y 1613).

A mi tutora la DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA por dejarme formar parte de grupo de trabajo, gracias por su apoyo y por los comentarios que ayudaron a la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial DR. BENNY WEISS STEIDER, DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS por sus comentarios y apoyo para la conclusión de este trabajo

Agradecimientos a título personal.

A Dios por permitirme cumplir otra meta.

A mis padres Eduardo y Violeta que me apoyan en cada momento de mi vida, gracias a ustedes es que estoy realizando un logro más. Los amo mucho.

A mis hermanas Violeta y Carina por su cariño y apoyo en todo momento. Las quiero mucho.

A mis abuelitos José, Lolita y “Tita” por su incondicional cariño y apoyo.

A los integrantes de la familia Molina y de la familia Castillo por siempre brindarme su apoyo.

A mis amigos que hice durante la carrera Cesar, Anita y Dani gracias por su apoyo y su amistad en todo este tiempo.

Al Dr. Alberto Monroy García gracias por el apoyo y asesoría brindada durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por hacer del laboratorio un ambiente de trabajo agradable, por su amistad, los consejos y la ayuda proporcionada durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunobiología Azucena, Luis, Ricardo, Ángeles, Katia, Alberto, Adriana, David, Alberto, Ana y Ale gracias por su amistad y por hacer el ambiente de trabajo más ameno.

A mis sinodales Dra. Marcela Lizano Soberón, Dra. Rebeca López Marure, Dr. Benny Weiss Steider, Dr. Hugo López Muñoz y al Dr. Juan José Montesinos Montesinos por sus consejos y observaciones.

Índice.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU RELACIÓN CON CaCU.....	5
3. MICROAMBIENTE TUMORAL	7
3.1 TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante β).....	9
3.2 EGF (Factor de Crecimiento Epidermal).....	10
3.3 IL-10 (Interleucina 10).....	11
3.4 IFN (Interferón).....	12
4. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	13
5. VÍA ADENOSINÉRGICA.....	15
5.1 CD39 (NTPDasa1).....	16
5.2 CD73 (5'-nucleotidasa).....	17
5.3 Nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (NPP).....	18
5.4 Fosfatasa Alcalinas (AP).....	18
5.5 ADA (Adenosina Deaminasa).....	19
5.6 PNP (Purina Nucleósido Fosforilasa).....	20
6. ADENOSINA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	22
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
8. HIPÓTESIS.....	27
9. OBJETIVO GENERAL.....	27
9.1 Objetivos Particulares.....	27
10. METODOLOGÍA.....	28
10.1 Cultivo celular.....	28
10.2 Citometría de flujo.....	28
10.3 ELISA.....	29

10.4 Western Blot.....	29
10.5 Cromatografía en capa fina (CCF).....	30
10.6 Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC).....	31
10.7 Análisis Estadístico.....	31
11. RESULTADOS.....	32
11.1 Efecto de IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β en la expresión de CD73 en membrana de células tumorales de CaCU.....	32
11.2 Efecto de IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β en la secreción de sCD73 en células tumorales de CaCU.....	33
11.3 Actividad catalítica de sCD73 producida por las células tumorales CaSki cultivadas en presencia de citocinas.....	36
12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
13. CONCLUSIONES.....	47
14. PERSPECTIVAS.....	47
15. REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1 Progresión de la infección de HPV a CaCU.....	7
Figura 2 Papeles de TGF- β en la carcinogénesis.....	9
Figura 3 Inhibición de la respuesta inmune por parte del HPV.....	14
Figura 4 Esquema de la vía adenosinérgica.....	21
Figura 5 Unión de Adenosina a receptores en la célula.....	23
Figura 6 Efecto de TGF- β , EGF, IL-10 e IFN- β sobre la presencia de CD73 en membrana de las células CaSki.....	33
Figura 7 Efecto de TGF- β , EGF, IL-10 e IFN- β sobre la secreción de sCD73 en las células CaSki.....	34
Figura 8 Detección de CD73 en sobrenadantes y lisados de células CaSki tratadas con citocinas.....	36
Figura 9 Actividad catalítica de sCD73 contenida en sobrenadantes de células CaSki.....	38
Figura 10 Actividad catalítica de sCD73 en sobrenadantes de células CaSki con IFN- β , EGF e IL- 10.....	39
Figura 11 Actividad catalítica de sADA contenida en sobrenadantes de células CaSki.....	40
Figura 12 Análisis cuantitativo de la producción de Adenosina en sobrenadantes de células CaSki.....	42

ABREVIATURAS.

ADA	Adenosina Deaminasa
ADP	Difosfato de Adenosina
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ATP	Trifosfato de Adenosina
APCP	Adenosina 5` α , β Metileno Monofosfato
CaCU	Cáncer Cérvico –Uterino
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
EGFR	Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
HPV	Virus del Papiloma Humano
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PNP	Purina Nucleósido Fosforilasa
T reg	Linfocitos T reguladores
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) se asocia con la infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo (HPV-AR) en casi el 100% de los casos. En algunas mujeres la infección por HPV-AR persiste dando lugar a la evasión del sistema inmune y al desarrollo de CaCU. Diversos mecanismos participan en la evasión e inmunosupresión de la respuesta inmune durante el desarrollo del CaCU, entre ellos: la baja producción de interferones, así como la producción de citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β . Uno de los mecanismos recientemente propuestos en la evasión y supresión inmune es la producción de Adenosina a través de la actividad catalítica de ATP extracelular mediante las ecto-enzimas CD39 y CD73, y se ha reportado que factores inmersos en el microambiente tumoral pueden influenciar su expresión y secreción.

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de TGF- β , EGF, IFN- β e IL-10 sobre la secreción de CD73 en forma soluble (sCD73) en células tumorales de CaCU. La presencia de sCD73 en sobrenadantes de células tumorales cultivadas con las citocinas se determinó mediante la técnica de ELISA y Western-blot. La actividad catalítica de sCD73 se determinó mediante la incubación de los sobrenadantes con AMP (sustrato) y en presencia o ausencia de APCP (inhibidor específico de CD73). Los productos de la hidrólisis fueron revelados mediante cromatografía de capa fina (CCF) y la Adenosina fue cuantificada por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC). En este estudio se encontró que TGF- β y EGF incrementaron notablemente la expresión de CD73 en membrana de las células tumorales comparada con la expresión basal de dicha ecto-nucleotidasa; mientras que EGF e IL-10 indujeron mayor producción de sCD73 comparada con la producida en condiciones basales. Asimismo, al analizar los productos de la hidrólisis de AMP con los sobrenadantes obtenidos de las células CaSki cultivadas con las diferentes citocinas, se observó que las células cultivadas con TGF- β produjeron esencialmente Adenosina e Inosina; mientras que los derivados de las células cultivadas en presencia de IL-10, IFN- β y EGF produjeron Inosina e Hipoxantina como productos finales de la hidrólisis. Estos resultados sugieren que TGF- β , IL-10, IFN- β y EGF pueden modular la producción de varias enzimas participantes en la vía

adenosinérgica en células de CaCU, tales como: CD73, fosfatasa alcalina, ADA y PNP entre otras. Por lo que será importante conocer su papel tanto en el microambiente tumoral del CaCU como a nivel periférico, con la finalidad de dirigir estrategias terapéuticas que regulen su función.

ABSTRACT

Cervical cancer (CeCa) is associated with high risk HPV (HPV-HR) infection in nearly 100% of the cases. In some women the HPV-HR persist leading to the immune evasion and development of CeCa. Several mechanisms are involved in immune evasion and immunosuppression in CeCa, among them the low production of interferons as well as the production of immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- β . One of the recently proposed mechanisms in suppression and evasion of immune system is the production of adenosine through the catalytic activity of extracellular ATP by ecto-enzymes CD39 and CD73 and it has been reported that elements in the tumor microenvironment can influence their expression and secretion.

The aim of this study was to evaluate the effect of TGF- β , EGF, IFN- β and IL-10 on the secretion of soluble CD73 (sCD73) in CeCa tumor cells. The presence of sCD73 in tumor cells supernatants cultured with cytokines was determined by ELISA and Western blot. The catalytic activity of sCD73 was determined incubating the supernatants with AMP (substrate) and in the presence or absence of APCP (specific inhibitor of CD73). The hydrolysis products were revealed through thin layer chromatography (TLC), the adenosine was quantified by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). In this study was found that TGF- β and EGF markedly increased the expression of membrane CD73 in tumor cells compared with the basal expression of the ecto-enzyme, while EGF and IL-10 induce more production of sCD73 compared with the ones produced in basal conditions. Likewise when analyzing the hydrolysis of AMP products with the supernatant obtained of CaSki cells cultured with the different cytokines it was observed that cells cultivated with TGF- β essentially produced adenosine and inosine; while cells cultured with IL-10, IFN- β and EGF produced Inosine and Hypoxanthine as final products of the hydrolysis. These results suggest that TGF- β , IL-10, IFN- β and EGF can modulate the production of several enzymes involved in the adenosinergic pathway in CeCa cells: such as CD73, alkaline phosphatase, ADA and PNP among others. So, it will be important to know their role in the CeCa tumor

microenvironment as well as to periphery level with the purpose of direct therapeutic strategies that regulate their function.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un crecimiento anormal de las células causado por múltiples cambios en la expresión de genes que conducen al desequilibrio de la proliferación y de la muerte celular, en constante evolución en una población de células que pueden invadir tejidos y metastatizar a sitios distantes, causando una morbilidad significativa y si no se trata, la muerte (Ruddon, 2007). El cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, la incidencia de esta enfermedad se espera que incremente a nivel mundial debido al crecimiento y envejecimiento de la población particularmente en países en vías de desarrollo (Torre *et al.*, 2015). Los cánceres más comunes del tracto reproductor femenino son los carcinomas cervicales, de ovario y de endometrio (Frumovitz, 2016).

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es el cuarto tipo de cáncer más letal en mujeres a nivel mundial, en el 2012 se registraron cerca de 527,600 nuevos casos de CaCU y se le atribuyeron 265,700 muertes alrededor del mundo, siendo los países en vías de desarrollo los que registraron el mayor número de casos. El CaCU es la segunda neoplasia más común en mujeres en México (Globocan, 2017).

2. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV) Y SU RELACIÓN CON CaCU

Los virus son los agentes etiológicos de aproximadamente el 15% de los cánceres a nivel mundial. El virus de papiloma humano (HPV) se encuentra presente en más del 99% de los casos de cáncer cervical, donde el HPV-16 es el tipo de papiloma carcinogénico más comúnmente encontrado a nivel mundial (Walboomers *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2014).

Los HPV de alto riesgo son un pequeño grupo de adenovirus que infectan el epitelio escamoso estratificado. A la fecha se han identificado más de 200 tipos de HPV y se han dividido en HPV de alto riesgo y de bajo riesgo en base a su capacidad oncogénica (Lee *et al.*, 2016), cerca de 40 tipos infectan preferentemente el epitelio estratificado de la mucosa:

del tracto anogenital (cérvix, vagina, ano) y de la cavidad oral (Spurgeon *et al.*, 2017; Zur Hausen, 2009). Los HPV de bajo riesgo causan verrugas genitales, mientras que los tipos considerados de alto riesgo comúnmente se asocian con casos de CaCU siendo responsables de cerca del 5% de cáncer a nivel mundial (Spurgeon *et al.*, 2017).

El HPV regula diversos factores de crecimiento, citocinas y otros mediadores paracrinos que tienen el potencial de impactar en el comportamiento de las células en el microambiente, incluyendo la promoción de angiogénesis y evasión del sistema inmune (Woodby *et al.*, 2016). Más del 90% de las infecciones por HPV en el cervix son eliminadas naturalmente. Las infecciones por HPV pueden persistir por años o incluso décadas, la infección persistente por HPV de alto riesgo representa una alta probabilidad para el desarrollo de cáncer.

La progresión de la infección de HPV a CaCU es un proceso que puede ser dividido en 4 etapas (Figura 1). La primera etapa comprende la infección con HPV (en la mayoría de los individuos la infección es eliminada en 2 años), sin embargo en el 10% de las infecciones el virus puede persistir por varios años y es fuertemente asociado con el diagnóstico de lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIBG). La segunda etapa se caracteriza por una leve displasia debido a la progresión persistente de las células infectadas hacia células precancerosas, esta lesión puede progresar en la tercera etapa hacia lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG) caracterizada por una displasia moderada. La lesión de alto grado consigue avanzar hacia la última etapa que corresponde al carcinoma invasivo. Durante las dos primeras etapas la regresión espontánea es común (Piersma, 2011).

A pesar de que se ha demostrado el papel del HPV en el proceso de carcinogénesis, la infección persistente por HPV de alto riesgo no es suficiente para el desarrollo del CaCU, otros factores contribuyen a este proceso (Spurgeon *et al.*, 2017). Uno de los factores reconocidos es el microambiente o estroma.

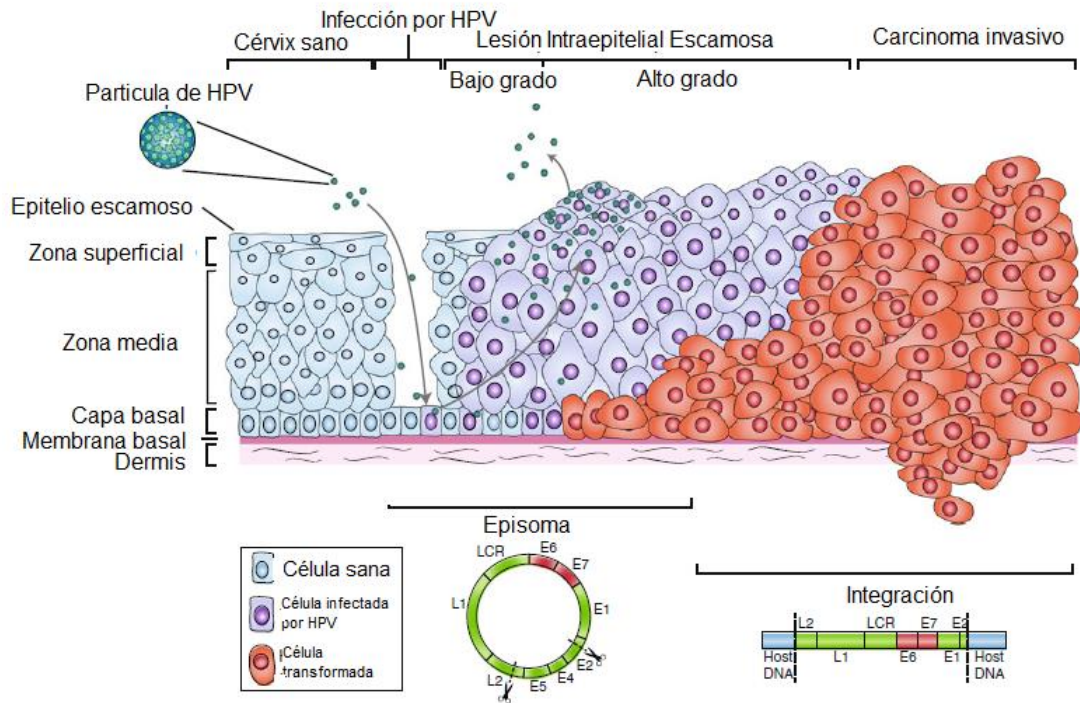


Figura 1. Progresión de HPV a CaCU. Donde se puede observar que los viriones entran a través de microabrasiones e infectan células basales; también se observan los diferentes estadios de la enfermedad con lesiones de bajo y alto grado y el estadio de cáncer avanzado; junto con la intervención del VPH en cada una de estas etapas. Tomada y modificada de Piersma 2011.

3. MICROAMBIENTE TUMORAL

La infección es generalmente controlada por el sistema inmune y solamente en pocas personas el HPV persiste incrementando el riesgo de desarrollar lesiones intraepiteliales (Morales-Sánchez *et al.*, 2014). Cuando la infección es persistente y el sistema inmune está suprimido, 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 (Moody *et al.*, 2010).

De acuerdo con el concepto de inmunoección del cáncer la interacción entre células cancerígenas y células del sistema inmune ocurre en tres fases esenciales; eliminación,

equilibrio y escape. Durante este proceso tanto las células tumorales así como las células del sistema inmune liberan varios factores solubles como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, enzimas que degradan la matriz y nucleótidos que facilitan el escape del tumor por parte del sistema inmune permitiendo así el crecimiento, angiogénesis y metástasis (Albini *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2009).

