



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Biología

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental
Zaragoza

Laboratorio de Inmunobiología

**“Efecto de la adenosina en la morfología y migración de
células de cáncer cérvico-uterino”**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta

ERICK YAEL HOYOS CÁRDENAS

Directora de Tesis

DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA



Ciudad de México

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología en la UMIEZ de la FES Zaragoza, UNAM, y en el Laboratorio de Inmunobiología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, PAPIIT IN225519 y FIS/IMSS/PROT/PRIO/19/114.

“A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto, y de pronto toda nuestra vida se concentra en un solo instante”.

Oscar Wilde.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme proporcionado una educación digna y la oportunidad de desarrollarme.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme realizar mi carrera.

A la Dra. María de Lourdes Mora García por aceptarme en el laboratorio en el que se realizó el presente trabajo, así como por la atención que me proporcionó durante mi periodo en el laboratorio.

Al Dr. Alberto Monroy García por orientarme a lo largo de mi proyecto, al igual que por prestarse afable y familiar durante mi estancia en el laboratorio,

Al Dr. Jorge Hernández Montes por aportar su buen trato y atención al aconsejarme sobre cómo pudiera mejorar mi proyecto, al igual que por presentarse siempre accesible.

A la Dra. Rosario García Rocha por ser mi tutora, así como por siempre asesorarme de manera amable y darme el tiempo para ayudarme a solucionar mis dudas.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunobiología por hacer agradable el ambiente, y del mismo modo, prestarse a ayudar y mejorar con sus observaciones la calidad de los proyectos.

DEDICATORIAS

A mi padre, que pese a que no presenciara ni este ni todos los logros que alcanzare, en cada uno de ellos me acompaña; lo llevo en mis valores, en mis ademanes y en mis decisiones. Es por esto que todos mis logros tambien son tuyos, y es por esto que mas que una dedicatoria, esto es un gracias por haber sido mi padre y por haber estado lo mas que pudiste acompañandome.

A mi madre por criarme y ser el soporte de la familia, por el apoyo que me ha dado a traves de mi vida y por su constante esfuerzo para que salgamos adelante mi hermano y yo. Este logro tambien es tuyo.

A mi hermano que me ha sido mi compañero en los momentos importantes y por el apoyo y comprension que nos damos.

ÍNDICE

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Marco teórico	3
- Cáncer	3
- Cáncer cervico-uterino (CaCU)	4
- VPH en el desarrollo de CaCu	4
-Evasión de la respuesta inmune	7
- Ecto 5´nucleotidasa y su expresión en el cáncer	8
- Participación de Ado en el cáncer	10
- Receptores de adenosina	11
- A1R	13
-A2AR	13
-A2BR	14
- A3R	14
4.Justificación y planteamiento del problema.....	14
5.Hipótesis	15
6.Objetivos	15
7. Metodología	16
8.Resultados	18
9.Análisis de resultados	32
10. Conclusiones	36
11. Perspectivas	37
12. Bibliografía	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virus del papiloma humano y su capacidad de acceder a las células basales del epitelio cervical a través de micro abrasiones en el epitelio cervical.

Figura 2. La adenosina producida en el microambiente tumoral regula las funciones efectoras de la respuesta inmune.

Figura 3. Biosíntesis y catabolismo de la Ado y las vías del segundo mensajero acopladas a los receptores de Ado.

Figura 4. Efecto de Ado y del agonista de A2AR/A2BR sobre la proliferación de las células MS751

Figura 5. Efecto de Ado sobre la viabilidad de las células de CaCu.

Figura 6. Efecto de Ado en la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en células tumorales de CaCu.

Figura 7. Efecto de CGS-21680 en la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en células tumorales de CaCu.

Figura 8. Efecto de ZM241385 y MRS1754 en la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en células tumorales de CaCu.

Figura 9. Efecto de Ado sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Figura 10. Efecto de CGS-21680 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Figura 11. Efecto de ZM241385 y MRS1754 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Grafica 1. Efecto de Ado y del agonista de A2AR/A2BR sobre la proliferación de las células MS751.

Grafica 2. Representación gráfica del efecto de Ado sobre la viabilidad de las células de CaCu.

Grafica 3. Efecto de Ado sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Grafica 4. Efecto de CGS-21680 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Grafica 5. Efecto de ZM241385 y MRS1754 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

1. ABREVIATURAS

A1R – Receptor A1

A2AR – Receptor A2A

A2BR – Receptor A2B

A3R – Receptor A3

Ada – Adenosin deaminasa

ADN - Ácido desoxirribonucleico

Ado - Adenosina

ADP – Adenosin difosfato

AMP – Adenosin monofosfato

ATP - Adenosin trifosfato

CaCu - Cáncer cérvico-uterino

CD73 – Ecto nucleotidasa

CGS - CGS-21680

LIAG – Lesión Intraepitelial de alto grado

LIABG – Lesión intraepithelial de bajo grado

MR – MRS 1754

NIC – Neoplasia intraepithelial cervical

pRB – Proteína de retinoblastoma

VGEF – Factor de crecimiento endothelial vascular

VPH – Virus del papiloma humano

ZM – ZM 241385

2. RESUMEN

En México, el cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. Aun cuando se sabe que la infección por VPH de alto riesgo es el factor etiológico que participa en el desarrollo del CaCu, se desconocen los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden la respuesta inmune y aumentan su potencial proliferativo y migratorio. Recientemente, se ha propuesto que la generación de adenosina (Ado), producida mediante la hidrólisis de AMP a través de la actividad enzimática de la 5'-nucleotidasa (CD73), participa en la señalización de receptores purinérgicos tipo 1 (A1R, A2AR, A2BR y A3R) en la membrana de las células tumorales para promover la proliferación y cambios morfológicos de tipo mesenquimal asociados con la migración celular.

En el presente trabajo de investigación se analizó el efecto de Ado sobre la proliferación y viabilidad celular, así como en la inducción de cambios morfológicos y migración de células tumorales de CaCu. Para ello, células tumorales MS751 (VPH-18+) fueron cultivadas en presencia de Ado y un agonista de A2AR y A2BR (CGS-21680). De manera interesante, ambas moléculas redujeron marginalmente la proliferación celular entre 2-18% y tuvieron un efecto en la reducción de la viabilidad celular entre 2-9%. Sin embargo, el bloqueo de A2AR con el antagonista específico ZM241385, disminuyó la viabilidad alrededor del 10%; mientras que el bloqueo de A2BR con el antagonista específico MRS1754, aumentó la proliferación celular en un 6%, sugiriendo que la señalización de Ado hacia estos receptores no modifica de manera importante la viabilidad y el estatus proliferativo de las células tumorales de CaCu. Sin embargo, el cultivo de las células tumorales MS751 en presencia de Ado o CGS-21680, indujo cambios morfológicos de tipo mesenquimal en éstas, incrementando la presencia de extensiones del citoesqueleto y modificando su capacidad migratoria. Por otra parte, la adición del antagonista ZM241385, revirtió de manera importante tanto la generación de cambios

morfológicos, como la capacidad migratoria de las células tumorales inducida por Ado.

Estos resultados sugieren un papel relevante de la señalización de Ado sobre A2AR para mantener la viabilidad y capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu. Por lo cual, sería importante considerar su papel funcional como blanco terapéutico en este tipo de neoplasia.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Cáncer

El término cáncer se refiere a una enfermedad que tiene como principal característica el crecimiento acelerado y descontrolado de células anormales, el cual es causado por múltiples cambios en la expresión de genes que conducen a la inestabilidad genómica y al desequilibrio de la proliferación y resistencia a muerte (Bustamante L.M, 2012).

