



SOCIEDAD MEXICANA DE ONCOLOGÍA, A.C.

GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

www.gamo-smeo.com



ARTÍCULO ORIGINAL

Regulación de hemoxygenasa e indoleamina por citocinas en células de cáncer cervicouterino y actividad citotóxica de células *natural killer*

Pablo C. Ortiz-Lazareno¹, Paulina Gómez-Lomeli¹, Georgina Hernández-Flores¹,
Cristina Rodríguez-Padilla², Francisco Javier Ochoa-Carrillo³ y Alejandro Bravo-Cuellar^{1,4,*}

¹División de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jal.; ²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L.; ³Cirujano oncólogo, Instituto Nacional de Cancerología de México, Ciudad de México; ⁴Departamento de Ciencias de la Salud, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Tepatitlán de Morelos, Jal. México

Recibido el 23 de junio de 2017; aceptado el 9 de septiembre de 2017
Disponibile en Internet el 19 de diciembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Indoleamina;
Histidina
decarboxilasa;
Cáncer cervicouterino;
Citocinas;
Células NK

KEY WORDS

Indoleamine;
Histidine
decarboxylase;

Resumen Objetivo: Determinar el efecto de las citocinas interleucinas (IL)4 y 10, interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en la expresión proteica de las enzimas hemoxygenasa 1 (HO-1) e indoleamina (IDO) en líneas de cáncer cervicouterino, y la actividad citotóxica de células *natural killer* (NK) en células tumorales pretratadas con inhibidores de HO-1 e IDO. **Material y métodos:** Las líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa (VPH 18+), SiHa (VPH 16+) y C-33A (VPH-) se trataron con 20 ng/ml de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α durante 3, 6 y 12 h, y posteriormente se evaluó la expresión proteica por citometría de flujo. La actividad citotóxica de las células NK se realizó en tiempo real durante 4 h. **Resultados:** Se observaron cambios en la expresión proteica de HO-1 e IDO a tiempos cortos de tratamiento, incrementando, de manera general, la expresión de las enzimas en las tres líneas celulares. De manera importante se incrementa la actividad citotóxica de las células NK en células HeLa pretratadas con el inhibidor de HO-1 y en SiHa pretratadas con el inhibidor de IDO. **Conclusiones:** IDO es una enzima supresora regulada positivamente por IL-10 en HeLa y SiHa. La citotoxicidad mediada por células NK se incrementa en células HeLa y SiHa pretratadas con los inhibidores de HO-1 e IDO, respectivamente, por lo cual estas enzimas podrían formar parte de los mecanismos de escape tumoral en cáncer cervicouterino. (creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Abstract Objective: To determine the effect of the cytokines interleukin (IL-4), IL-10, Interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF- α) in protein expression of HO-1 and IDO in cervical cancer cell lines and the cytotoxicity of NK cells in co-culture with cervix cancer cells pretreated with HO-1 and IDO inhibitors. **Methods:** The cervical cancer cell lines HeLa (HPV 18+), SiHa (HPV 16+) and C-33A (HPV -) were treated with 20 ng/mL of IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF- α for 3 h, 6 h and 12 h, after that protein expression was assessed by flow cytometry. The

*E-mail para correspondencia: abravocster@gmail.com (A. Bravo-Cuellar)

doi: 10.24875/j.gamo.M17000084

1665-9201 / © 2017 Sociedad Mexicana de Oncología. Publicado por Permanyer México. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cervix cancer;
Cytokines;
NK cells