Recientemente se ha reportado una asociación importante entre los cambios en la expresión de algunas citocinas y la incidencia de lesiones precancerosas, su progresión a cáncer e incluso en el desarrollo de metástasis. Aproximadamente 50 citocinas y algunos de sus receptores se han encontrado alterados durante la carcinogénesis y metástasis en CaCU. Citocinas como IL-6, IL-8, IL-12, IL-4, VEGF, IL-10 han sido sugeridos como posibles biomarcadores de cáncer invasivo y metástasis (Paradkar *et al.*, 2014).

La expresión de citocinas anti-inflamatorias e inmunosupresoras dentro del microambiente cervical determina la persistencia del HPV así como la progresión tumoral. En el microambiente cervical de mujeres que han presentado infección por HPV se han encontrado altos niveles de IL-10, los cuales incrementan durante el desarrollo de la enfermedad. Muchas mujeres con infección persistente por HPV tienen altos valores de IL-10 mientras que las mujeres que han eliminado la infección presentan bajos niveles de IL-10 y poseen altos valores de IFN- γ (Sasagawa *et al.*, 2012).

Un estudio realizado por Audirac-Chalifour y colaboradores en 2016 en muestras provenientes de pacientes con lesiones escamosas y CaCU, se encontraron altos niveles de IL-10 los cuales se correlacionaron con un incremento significativo en lesiones escamosas así como también en CaCU. También observaron un ligero incremento en los niveles de citocinas tales como TGF- β , IL-4, IL-6, TNF- α e IFN- α en comparación con muestras de mujeres que no presentan infección por HPV, resultados similares han sido reportados por otros grupos de trabajo (Daniilidis *et al.*, 2016; Chopra *et al.*, 1998). Debido a que en pacientes con CaCU se ha reportado un incremento en los niveles de citocinas de tipo Th2 y una disminución en citocinas de tipo Th1, se procedió a analizar estos factores del microambiente tumoral.

3.1 TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante β)

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citocina que juega un papel supresor de la respuesta inmune, tiene papeles importantes durante la carcinogénesis en etapas tempranas y promueve la apoptosis de células epiteliales normales, de células linfoides, así como de tumores pre-malignos; mientras que en etapas avanzadas adquiere capacidad pro-oncogénica y pro-metástasica (Figura 2) (Papageorgis *et al.*, 2015).

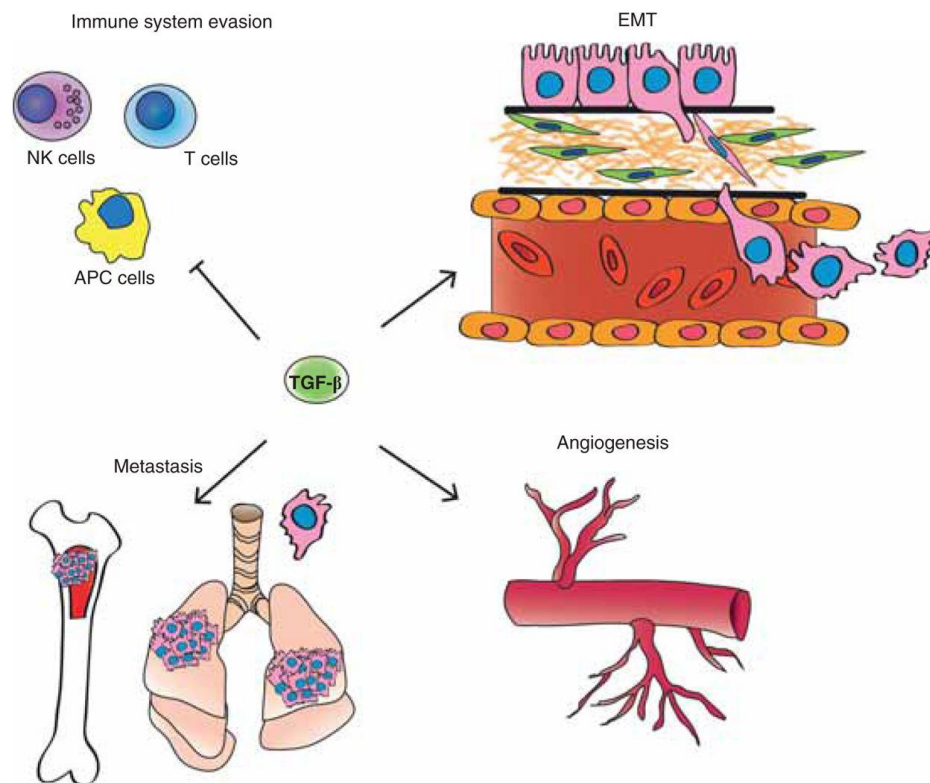


Figura 2. Papeles del TGF- β en carcinogénesis. Dentro de la progresión tumoral TGF- β participa en varios procesos como la evasión de la respuesta inmune, inducción de metástasis, angiogénesis y transición epitelio mesénquima (EMT) Tomada de Katz *et al.*, 2013.

El TGF- β participa en la inhibición de la proliferación de linfocitos T mediante el bloqueo de la producción de IL-2 (citocina necesaria para la activación de linfocitos T), inhibe también la expresión de moléculas efectoras como IFN- γ , perforinas y promueve la generación de células T reguladoras (T reg). Se han encontrado altos niveles de TGF- β en diferentes tipos

de tumores como: melanoma, mama, colon, estómago, hígado, pulmón así como también en enfermedades hematológicas, las cuales se asocian con malos pronósticos de sobrevivencia en pacientes (Wrzesinski, 2007).

En muestras provenientes de neoplasias intraepiteliales, se ha observado una menor expresión de TGF- β mientras que en estadios más avanzados hay un incremento en la expresión de TGF- β . De igual forma se han encontrado altos niveles de TGF- β en sueros de pacientes con CaCU. La expresión de TGF- β se asocia con una mayor infiltración e invasividad (Zhu *et al.*, 2016).

3.2 EGF (Factor de Crecimiento Epidermal)

El factor de crecimiento epidermal (EGF) y sus receptores fueron de los primeros biomarcadores identificados en CaCU. La principal anomalía ha sido una sobreexpresión del receptor EGFR, en particular para la sobrevivencia después de la radioterapia ya que se encuentra relacionado con un bajo pronóstico de las pacientes. (Paradkar *et al.*, 2014). En el CaCU, el mecanismo que conduce a la sobreexpresión de EGFR no ha sido aclarado (Schrevel *et al.*, 2011).

El EGFR es un miembro de la familia de receptores de ErbB y se une a varios ligandos, de los cuales el más conocido es el EGF. La señalización a través de EGFR es crucial para la migración de queratinocitos y proliferación en la reparación de heridas. El EGF induce la activación de EGFR en queratinocitos estimulando la vía de señalización MAPK conduciendo a la estimulación del crecimiento. El papel de EGFR en el crecimiento de queratinocitos y migración lo convierte en un blanco potencial para los oncogenes virales. La señalización a través de EGFR es necesaria para la inmortalización de las proteínas E6 y E7 de HPV-16; mientras que la proteína E5 regula la expresión en membrana de EGFR (Woodby *et al.*, 2016).

3.3 IL-10 (Interleucina-10)

La IL-10 es una citocina inmunoregulatoria producida por muchos tipos celulares incluyendo células de tipo Th2, células T reguladoras y células T CD8⁺. Varias células tumorales son capaces de producir IL-10. Esta citocina es predominantemente conocida por su efecto en la regulación del balance de células Th1/Th2. Puede inhibir las respuestas de tipo Th1 y Th2 con un efecto predominante sobre la población Th1 (Berti *et al.*, 2017). La proteína o mRNA de IL-10 se han encontrado elevados en varios tipos de cánceres como: renal, hepatocelular, ovario, melanoma, glioma, etc. (Wang *et al.*, 2013)

En diferentes tipos de microambientes, incluido el CaCU, IL-10 ejerce un amplio rango de efectos en varios tipos celulares. Se ha demostrado que IL-10 influencia la persistencia del HPV la cual es fuertemente asociada con la progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales hacia cáncer. Posterior a la infección por HPV los niveles de IL-10 incrementan como resultado de la acción de las proteínas del HPV sobre el gen. El mantenimiento de los altos niveles de expresión de IL-10 junto con otras citocinas y factores inmunosupresores pueden contribuir al desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas debido a que permite al virus evadir al sistema inmune permitiendo así la persistencia del virus (Berti *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2013).

Cuando la actividad de la oncoproteína E6 es alta se ha observado que la IL-10 promueve el crecimiento tumoral. La IL-10 contribuye a la disminución de la respuesta antitumoral ya sea desregulando la expresión de moléculas de clase 1 o incrementando la expresión de HLA-G en trofoblastos y monocitos. Los polimorfismos en el gen de IL-10 afectan la eliminación de la infección de HPV de alto riesgo. La dualidad de la función biológica de IL-10 como una citocina anti-inflamatoria y anti-angiogénica se refleja en los contradictorios datos observados en CaCU. Se han encontrado altos niveles de IL-10 en la mayoría de los casos de CaCU. Varios estudios de transfección génica en IL-10 han demostrado que la IL-10 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y metástasis en varios tipos de cáncer aunque el mecanismo aún no ha sido dilucidado. La IL-10 puede actuar inhibiendo

factores angiogénicos como VEGF, IL-1 β , TNF- α , IL-6 y metaloproteinasas o aumentando la lisis tumoral dependiente de células NK (Wang *et al.*, 2013). La expresión de IL-10 en tejidos cervicales de mujeres mexicanas demuestra una clara tendencia a incrementar conforme progresa el CaCU.

3.4 IFN (Interferón)

Los Interferones (IFN) pertenecen al grupo de citocinas cruciales las cuales crean un estado antiviral activando la inmunidad celular la cual es potenciada en presencia de TNF- α (Barros *et al.*, 2018).

Los interferones se clasifican en IFN de tipo I (IFN- α , β , κ , ϵ , y ω), IFN de tipo II (IFN- γ) o IFN de tipo III (IFN- λ), los bajos niveles de IFN que se encuentran de manera constitutiva participan en la señalización basal de diversas citocinas, ya que estos pueden señalar de manera paracrina. Los IFNs pueden influenciar el estroma inhibiendo funciones de los fibroblastos y la producción de matriz extracelular. El tratamiento de queratinocitos con IFN de tipo I y II ha mostrado bajo diversas condiciones inhibir reversiblemente la proliferación celular, promover la diferenciación celular o causar la muerte celular lo que sugiere que los IFNs en una epidermis intacta pueden tener un papel anti-proliferativo adicional además de su papel antiviral (Woodby *et al.*, 2016).

Los HPV de los tipos 16, 18 y 31 son capaces de bloquear la expresión del gen estimulado por interferón (ISG) y de comprometer la función antiviral de las citocinas involucradas en la respuesta inmune, incluyendo la función de los interferones. Las propiedades antiviral y antitumoral de los IFNs de tipo I son complementadas por su papel en la inmunovigilancia. Cuando las células epiteliales son infectadas con HPV se induce la producción de IFN α/β lo cual conduce a la inhibición de la replicación viral, una inducción de funciones anti-proliferativas y citotóxicas así como una regulación negativa de la angiogénesis. Sin embargo las oncoproteínas E6 y E7 bloquean corriente abajo los blancos de IFN α/β

generando de esta manera un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Montes *et al.*, 2014). El HPV16 y HPV18 parecen inhibir la respuesta inmune innata a través de la desregulación de IFNs. Debido a la reducida expresión o a la alteración de los receptores de los IFNs su función se encuentra disminuida y se asocia con una disminución de apoptosis en células tumorales (Paradkar *et al.*, 2014).

4. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune innata es crucial para la eliminación del virus. Es un mecanismo esencial para la inducción de una respuesta adaptativa, prevención de una infección crónica así como del desarrollo del cáncer. El HPV puede evadir estos mecanismos lo que conduce a una transformación celular. En CaCU y en otros tipos de cáncer asociados al HPV los fibroblastos pueden contribuir a la evasión de la respuesta inmune, llevando a cabo actividades como el incremento en la expresión de genes pro-inflamatorios y quimiocinas, reclutando mastocitos, macrófagos y neutrófilos, secretando IL-10 o TGF- β así como otros factores de crecimiento. (Barros *et al.*, 2018).

Otro mecanismo por el cual las células tumorales evaden la respuesta inmune es a través de la modulación a la baja de la maquinaria del procesamiento antigénico afectando la vía del MHC clase 1 (Figura 3), transportadores asociados con la proteína de procesamiento antigénico (TAP) y tapasina. Por lo que la expresión de antígenos tumorales es desregulada lo que conduce a un incremento en la incidencia y metástasis (Vinay *et al.*, 2015). Los TLR y citocinas juegan un papel importante en la defensa del sistema inmune contra el HPV. La expresión de los receptores TLR4 y TLR9 son alterados durante la infección por HPV.

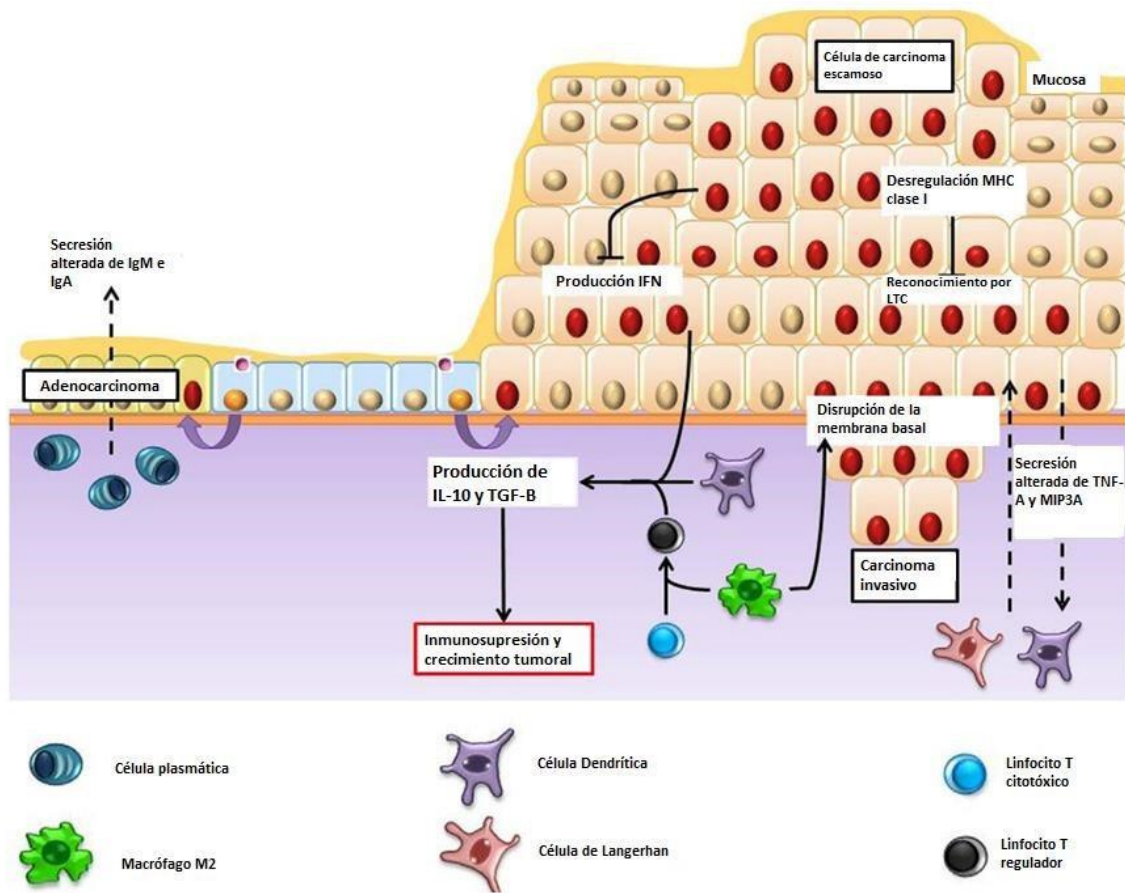


Figura 3. Evasión de la respuesta inmune por HPV. Después de la integración del genoma viral en el genoma del huésped las oncoproteínas virales son sobreexpresadas y se induce el desarrollo de las células tumorales. Las oncoproteínas muestran varias actividades inmunosupresivas. La migración de las células de Langerhan y células dendríticas en sitios dañados es alterada. Tomado y modificado de Langers *et al.*, 2014.