El cáncer es una enfermedad que va en aumento y es considerada como una de las principales causas de muerte a nivel mundial; se calcula que debido al cáncer, en 2015 se dieron 8.8 millones de defunciones, además, se identificaron cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1,69 millones de muertes), cáncer hepático (788 000 defunciones), cáncer colorrectal (774 000 muertes), cáncer gástrico (754 000 defunciones) y de mama (571 000 muertes) (Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017).

La detección de cáncer en etapa avanzada, así como la falta de diagnóstico y tratamiento son frecuentes. En 2017, el 26% de países de ingresos bajos informaron que la sanidad pública contaba con servicios de patología para atender a la población. Alrededor del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30% (OMS,2018).

En el 2018, se estimó que se dieron 18 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes. Además, se estimó que en términos de la sobrevivida a los cinco años después del diagnóstico existen 43.8 millones de personas (IARC, 2018).

Pese a todo esto, se estima que entre el 30% y el 50% de los cánceres son prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, diagnósticos y tratamientos oportunos (OMS, 2018).

3.2. Cáncer cervicouterino (CaCu)

Dentro de los tipos de cáncer más comunes del tracto reproductor femenino se encuentran los carcinomas cervicales, de ovario y endometrio.

El CaCu está en el tercer puesto de incidencia a nivel mundial y es el cáncer ginecológico más frecuente en países en desarrollo (Moshkovich O, et al. 2015), además, es una patología con una alta mortalidad en las pacientes que la padecen, esto principalmente debido a la complejidad de su diagnóstico y falta de chequeos regulares (Narod, 2016). En el año 2012 se estimaron más de 260 000 muertes por cáncer cervicouterino (CaCu) en todo el mundo, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer femenino (Globocan, 2012). En México, el CaCu representa la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia aproximada de 14, 000 casos y una tasa de incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres (INEGI 2016).

El aumento del CaCu en los países en desarrollo se atribuye al comienzo temprano de actividades sexuales, ciertos comportamientos sexuales como edad temprana en la primera relación, múltiples parejas sexuales, el no utilizar condón, embarazos múltiples con asociación de clamidia e inmunosupresión con VIH, que se ha relacionado con un mayor riesgo de infección de VPH (Gustafsson L et al, 1997). Las mujeres infectadas por el VIH tienen un mayor riesgo, especialmente por la persistencia de múltiples infecciones causadas por algún virus de papiloma humano (VPH), que se relacionan con un mayor riesgo de progresión a lesiones cervicales precancerosas en comparación con mujeres no infectadas por el VIH (Denny L, et al., 2012).

En más del 99% de los casos en los que se presenta el CaCu, se le asocia con la infección de virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, especialmente el genotipo 16 que se encuentra en cerca del 50% de los casos con CaCu, seguido por el VPH 18, 45 y 31 (Muñoz et al., 2003).

3.3 VPH en el desarrollo de CaCu

El VPH es un virus de ADN bicatenario, perteneciente a la familia Papillomaviridae, y es uno de los virus de transmisión sexual más comunes en todo el mundo. Presenta una estructura icosaédrica no envuelta y su genoma contiene ocho marcos de lectura abiertos (ORF) (Doorbar, J. et al. 2015). Estos ORF codifican ocho proteínas, cuya expresión se da en etapas tempranas (E1, E2, E4-E7) y etapas tardías (L1 y L2). Las proteínas de expresión temprana se producen tras la infección

viral de la célula huésped y están asociadas con la infección y la transformación de las células infectadas. Mientras tanto, las proteínas tardías constituyen la cápside viral y promueven la propagación de la infección a través del sistema del huésped, esto por medio de la liberación de partículas del virus dentro de las células epiteliales superficiales (Doorbar J. et al. 2015).

Actualmente, hay alrededor de 200 genotipos de VPH documentados; sin embargo, solo algunos presentan potencial carcinogénico y se ha visto que tienen la capacidad de inducir cáncer (van Doorslaer, K. et al. 2017). La relación que tienen diferentes tipos de VPH con diferentes síntomas clínicos dio pie a que se propusiera una clasificación para los diferentes tipos de VPH, basándose en la gravedad de los resultados clínicos, es decir, en bajo, intermedio y alto riesgo. Los tipos de alto riesgo abarcan aquellos que puede inducir el desarrollo de células tumorales. La gravedad de los síntomas generalmente se relaciona con la afinidad presentada por las oncoproteínas E6 y E7 dentro de cada tipo de VPH hacia las proteínas diana: supresores de tumores p53 y proteína de retinoblastoma (pRB), respectivamente (Chan, P.K.S. et al. 2012).

Se estima que del 10 al 15% de las mujeres tienen tipos de VPH oncogénicos (alto riesgo de VPH: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, 82 y VPH bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81) (Vaisy A, et al., 2014).

Los VPH son virus que afectan el epitelio y las mucosas provocando lesiones benignas proliferativas, que pueden provocar lesiones en la matriz o el útero, derivando en neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) (Tirado et al., 2005; Hunter et al., 2008; Park et al., 2008)

La progresión de la infección de VPH a CaCu puede ser clasificada en 4 etapas: la primera etapa consiste en la infección del VPH, la cual suele ser eliminada por el sistema inmune en los primeros dos años, sin embargo, en el 10% de las infecciones el virus puede persistir por varios años y está asociado con el diagnóstico de lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIBG). La segunda etapa se identifica cuando se presenta una displasia leve, debido a la progresión persistente de las células infectadas hacia las células precancerosas, esta lesión puede progresar en la tercera etapa hacia lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG), caracterizada por una displasia moderada (Figura 1). En estas lesiones, la infección persistente por los VPH de alto riesgo puede provocar la pérdida de funciones de vías de regularización celular. La integración de genes del VPH al genoma celular puede bloquear las proteínas reguladoras del ciclo celular, como p53 (proteína encargada de la reparación y la apoptosis) y Rb (proteína supresora de tumores) (Carrero, 2012).

Un ejemplo de lo anterior es la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 de VPH-16 en la célula huésped, dando como resultado la integración del genoma del VPH en cromosomas celulares (Moodley, 2005). La expresión de estos oncogenes se debe a que la incorporación del genoma del VPH suele causar la ruptura de la región de E2, por lo que esta proteína deja de producirse. E2 regula negativamente la expresión de E6 y E7, ya que al expresarse estas proteínas conducen a la degradación de p53 y RB, las cuales controlan el ciclo celular. En consecuencia, se presenta un crecimiento anormal y la acumulación de alteraciones genéticas que conllevan al desarrollo de cáncer (Bosch et al., 2008). Cuando la LIAG avanza hacia el carcinoma invasivo se considera la cuarta etapa (Piersma, 2011).