cytotoxic activity of NK cells was performed in real time for 4 h. **Results:** Protein expression of the enzymes were changed at early times, increasing the expression of the enzymes in the 3 cell lines. We observed an increase in cytotoxic activity of NK cells cocultured with HeLa cells pretreated with the HO-1 inhibitor and in SiHa cells pretreated with the IDO inhibitor. **Conclusion:** The suppressor enzyme IDO is positively regulated by IL-10 in HeLa, SiHa, and NK cytotoxic activity increase in HeLa and SiHa cells pretreated with HO-1 and IDO inhibitors respectively, which could be part of tumor escape mechanisms in cervix cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres de los países en desarrollo^{1,2}. El principal factor de riesgo para desarrollar este cáncer es la infección por el virus del papiloma humano (VPH)^{3,4}. Aunque la infección por VPH no induce una respuesta inflamatoria aguda, se ha observado en pacientes con lesiones de alto y bajo grado así como con cáncer cervicouterino, un incremento de citocinas como TNF- α e IL-1⁵.

Una respuesta T helper 1 (TH1) podría ser importante en la eliminación del virus, ya que acentúa la respuesta celular mediante la producción de IL-2 e IFN- γ . La respuesta Th2 incrementa la inmunidad humoral y, en consecuencia, se libera IL-4 e IL-10⁶. Sin embargo, una respuesta Th2 puede producir un control inadecuado del proceso infeccioso del VPH, debido a que se ha encontrado una disminución en la expresión de IL-2 y un incremento de IL-4 en lesiones de alto grado⁷, además de sobreexpresión de IL-10 en lesiones de alto grado comparadas con las lesiones de bajo grado y tejido cervical normal^{8,9}.

En lesiones asociadas al VPH se encontró que, tanto las células dendríticas como las células mieloides del estroma, expresan la enzima IDO, conocida por su papel en la inducción de células T supresoras, lo cual pudiera contribuir a la inmunosupresión de las células del sistema inmune localizadas en el microambiente tumoral, como las células NK¹⁰, y facilitar el crecimiento tumoral.

Indoleamina es la enzima encargada de catabolizar el triptofano y está codificada por el gen localizado en el cromosoma 8p12. En 1990, Munn DH, Mellor AL, et al. reportaron que la actividad de IDO es esencial en ratones para prevenir el rechazo alógeno de la madre al feto debido a inmunidad mediada por células T. Estudios subsecuentes han extendido ampliamente el papel inmunosupresor de IDO en una variedad de infecciones crónicas, que incluyen infecciones virales, parasitarias y bacterianas en el ser humano^{11,12}.

Se ha reportado que en células de cáncer cervicouterino y en adenocarcinoma cervical IDO se encuentra sobreexpresada, mientras que las células estromales adyacentes carecen de dicha expresión. En contraste, no se expresa en epitelio escamoso cervical o en las glándulas endocervicales¹³.

La HO-1 es la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo y da lugar a tres productos fundamentales: biliverdina, hierro libre y monóxido de carbono¹⁴. Tiene un papel importante en la modulación de procesos inflamatorios y en los mecanismos de defensa antioxidante que posee el organismo ante la presencia de algún daño y en el bloqueo de los procesos apoptóticos^{15,16}. Esta enzima es sobreexpresada en cáncer de páncreas, colon y pulmón, en donde favorece la proliferación tumoral y resistencia a la terapia antitumoral^{17,18}. La inducción de HO-1 en células tumorales, sometidas a algún agente estresor, incrementa su resistencia a la apoptosis. Asimismo, la inhibición de esta

enzima conduce a la reducción del crecimiento tumoral y a un incremento en la sensibilidad a la quimioterapia¹⁹. En nuestro laboratorio observamos que en células NK en cocultivo con células de cáncer cervicouterino tratadas previamente con un inhibidor específico de HO-1, la producción de IFN- γ y TNF- α por las células NK se incrementó en comparación con aquéllas que estuvieron en contacto con líneas celulares sin tratamiento²⁰.