En estudios acerca del desarrollo del CaCU los niveles reportados para los receptores TLR4 y TLR9 fueron cruciales para la iniciación de la respuesta inmune innata debido a la inducción de la síntesis de citocinas y citotoxicidad sobre las células, por lo que generalmente bajos niveles de estos receptores se asocian con un bajo pronóstico y progresión tumoral. Las citocinas son los mediadores primordiales de la respuesta inmune. Se ha reportado que en el CaCU las citocinas de tipo Th1 son alteradas mientras que las citocinas de tipo Th2 son estimuladas. Las citocinas Th1 son potentes activadores de inmunidad celular que pueden anteceder la eliminación del HPV y las citocinas Th2

disminuyen la respuesta inmune llevando a una ineficiente eliminación del virus (Barros *et al.*, 2018).

La vía de señalización purinérgica, en donde el ATP extracelular, ADP y Adenosina actúan como las principales moléculas de señalización, ha surgido como un importante jugador en la progresión del cáncer. La adenosina promueve el crecimiento de las células tumorales, incrementa la angiogénesis, inhibe la producción de citocinas Th1, promueve la adhesión de las células inmunes al endotelio y contribuye a la supresión de las células T CD8+ y NK, predominantemente vía el receptor A2A permitiendo la evasión inmune del tumor. (Gao *et al.*, 2014).

5. VÍA ADENOSINÉRGICA

Los nucleósidos y nucleótidos extracelulares participan en una variedad de diferentes repuestas celulares entre las cuales se encuentran la estimulación o inhibición de la muerte celular, proliferación, migración, diferenciación y secreción de factores y mediadores inflamatorios. El ATP cumple con los requerimientos para ser un mensajero extracelular. Se presenta en mínimas cantidades (nmol/l) en el espacio extracelular bajo condiciones fisiológicas, es almacenado de forma intracelular en altas concentraciones (de 5 a 10 nmol/l), es soluble en agua y es rápidamente degradado por nucleotidasas extracelulares. La privación de oxígeno limita la disponibilidad de fuentes de energía e induce la acumulación de ATP extracelular y subsecuentemente Adenosina en los tumores (Di Virgilio *et al.*, 2017).

El ATP extracelular actúa como una molécula asociada a daño y se puede unir a receptores purinérgicos para activar las cascadas de señalización e inducir una respuesta inflamatoria, esta molécula puede ser liberada al espacio extracelular en condiciones de necrosis, apoptosis, hipoxia, estrés o inflamación (Zhao *et al.*, 2017).

5.1 CD39 (NTPDasa1)

Las enzimas pertenecientes a la familia ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa hidrolizan nucleótidos extracelulares trifosfatados y difosfatados en presencia de concentraciones milimolares de Ca^{2+} o Mg^{2+} dando como resultado nucleósidos monofosfatados. En mamíferos se han identificado ocho miembros de esta familia: NTPDasa1 (CD39), NTPDasa2, NTPDasa3 y NTPDasa8, las cuales se encuentran ubicadas en la superficie celular mientras que las NTPDasas 4-7 se encuentran de manera intracelular (Zimmermann *et al.*, 2012).

CD39 (E.C. 3.6.1.5) es una proteína integral de membrana que fosfohidroliza ATP, fue descrita como un marcador de activación en linfocitos B, es también la más expresada por monocitos-macrófagos. Una gran variedad de tipos celulares pueden liberar al espacio extracelular ATP o ADP desde compartimientos intracelulares (Antonioli *et al.*, 2013).

La enzima CD39 limitante en la generación de Adenosina inmunosupresora, juega un papel importante en la progresión tumoral. Se ha reportado que linfocitos T reg CD39^+ son capaces de inhibir la inmunidad antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro*. CD39 es altamente expresada en tejidos tumorales, la sobreexpresión de dicha ecto enzima fue reportada como un predictor de bajo pronóstico en pacientes (Zhao *et al.*, 2017). Se reportaron bajas cantidades de sCD39 circulando en el torrente sanguíneo, también se incorpora en forma de micropartículas donde juega un papel en el intercambio de señales regulatorias entre leucocitos y células vasculares (Zimmermann *et al.*, 2012). Se ha reportado que sCD39 tiene propiedades antitrombóticas (Pinsky *et al.*, 2002) y que esta molécula puede ser liberada al medio extracelular en condiciones de estrés conservando su actividad catalítica (Yegutkin *et al.*, 2000).

5.2 CD73 (5'-nucleotidasa)

CD73 (5'-nucleotidasa) es una proteína homodimérica anclada a un glicofosfatidilinositol (GPI) cuyo dominio catalítico está orientado hacia el medio extracelular, se encuentra tanto anclada a la membrana como en forma soluble y juega un papel crucial en el interruptor de la vía adenosinérgica, generadora de Adenosina catalizando la hidrólisis de AMP hacia Adenosina y fosfato (Figura 4) (Gao *et al.*, 2014; Romio *et al.*, 2011). Se expresa en subconjuntos de células T, células mieloides, células estromales de la médula ósea, células epiteliales del timo y células B humanas (Regateiro *et al.*, 2013).

CD73 puede encontrarse ligada a la membrana citosólica, en núcleo, en mitocondria y de manera soluble en dos formas (e-N y cN-II), las cuales dependen del sustrato: la primera (e-N) es dependiente de AMP y se deriva de la forma unida a la membrana; el otro (cN-II) es IMP-dependiente y regula los niveles de monofosfatos de nucleósidos intracelulares (Bianchi *et al.*, 2003).

Las formas solubles de CD73 han sido descritas en varios tejidos incluyendo suero, fluido sinovial (Zimmermann *et al.*, 2012) y placenta (Klemmens, 1990). Las formas solubles de CD73 pueden tener diferentes orígenes celulares, provenir de la hidrólisis de CD73 anclado a la membrana por una fosfolipasa c endógena, también puede ser liberada vía microvesículas o como exosomas, el grado de liberación de CD73 de la superficie celular varía entre tipos celulares. Las formas solubles de la enzima pueden ser capaces de difundir entre las células y conferir actividad a sitios distantes de la expresión de CD73 (Zimmermann *et al.*, 2012). Los exosomas aislados de pacientes con mesotelioma co-expresan CD39 y CD73 y se diseminan rápidamente del tumor primario hacia los nodos linfáticos, la presencia de CD39 y CD73 en dichos exosomas puede potencialmente suprimir la inmunidad sistémica y ayudar en la generación de nichos pre-metástasicos (Vijayan *et al.*, 2017). Las 5' nucleotidasas solubles han sido ligadas a la resistencia de fármacos empleados en el tratamiento contra el cáncer, debido a su habilidad para metabolizar varios monofosfatos análogos (Borowiec *et al.*, 2006). Además de la función enzimática de CD73, esta ecto

nucleotidasa funciona como molécula de adhesión, participando en la migración de células como se ha reportado para líneas celulares de cáncer de mama y melanoma (Vijayan *et al.*, 2017).

5.3 Nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (NPP)

La familia de ecto-NPP consiste de una familia de siete ectoenzimas las cuales se relacionan estructuralmente (NPP1 a NPP7). Los miembros de esta familia tienen amplia especificidad de sustrato, capaces de hidrolizar uniones de pirofosfatos y fosfodiéster en dinucleótidos, ácidos nucleicos así como también en colin fosfato ésteres y lisofosfolípidos. Dentro del contexto de la vía adenosinérgica solo los tres primeros miembros de la familia son capaces de hidrolizar varios nucleótidos (Yegutkin, 2008).

NPP1-NPP3 tienen una amplia distribución en los tejidos, pueden ser co-expresadas en el mismo tejido o incluso en la misma célula. A menudo se expresan en superficies epiteliales. Se han descrito que las NPP1, NPP2, NPP3, NPP6 y NPP7 pueden estar también como forma soluble principalmente en el suero, sin embargo el mecanismo por el cual estas son liberadas aún no es dilucidado (Zimmermann *et al.*, 2012).

5.4 Fosfatasas Alcalinas (AP)

Las fosfatasas alcalinas (AP) son enzimas ubicuas las cuales se encuentran unidas a la membrana plasmática mediante un GPI. Estas enzimas poseen una amplia especificidad de sustratos hacia diferentes fosfomonoesteres y otros compuestos que contienen fosfatos incluyendo nucleótidos de adenina, polifosfatos inorgánicos, pirofosfatos con la liberación de fosforo inorgánico (Yegutkin, 2014).

Las AP son ampliamente expresadas en procariontes y eucariontes, se pueden encontrar en cualquier tejido, incluyendo una variedad de tumores y suero. El genoma humano codifica

para cuatro genes de AP: TNAP (alta expresión en hígado, hueso y riñón así como en otros tejidos), PLAP (expresión en placenta), GCAP (expresión en células germinales) e IAP (expresión en intestinos) (Zimmermann *et al.*, 2012; Yegutkin, 2014).

Dentro de la vía adenosinérgica las AP pueden hidrolizar ATP extracelular vía ADP y AMP a Adenosina. Estas son las únicas ecto nucleotidasas que pueden desfosforilar secuencialmente nucleósidos trifosfatados a nucleósidos. Las AP de igual forma se pueden encontrar de forma soluble siendo éstas el resultado de la acción de fosfolipasas C fosfatidilinositol específicas. Son abundantes en el suero, aproximadamente un 95% de las fosfatasas alcalinas que se encuentran circulando en el suero se deriva del hueso e hígado (Zimmermann *et al.*, 2012).

5.5 ADA (Adenosina Deaminasa)

Adenosina deaminasa (ADA, E.C. 3.5.4.4) es una enzima citosólica de 40 kDa y puede aparecer en la membrana de la célula. El gen que codifica para la proteína ADA se encuentra ubicado en el cromosoma 20. ADA participa en el metabolismo de purinas donde degrada Adenosina o 2'-deoxiadenosina para producir Inosina o 2'-deoxinosina respectivamente (Figura 4). El metabolismo subsecuente de estos nucleósidos deaminados conduce a la generación de hipoxantina la cual puede ser transformada hacia ácido úrico por la xantina oxidasa o almacenada en mononucleótidos por la acción de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Antonioli 2012; Franco 1997).

En humanos se han detectado diferentes isoformas de ADA y se han designado como ADA-1, ADA-2 y ADA-3. Además de participar en el catabolismo de Adenosina, también pueden interactuar con proteínas de anclaje en la superficie celular. Se han identificado dos diferentes proteínas de anclaje: la glicoproteína transmembranal dipeptidil-peptidasa IV (CD26) y los receptores de Adenosina A1, A2A y A2B (Antonioli 2012; Cortes *et al.*, 2015). Aunque la actividad de ADA2 en el plasma se descubrió hace mucho tiempo, la proteína

responsable para esta actividad se aisló recientemente. Esta isoenzima es responsable de una pequeña porción de la actividad total de ADA en varios tejidos. ADA1 y ADA2 tienen diferentes propiedades catalíticas, bioquímicas e inmunoquímicas. ADA2 tiene 100 veces menor afinidad por Adenosina y 2'-deoxiadenosina que ADA1, es débilmente inhibida por eitró-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA) y alcanza su máxima actividad en un pH ligeramente ácido. ADA2 es específicamente diseñada para actuar en el medio extracelular esto debido a su presencia en el suero. La isoenzima ADA1 se encuentra en todos los tejidos y eritrocitos. Probablemente debido a su habilidad de unirse a la superficie de células hematopoyéticas, una pequeña porción de la enzima circula libremente en el plasma. Los niveles más altos de ADA1 se encuentran en el duodeno, nódulos linfáticos, bazo y timo. La función principal de ADA1 es reducir los niveles intracelulares de Adenosina y de 2'-deoxiadenosina los cuales son tóxicos para las células (Cortes *et al.*, 2015).

ADA puede ser expresada como ectoenzima en la superficie de células dendríticas, linfocitos, tejidos linfoides y tejidos no linfoides, también puede ser encontrada como forma soluble dentro del suero. Un estudio realizado por Pettengill en 2013 observó que en el suero de recién nacidos se encontraba una forma catalíticamente activa de ADA.

5.6 PNP (Purina Nucleósido Fosforilasa)

Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) es una enzima ubicua que tiene un papel importante en el metabolismo de las purinas. El gen que codifica para la proteína PNP se encuentra localizado en el cromosoma 14. PNP es un trímero de aproximadamente 90 KDa, se ha encontrado en la mayoría de los tejidos siendo los tejidos linfoides los que presentan los niveles más altos.

Hasta hace poco no se tenían datos acerca de la presencia de PNP en el microambiente extracelular. La expresión de PNP en la superficie celular junto con ADA ayuda en el metabolismo de nucleósidos extracelulares (Peña-Altamira *et al.*, 2018; Giuliani *et al.*, 2012)

(Figura 4). Se ha reportado que los niveles de PNP incrementan en los tumores (Maeda *et al.*, 1992) y también puede ser secretado como una forma soluble (Yegutkin, 2014).

En un estudio realizado por Giuliani y colaboradores en el 2017 se observó que esta enzima se podía encontrar en el medio extracelular con actividad catalítica para convertir Inosina hacia Hipoxantina (Giuliani *et al.*, 2017).

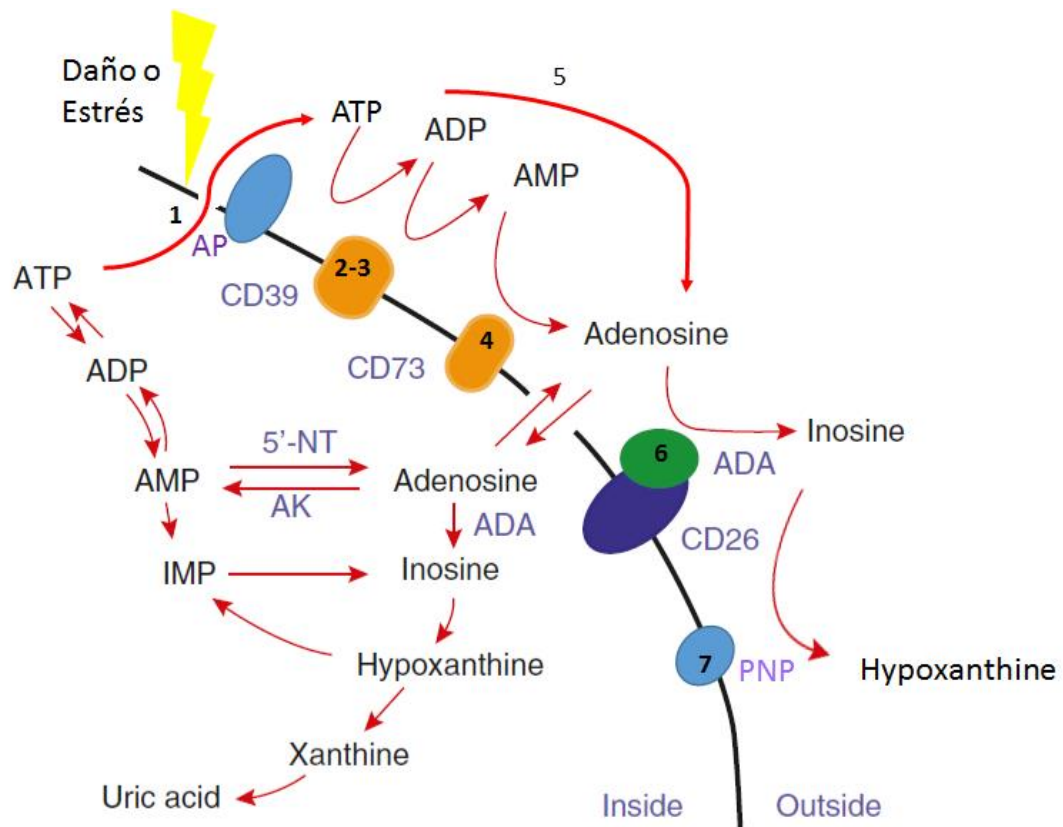


Figura 4. Esquema de señalización de la vía adenosinérgica. (1) La liberación de ATP por parte de una célula dañada vía excitocitos o mecanismos no líticos. (2- 3) Hidrólisis de ATP mediante CD39 para producir ADP y AMP y la liberación de fosforo inorgánico (4) Hidrólisis del AMP por CD73 para producir Adenosina, (5) Actividad hidrolítica de fosfatasa alcalinas para producir adenosina, (6) Desaminación de la Adenosina para producir Inosina por parte de ADA finalmente la hidrólisis de Inosina por parte de PNP para la producción de hipoxantina (7). Tomado y modificado de Schwab, 2016

CD39 y CD73 se han encontrado sobreexpresados en muchos tipos de líneas celulares cancerígenas como: leucemia, glioblastoma, melanoma, de ovario, vejiga, tiroides, esofágico, gástrico, de colon, de próstata y de mama (Gao *et al.*, 2014; Yegutkin *et al.*, 2012;

Clayton *et al.*, 2011). La alta expresión de CD73 ha sido asociada con un pronóstico adverso y una alterada respuesta inmune anti-tumoral en varios tipos de cáncer (Cuadro 1) (Allard *et al.*, 2016).