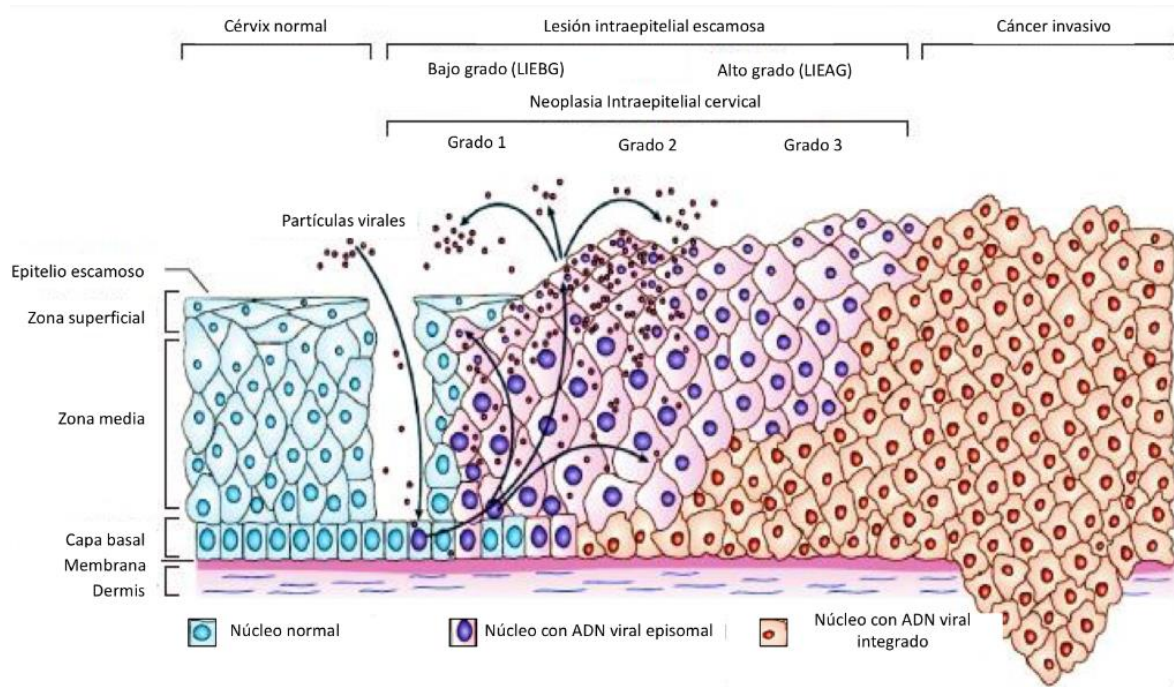


Figura 1. Virus del papiloma humano y su capacidad de acceder a las células basales del epitelio cervical a través de micro abrasiones en el epitelio cervical. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado promueven la replicación viral. Un número desconocido de infecciones de papiloma humano de alto riesgo progresan a neoplasias intraepiteliales cervicales. La progresión de lesiones no tratadas en cáncer está asociada con la integración del genoma del virus del papiloma humano en los cromosomas hospederos (Crosbie EJ et al.2013).

La frecuencia del cáncer cervical después del tratamiento por displasia generadas por VPH es menor al 1% y la mortalidad es menor que 0.5% (Soutter WP. et al, 1997).

3.4. Evasión de la respuesta inmune

El sistema inmunológico es capaz de identificar proteínas con mutaciones provenientes de oncogenes, proteínas virales en tumores que tienen su origen en una infección viral, como el cáncer de cérvix o proteínas propias del cuerpo con una expresión anómala. Pese a esto, la progresión de los tumores es capaz de ocasionar supresión inmune, obstruyendo la capacidad del sistema inmunológico de proveer una respuesta antitumoral o una eliminación tumoral efectiva (Dranoff G, 2004).

Desde hace varios años el cáncer se ha estudiado como una enfermedad sistémica, ampliando el enfoque de solo ver la célula tumoral al de ver el microambiente en el cual se desarrolla. El sistema inmunológico del hospedero es un componente crucial del microambiente en el que se desarrolla un tumor (Hanahan D, 2011).

El sistema inmunológico tiene la capacidad de detectar y eliminar células tumorales, sin embargo, también puede proveer un microambiente favorable para el crecimiento tumoral (Chow MT, 2012). La capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune y la inflamación crónica en el microambiente tumoral son factores promotores para la oncogénesis (Berraondo P, 2016). Además, los tumores malignos tienen la capacidad de provocar un estado inflamatorio crónico, el cual promueve el crecimiento tumoral y evita su eliminación (Chow MT, 2012).

Recientemente se encontró que la supresión inmune se debe a la capacidad que tienen las neoplasias de modificar la respuesta inmunológica del cuerpo. El microambiente tumoral es capaz de evitar la respuesta de linfocitos T colaboradores y citotóxicos, los cuales son específicos para los antígenos tumorales ya que promueven la producción de citocinas y factores proinflamatorios. De este modo ocurre una acumulación de células supresoras, como los linfocitos T reguladores, que inhiben una respuesta del sistema inmune (Finn OJ, 2012).

Se ha estipulado que la generación de adenosina (Ado) en el microambiente tumoral participa de manera importante para promover cambios morfológicos asociados con la proliferación y migración celular (Antonioli et al, 2013).

En los tejidos inflamados no malignos, la adenosina producida dentro del microambiente hipóxico funciona para controlar la respuesta inflamatoria y reducir el daño colateral del tejido normal (Scheibner KA, 2009). No obstante, en cáncer la participación de Ado se enfoca en la protección tumoral, debido a que media la inactivación de células T efectoras (Figura 2) (Ohta A, 2006).

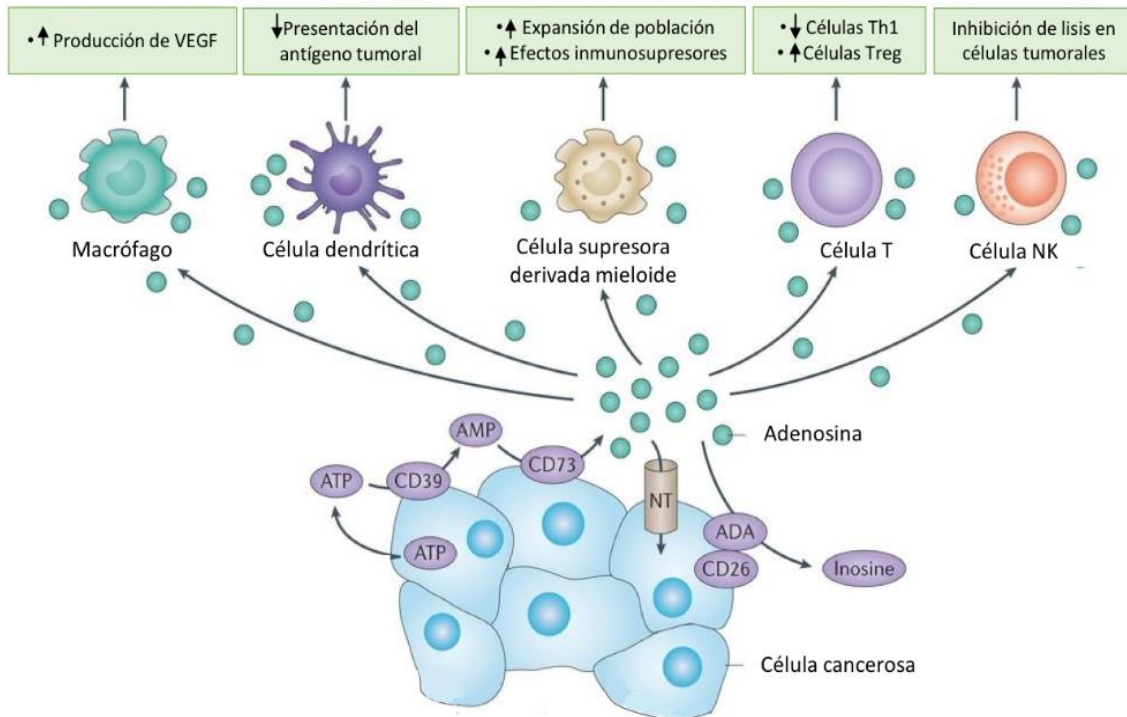


Figura 2. La adenosina producida en el microambiente tumoral regula las funciones efectoras de la respuesta inmune. La adenosina producida en el microambiente tumoral a través de la hidrólisis de ATP/ADP y AMP a adenosina por la actividad funcional de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, respectivamente, suprime las funciones de los macrófagos, células dendríticas, células supresoras mieloides, y la función efectora de las células T y las células asesinas naturales (NK). Tomado y modificado de Antonioli L. et al., 2013.