Sin embargo, se desconoce el efecto que puedan tener citocinas como IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ en líneas celulares de cáncer de cervicouterino sobre la expresión de IDO y HO-1, así como la actividad citotóxica de células NK en células de cáncer cervicouterino pretratadas con estos inhibidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las líneas celulares HeLa (VPH 18+), SiHa (VPH 16+), C-33A (VPH-) fueron donadas por P. Boukamp (DKFZ Heidelberg, Alemania), se mantuvieron en medio DMEM (Gibco, Life Technologies, Grand Island, Nueva York, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino, libre de LPS (Gibco), 100 U de penicilina y 100 μ g de estreptomina por cada mililitro de medio (Gibco) y L-glutamina al 1% (Gibco). Para expandir las células NK-92 (ATCC n.º CRL-2407) se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 15% de suero fetal bovino, libre de LPS, 100 U de penicilina y 100 μ g de estreptomina por cada mililitro de medio, L-glutamina al 1% y 80 U/ml de IL-2 (Biolegend, San Diego, CA, EE.UU.). Todas las líneas celulares se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Para determinar la expresión de las enzimas IDO y HO-1, las líneas de cáncer cervicouterino se sembraron en placas de p-100 (1 x 10⁶ células por placa), y se trataron con TNF- α , IFN- γ (Biolegend), IL-10 o IL-4 (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) a una concentración de 20 ng/ml, en medio de cultivo DMEM suplementado, durante 3, 6 y 12 h a 37 °C y con un 5% de CO₂.

Las líneas tumorales HeLa, SiHa y C-33A se sembraron en frascos de cultivo y se trataron, de manera independiente, con protoporfirina de estaño IX (SnPP; Frontier Scientific, Inc. Logan, UT, EE.UU.), inhibidor de HO-1, a una concentración de 25 μ M y 1-L-metil triptófano (1-MT; Sigma-Aldrich), inhibidor de IDO, a una concentración de 2.5 mM, ambos durante 48 h.

Valoración de las enzimas indoleamina y hemooxigenasa 1

Al finalizar los tratamientos con las citocinas, las líneas de cáncer se lavaron con PBS (Gibco) y se fijaron con solución

fijadora (BioLegend) durante 20 min. Después de realizar un lavado con solución de permeabilización (BioLegend), se permeabilizaron durante 5 min con esta solución. Las células se marcaron con los anticuerpos primarios: ratón anti-HO-1 humano (abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) y ratón anti-IDO-1 humano (AbD serotec, Oxford, Reino Unido) durante 30 min. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios: cabra antirratón inmunoglobina G (IgG) acoplado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; abcam) y conejo antirratón IgG acoplado con ficoeritrina (PE; AbD serotec), durante 30 min, protegidos de la luz. Posterior a la incubación con anticuerpos se realizó un lavado con PBS, se fijaron las células con paraformaldehído al 0.5% (Sigma) en PBS y se analizaron en el citómetro de flujo EPICS-XL (Beckman Coulter Corp.). Los datos se analizaron usando el *software* WINMDI versión 2.9. Se adquirieron al menos 20,000 eventos para cada muestra. Se obtuvieron el porcentaje de expresión y la media geométrica de la intensidad de fluorescencia media de todos los grupos experimentales. Los datos se representaron como la media del porcentaje de expresión.

Valoración de muerte celular en tiempo real

Se sembraron 5,000 células tumorales pretratadas o no con los inhibidores específicos de las enzimas HO-1 e IDO en la placa de 96 pozos (E-plate; Roche), siguiendo las instrucciones del manual del xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA; Roche); se agregaron las células NK suficientes para cubrir el rango blanco:efector 1:20 y se mantuvo el cocultivo durante 4 h.

Se obtuvo el índice celular normalizado (nCI) mediante el *software* RTCA, y a partir de éste se calculó el porcentaje de lisis usando la fórmula: % lisis = [nCI (no efectoras) x nCI (efectoras)]/nCI (no efectoras) x 100. Los resultados se expresan como el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se obtuvieron las medias y la desviación estándar de al menos tres observaciones por triplicado de cada uno de los grupos. Los datos se analizaron por prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Valores con $p \leq 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

RESULTADOS

Interferón γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 reducen la expresión de HO-1 en líneas de cáncer cervicouterino: para evaluar el efecto del tratamiento de las citocinas en la expresión de HO-1, las líneas HeLa, SiHa y C-33A fueron tratadas con 20 ng/ml de IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α durante 3, 6 y 12 h. La expresión de HO-1 en HeLa disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) desde las 3 h de tratamiento con IFN- γ y TNF- α , mientras que IL-4 e IL-10, a las 12 h de tratamiento inducen una disminución en la expresión (Fig. 1).