Enzima	Tipo de cáncer	Hallazgo
CD39	Cáncer gástrico	Elevada expresión de CD39 en el tumor correlacionado con un bajo pronóstico de supervivencia en pacientes.
	CLL (Leucemia Linfocítica Crónica)	Elevada expresión de CD39 en células T, pero no en células B asociada a baja supervivencia.
	HCC (Carcinoma Hepatocelular)	Baja supervivencia observada en pacientes con alta expresión de CD39.
CD73	Cáncer gástrico	La alta expresión de CD73 se asocia con bajo pronóstico en pacientes.
	TNBC (Cáncer de mama triple negativo)	La alta expresión de CD73 se asocia con bajo pronóstico en pacientes.
	Cáncer de endometrio	La alta expresión de CD73 se asocia con un mejor pronóstico en estos pacientes.
	Cáncer de ovario	La alta expresión de CD73 se asocia como un marcador de bajo pronóstico en estos pacientes.
	Adenocarcinoma rectal	La alta expresión de CD73 se asocia con los peores pronósticos en pacientes.

Cuadro 1. Hallazgos sobre CD39 y CD73 en diversos tumores. Tomado de Vijayan *et al.*, 2017

6. ADENOSINA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

La Adenosina extracelular actúa sobre receptores específicos de membrana y es degradada a Inosina por Adenosina deaminasa. La Adenosina también puede ser tomada por las células y fosforilada hacia AMP cíclico por Adenosina cinasa (Di Virgilio *et al.*, 2017).

La Adenosina se une a receptores purinérgicos (receptores de adenosina), acoplados a proteínas G, los cuales se expresan ampliamente por varias células, incluyendo células T, células B y células dendríticas (Smyth *et al.*, 2013; Kumar, 2013). Cada receptor muestra diferente afinidad por la Adenosina. Los receptores A1, A2A y A3 responden a bajos niveles

de Adenosina (250-700 nM) y son categorizados como receptores de alta afinidad (Figura 5). La activación del receptor A2B (baja afinidad) ocurre solamente bajo condiciones patológicas como las que se presentan en el microambiente tumoral en donde se acumulan altas concentraciones de Adenosina (Vijayan *et al.*, 2017). La interacción de Adenosina con los receptores A1 y A3 induce una disminución en los niveles intracelulares de AMP cíclico; mientras su interacción con los receptores A2A y A2B, los incrementa, debido a la activación de adenil ciclasa (Stagg *et al.*, 2010).

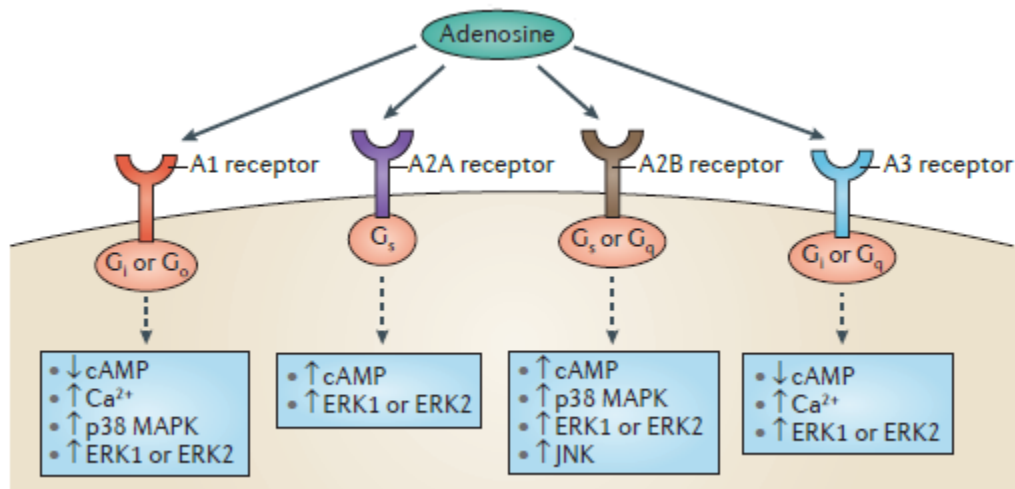


Figura 5. Unión de adenosina a receptores en la célula. La Adenosina generada dentro del microambiente se une a receptores expresados en diferentes células a través de los cuales activan vías de señalización. Tomado de Antonioli *et al.*, 2013.

La activación de diferentes receptores puede tener diferentes consecuencias. Los receptores A2A están estrechamente relacionados a la proteína de unión de respuesta a AMP cíclico, la cual eventualmente se conduce al gen de transcripción CEBP β . La proteína CEBP β se une al gen promotor de IL-10 la cual activa la transcripción de IL-10 y subsecuentemente conduce a la liberación de dicha citocina (Zhao *et al.*, 2017).

A altas concentraciones de Adenosina las células pueden activar el proceso de apoptosis aunque algunas células tumorales son resistentes a esta acción mediada por Adenosina.

Además de los efectos de la Adenosina en el crecimiento tumoral, la Adenosina actúa en poblaciones aisladas de células cancerígenas para incrementar la motilidad, adhesión a la matriz extracelular, la expresión de proteínas de anclaje y receptores para moléculas que pueden dirigir el movimiento celular (Schwab, 2016). La Inosina ha sido reportada como un agonista débil del receptor A3 de Adenosina aunque también puede afectar indirectamente la señalización purinérgica compitiendo con el transporte de nucleósidos (Di Virgilio *et al.*, 2017). Las concentraciones de Adenosina en el espacio extracelular son altamente reguladas por ectoenzimas como ADA. En tejidos normales donde las concentraciones de Adenosina son bajas, la principal vía a través de la cual la Adenosina es metabolizada involucra la fosforilación de AMP por Adenosina cinasa. A mayores concentraciones de Adenosina como las que se encuentran dentro de un tumor la principal vía a través de la cual la Adenosina es metabolizada ocurre a través de la desaminación hacia Inosina por medio de ADA.

El complejo CD39/CD73 participa en el inmunoescape tumoral inhibiendo la activación, la expansión clonal y migración de los linfocitos T (CD4+ y CD8+) hacia el sitio del tumor (Antonioli *et al.*, 2013). La Adenosina presente en el ambiente extracelular es un factor regulador inmune de potente protección en las células y tejidos del daño inmune, reprime también las respuestas inmunes en el microambiente tumoral, asistiendo la evasión inmune del tumor y se acumula en el microambiente tumoral (Clayton *et al.*, 2011).

La concentración extracelular de Adenosina se puede incrementar en respuesta a un cambio metabólico, cuando las células son privadas de nutrientes o de oxígeno (Ohta, 2016). La hipoxia es un elemento central en la patogénesis de muchas enfermedades cardiovasculares, inflamatorias e infecciosas, es también una de las causas principales para la producción de Adenosina; por lo tanto, la Adenosina se encuentra en mayor concentración en sitios hipóxicos asociados con el tumor (Ohta, 2016; Kumar, 2013). Las condiciones de hipoxia se relacionan con una liberación masiva de ATP en el espacio extracelular, que se convierte rápidamente en AMP por CD39 y luego en Adenosina por CD73 (Antonioli *et al.*, 2014).

Existen mecanismos adicionales que incrementan la expresión de CD39 y CD73, entre ellos, los factores inmersos en el microambiente tumoral (Turcotte *et al.*, 2015), uno de los factores reportados que incrementa la expresión en membrana de CD39 y CD73 en células tumorales es la hipoxia (Vijayan *et al.*, 2017), además varios factores solubles se encuentran asociados al microambiente tumoral incluyendo IFN tipo I, TNF- α , IL-1 β , PGE2, TGF- β los cuales han mostrado aumentar la expresión de CD73 en varios tipos celulares (Allard *et al.*, 2014; Beavis *et al.*, 2012; Regateiro *et al.*, 2011; Cortes-Escamilla, 2016). Zhi y colaboradores en 2012 mostraron que al cultivar células de cáncer de mama con TGF- β se incrementa la expresión de CD73 en membrana y resultados similares se han reportado en cáncer de próstata, de igual forma se ha mostrado que IFN- β incrementa la expresión en membrana de CD73 (Niemela *et al.*, 2008).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el CaCU representa un problema de salud pública al ocupar el segundo lugar en mortalidad en mujeres (INEGI, 2018). Las células tumorales infectadas por HPV presentan diversos mecanismos que conducen a la supresión y evasión de la respuesta inmune, entre los cuales destacan: disminución de las moléculas de MHC clase I, alteración en el procesamiento de antígenos, el reclutamiento de células inmunosupresoras tales como linfocitos T reguladores y presencia de un microambiente tumoral inmunosupresor con altos niveles de TGF- β e IL-10 (Torres-Poveda *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2014). Recientemente se ha propuesto a la vía adenosinérgica como un mecanismo de supresión de la respuesta inmune en cáncer, en donde las células que se encuentran en condiciones hipóxicas, en estrés metabólico o con falta de nutrientes liberan al espacio extracelular ATP que es hidrolizado por CD39 para producir ADP/AMP, y finalmente por CD73 para producir Adenosina (Yegutkin, 2014). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que células tumorales de CaCU presentan CD73 en membrana y además producen CD73 soluble (sCD73) con capacidad para generar Adenosina e inhibir las funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (Molina-Castillo 2016; Mora-García *et al.*, 2017). Tomando en consideración que citocinas tales como TGF- β , EGF, IL-10 e IFN- β modulan la expresión de CD73 en diversos tipos tumorales (Allard 2014; Beavis *et al.*, 2012; Regateiro *et al.*, 2011) y que dichas citocinas se encuentran presentes en el microambiente tumoral del CaCU (Schrevel *et al.*, 2011; Torres-Poveda *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2018), el presente estudio se realizó con la finalidad de investigar si estas citocinas inducen la producción de sCD73 en células tumorales de CaCU. Lo cual será de gran relevancia para conocer el papel que juegan estas citocinas en el mantenimiento de un microambiente inmunosupresor a través de la inducción de CD73 y la generación de Adenosina.

8. HIPÓTESIS.

Se ha reportado que factores solubles tales como IL-10, TGF- β , IFN- β y EGF modulan la expresión de CD73 en diferentes tumores. Además, se sabe que dichos factores se encuentran presentes en el microambiente tumoral del CaCU. Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha reportado que células de CaCU son capaces de generar adenosina mediante la hidrólisis de AMP por CD73 expresada en la membrana celular y sCD73 liberada en los sobrenadantes de cultivo celular. En consecuencia, si cultivamos células tumorales de CaCU en presencia de estas citocinas, se espera que las células tumorales de CaCU incrementen la producción de sCD73, y por tanto, su capacidad para generar mayor cantidad de adenosina.

9. OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de TGF- β , EGF, IFN- β e IL-10 sobre la secreción de sCD73 en células tumorales CaSki.

9.1 Objetivos particulares.

- Analizar la expresión de CD73 en la membrana de células tumorales CaSki cultivadas en presencia de IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β
- Determinar la secreción de CD73 en forma soluble (sCD73) en células CaSki cultivadas en presencia de IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β
- Analizar la actividad catalítica de sCD73 producida por células CaSki cultivadas en presencia de IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β

10. METODOLOGÍA.

10.1 Cultivo celular.

Se utilizó la línea celular de CaCU CaSki (VPH-16) estas células se mantuvieron proliferando en medio de cultivo RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies), suplementado con suero fetal de bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies) al 10%, antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL), y bajo condiciones de esterilidad a temperatura constante de 37°C en una incubadora (Forma Scientific), con 5% de CO₂ y un ambiente de humedad saturante. Una vez que las cajas de cultivo estuvieron a 60-80% de confluencia, se tomaron alícuotas de 1x10⁷ células y se cultivaron durante 72 horas en placas de 6 pozos con medio Opti-MEM® (Life Technologies) libre de suero en ausencia o presencia de 25 ng/mL de cada una de las siguientes citocinas: IFN-β, IL-10, TGF-β y EGF. Posteriormente, los sobrenadantes se colectaron y se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min.

10.2 Citometría de flujo.

La expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales, se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para ello, 50 000 células tumorales sujetas a los diferentes tratamientos con citocinas fueron resuspendidas en PBS suplementado al 2% con SFB y colocadas en tubos Eppendorf a 4°C por 30 min, en obscuridad con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD73-PE (BD Pharmingen). Después de 2 lavados, las células marcadas fueron analizadas mediante un citómetro de flujo FACS- Calibur (BD Biosciences), contando un mínimo de 10,000 eventos.

10.3 ELISA.

Para determinar la presencia de sCD73 en los sobrenadantes de las células tumorales cultivadas en ausencia o presencia de las diferentes citocinas, se empleó un ensayo de ELISA. Para ello, se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano para ELISA/RIA (Corning, USA), en donde se colocaron por triplicado 100 µl de los sobrenadantes y se incubaron una hora a 37°C; transcurrido este tiempo se incubó durante toda la noche en refrigeración a 4°C. En otros pozos se colocó una serie de diferentes concentraciones (1-100ng/mL) de la enzima recombinante de CD73 diluida con medio Opti-MEM®. Los sobrenadantes se retiraron de la placa y se procedió a hacer dos lavados con TBS-Tween 20 previo al bloqueo. El bloqueo de cada placa, consistió en la adición de 100 µl de solución compuesta por TBS-Tween 20 y 2% de albumina sérica bovina (BSA), la placa se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente los pozos fueron lavados 4 veces con 300 µl de TBS-Tween 20 enseguida se adicionaron 100 µl de anticuerpo primario (5' Nucleotidase/CD73 Antibody Novusbio®) a una dilución 1:1000 en TBS-Tween 20 y se incubó por una hora a 37°C. Después se lavó la placa 6 veces con 300 µl/pozo de TBS-Tween 20 y se agregó el anticuerpo secundario. Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase Conjugated Millipore diluido 1:1000 en TBS-Tween 20 y se incubó 1 hora. Los pozos fueron lavados 8 veces con TBS-Tween 20. A continuación se adicionaron 100 µl a cada pozo del sustrato para la fosfatasa alcalina disolviendo 0.03g de sustrato (Sigma) a 5 ml de Dietanolamina. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora. La lectura se realizó a una longitud de onda de 405 nm.

10.4 Western Blot.

Con la finalidad de corroborar la presencia de sCD73 en los sobrenadantes de las líneas celulares cultivadas en presencia o ausencia de citocinas se utilizó la técnica de Western-blot. Se prepararon geles de poliacrilamida en los cuales se cargaron 20 µg de proteína contenida en los sobrenadantes y 20 µg de lisado de las células con buffer de carga. El gel

se enjuagó con buffer de corrida 1x y se colocó en una cámara de electroforesis a 80 volts y 30 amperes, hasta que las proteínas llegaron al final del gel. Posteriormente el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 100 amperes empleando una cámara de electrotransferencia (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, USA). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante una hora con una solución conteniendo TBS-Tween 20- BSA 5%, posteriormente se dejó incubando toda la noche con el anticuerpo primario (5' Nucleotidase/CD73 Antibody Novusbio®) a una dilución de 1:500 en una solución de TBS-Tween 20- BSA 3% en agitación suave. Después de retirar la solución con anticuerpo, la membrana fue lavada con TBS-Tween. A continuación se adicionó el anticuerpo secundario (Peroxidase Labeled Antibody to Rabbit IgG KPL®) a una dilución de 1:1500 en TBS-Tween 20- BSA 3% y se dejó en agitación suave por 1 hora y transcurrido el tiempo se retiró el anticuerpo secundario y la membrana fue lavada 5 veces con TBS-Tween. Para revelar la presencia de sCD73 en la membrana, se añadieron 500 µl de luminol/enhancer solution y 500 µl de Stable peroxide solution (Sigma-Aldrich, USA). Finalmente la membrana fue revelada con ayuda del equipo ChemiDoc MD Imaging System Biorad® y del software Studio Image 6.0.