3.5. Ecto 5' nucleotidasa (CD73) y su expresión en cáncer

Las ectonucleotidasas consisten en familias de enzimas que se expresan en la membrana plasmática y se encargan de hidrolizar nucleótidos a nucleósidos. Las ectonucleotidasas se dividen en 4 familias según sus actividades:

- 1) Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa (ENTPD o CD39) que hidroliza el ATP y el ADP para formar AMP;
- 2) La pirofosfatasa de ectonucleótido (ENPP) hidroliza sustratos tales como ATP, ADP y ADP-ribosa, para formar AMP;
- 3) La fosfatasa alcalina (AP) hidroliza diferentes nucleótidos y libera fosfato inorgánico (Pi), incluso hasta la generación de adenosina.

4) La Ecto-5'-nucleotidasa (NT5E o CD73), transforma AMP en adenosina (al-Rashida, 2014).

La señalización celular mediada por nucleótidos y nucleósidos implica varios pasos que comienzan con la liberación de ATP en el espacio extracelular a través de diferentes vías. Una vez liberado, el ATP puede activar dos subfamilias de receptores P2: P2X o P2Y (Ralevic, 1998). Al mismo tiempo, los nucleótidos se defosforilan mediante enzimas de membrana especializadas, conocidas como ectonucleotidasas, en nucleótidos bi- y monofosfato. Finalmente, la pérdida completa de fosfatos forma Ado (Zimmerman et al., 2012).

La Ecto-5'-nucleotidasa se encuentra principalmente en la superficie celular de la mayoría de tejidos, expresándose abundantemente en endotelio vascular y en menores niveles en diferentes tipos celulares (Dachuan et al., 2010). La actividad de CD73 se ha relacionado con el control de diversas respuestas fisiológicas tales como el intercambio iónico epitelial, el transporte de fluidos, la función plaquetaria, la hipoxia y el daño vascular (Colgan et al., 2006).

CD73 se ha encontrado expresado en diferentes tipos de cáncer, esto debido a que su expresión es inducida por la activación de HIF- α (factor inducible por hipoxia), la exposición a IFN tipo I y por la activación de la vía de señalización Wnt (Stagg et al., 2011). También se ha asociado con el mantenimiento de la integridad del endotelio vascular durante la hipoxia, debido a que suprime el tráfico transendotelial de los leucocitos a través de su actividad enzimática. Debido a esto, se ha propuesto que CD73 regula las interacciones entre las células endoteliales y los linfocitos como una molécula de adhesión (Zhang, 2010).

Esta ectoenzima se ha encontrado sobre expresada en varios tipos de cáncer (Zimmermann et al., 2012), y se ha demostrado que su expresión en conjunto con CD39 (ectoATPasa) en un tumor o en exosomas derivados de células tumorales limita la inmunidad antitumoral de células T citotóxicas (Gessi et al., 2007). Esta sobreexpresión de CD73 en el cáncer se debe a la hipoxia generada por los tumores y a la exigencia de nutrientes necesarios para la proliferación celular desmedida de las células tumorales. En respuesta a esta exigencia, se generan mayores cantidades de ATP, el cual es hidrolizado en Ado para promover la angiogénesis e inducir una reacción antiinflamatoria (Decking et al., 1997).

Adicionalmente, se ha encontrado que la actividad enzimática de CD73 puede promover la migración y proliferación de algunos tipos de cáncer (Baravesco et al., 2008).

3.6. Participación de Ado en el cáncer

La Ado es un nucleósido purina el cual es liberado por casi todos los tipos celulares, compuesto por una molécula de adenina unida a una molécula de ribosa (Hasko, 2007). Es una molécula relacionada con el control del sistema inmune, a través de la señalización de receptores presentes en la superficie de las células del sistema inmune (Oliveira et al., 2016). En tejidos no malignos inflamados, la función de la Ado producida dentro del microambiente hipóxico es limitar el exceso de la respuesta inflamatoria para reducir daño colateral del tejido normal por la inflamación de las células. Esto se debe directamente al efecto inhibitorio en las células T, que expresan A2AR (Scheibner KA et al., 2009).

En condiciones normales, las concentraciones extracelulares Ado oscilan entre 10-100nM en los diferentes tejidos. Intracelularmente, se mantiene en niveles bajos a través de la actividad metabólica de la adenosina cinasa (Adk) y la adenosina deaminasa (Ada). En deficiencia de ADA, hipoxia o inflamación, la producción de Ado intracelular incrementa y es transportada a través de la membrana por transportadores de nucleósidos que conducen a la activación de los receptores de Ado (Gessi et al., 2007).

Debido a que en el cáncer se presenta una disponibilidad baja de oxígeno, así como un proceso inflamatorio, las células liberan nucleótidos, principalmente ATP y adenosina difosfato (ADP). Las concentraciones de ATP intracelulares son relativamente altas, por lo que al presentarse condiciones de daño celular el ATP es liberado (Sitkovsky et al, 2009). A través de la vía adenosinérgica, este es metabolizado a AMP por CD39 y después a Ado por CD73.

En los tumores sólidos las concentraciones extracelulares de Ado aumentan hasta 1000 veces más que en tejidos normales (Adair, 2005) como consecuencia de la glicolisis anaerobia en regiones hipóxicas y la utilización preferencial de glicolisis aerobia para energía metabólica en regiones no hipóxicas (efecto Warburg) (Jin D, et al., 2010). Se ha reportado que las concentraciones de adenosina en el microambiente tumoral oscilan entre 10-100uM (Ohta 2016). La principal fuente de Ado en sitios de inflamación y en el microambiente tumoral es el ATP extracelular liberado por estrés o muerte celular (Antonioli L. et al., 2013, Hasko G. et al., 2008).

La Ado ha sido reportada como uno de los factores que promueven la angiogénesis en células tumorales, esto debido a que regula la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VGEF) a través de sus receptores (Merighi et al., 2005).

3.7 Receptores de Ado

La Ado, ya sea por la liberación de las células o después de ser derivada extracelularmente de moléculas relacionadas (Olah, 1995), es un regulador involucrado en diversas funciones celulares a través de segundos mensajeros como el AMPc, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3) (Rangel et al., 2007).

Las células median los efectos de la Ado a través de su unión a cuatro subtipos de receptores de adenosina, A1R, A2AR, A2BR y A3R. Estos receptores se encuentran expresados de manera específica por células y tejidos, distribuidos en la superficie celular. Estos receptores purinérgicos P1 contienen siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (Furuta S, 2012).

Las diferencias entre los receptores radican en su afinidad de unión a la Ado, siendo A2AR y A1R los receptores de mayor afinidad; el tipo de proteínas G que reclutan y en las vías de señalización que activan, pues A1R y A3R están unidos a proteínas Gi e inhiben la adenil ciclasa, mientras que A2AR y A2BR están unidos a Gs y estimulan la adenil ciclasa (Fishman P. 2009). Además de esto, los receptores presentan diferentes efectos en los procesos celulares (Freholm et al., 2007) (Figura 3).

En condiciones fisiológicas normales, la Ado puede activar los receptores A1, A2A y A3 de alta afinidad (EC50 en el rango de 0.2-0.7 μ M) pero se necesitan concentraciones suprafisiológicas de Ado para activar los receptores A2B de baja afinidad (EC50 ab. 24 μ M) (Fredholm BB, 2001).

Se ha descrito que el papel principal de la adenosina en la angiogénesis es su capacidad para regular la producción de factores pro y antiangiogénicos, mediados predominantemente a través de los receptores A2A y A2B (Auchampach JA. 2007).