En SiHa sólo el tratamiento con IFN- γ indujo modificaciones en la expresión de la enzima, puesto que la incrementó a las 3 y 6 h ($p < 0.05$) posteriores a la adición de la citocina. En C-33A, el IFN- γ incrementó la expresión de la enzima HO-1 a las 6 h de tratamiento, mientras que el TNF- α indujo un aumento en la expresión de la enzima a las 3 h, manteniendo este incremento hasta las 6 h comparadas con las células sin tratar.

La expresión de IDO en líneas celulares de cáncer cervicouterino se incrementa durante tiempos cortos de tratamiento con las citocinas. En la Fig. 2 se muestran las gráficas de la expresión proteica de la enzima IDO posterior a los tratamientos con las citocinas durante 3, 6 y 12 h. La expresión de IDO se incrementa en HeLa y SiHa a las 3 h, y en C-33A a las 12 h de tratamiento con IL-4. Sin embargo, en general no hay cambios significativos en las líneas de cáncer cervicou-

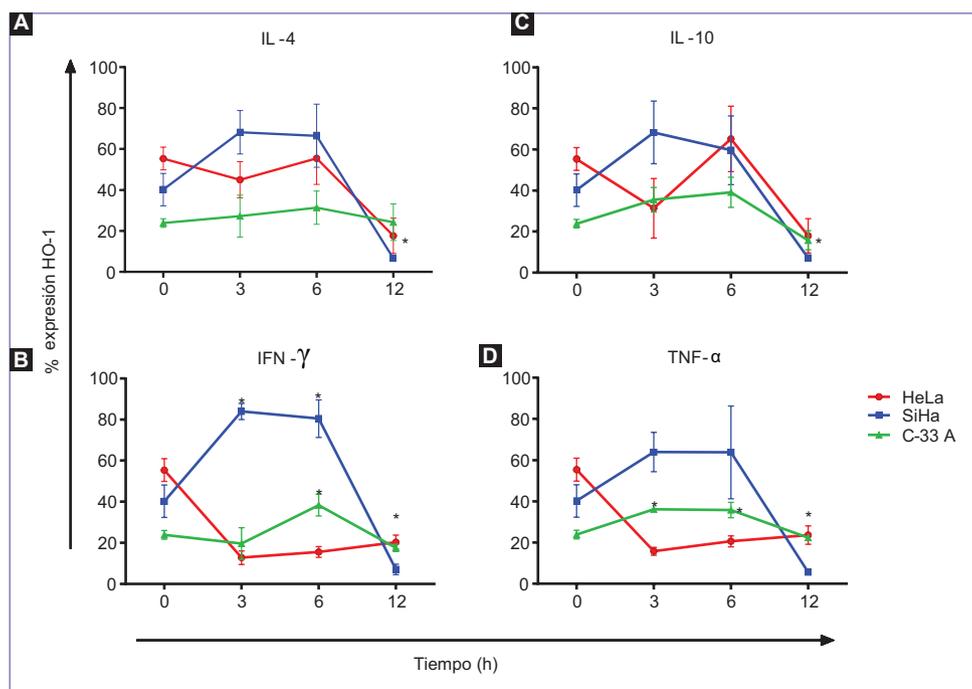


Figura 1. Cinética de expresión de HO-1. Las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, SiHa y C-33A se trataron con: A) IL-4, B) IL-10, C) IFN- γ y D) TNF- α durante 3, 6 y 12 h. Las barras representan el error estándar de la media. El tiempo 0 se considera como la expresión basal (* $p < 0.05$).