10.5 Cromatografía en capa fina (CCF).

La conversión de AMP a Adenosina fue analizada mediante un ensayo de cromatografía en capa fina, en donde los sobrenadantes se incubaron con AMP y APCP (inhibidor específico para CD73) a una concentración final de 2.5mg/mL durante 24, 48 y 72 horas. Se colectaron 1-2 µL de las muestras en laminillas fluorescentes de poliéster conteniendo silica gel (CCF, Sigma USA) (5x6.5cm). Posteriormente las laminillas se colocaron verticalmente en cámaras de elución las cuales contenían 2 ml de cada una de las fases móviles una de ellas compuesta por: isobutanol:alcohol isoamílico:etoxietanol:amoníaco:agua (9:6:18:9:15) y la otra compuesta de isobutanol:etilacetato:metanol:amoníaco (7:4:3:4) se dejaron correr durante 45 min en la cámara de elución, y posteriormente fueron retiradas para su secado

a temperatura ambiente. Como controles se emplearon muestras de 1 μ L de soluciones de 5mg/mL de Adenosina 5'-monofosfato (AMP), Adenosina (Ado), Inosina (Ino) e Hipoxantina (Hypo) (Sigma, Life science). Finalmente los compuestos AMP y Adenosina se visualizaron a través de un transiluminador con emisión de luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron.

10.6 Cromatografía líquida de Ultra Resolución (UPLC).

Para cuantificar la cantidad de Adenosina producida por la sCD73 contenidas en los sobrenadantes de los cultivos celulares sujetos bajo las diferentes condiciones, se utilizó un equipo de UPLC aquity (Waters, USA). Previo a la lectura de las muestras, se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de Adenosina disuelta en fase móvil (0.5% acetonitrilo: 5% metanol: 94.5% acetato de sodio 0.25 M, pH 6.3) para establecer los límites de detección. Los sobrenadantes de las células tumorales cultivadas en presencia de AMP y AMP+APCP fueron centrifugados a 12000 rpm y posteriormente filtrados con filtros de amicón de 3000 daltones (Millipore, USA). Muestras de 25 μ L fueron inyectadas al equipo UPLC para su determinación. El análisis se realizó empleando el software Empower 3 (Waters, USA).

10.7 Análisis estadístico.

Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de los experimentos realizados por triplicado. Los datos se analizaron en el software GraphPad Prism 6.0 mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey para determinar diferencia estadística. La significancia se determinó como $P < 0.05$

11. RESULTADOS.

11.1 Efecto de IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β en la expresión de CD73 en membrana de células tumorales de CaCU.

La acumulación de Adenosina extracelular en el microambiente tumoral, generada mediante la actividad de la ectonucleotidasa CD73, es un mecanismo ampliamente utilizado por los tumores para suprimir la respuesta inmune antitumoral (Allard *et al.*, 2016). Recientemente se ha reportado que la expresión y la función de CD73 en células tumorales es regulada por varios mediadores presentes en el microambiente tumoral tales como hipoxia, citocinas y PGE2 entre otros (Antonioli *et al.*, 2016). Tomando en consideración que las citocinas IL-10, TGF- β , EGF e IFN- β se producen de manera predominante en varios tipos de tumores (Allard *et al.*, 2017; Beavis *et al.*, 2012; Regateiro *et al.*, 2011) y que dichas citocinas se encuentran presentes en el microambiente tumoral del CaCU (Schrevel *et al.*, 2011; Torres-Poveda *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2018), en este estudio analizamos su efecto sobre la expresión de CD73 en células tumorales CaSki (HPV-16) de CaCU. Después de cultivar a las células tumorales durante 72 horas en ausencia o presencia de 25 ng/mL de cada una de las citocinas, se analizó la expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales mediante citometría de flujo, empleando el anticuerpo monoclonal anti-CD73-PE. Se observó que el tratamiento con TGF- β , y EGF produjeron un incremento de 50%, con respecto a la expresión basal de CD73 en la membrana de las células CaSki. Mientras que IL-10 e IFN- β no produjeron ningún cambio en la expresión de CD73 en las células tumorales (Figura 6).

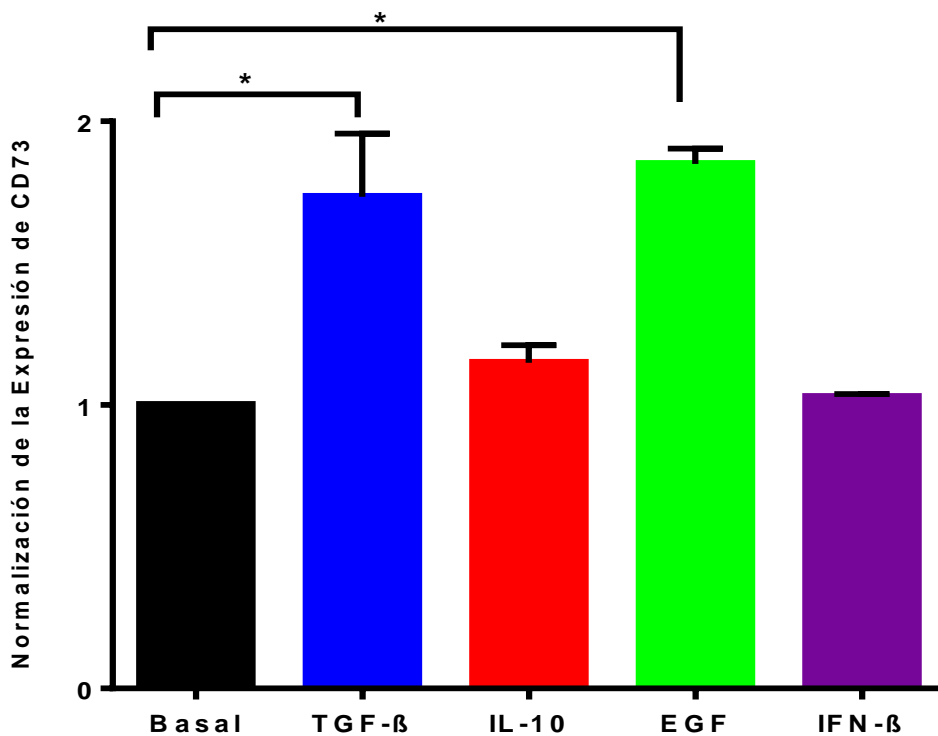


Figura 6. Efecto de IL-10, TGF-β, EGF e IFN-β sobre la expresión de CD73 en membrana de las células tumorales CaSki. 50 000 células CaSki se cultivaron durante 72 horas en ausencia o presencia de 25ng/mL de cada una de las citocinas y la expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales se determinó mediante citometría de flujo. Experimento representativo de 3 ensayos realizados. *, indica diferencias significativas $p < 0.05$, respecto al basal.

11.2 Efecto de IL-10, TGF-β, EGF e IFN-β en la secreción de sCD73 en células tumorales de CaCU.

Para analizar si las citocinas IL-10, TGF-β, EGF e IFN-β inducen la secreción de sCD73 en CaCU, tal como ha sido reportado en varios tipos celulares (Klemmens, 1990), se cultivaron 1×10^7 células CaSki durante 72 horas en placas de 6 pozos en ausencia o presencia de cada una de las citocinas. La secreción y concentración de sCD73 fue determinada en cada uno de los sobrenadantes mediante la técnica de ELISA. Como control positivo se realizó una curva de concentración con proteína recombinante humana CD73 (Figura 7A). Cuando las células fueron tratadas con EGF e IL-10 la concentración de sCD73 detectada en los sobrenadantes incrementó de manera significativa respecto a la concentración basal (5ng/mL), las cuales fueron de 10.5 y 10ng/mL, respectivamente. Mientras que en los

sobrenadantes de las células tratadas con TGF- β e IFN- β se observó una concentración de 7ng/mL de sCD73 en ambos casos, el cual no fue significativo respecto a la concentración basal (Figura 7B).

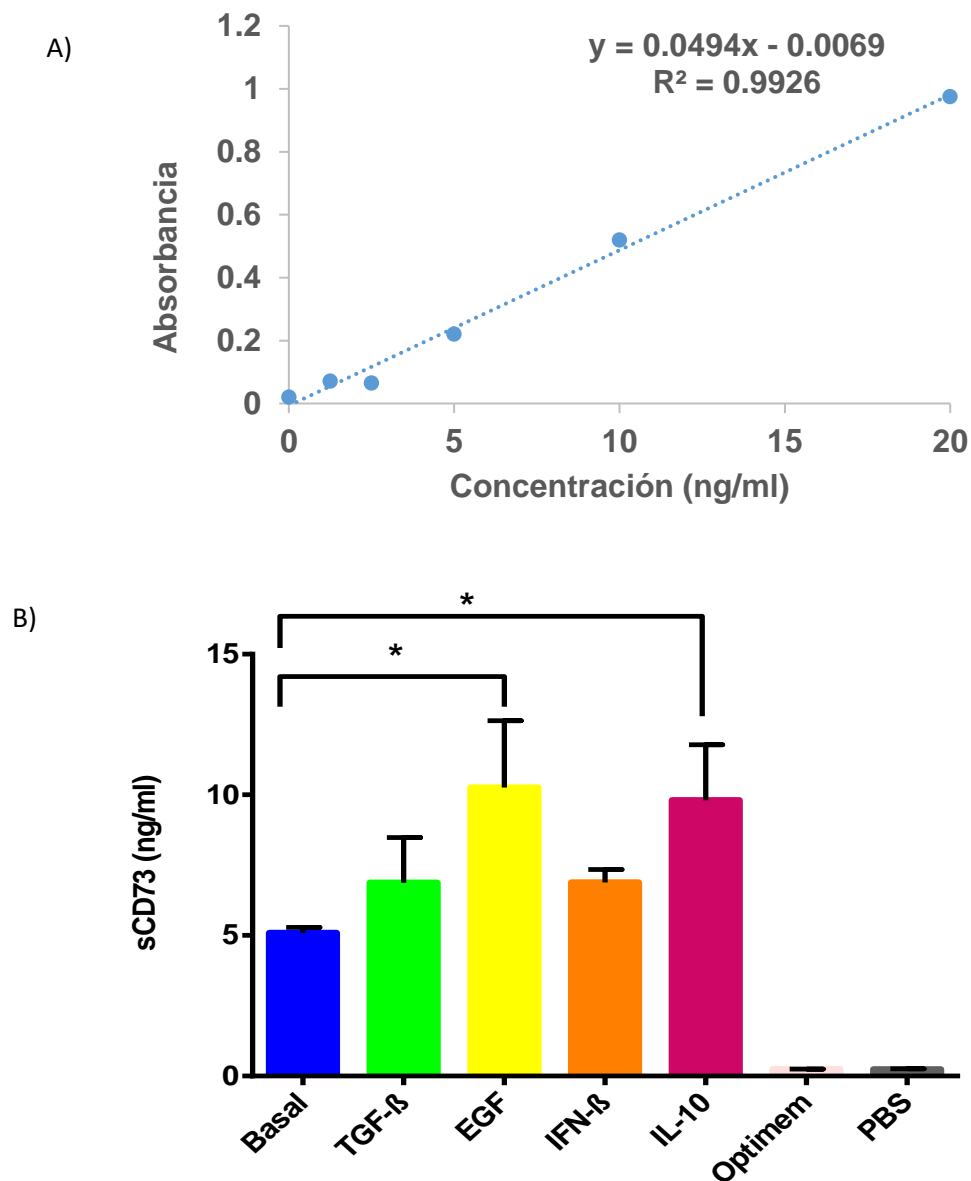
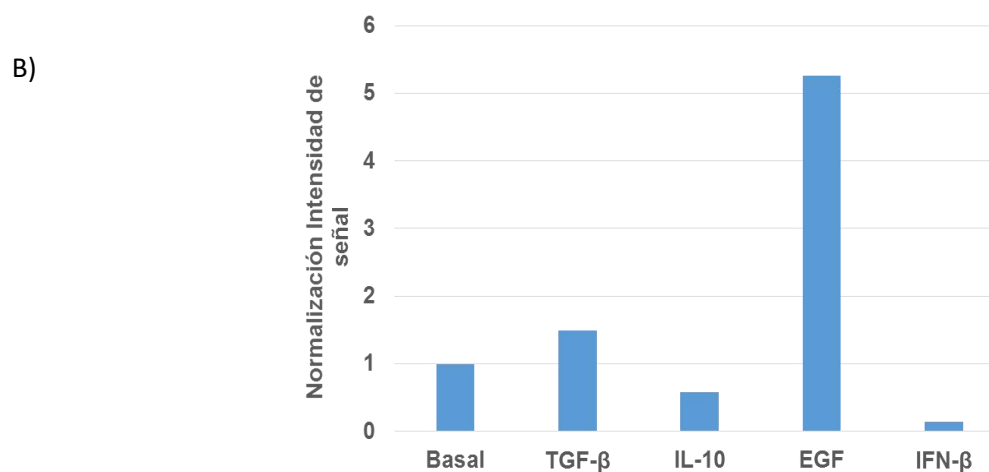
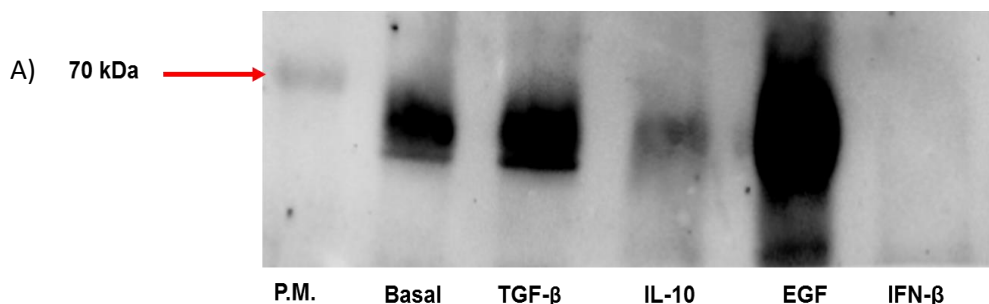


Figura 7. Efecto de TGF- β , EGF, IL-10 e IFN- β sobre la secreción de sCD73 en células tumorales CaSki. 1×10^7 células tumorales CaSki fueron cultivadas durante 72 horas en placas de 6 pozos con 2mL de medio libre de suero en presencia y ausencia de 25ng/mL de las citocinas. (A) Se muestra una curva patrón con diferentes concentraciones de la enzima CD73 recombinante humana. (B) Se muestran las concentraciones de sCD73 contenidas en los sobrenadantes de las células tumorales CaSki cultivadas en ausencia y presencia de las diferentes citocinas como control negativo se utilizó medio Optimem®. Experimento representativo de 3 ensayos realizados. *, indica diferencias significativas $p < 0.05$ respecto al basal

Al analizar mediante Western blot, la presencia de CD73 en lisados de las líneas celulares tratadas con las citocinas, se observó que TGF- β y EGF indujeron incremento significativo de CD73 respecto al producido por las células sin tratamiento. Las bandas correspondientes a la proteína CD73 (Figura 8A) y su análisis densitométrico (Figura 8B) mostraron un incremento del 50% y del 400% respectivamente, en relación al lisado de las células sin tratamiento. Por otro lado, al detectar sCD73 en los sobrenadantes de las células tumorales, se observó que las células tratadas con TGF- β e IL-10 mostraron incremento del contenido de sCD73 del 50% y del 100% respectivamente, en relación a las células que no recibieron tratamiento con citocinas (Figuras 8C y 8D). Lo anterior sugiere que EGF y TGF- β incrementan el contenido de CD73 a nivel de membrana mientras que, tanto IL-10 como TGF- β inducen la liberación de sCD73 en las células de CaCU.