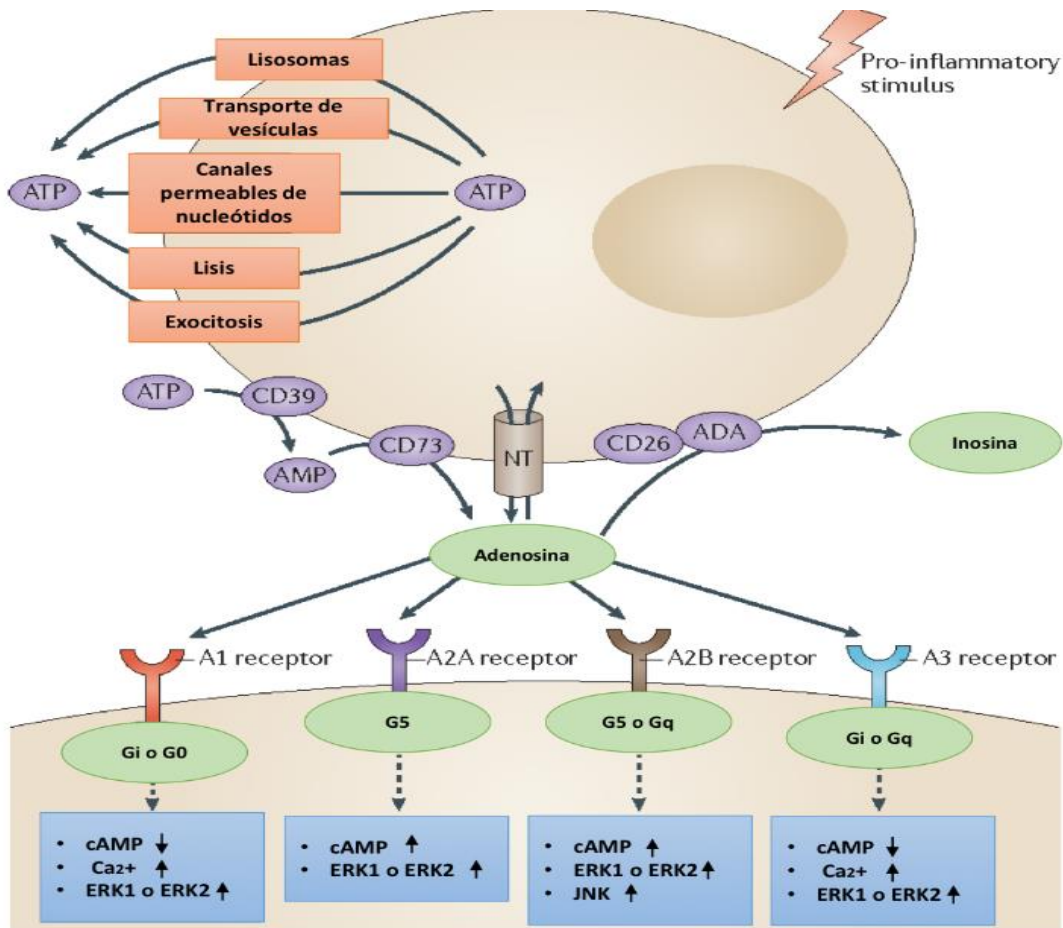


Figura 3. Biosíntesis y catabolismo de la Ado y las vías del segundo mensajero acopladas a los receptores de Ado. La aparición de eventos patológicos promueve una acumulación extracelular de ATP, que es seguida por su degradación secuencial a AMP por la enzima CD39 de la superficie celular y a la adenosina por CD73. La adenosina extracelular puede unirse a cuatro receptores diferentes acoplados a la proteína G que estimulan (A2A y A2B) o inhiben (A1 y A3) la actividad de la adenil ciclasa. La estimulación de los receptores A1 y A3 también puede estimular la liberación de iones de calcio de las reservas intracelulares. Además, todos los receptores de adenosina se acoplan a las rutas de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), incluidas la quinasa 1 regulada por señal extracelular ERK1, ERK2 y p38 MAPK. En el espacio extracelular, las concentraciones de adenosina están controladas por la adenosina desaminasa (ADA; que cataliza la conversión de adenosina en inosina) y por la actividad de los transportadores de nucleótidos (NT). Tomado y modificado de Antonioli L. et al, 2013.

3.8. A1R

A1R tiene una función inhibidora en la mayoría de los tejidos en los que se expresa. La activación de A1R provoca la unión de la proteína Gi1 / 2/3 o Go. La unión de Gi1 / 2/3 provoca una inhibición de la adenilato ciclasa y, por lo tanto, una disminución en la concentración de cAMP (Fredholmet al., 2007). Tanto A1R como A3R inhiben la adenilato ciclasa (Fishman P, et al., 2009).

En cáncer, se ha reportado que la activación de estos receptores disminuye la expresión de p27, con lo que se desregula la actividad de CDK4, en el caso particular de células de colon se induce apoptosis al utilizar agonistas para este receptor y otro de sus efectos observados es que en células de carcinoma de mama media la progresión del ciclo celular y la proliferación (Kalhan et al., 2012, Mirza et al., 2005).

3.9. A2AR

La actividad de A2AR está mediada por proteínas G que activan adenilato ciclasa. (Jacobson et al., 2006). En contraste a A1R y A3R, el receptor A2AR inhibe la inflamación destructiva al inducir AMP cíclico, mientras promueve células T reguladoras y cicatrización de la herida (van der Putten C. et al. 2009, Macedo L. et al, 2007).

La adenosina ha demostrado ser una molécula antiinflamatoria por excelencia (Sullivan. 2004). En estudios recientes, se ha demostrado el efecto antiinflamatorio de la activación de A2AR en la regulación de las funciones de los neutrófilos, incluyendo la disminución de la expresión y potencial de adhesión de moléculas de adhesión alpha 4/beta integrina, previniendo la expresión y liberación de TNF-alpha, MIP -1alpha/CCL3 (Mc Coll, 2006). Las señales de A2AR inducen la fosforilación MAPK3/1 ERK1/2 en células del sistema inmune (Antonioli L.et al., 2013) lo que resulta en la supresión de citocinas proinflamatorias vía fosforilación de c-FOS (Koga K. et al, 2009).

En los tumores, la Ado extracelular es pro-tumorigénica a través de su capacidad conocida para inhibir la función de las células T y apoyar la angiogénesis. Esto se debe a un efecto directo sobre los vasos sanguíneos (Desai A, 2005), pero también puede deberse al hecho de que la señalización A2AR en los macrófagos incrementa la producción de VEGF (Ramanathan M, 2007)

En cáncer, A2AR y A2BR se les atribuyen los efectos inmunosupresores de la Ado, y la capacidad de promover la proliferación y migración celular, ya que estos

comparten una vía de señalización basada en la activación de la adenilato ciclasa y la acumulación de AMPc intracelular (Beavis et al., 2012).

3.10. A2BR

Este receptor estimula la actividad de la adenilato ciclasa en presencia de Ado. También, al interactuar con netrin-1 provoca el alargamiento del axón (Mediero et al., 2012). A2BR es un receptor de baja afinidad que se cree que permanece en silencio en condiciones fisiológicas y que se activa como consecuencia del aumento de los niveles extracelulares de Ado (Ryzhov et al., 2008).

Este receptor se encuentra sobre expresado en algunas condiciones patológicas donde se presenta hipoxia, una de estas condiciones es en los tumores sólidos (Kasama H, et al., 2015).

Se ha reportado que la Ado generada por la actividad de CD73 endotelial limita el acceso de las células T reactivas del tumor a través de la vía de activación del A2BR. Es por esto que la activación del receptor A2B dificulta la adhesión de leucocitos al endotelio por medio de señales intracelulares dependientes de AMPc, que pueden al mismo tiempo aumentar la actividad y expresión de CD73 (Bours et al., 2006).

3.11. A3R

En el caso del A3R, se ha comprobado que la Ado ejerce sus efectos proliferativos por medio de la actividad de este receptor. Así mismo, se ha demostrado que este mismo receptor se encuentra expresado en algunos tipos de cáncer, como en glioblastoma multiforme y cáncer de mama (Merighi et al., 2005, Ledderose et al., 2016). Se demostró que A3AR promueve la angiogénesis a través de un mecanismo paracrina que implica la expresión diferencial y la secreción de factores angiogénicos de los mastocitos (Feoktistov I, 2003).

4. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aun cuando se conoce que la infección por VPH de alto riesgo es el factor etiológico que participa en el desarrollo del CaCu, se desconocen los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden la respuesta inmune y aumentan su potencial proliferativo y migratorio. Recientemente, se ha propuesto que la generación de Ado a través de la actividad de CD73 en el microambiente tumoral y su interacción con receptores A2AR y A2BR favorece la proliferación y migración celular (Antonioli et

al, 2013), por lo que la señalización adenosinérgica puede constituir uno de los factores claves para comprender las actividades protumorales.

Nuestro grupo de investigación ha determinado la expresión y actividad funcional de CD73 (Mora-García et al, 2017) así como la expresión de los receptores A2A y A2B en células tumorales de CaCu (García-Rocha et al, 2018). Por tanto, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar si Ado participa en la proliferación e inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal y favorece la capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu.

5. HIPÓTESIS

La Ado inducirá cambios morfológicos que modificarán la capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu a través de su interacción con los receptores A2A y A2B.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la participación de la Ado en la inducción de cambios morfológicos y su efecto sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Objetivos particulares

- Analizar el efecto de Ado sobre la proliferación de células tumorales de CaCu.
- Analizar el efecto de Ado sobre la viabilidad de células tumorales de CaCu.
- Analizar el efecto de Ado sobre cambios morfológicos en células tumorales de CaCu.
- Analizar el efecto de Ado sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

7. METODOLOGÍA

Cultivo celular

Se utilizaron células de la línea MS751 (VPH18+) de CaCu, las cuales fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC USA). Las células tumorales fueron cultivadas *in vitro* utilizando medio de cultivo (MC) consistente de medio RPMI-1640 GibcoBRL (Life Technologies, USA) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) dializado (GibcoBRL, Life Technologies, USA). Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora (Forma Scientific) bajo esterilidad a una temperatura constante de 37°C con 5% de CO₂ en un ambiente húmedo saturante.

Diseño experimental

Para llevar a cabo los diferentes experimentos, las células tumorales fueron cultivadas bajo las diferentes condiciones experimentales:

- 1- Condición Basal (Solo MC).
- 2- MC + Ado (10µM).
- 3- MC + Ado (10 µM) + ZM 241385 (Antagonista de A2AR)
- 4- MC + Ado (10µM) + MRS 1754 (Antagonista de A2BR) (10µM).
- 5- MC + CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (10µM).
- 6- MC + CGS-21680 (10µM) + MRS 1754 (antagonista A2BR) (10µM)
- 7- MC + CGS-21680 (10µM) + ZM 241385 (antagonista de A2AR) (10µM).
- 8- MC + MRS 1754 (10µM).
- 9- MC + ZM 241385 (10µM).

Las células tumorales fueron incubadas con los antagonistas 30 minutos antes de adicionar adenosina o los agonistas de los receptores de Ado.

Proliferación celular

La proliferación de las células tumorales cultivadas bajo las diferentes condiciones se determinó por citometría de flujo mediante marcaje celular con carboxifluoresceína diacetato N-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich). Una molécula de carboxifluoresceína es una molécula de fluoresceína con un grupo carboxilo

añadido, la cual se utiliza comúnmente como agente trazador con una longitud de onda de excitación de 494 nm y una longitud de onda de emisión de 518 nm. Para este marcaje, las células tumorales fueron incubadas en presencia de 1 μ M de CFSE durante 15 min. Después de dos lavados con PBS, alícuotas de 100,000 células marcadas fueron cultivadas durante 48 horas en cajas de 6 pozos, con cada uno de los tratamientos antes mencionados. Pasadas 48 horas, las células fueron cosechadas mediante tratamiento con solución de EDTA, se lavaron dos veces con PBS+3% SFB y se procedió a analizar mediante el citómetro de flujo la fluorescencia en cada caso. Los resultados fueron analizados a través del software Summit v4.3.

Viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada a través de la tinción con el colorante 7-AAD, la cual se basa en que el 7-AAD es un compuesto químico fluorescente con una longitud de onda de excitación de 543 nm y una longitud de onda de emisión de 655 nm que se intercala en el ADN bicatenario, debido a que tiene una alta afinidad por la región rica en guanina-citosina. Las células tumorales fueron incubadas en presencia de 1 μ M de 7-AAD durante 15 min y posteriormente lavadas dos veces con PBS. Alícuotas de 100 000 células fueron cultivadas durante 48 en cajas de 6 pozos bajo los diferentes tratamientos antes mencionados. Al término del cultivo, las células fueron cosechadas y marcadas con 5 μ L de 7-AAD en cada tubo incubando durante 10 minutos a 36°C protegidas de la luz. Las células con membranas comprometidas fueron teñidas con 7-AAD. Por otro lado, una muestra de células tumorales fue tratada con 100 μ L de peróxido de hidrógeno al 1% durante 45 minutos a 36°C, la cual fue marcada y utilizada como control positivo de muerte celular.

La muerte celular se determinó mediante citometría de flujo recolectando un mínimo de 100.000 eventos con ayuda de un equipo Coulter Epics Ultra Cytometer de Flujo (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) para determinar el porcentaje de células tumorales positivas para 7-AAD. Los resultados fueron analizados a través del software Summit v4.3.

Análisis de la morfología celular

Para analizar la morfología celular, 50,000 células MS751 fueron cultivadas en cajas de 6 pozos, cada pozo con su condición específica, en 2 mL de medio RPMI-1640 libre de rojo fenol 1640 suplementado con 1% SFB dializado (Medio de cultivo) durante 48 horas, aplicando las condiciones en t0 y pasadas 24 hrs. Después de 48 horas de cultivo se tomaron fotografías de campos al azar, de los cuales se contaron 100 células de cada condición para identificar qué porcentaje presentaba prolongaciones, seleccionando las imágenes más representativas de cada

condición de acuerdo con el porcentaje. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss con cámara para análisis de imagen (Carl Zeiss AG, Oberkichen Germany) con objetivo 40x, utilizando contraste de fases.

Migración celular

Para determinar la migración de las células tumorales, se realizó un ensayo de rasgado, herida o “scratch” de la siguiente manera: 400,000 células fueron cultivadas en placas de 6 pozos, cada uno con 2 mL de MC con 10% de SFB. Cuando los pozos presentaron una confluencia de 90-100%, se retiró el MC y se cultivó durante 24 horas con MC sin SFB. Pasadas estas 24 horas, se retiró el MC y se hizo un rasgado con una punta de micropipeta sobre la monocapa de células tumorales. Posteriormente se eliminaron las células desprendidas con dos lavados suaves con PBS, en seguida se tomaron fotografías y se determinaron mediciones de la amplitud del rasgado (Tiempo inicial, T₀) con ayuda de un microscopio invertido con cámara y con un objetivo de 10x. Después, las células fueron cultivadas en presencia de las condiciones antes mencionadas, pre-incubando por 30 minutos los pozos con antagonistas antes de agregar adenosina o el CGS-21680.

Transcurridas 24 horas de incubación, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado suave con PBS y posteriormente se tomaron fotografías con el microscopio invertido con cámara, con un objetivo 10x. El análisis de las fotografías se hizo a través del programa de procesamiento digital ImageJ. Con ayuda de este programa, se determinó el área recorrida por las células entre el tiempo inicial (T₀) y a las 24 hrs de cultivo (T₁).