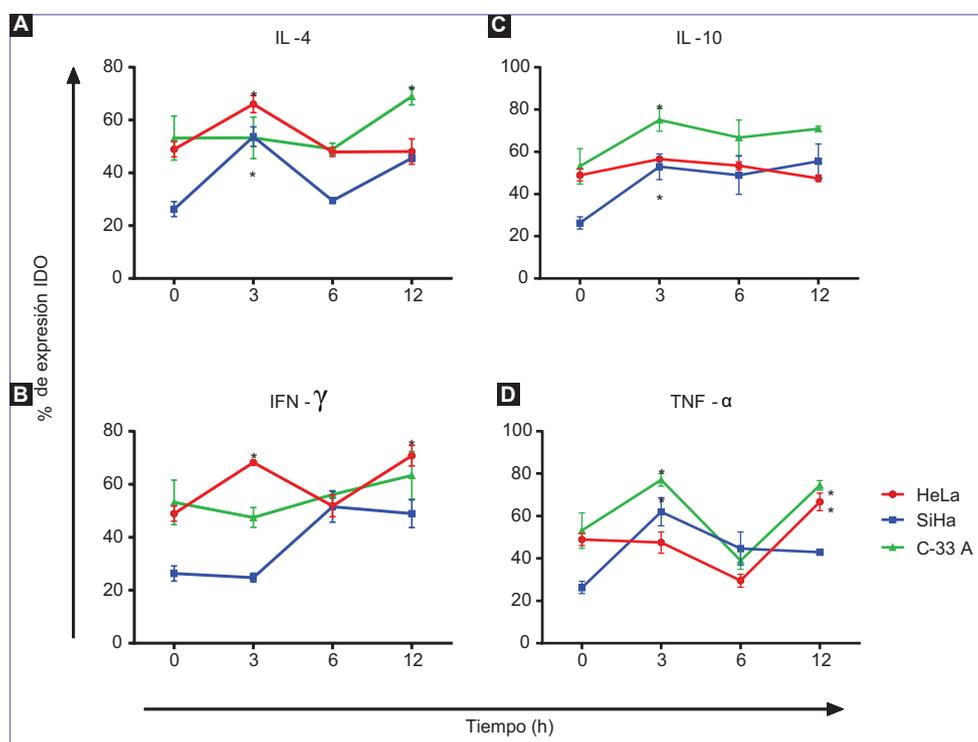


Figura 2. Cinética de expresión de la enzima IDO. HeLa, SiHa y C-33A se trataron durante 3, 6 y 12 h con: A) IL-4, B) IL-10, C) IFN- γ y D) TNF- α . Las barras representan el error estándar de la media. El tiempo 0 se considera como la expresión basal (* $p < 0.05$).

terino con respecto a los niveles basales observados en estas líneas celulares. Cuando SiHa y C-33A fueron tratadas con IL-10, la expresión de IDO se incrementó significativamente a las 3 h de tratamiento ($p < 0.05$).

El tratamiento con IFN- γ induce un incremento en la expresión de la enzima en las células HeLa durante las primeras 3 h ($p < 0.05$), disminuyendo progresivamente respecto al tiempo de tratamiento hasta alcanzar una expresión similar al grupo basal. En SiHa se observa un incremento de la enzima IDO a partir de las 6 y 12 h ($p < 0.05$). Las células de cáncer de cérvix fueron tratadas con TNF- α , y se observa un incremento en la expresión de IDO en SiHa y C-33A a las 3 y 12 h ($p < 0.05$).