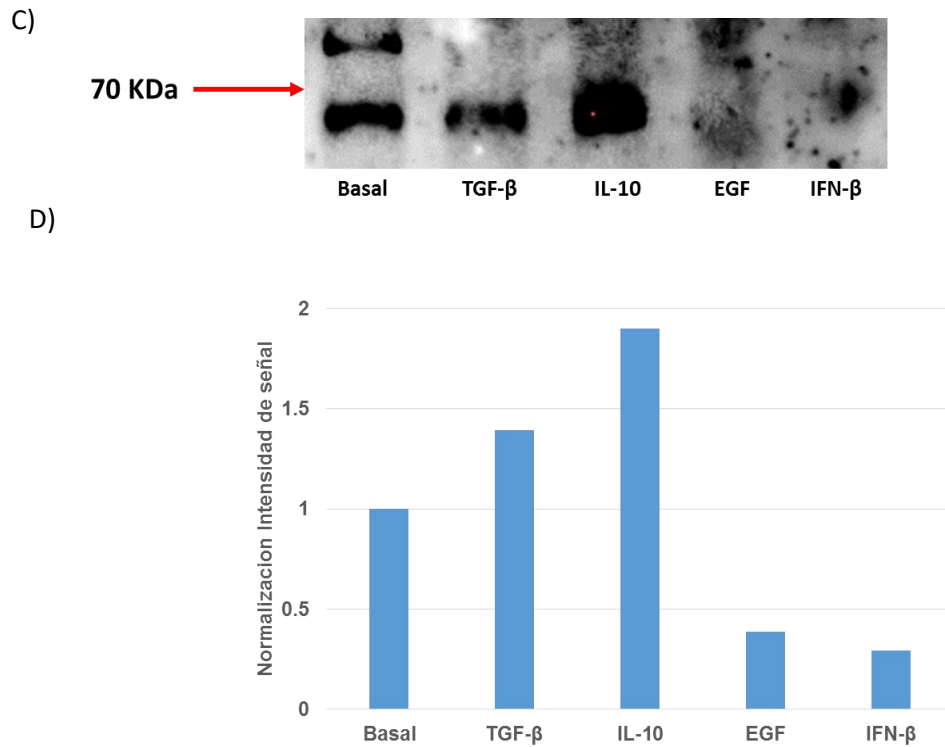


Figura 8 - Detección de CD73 en sobrenadantes y lisados de células CaSki tratadas con citocinas. 1×10^7 células CaSki fueron cultivadas en presencia o ausencia de 25ng/mL de citocinas durante 72 horas. Veinte μg de proteína total contenida en los lisados celulares o sobrenadantes de los cultivos fueron separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para incubarse con un anticuerpo anti-CD73 descrito en materiales y métodos. A) Las bandas de proteína detectadas en los lisados celulares por el anticuerpo monoclonal anti-CD73 mostraron un Peso Molecular cercano a 70KDa. B) Se muestran los valores del análisis densitométrico de la proteína CD73 detectada para cada tratamiento. C) Las bandas de proteína de sCD73 detectadas mediante western blot también muestran un peso similar a los 70 KDa. D) Se muestran los valores del análisis densitométrico de la proteína CD73 detectada para cada sobrenadante

11.3 Actividad catalítica de sCD73 producida por las células tumorales CaSki cultivadas en presencia de citocinas

En estudios previos se ha reportado que sCD73 producida por diferentes tipos celulares es capaz de convertir AMP a Adenosina (Zimmermann *et al.*, 2012), por lo que se procedió a evaluar la actividad catalítica de sCD73 producido por las células tumorales tratadas con las diferentes citocinas. Para ello se tomaron 100 μL de cada uno de los sobrenadantes y se incubaron durante 72 horas en presencia de ya sea 2.5 mg/ml de AMP, o de AMP más 2.5mg/mL de Adenosina 5'-(α , β -metilen) difosfato (APCP) (inhibidor específico de CD73). En la Figura 9 se muestran las cromatografías correspondientes a la hidrólisis de AMP. Las

células que no fueron tratadas con citocinas (Fig. 9A), y de manera más notable, aquellas que fueron tratadas con TGF- β (Fig. 9B), generaron Adenosina e Inosina a partir de las 48 horas; mientras que, las células tratadas con EGF (Fig. 9C), IFN- β (Fig. 9D) e IL-10 (Fig. 9E), a partir de las 24 horas generaron Inosina y otro subproducto de la hidrólisis que corresponde a una banda intermedia entre Adenosina e Inosina, sugiriendo que además de sCD73 se induce Adenosina desaminasa y otra enzima participante en la degradación de Inosina. Tomando en consideración que la enzima Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP), localizada en la superficie celular, cataliza la conversión de Inosina a Hipoxantina (Yegutkin, 2014), se procedió a analizar si el subproducto observado correspondía a Hipoxantina. Para ello se utilizó una fase móvil que permite una mejor separación entre los productos de la degradación de Adenosina. En la Figura 10 se observan las cromatografías de capa fina realizadas con los sobrenadantes de las células tratadas con EGF (Fig. 10A), IFN- β (Fig. 10B) e IL-10 (Fig. 10C), incorporando Hipoxantina como testigo. En el sobrenadante de las células tratadas con EGF, IL-10 e IFN- β la generación de Inosina e Hipoxantina se observa a partir de las 24 horas e incrementa conforme el tiempo de incubación, sugiriendo la inducción tanto de ADA como de PNP en las células tratadas con estas citocinas. Tomando de manera conjunta estos resultados, se puede concluir que además de inducir la producción de CD73 o sCD73, las citocinas TGF- β , EGF, IFN- β e IL-10 pueden inducir otras enzimas participantes en la obtención de productos de la degradación de AMP a Adenosina, Inosina e Hipoxantina.

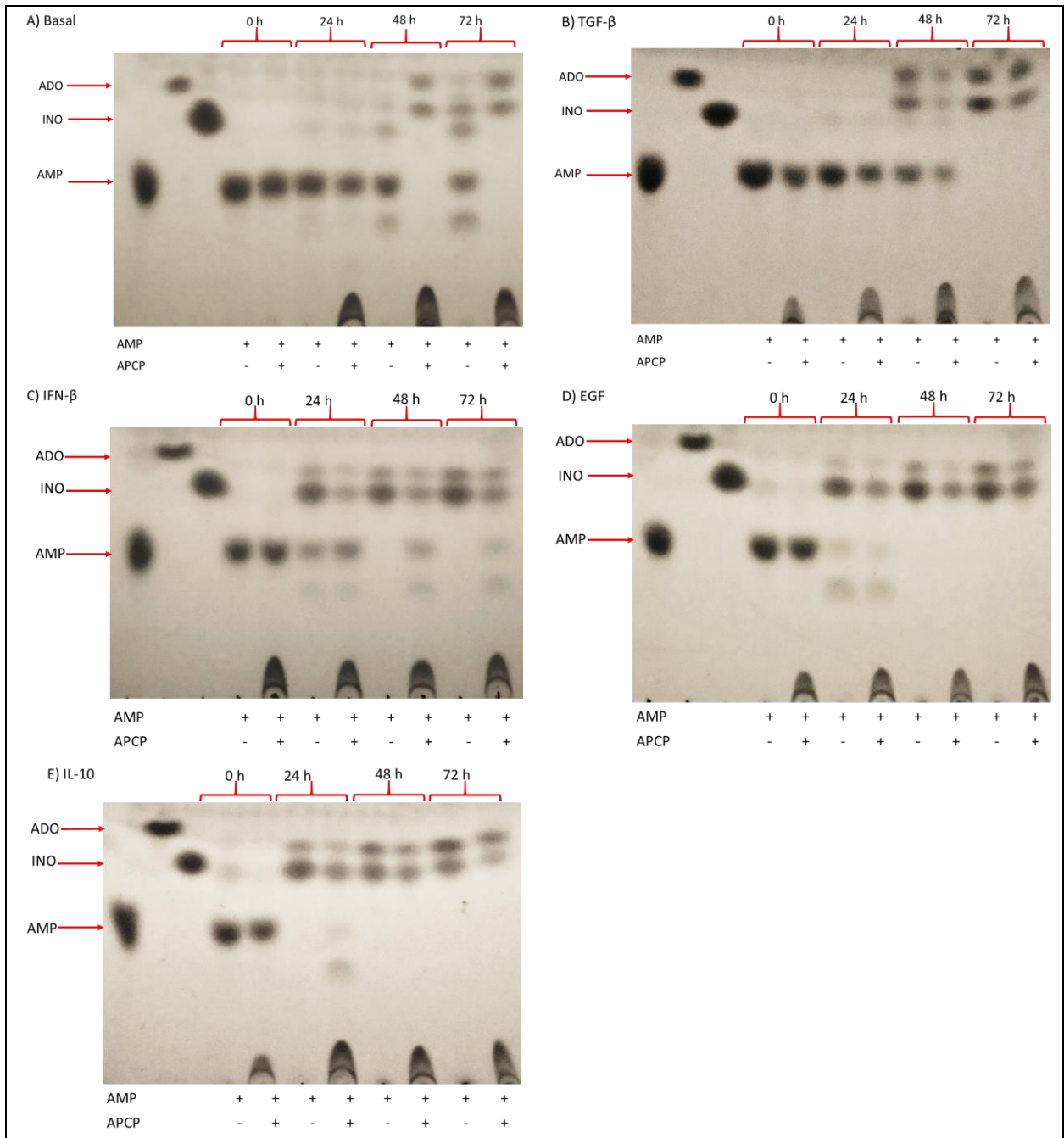


Figura 9. Productos de la hidrólisis de AMP generados por la actividad de los sobrenadantes de las células CaSki tratadas con citocinas. Sobrenadantes de células CaSki cultivadas durante 72 horas en medio de cultivo (A), o en presencia de 25ng/ml de TGF-β (B) de IFN-β (C) de EGF (D) o de IL-10 (E) fueron incubados en presencia de 2.5mg/ml de AMP o de AMP+APCP (inhibidor específico de CD73). La hidrólisis de AMP fue evidenciada mediante cromatografía en capa fina y visualizada con ayuda de un transiluminador en una cámara con luz UV. Se muestran los productos de la hidrólisis de AMP cada 24 horas. ADO, Adenosina; HYPO, Hipoxantina; INO, Inosina.

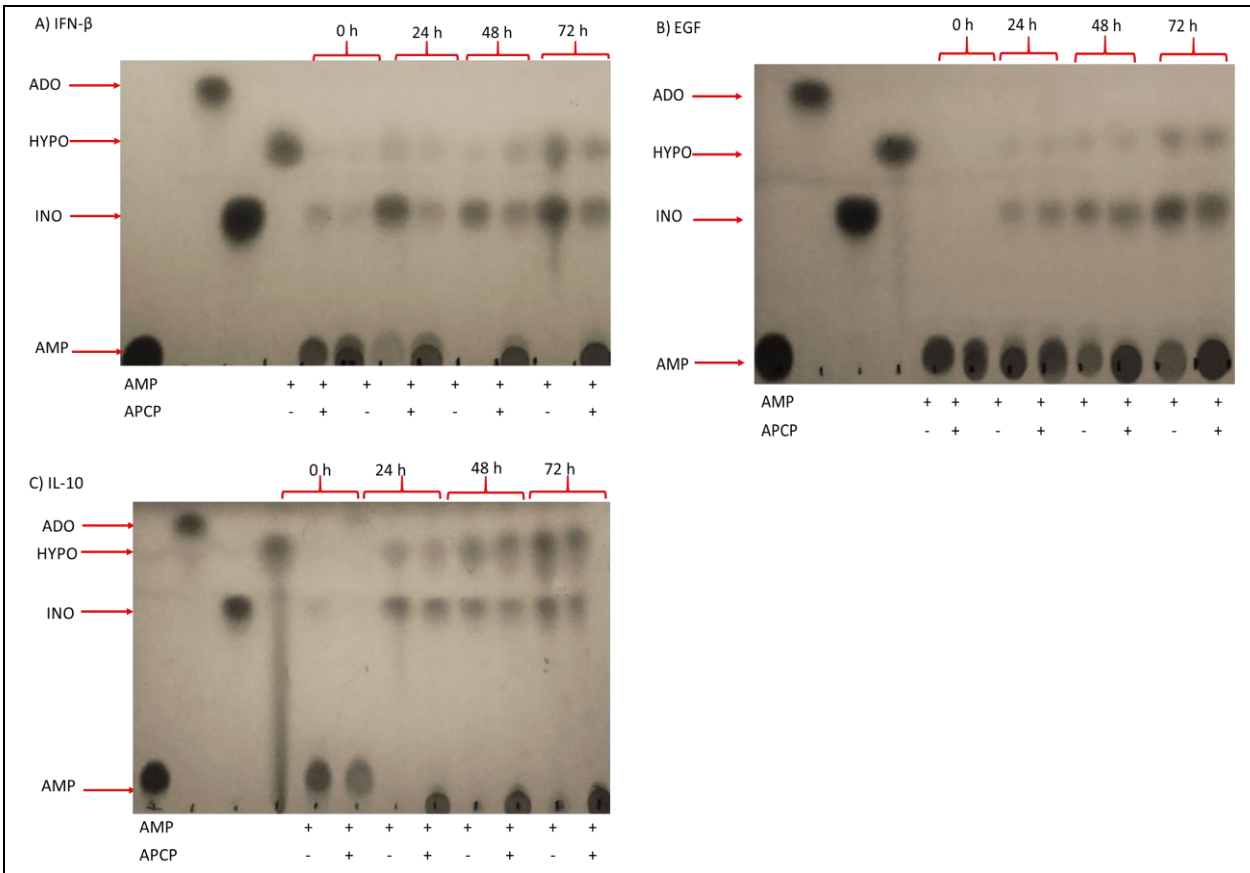


Figura 10. Productos de la hidrólisis de AMP generados por la actividad de los sobrenadantes de las células CaSki tratadas con citocinas. Sobrenadantes de células CaSki cultivadas durante 72 horas en presencia de IFN-β (A) de EGF (B) o de IL-10 (C) fueron incubados en presencia de 2.5mg/mL de AMP o de AMP+APCP (inhibidor específico de CD73). La hidrólisis de AMP fue evidenciada mediante cromatografía en capa fina y visualizada con ayuda de un transiluminador en una cámara con luz UV. Se muestran los productos de la hidrólisis de AMP cada 24 horas. ADO, Adenosina; HYPO, Hipoxantina; INO, Inosina.

Por otra parte, para corroborar que ADA está catalíticamente activa en los sobrenadantes de las células tumorales cultivadas con las citocinas, éstos fueron incubados durante 72 horas en presencia o ausencia de 1 mM de ENHA (inhibidor específico para ADA). En la Figura 11 se observa que cuando ADA se encuentra activa se obtienen los productos de la degradación de Adenosina como Inosina e Hipoxantina, sin embargo cuando ADA fue inhibida, se observó mayor generación de Adenosina a partir de las 24, la cual incrementó conforme el tiempo de incubación. Estos resultados sugieren que además de la inducción de sCD73 con las citocinas, también se induce la liberación de sADA en los sobrenadantes de las células tratadas con las citocinas.