Análisis estadístico

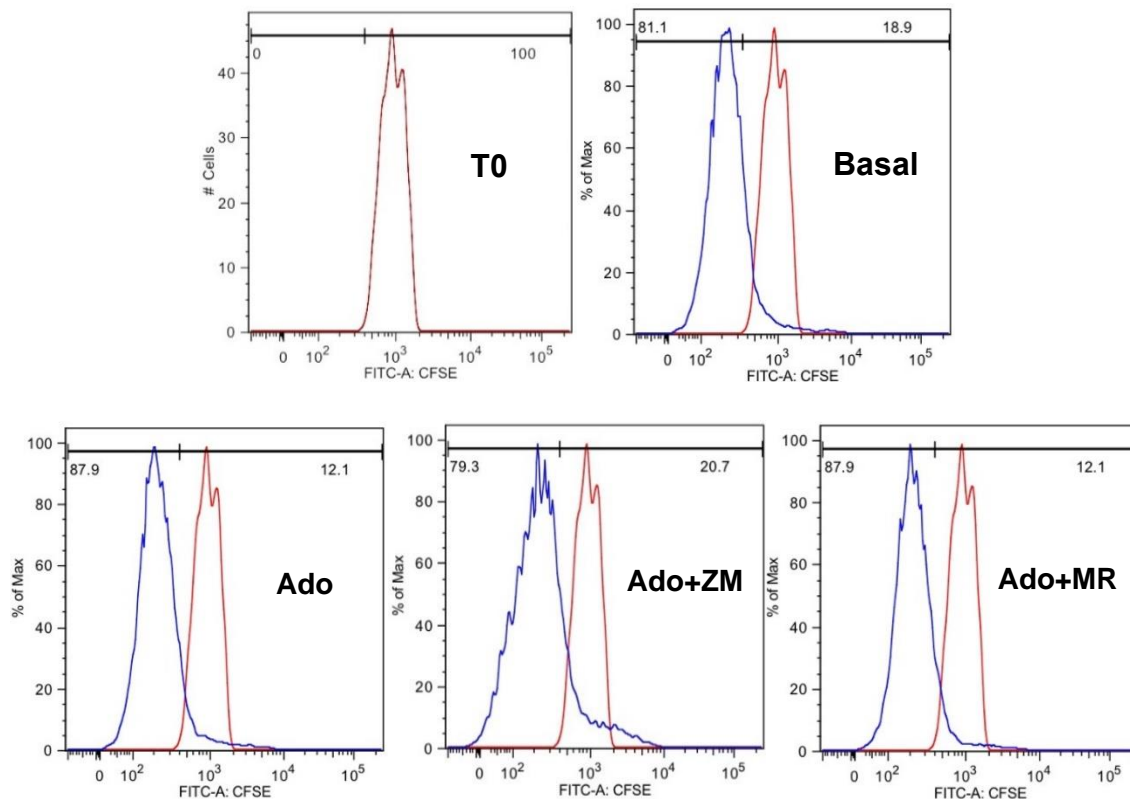
Cada uno de los experimentos se llevó a cabo por triplicado. Se utilizó análisis de varianza no paramétrico a través de la prueba de U de Mann-Whitney, por medio del software Graphpad prisma versión 7 en los resultados del ensayo de scratch.

8. RESULTADOS

Efecto de Ado sobre la proliferación de las células tumorales MS751.

Se ha reportado que la adenosina puede promover el crecimiento tumoral, ya sea induciendo la proliferación, migración y metástasis de las células tumorales mediante la interacción con receptores para Ado, primordialmente A_{2A} y A_{2B} (Otha

et al, 2016). Para analizar el efecto de Ado sobre la proliferación de las células MS751, 100,000 células marcadas previamente con CFSE fueron cultivadas durante 48 horas bajo las diferentes condiciones de cultivo en placas de 6 pozos con un volumen final de 2mL, agregando MC con las condiciones en T0 y pasadas 24 horas. Posteriormente se determinó la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) mediante citometría de flujo. Se tomo la IMF de la condición en fresco para señalar los porcentajes de las poblaciones celulares que proliferaron en cada condición (Figura 4). La adición de Ado y CGS-21680 incremento ligeramente en 6.8% y 5.6%, respectivamente, la proliferación de las células MS751. La adición del antagonista de A2AR (ZM241385) en presencia de Ado y CGS-21680 redujo la proliferación de las células MS751 producida por ambos agonistas, en 1.8% y 11.2% respectivamente. Sin embargo, la adición del antagonista de A2BR (MR1754) en presencia de Ado y CGS-21680, incremento la proliferación en un 6.7% y 4.5%, respectivamente. Asimismo, la adición de los antagonistas ZM241385 y MR 1754 en ausencia de Ado o CGS-21680, se diferenciaron de la proliferación basal por 3.5% y 4.2%, respectivamente (Gráfica 1). Lo anteriormente mencionado sugiere que la señalización de Ado o del agonista CGS-21680 no influye en la proliferación de las células tumorales MS751.



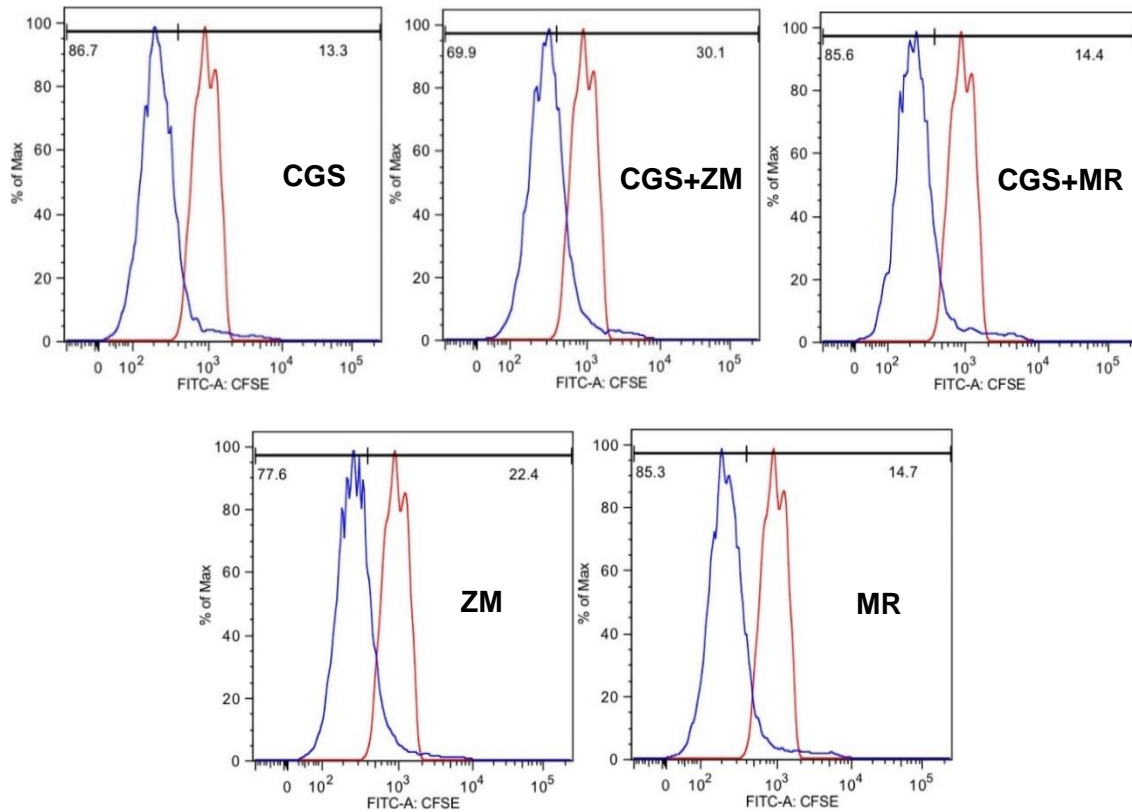
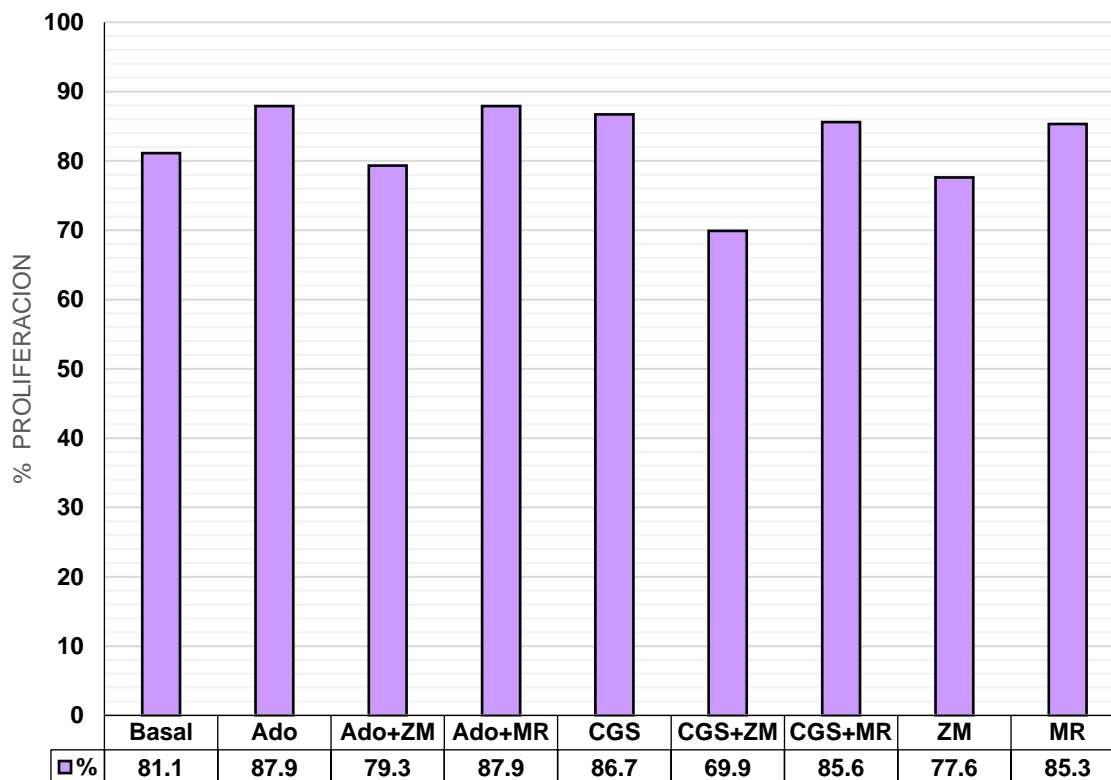