Valoración de citotoxicidad mediada por células NK en las células tumorales tratadas con el inhibidor de HO-1 (SnPP) e IDO (1-MT), para evaluar la participación de HO-1 e IDO expresadas por las líneas de cáncer de cervicouterino en la resistencia a la actividad citotóxica de células NK: las células tumorales fueron pretratadas con inhibidores específicos de estas enzimas y posteriormente se realizó cocultivo con células NK, evaluando la lisis celular mediada por NK en tiempo real. En la Fig. 3 se muestra el porcentaje de lisis de las líneas HeLa, SiHa y C-33A mediado por células NK. La inhibición de HO-1 en las líneas tumorales favoreció un incremento en el porcentaje de lisis, de manera significativa en HeLa (VPH 18+). Por otro lado, la inhibición de IDO en las líneas tumorales favoreció un incremento en el porcentaje de lisis en células SiHa comparado con las células sin tratar con el inhibidor (VPH 16+).

DISCUSIÓN

Las células del sistema inmune y la liberación de sus mediadores solubles, como citocinas, puede moldear las células

tumorales, favoreciendo los cambios para que éstas produzcan moléculas que normalmente no expresarían, mismas que le permitirán evadir la apoptosis, proliferar sin control e incluso evadir la repuesta inmune^{21,22}. Dentro de las moléculas que las células tumorales pueden expresar encontramos ciertas citocinas, (p. ej., IL-10 y factor de crecimiento transformante B [TGF- β], quimiocinas receptor de quimiocina tipo 2 (CCR2) o enzimas tales como IDO y HO-1^{23,24}.

Se ha reportado la sobreexpresión de HO-1 e IDO en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer cervicouterino^{20,25,26}. Los mecanismos de regulación de estas enzimas van desde factores de transcripción, activados por estímulos externos, hasta los productos de la actividad de las enzimas²⁷. La expresión de IDO en respuesta a citocinas es dependiente del tipo celular²⁸, igual que HO-1. Por ejemplo, se ha reportado que en líneas tumorales de glioblastoma humano, el IFN- γ suprime la expresión de HO-1 y el TNF- α no tiene efecto alguno en la expresión de esta enzima²⁹. Estas variaciones las observamos en nuestro estudio, en el cual, a pesar de que las tres líneas de cáncer cervicouterino son células epiteliales, la respuesta a las citocinas fue diferente en cada una de éstas.

En la expresión de HO-1 en la línea celular SiHa observamos, posiblemente, el fenómeno de redundancia entre las citocinas, puesto que la variación en la expresión de las enzimas con respecto al tiempo es la misma para las cuatro citocinas.

El IFN- γ induce un incremento en la expresión de IDO en las líneas de cáncer de cérvix HeLa y SiHa durante las primeras horas de tratamiento; en C-33A la expresión se incrementa hasta las 12 h. En diferentes tipos celulares el IFN- γ es capaz de inducir la expresión de IDO³⁰⁻³². En líneas de células epiteliales HLE-B3, la actividad de la enzima IDO se incrementa de manera proporcional a la concentración de IFN- γ ³³.