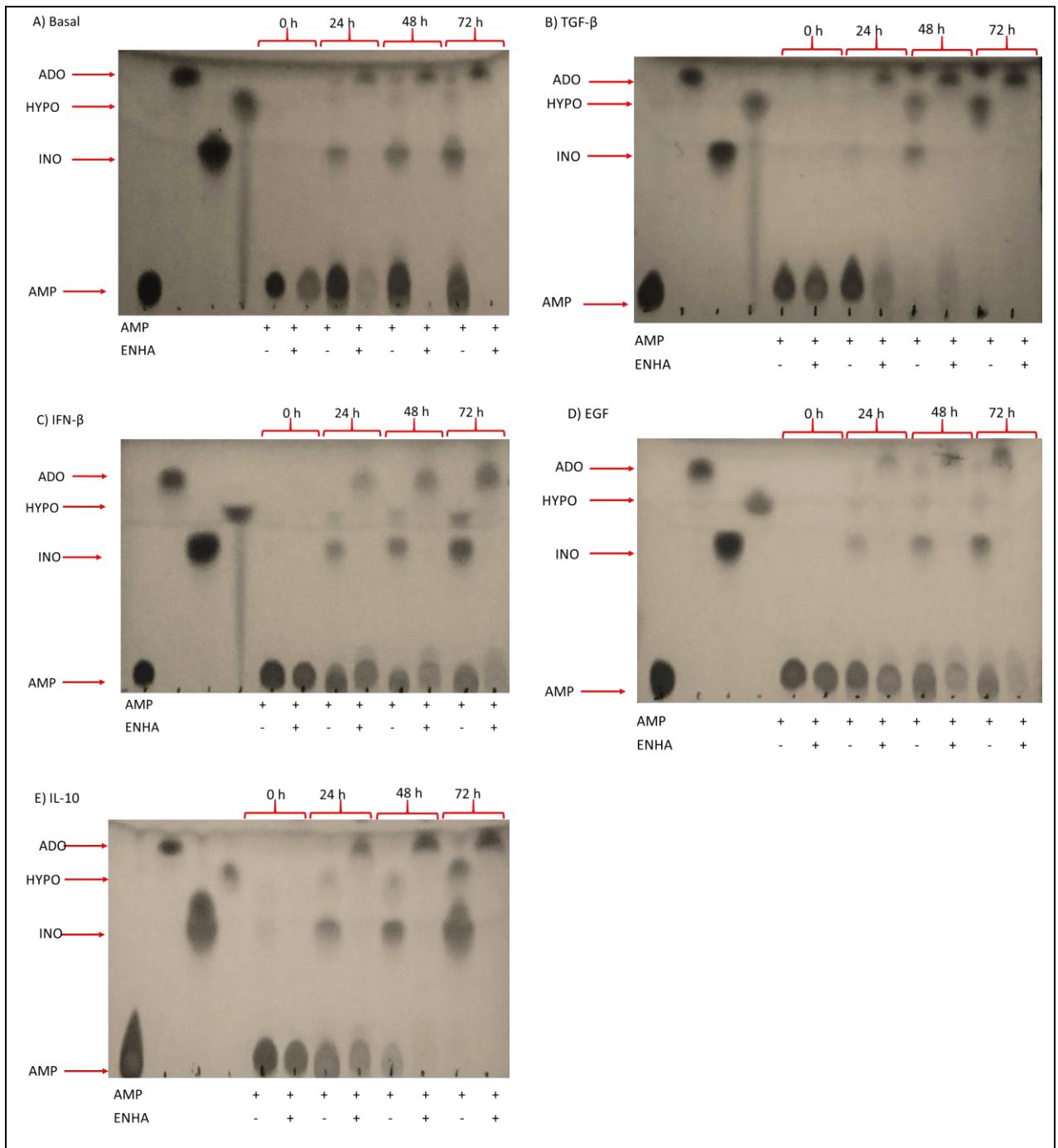
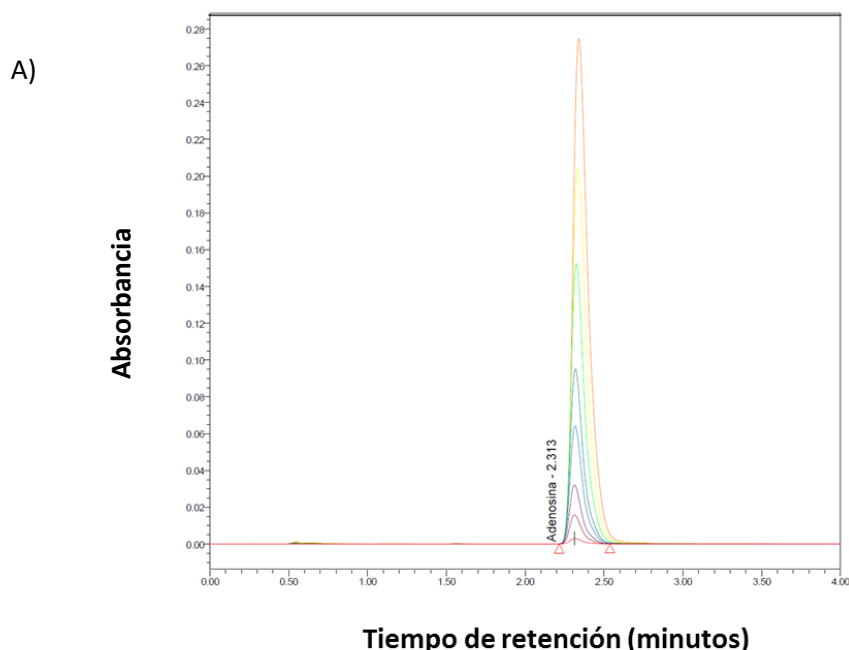


Figura 11. Actividad catalítica de sADA contenida en sobrenadantes de CaSki. Sobrenadantes de células CaSki cultivadas durante 72 horas en medio de cultivo (A), o en presencia de 25ng/ml de TGF-β (B), IFN-β (C), EGF (D), o de IL-10 (E), fueron incubados en presencia de 2.5mg/ml de AMP y en presencia o ausencia de ENHA (inhibidor específico de ADA). La hidrólisis de AMP fue visualizada a través de cromatografía en capa fina y revelada con ayuda de un transiluminador en una cámara con luz UV.

Por otro lado, para cuantificar la Adenosina generada por la actividad hidrolítica de sCD73 contenida en los sobrenadantes de las células tumorales sujetas a los diferentes tratamientos, se tomaron muestras de cada sobrenadante y se incubaron durante 72 horas en presencia de AMP y APCP. El contenido de Adenosina se determinó cada 24 horas mediante UPLC (cromatografía líquida de ultra resolución) con ayuda de una curva patrón de adenosina pura (Figura 12A y 12B)

De manera interesante, los sobrenadantes de las células tratadas con TGF- β mostraron mayor capacidad hidrolítica para convertir AMP a Adenosina respecto al obtenido por células CaSki sin tratamiento. Después de 72 horas de incubación los sobrenadantes de CaSki tratadas con TGF- β produjeron 1207 ng/mL de Adenosina y en los sobrenadantes de las células CaSki sin tratamiento sólo se detectó una producción de 186 ng/mL de Adenosina. La adición de APCP redujo notablemente la generación de adenosina a 109 y 24 ng/mL respectivamente (Figura 12C). Es importante mencionar, que acorde con las cromatografías de capa fina, mediante el análisis de cromatografía de UPLC no se encontraron cantidades detectables de adenosina en los sobrenadantes de las células tratadas con EGF, IFN- β e IL-10 e incubados durante 72 horas con AMP. Lo cual refuerza la hipótesis de que estas citocinas incrementan la expresión de ADA y PNP.



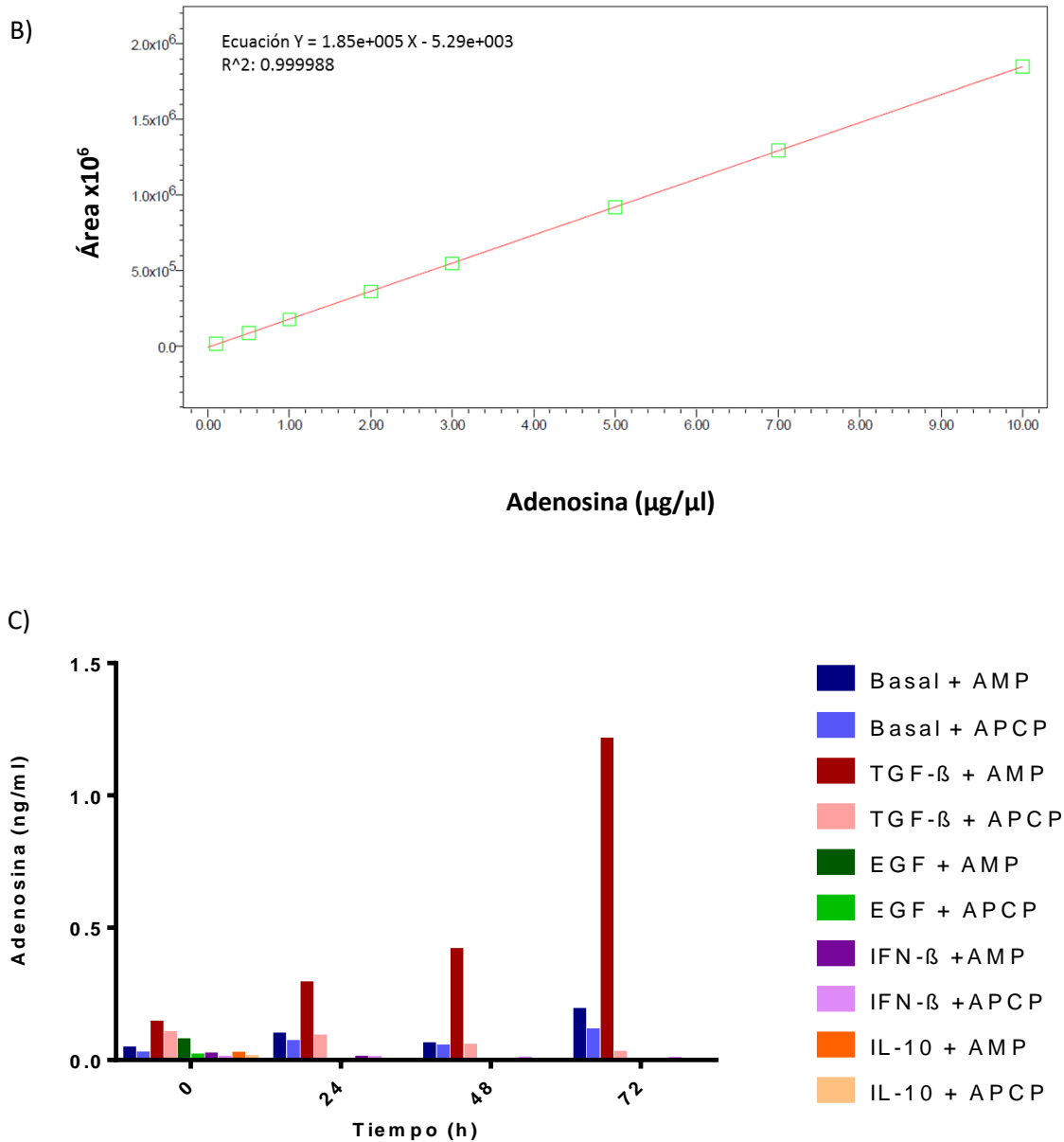


Figura 12. Análisis cuantitativo de la producción de adenosina en sobrenadantes de células CaSki. A) Cromatograma representativo de una curva patrón de adenosina sintética obtenida a partir de diluciones seriadas a partir de una solución base de $1\mu\text{g}/\text{mL}$. B) Curva tipo que representa las concentraciones de adenosina en relación con el área bajo la curva de cada histograma, se muestra una correlación de 0.999%. C) Cantidad de adenosina producida por sobrenadantes obtenidos de células CaSki cultivadas durante 72 horas con medio de cultivo o en presencia de $25\text{ng}/\text{mL}$ de TGF- β , EGF, IFN- β o IL-10 y posteriormente cultivadas en presencia de $2.5\text{mg}/\text{mL}$ de AMP y en presencia o ausencia de $2.5\text{mg}/\text{mL}$ APCP. Ensayo representativo de 3 realizados de forma independiente.

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La hidrólisis de nucleótidos extracelulares es regulada por varias familias de ecto nucleotidasas entre las que se incluyen: la familia ENTPDasa, las ecto-nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa (E-NPP) las NAD glicohidrolasas, fosfatasas alcalinas y adenilato cinasas, CD39 y CD73, cuya actividad hidrolítica conduce a la generación de Adenosina, un nucleósido conocido por su actividad supresora de la respuesta inmune (Allard *et al.*, 2017). Se ha reportado que dentro del microambiente tumoral hay factores que inducen incremento en la expresión de CD73, como es el caso de TGF- β e IL-10, IFNs, EGF, entre otros. En el caso particular de CaCU se ha reportado que los niveles de TGF- β e IL-10 incrementan conforme la enfermedad progresa (Danilidis *et al.*, 2016), y que TGF- β puede modular la expresión de IL-10 (Torres-Poveda *et al.*, 2014; García-Rocha *et al.*, 2015). Asimismo, EGF se asocia con bajo pronóstico de sobrevivencia en las pacientes de CaCU (Schrevel *et al.*, 2011), mientras que los niveles de IFN en la progresión de CaCU permanecen bajos (Barros *et al.*, 2018). Nuestro grupo de trabajo recientemente ha publicado que células tumorales de CaCU generan altas concentraciones de Adenosina mediante la actividad funcional de CD73 expresada en la membrana celular (Mora-García *et al.*, 2017), y que también las células tumorales producen sCD73 con capacidad hidrolítica para generar Adenosina a partir de AMP (Molina-Castillo, 2016). Sin embargo, se desconoce si citocinas como TGF- β , IL-10, IFN- β y EGF tienen algún efecto en la secreción de sCD73 sobre células tumorales de CaCU. En este estudio se encontró que TGF- β y EGF incrementaron notablemente la expresión de CD73 en membrana de las células tumorales comparada con la expresión basal de dicha ecto-nucleotidasa; mientras que EGF e IL-10 indujeron mayor liberación de sCD73 comparada con la producida en condiciones basales. Asimismo, al analizar los productos de la hidrólisis de AMP con los sobrenadantes obtenidos de las células CaSki cultivadas con las diferentes citocinas, se observó que las células cultivadas con TGF- β produjeron esencialmente Adenosina e Inosina; mientras que los derivados de las células cultivadas en presencia de IL-10, IFN- β y EGF produjeron Inosina e Hipoxantina como productos finales de la hidrólisis. Lo cual sugiere que estas citocinas

inducen de manera diferencial la producción de las enzimas CD73, ADA y PNP de manera soluble. Por tanto, la presencia de estas enzimas en el microambiente puede estar condicionada por las concentraciones existentes de estas citocinas. Por ejemplo en el desarrollo de CaCU existe predominancia de la producción de TGF- β e IL-10 en el microambiente tumoral durante la evolución del crecimiento tumoral (Barros *et al.*, 2018), por lo que CD73 y ADA pueden predominar en estados avanzados de la enfermedad. Por otra parte, estas citocinas no solo pueden inducir la expresión de CD73 en las células tumorales, sino también en varios tipos celulares encontrados en el microambiente tumoral. Por ejemplo, en células endoteliales se demostró que los IFNs de tipo I incrementaron la expresión de CD73 de manera dosis dependiente (Airas *et al.*, 2007); también se reportó que TGF- β incrementó la expresión de CD73 en membrana en cáncer de próstata (Leclerc *et al.*, 2015) y en células T reguladoras (Regateiro *et al.*, 2011).

Por otra parte, es importante mencionar que en el análisis de Western blot de los sobrenadantes de las células tumorales tratadas con citocinas, al revelar la presencia de sCD73 con el anticuerpo utilizado, se observaron dos bandas: una con peso molecular de aproximadamente 70 KDa, y otra banda con un peso ligeramente menor (aproximadamente 60 KDa). La banda de menor peso se encontró en mayor proporción en los sobrenadantes de las células que fueron cultivadas en ausencia de citocinas y en aquellas tratadas con TGF- β , IL-10. En este contexto, la presencia de ambas isoformas fue reportada por Vogel en 1992 en corteza cerebral de bovino, y más tarde por Navarro y colaboradores en 1998 en células de cáncer de colon. En ambos trabajos se refiere que la isoforma de menor peso molecular corresponde a una isoforma menos glicosilada de CD73 con menor actividad catalítica que la de mayor peso molecular. En nuestro estudio, observamos que los sobrenadantes de las células tratadas con las diferentes citocinas mostraron tener en conjunto mayor actividad catalítica sobre AMP que el obtenido de las células cultivadas en ausencia de citocinas. De hecho, los sobrenadantes de las células tratadas con EGF, IFN- β e IL-10 generaron a partir de las primeras 24 horas Inosina e Hipoxantina y no fue detectada la presencia de Adenosina, lo cual indicaría que la Adenosina que es generada por sCD73 es inmediatamente catalizada a estos productos, sin embargo la adición de APCP (inhibidor

específico de CD73) a estos sobrenadantes, no fue capaz de detener la conversión de AMP a Adenosina, sugiriendo que además de sCD73, otras enzimas que catalizan la hidrólisis de AMP a Adenosina, tal como fosfatasa alcalina (Yegutkin, 2014) pudieran ser inducidas por estas citocinas, lo cual será importante de averiguar en estudios posteriores. En contraste, en los sobrenadantes de las células tratadas con TGF- β , la conversión de AMP a Adenosina fue inhibida al agregar APCP, sugiriendo este factor induce preferentemente la producción de sCD73.

La actividad catalítica de sCD73 recientemente ha sido estudiada en sueros de pacientes, por ejemplo, Airas en 2007, Huang en 2015 y Morello en 2017, evaluaron los contenidos y actividad de sCD73 en pacientes con esclerosis múltiple y pacientes con diferentes tipos de cáncer, encontrando que altas concentraciones de esta nucleotidasa se asociaron con poca sobrevivencia. Resulta muy interesante observar que las dos citocinas que se encuentran sobreexpresadas en CaCU (TGF- β e IL-10) presentan actividades diferentes, ya que mientras TGF- β favorece la producción de sCD73, que contribuye a la producción de Adenosina; IL-10 parece inducir la producción de otras enzimas que conducen a la degradación de Adenosina, lo cual indicaría que dentro del tumor ambas citocinas desempeñan papeles diferentes. De hecho, se ha reportado que los niveles altos de Adenosina pueden ser dañinos para los tejidos y órganos de un individuo, por lo que en estados patológicos surgen mecanismos para contrarrestar la producción excesiva de Adenosina y evitar la toxicidad a los tejidos (Antonioli, 2012). En este trabajo detectamos que la inducción de ADA y muy probablemente PNP, puedan actuar para tal efecto, ya que los sobrenadantes de las células tratadas con EGF, IFN- β e IL-10 produjeron Inosina e Hipoxantina como productos de la hidrólisis de AMP, los cuales fueron revertidos en gran parte al adicionar EHNA, inhibidor específico de la enzima ADA. La actividad catalítica de ADA se ha visto incrementada en sueros de pacientes con varios tipos de cáncer (Vannoni *et al.*, 2004). En el carcinoma oral de células escamosas se encontró que la actividad de ADA incrementa conforme el grado histopatológico de la enfermedad siendo los estadios más avanzados de la enfermedad los que presentan la mayor expresión y actividad catalítica de ADA (Kelgrande *et al.*, 2014). De igual forma se ha reportado un incremento en la actividad catalítica de PNP en sueros de

pacientes con cáncer (Russo *et al.*, 1981). Recientemente el grupo de Peña-Altamira reportó una forma soluble de PNP derivada de la membrana de astrocitos y microglia, la cual es liberada mediante vesículas manteniendo su actividad catalítica, notando que altas concentraciones de ATP pueden estar influenciando la liberación de esta forma soluble. Resultados similares fueron obtenidos por Giuliani en 2017.