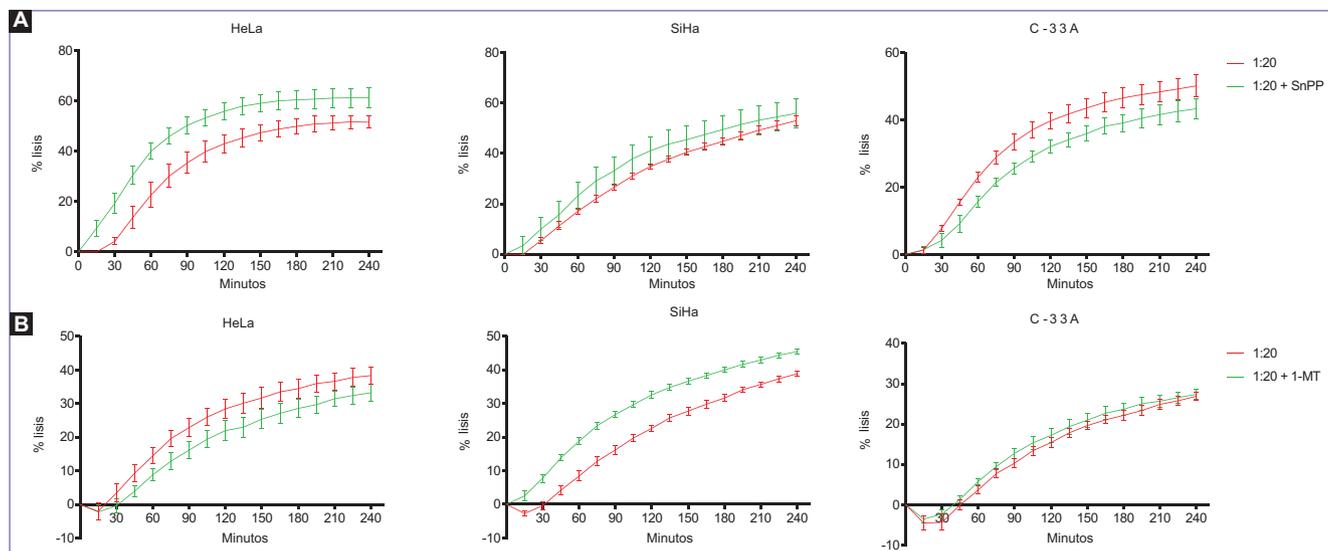


Figura 3. Actividad citotóxica de células NK en cocultivo con células de cáncer cervicouterino. Las células HeLa, SiHa y C-33A se pretrataron o no con: **A)** inhibidor de IDO (1-MT) y **B)** inhibidor de HO-1 (SnPP). Se determinó la citotoxicidad mediada por células NK en tiempo real mediante la determinación de la impedancia. Las barras representan el error estándar de la media.

El TNF- α , particularmente en SiHa, induce un incremento en la expresión de IDO. Con respecto al TNF- α , no se ha observado que tenga algún efecto sobre la expresión de esta enzima^{32,34,35}; sin embargo, es capaz de potenciar la expresión de la misma cuando se combina con otras citocinas proinflamatorias^{30,32}. En nuestro estudio encontramos que el TNF- α induce cambios en la expresión, independientemente del tipo celular.

Con respecto a IL-10, esta citocina induce un incremento en la expresión de IDO durante las primeras 12 h en las tres líneas de cáncer de cervicouterino, siendo éste menor en células HeLa. En otros estudios se ha reportado que IL-10 incrementa la expresión de la enzima IDO en linfocitos T reguladores^{36,37}.

Con base en nuestras observaciones, HO-1 tiene un rol protector en células HeLa (VPH 18+), ya que al inhibir esta enzima se incrementa la actividad citotóxica de las células NK, mientras que la enzima IDO protege a la célula tumoral SiHa (VPH 16+) de la citotoxicidad de las células NK. Esto es interesante, ya que nos indica diferentes mecanismos protectores para evadir la respuesta inmune, en particular la ejercida por células NK, como se demuestra en este estudio. Estos mecanismos probablemente estén relacionados con la infección y tipos del VPH, ya que en la línea C-33A, negativa a VPH, no se observaron estas diferencias.

Cabe resaltar que los cambios que observamos en nuestro estudio en la expresión de las enzimas, al ser retadas con las citocinas, se presentaron en tiempos cortos de tratamiento, esto debido a que son enzimas de respuesta al estrés, lo que confiere un papel protector a las células que las expresan^{28,38}. Es interesante señalar que este rol protector se confirmó cuando se inhibió tanto a HO-1 e IDO, y las células se volvieron más sensibles a la muerte celular mediada por células NK.