Los resultados de este trabajo nos permiten sugerir que citocinas como EGF, IFN- β e IL-10 pueden modular la producción de varias enzimas de manera soluble entre ellas: sCD73, fosfatasa alcalina, ADA y PNP entre otras, por lo que será importante conocer, además de la inducción, el papel que guardan estas enzimas dentro del microambiente tumoral de CaCU y a nivel periférico en sueros de pacientes con CaCU, con la finalidad de dirigir estrategias terapéuticas que regulen su función.

13. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que citocinas como el TGF- β , y EGF inducen un aumento en la expresión de CD73 en membrana de células CaSki, y que estas citocinas junto con IL-10 incrementan la liberación de CD73 y por tanto su capacidad para generar Adenosina comparada con la actividad basal de sCD73. Lo anterior sugiere que la liberación de CD73 contribuye a la formación de un microambiente tumoral inmunosupresor.

14. PERSPECTIVAS.

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo y con los obtenidos en el presente trabajo, la producción de sCD73 en la línea celular CaSki puede ser regulada por diversas citocinas, por lo que se recomienda:

- Evaluar el papel de estas citocinas en otras líneas celulares de CaCU.
- Analizar el papel de los exosomas y de las formas solubles liberadas por medio de la fosfolipasa C
- Analizar las dos formas solubles de CD73 que se liberan en el sobrenadante sin tratamiento.
- Analizar la regulación de otras enzimas que participan en el catabolismo de nucleótidos en células tumorales de CaCU, tales como fosfatasas alcalinas, ADA y PNP tanto en la membrana celular como su producción de manera soluble.
- Determinar los niveles de fosfatasas alcalinas, ADA y PNP en sueros de pacientes con CaCU

15. REFERENCIAS.

- Airas L, Niemelä J, Yegutkin G & Jalkanen S. Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis: A Special Reference to CD73 and Adenosine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1110: 641-648. 2007
- Albini A, Noonan D. M & Ferrari N. Molecular pathways for cancer angioprevention. *Clinical Cancer Research*. 13:4320-4325. 2007
- Allard B, Turcotte M & Stagg J. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 18:863-881. 2014
- Allard D, Allard B, Gaudreau P.O., Chrobak P & Stagg J. CD73-adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. *Immunotherapy*. 8:145-163. 2016
- Allard B, Beavis P. A, Darcy P. K & Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*. 29: 7-16. 2016
- Allard B, Longhi M. S, Robson S. C & Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*. 276:121-144. 2017
- Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F, Blandizzi C & Fornai M. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Current Drug Targets*. 13:842-862. 2012
- Antonioli L, Pacher P, Vizi E. S & Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 19:355-367.2013
- Antonioli L, Haskó G, Fornai M, Colucci R & Blandizzi C. Adenosine pathway and cancer: where do we go from here? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 18:973-977. 2014
- Antonioli L, Yegutkin G. G., Pacher P, Blandizzi C & Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in Cancer*. 2:95-109. 2016.
- Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K., Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B & García-Carrancá A. Cervical microbiome and

cytokine profile at various stages of cervical cancer: a pilot study. *PloS one*. 11: e0153-274. 2016

- Barros M. R, de Melo C. M. L, Rego M. L. C. M. G, de Lima R. D. C. P, de Freitas A. C. & Venuti A. Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 37:137. 2018
- Barros M. R, de Oliveira T. H. A, de Melo C. M. L, Venuti A & de Freitas A. C. Viral Modulation of TLRs and Cytokines and the Related Immunotherapies for HPV-Associated Cancers. *Journal of Immunology Research*. (2018) 2018.
- Beavis P. A, Stagg J, Darcy P. K & Smyth M. J. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*. 33:231-237. 2012
- Berti F. C. B., Pereira A. P. L., Cebinelli G. C. M., Trugilo K. P & de Oliveira K. B. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 34:1-13.2017
- Bianchi V & Sychala J. Mammalian 5'-nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 46195-46198. 2003
- Borowieck A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K & Skladanowski A. C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica-english edition*. 53:269-278.2006
- Chopra V, Dinh T. V & Hannigan E. V. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Investigation*. 16:152-159. 1998
- Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason M. D & Tabi Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *The Journal of Immunology*. 187: 676–683. 2011
- Cordero O. J, Salgado F. J, Fernández-Alonso C. M, Herrera C, Lluís C, Franco R & Nogueira M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 70:920-930. 2001

- Cortés A, Gracia E, Moreno E, Mallol J, Lluís C, Canela E. I & Casadó V. Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Medicinal Research Reviews*. 35: 85-125. 2015
- Cortes-Escamilla CE. Efecto de TGF-Beta sobre la expresión de la ectoenzima 5'-nucleotidasa (CD73) en la capacidad migratoria de células tumorales de cáncer cérvicouterino. Tesis de licenciatura. UNAM. México, CDMX. 2016
- Daniilidis A, Koutsos J, Oikonomou Z, Nasioutziki M, Hatziparadisi K & Tantanasis T. Cytokines of cervical mucosa and human papilloma virus infection of the cervix: a descriptive study. *Acta Cytologica*. 60: 58-64. 2016
- Di Virgilio F & Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 36:293-303. 2017
- Feng B & Chen L. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 24:717-721. 2009
- Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela E. I & Lluís C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology*. 5: 283-294. 1997
- Frumovitz M. Small-and large-cell neuroendocrine cervical cancer. *Oncology*. 30: 70-78. 2016
- Gao Z. W, Dong K & Zhang H. Z. The Roles of CD73 in Cancer. *BioMed Research International*. (2014) p. 460654. 2014
- García-Rocha R, Moreno-Lafont M, Mora-García M. L, Weiss-Steider B, Montesinos J. J, Piña-Sánchez P & Monroy-García A. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF- β 1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity. *Cytokine*. 76: 382-390. 2015
- Giuliani P, Ballerini P, Ciccarelli R, Buccella S, Romano S, D'Alimonte I, Poli A, Beraudi A, Peña E, Jiang S, Rathbone M. P, Caciagli F & Di Iorio P. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. 26: 51-65. 2012

- Giuliani P, Zuccarini M, Buccella S, Peña-Altamira L. E, Polazzi E, Virgili M, & Ciccarelli R. Evidence for purine nucleoside phosphorylase (PNP) release from rat C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry*. 141: 208-221. 2017
- Globocan. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Consultado el 12 de agosto de 2017.
- Huang Q, Durham N. M, Sult E, Wu Y, Liu J & Sachsenmeier K. Abstract 1538: Levels and enzyme activity of CD73 in primary samples from cancer patients. *Cancer Research*. 75:1538–1538. 2015
- INEGI 2018. Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en: www.inegi.gob.mx
- Kelgandre D. C, Pathak J, Patel S, Ingale P & Swain N. Adenosine deaminase-a novel diagnostic and prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 17:1865-1868. 2016
- Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signalling*. 9: 145-165. 2013
- Klemens M. R., Sherman W. R., Holmberg N. J., Ruedi J. M., Low M. G & Thompson L. F. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 172: 1371-1377. 1990
- Lee S. J, Yang A, Wu T. C & Hung C. F. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of Gynecologic Oncology*. 27:1-17. 2016
- Leclerc B. G, Charlebois R, Chouinard G, Allard B, Pommey S, Saad F & Stagg J. CD73 expression is an independent prognostic factor in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 22:158-168. 2015
- Maeda K, Morita K, Shibata T, Naito Y & Mizuno A. Simultaneous assay of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activity as possible biochemical means to detect non-hodgkin lymphomas of the oral cavity. *Cancer*. 70:20-27. 1992
- Mandapathil M, Szczepanski M, Harasymczuk M, Ren J, Cheng D, Jackson E. K, Gorelik E, Johnson J. T, Lang S & Whiteside T. L. CD26 expression and adenosine

- deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4+ T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *OncolImmunology*. 1:659-669.2012
- Molina-Castillo G. Determinación de la actividad funcional de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 soluble (sCD39 y sCD73) en líneas de cáncer cérvico uterino. Tesis de licenciatura. UNAM. México, CDMX. 2016.
 - Montes L, Andrade C. M, Michelin M. A & Murta E. F. The importance of alpha/beta (alpha/13) interferon receptors and signaling pathways for the treatment of cervical intraepithelial neoplasias. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 35:368–372. 2014
 - Moody C. A & Laimins L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*. 10: 550-560. 2010
 - Morello S, Capone M, Sorrentino C, Giannarelli D, Madonna G, Mallardo D, Grimaldi A. M, Pinto A & Ascierto P. A. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *Journal of Translational Medicine*. 15: 244. 2017
 - Mora-García M. L, Ávila-Ibarra L. R, García-Rocha R, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Don-López C. A, Gutiérrez-Serrano V, Titla Vilchis I. J, Fuentes-Castañeda M. C, Monroy-Mora A, Jave-Suárez L. F, Chacon-Salinas R, Vallejo-Castillo L, Pérez-Tapia S. M & Monroy-García A. Cervical cáncer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular Immunology*. 320: 46-55. 2017
 - Morales-Sánchez A & Fuentes-Pananá E. M. Human Viruses and Cancer. *Viruses*. 6: 4047-4079. 2014
 - Niemelä J, Ifergan I, Yegutkin G. G, Jalkanen S, Prat A & Airas L. IFN- β regulates CD73 and adenosine expression at the blood–brain barrier. *European Journal of Immunology*. 38:2718-2726. 2008
 - Navarro J. M, Olmo N, Turnay J, López-Conejo M. T & Lizarbe M. A. Ecto-5'-nucleotidase from a human colon adenocarcinoma cell line. Correlation between

enzyme activity and levels in intact cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 187: 121-131. 1998

- Ohta A. A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 7:109. 2016
- Paradkar P. H, Joshi J. V, Mertia P. N, Agashe S. V & Vaidya R. A. Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*. 15: 3851-3864. 2014
- Papageorgis P & Stylianopoulos T. Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery. *International Journal of Oncology*. 46: 933-943. 2015.
- Peña-Altamira L. E, Polazzi E, Giuliani P, Beraudi A, Massenzio F, Mengoni I, Poli A, Zuccarini M, Cicarelli R, Di Iorio P, Virgili M, Monti B & Caciagli F. Release of soluble and vesicular purine nucleoside phosphorylase from rat astrocytes and microglia induced by pro-inflammatory stimulation with extracellular ATP via P2X7 receptors. *Neurochemistry International*. 115: 37-49. 2018
- Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán J. L, Usheva A, Bingham T & Gelinas L. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5' NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *Journal of Biological Chemistry*. 38: 27315–27326. 2013.
- Piersma S J. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cáncer Microenvironment*. 4: 361-375. 2011
- Pinsky D. J, Broekman M. J, Peschon J. J, Stocking K. L, Fujita T & Ramasamy R. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *Journal of Clinical Investigation*. 109:1031–1040. 2002.
- Regateiro F. S, Howie D, Nolan K. F, Agorogiannis E. I, Greaves D. R, Cobbold S. P & Waldmann H. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *European Journal of Immunology*. 41:2955–2965. 2011

- Regateiro F. S, Cobbold S. P & Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clinical & Experimental Immunology*. 171: 1-7. 2013
- Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Huls S, Burghoff S & Schrader J. Extracellular purinemetabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 301: 530–539. 2011
- Ruddon R W. *Cáncer Biology*, 4th Ed (N.Y) Oxford University Press. pp 402-427. 2007
- Russo M, Giancane R, Apice G & Galanti B. Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activities in peripheral lymphocytes from patients with solid tumours. *British Journal of Cancer*. 43:196-200. 1981
- Sasagawa T, Takagi H & Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 18: 807-815. 2012
- Schrevel M, Gorter A, Kolkman-Uljee S. M, Trimbos J. B. M, Fleuren G. J & Jordanova E. S. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer. *Modern Pathology*. 24: 720-728. 2011
- Schwab M. (eds). Adenosine. In: *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2016
- Smyth L. A, Ratnasothy K, Tsang J, Boardman D, Warley A, Lechler R & Lombardi G. CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *European Journal of Immunology*. 43: 2430-2440. 2013
- Spurgeon M. E & Lambert P. F. Human Papillomavirus and the Stroma: Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle and Carcinogenesis. *Viruses*. 9: 219. 2017
- Stagg J & Smyth M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 29: 5346-5358. 2010
- Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer K. M & Smyth M. J. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:1547-1552. 2010.

- Stone S. C, Rossetti R. A. M, Lima A. M & Lepique A. P. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2: 63-75. 2014
- Torre L. A, Bray F, Siegel R. L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J & Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 65: 87-108. 2015
- Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García A. I, Bermúdez-Morales V. H, Peralta-Zaragoza O & Madrid-Marina V. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World Journal of Clinical Oncology*. 5:753-763. 2014
- Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, Rahimi K & Stagg J. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Research*. 75: 4494-4503 2015
- Vannoni D, Bernini A, Carlucci F, Civitelli S, Di Pietro M. C, Leoncini R, Rosi F, Tabucchi A, Tanzini G & Marinello E. Enzyme activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues. *Medical Oncology*. 21:187-195. 2004
- Vijayan D, Young A, Teng M. W & Smyth M. J. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 17:709-724. 2017
- Vinay D. S, Ryan E. P, Pawelec G, Talib W. H, Stagg J, Elkord E & Signori E. Immune evasion in cancer: Mechanistic Basis and Therapeutic Strategies. In *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. 35:S185-S198. 2015
- Vogel M, Kowalewski H, Zimmermann H, Hooper N. M & Turner A. J. Soluble low-Km 5'-nucleotidase from electric-ray (*Torpedo marmorata*) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage. *Biochemical Journal*. 284:621-624. 1992
- Walboomers J. M, Jacobs M. V, Manos M. M, Bosch F. X, Kummer J. A, Shah K. V & Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*. 189: 12-19. 1999
- Wang Y, Liu X. H, Li Y H & Li O. The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. *Biomedical Reports*. 1: 347-351. 2013

- Woodby B, Scott M & Bodily J. The interaction between human papillomaviruses and the stromal microenvironment. In Progress in Molecular Biology and Translational Science. Academic Press. 14:169-238. 2016
- Wrzesinski S. H, Wan Y. Y & Flavell R. A. Transforming growth factor- beta and the immune response: implications for anticancer therapy. Clinical Cancer Research. 13:5262–5270. 2007
- Wu X. M, Liu X, Jiao Q. F, Fu S. Y, Bu Y. Q, Song F. Z & Yi F. P. Cytotoxic T Lymphocytes elicited by dendritic cell-targeted delivery of human papillomavirus Type-16 E6/E7 fusion gene exert lethal effects on CaSki cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 15: 2447-2451. 2014
- Yegutkin G, Bodin P & Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. British Journal of Pharmacology. 129: 921-926. 2000
- Yegutkin G, Samburski S. S & Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 17: 1328-1330. 2003
- Yegutkin G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimica et Biophysica ACTA (BBA)-Molecular Cell Research. 1783:673-694.2008
- Yegutkin G, Wieringa B, Robson S. C & Jalkanen S. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 26:3875-3883. 2012
- Yegutkin G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 49: 473-497. 2014
- Zimmermann H, Zebisch M & Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signalling. 8: 437-502. 2012

- Zhao H, Bo C, Kang Y & Li H. What Else Can CD39 Tell Us? *Frontiers in Immunology*. 8:727. 2017 doi: 10.3389/fimmu.2017.00727
- Zhi X, Wang Y, Yu J, Zhang L, Yin L & Zhou P. Potential prognostic biomarker CD73 regulates epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology life*. 64: 911-920. 2012
- Zhu H, Luo H, Shen Z, Hu X, Sun L & Zhu X. Transforming growth factor- β 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer. *Tumor Biology*. 37: 7075-7083. 2016
- Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virology*. 392: 1-10. 2009