CONCLUSIONES

La enzima HO-1 disminuye cuando las células tumorales son tratadas con las diferentes citocinas, por lo que otras citoci-

nas o moléculas pueden estar involucradas en su regulación. La enzima supresora IDO es regulada positivamente por IL-10 en HeLa y SiHa, por lo cual podría formar parte de los mecanismos de escape tumoral en cáncer cervicouterino. La actividad citotóxica de células NK se incrementa en células HeLa pretratadas con el inhibidor de HO-1 y en células SiHa pretratadas con el inhibidor de IDO.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Investigación en Salud, por el financiamiento obtenido para la realización de este trabajo FIS/IMSS/PROT/508, y a la Red Temática del CONACYT de Inmunología en Cáncer y Enfermedades Infecciosas INMUNOCANEI-CONACYT N.º 280135.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
- Jayshree RS, Sreenivas A, Tessa M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res.* 2009;130(3):286-95.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007;370:890-907.
- Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction.* 2009;138:903-19.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.

7. Al-Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* 1998;184(3):283-90.
8. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 1998;113(2):183-9.
9. Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos AC, Teodoro Ld, Murta EF, Michelin MA. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Human Immunol.* 2012;73(9):920-6.
10. Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol.* 2008;1(5):412-20.
11. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev.* 2008;222:206-21.
12. Liu X, Newton R, Friedman S, Scherle P. Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9(8):938-52.
13. Inaba T, Ino K, Kajiyama H, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Oncol.* 2010;117(3):423-8.
14. Chabannes D, Hill M, Merieau E, et al. Arole for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007;110(10):3691-4.
15. Piantadosi CA, Withers CM, Bartz RR, et al. Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem.* 2011;286(18):16374-85.
16. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev.* 2006;86(2):583-650.
17. Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, et al. Inhibition of Heme Oxygenase-1 Increases Responsiveness of Pancreatic Cancer Cells to Anticancer Treatment. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3790-8.
18. Castronuovo CC, Sacca PA, Meiss R, et al. Homeostatic response under carcinogen withdrawal, heme oxygenase 1 expression and cell cycle association. *BMC Cancer.* 2006;6:286.
19. Simon T, Anegon I, Blancou P. Heme oxygenase and carbon monoxide as an immunotherapeutic approach in transplantation and cancer. *Immunotherapy.* 2011;3:15-8.
20. Gómez-Lomelí P, Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, et al. Increase of IFN- γ and TNF- α production in CD107a+ NK-92 cells co-cultured with cervical cancer cell lines pre-treated with the HO-1 inhibitor. *Cancer C Int.* 2014;14(1):100.
21. Bhatia A, Kumar Y. Cancer Immunoediting: Immunosurveillance, Immune Equilibrium, and Immune Escape, In: Rezaei N. (eds) *Cancer Immunology.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2015;195-208.
22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
23. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(3):319-26.
24. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Rev Immunol.* 2006;6:715-27.
25. Takikawa O. Clinical aspects of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-initiated tryptophan metabolism: IDO is a target of drug discovery for various diseases. *International Congress Series.* 2007;1304:290-7.
26. Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Current Drug Targets.* 2010;11:1551-70.
27. Kim KM, Pae HO, Zheng M, et al. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ Res.* 2007;101(9):919-27.
28. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Rev Immunol.* 2004;4:762-74.
29. Takahashi K, Nakayama M, Takeda K, Fujita H, Shibahara S. Suppression of heme oxygenase-1 mRNA expression by interferon-gamma in human glioblastoma cells. *J Neurochem.* 1999;72(6):2356-61.
30. Babcock TA, Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor α in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine.* 2000;12(6):588-94.
31. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Investigation.* 2007;117:1147-54.
32. Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. NF- κ B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . *Cytokine.* 2006;35(1):53-61.
33. Mailankot M, Nagaraj RH. Induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(9):1446-54.
34. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood.* 2005;106(7):2375-81.
35. Däubener W, Mackenzie CR. IFN activated indoleamine 2,3- dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:517-24.
36. Battaglia M, Gianfrani C, Gregori S, Roncarolo MG. IL-10- Producing T Regulatory Type 1 Cells and Oral Tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1029:142-53.
37. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol.* 2005;78(5):1043-51.
38. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(1):99-103.