Figura 4. Efecto de Ado y del agonista de A2AR/A2BR sobre la proliferación de las células MS751. Histogramas de células tumorales MS751 previamente marcadas con CFSE fueron cultivadas durante 48 hrs bajo las siguientes condiciones: Medio de Cultivo Basal (Basal), 10 μ M Adenosina (Ado); Ado + ZM241385 (antagonista del A2AR) (Ado+ZM); Ado + MRS1754 (antagonista del A2BR) (Ado+MR); 10 μ M CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ZM; CGS+MR; ZM y MR. Los antagonistas ZM y MR fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de Ado o CGS a una concentración de 10 μ M. La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue determinada mediante citometría de flujo.

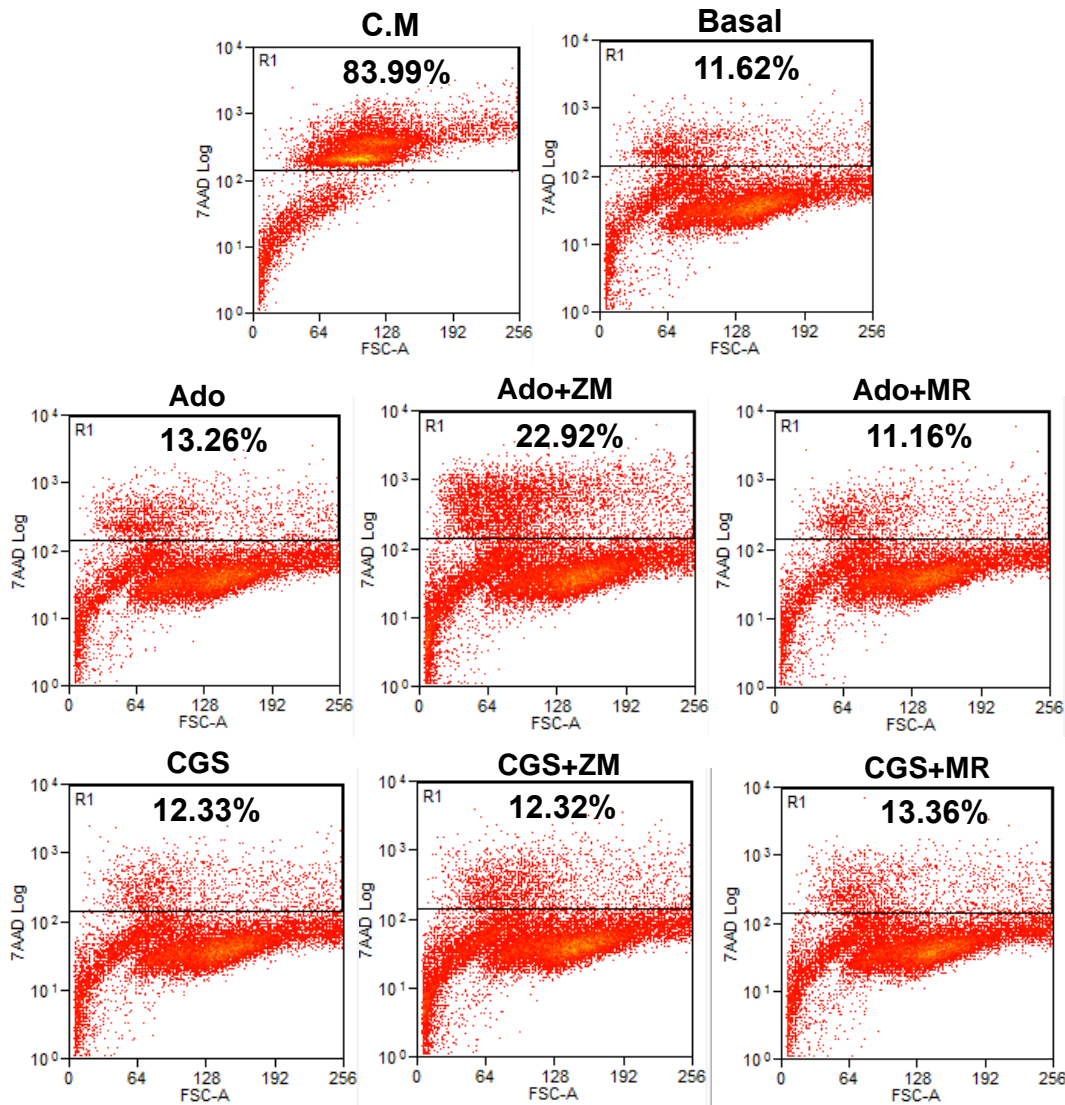


Gráfica 1. Representación gráfica del efecto de Ado y del agonista de A2AR/A2BR sobre la proliferación de las células MS751. Gráfica comparativa de los porcentajes proliferativos de cada condición, previamente marcadas con CFSE y cultivadas durante 48 hrs bajo las siguientes condiciones: Medio de Cultivo Basal (Basal), 10 μ M Adenosina (Ado); Ado + ZM241385 (antagonista del A2AR) (Ado+ZM); Ado + MRS1754 (antagonista del A2BR) (Ado+MR); 10 μ M CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ZM; CGS+MR; ZM y MR. Los antagonistas ZM y MR fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de Ado o CGS a una concentración de 10 μ M.

Efecto de Ado sobre la viabilidad de células de CaCu

Con la finalidad de analizar el efecto de Ado y del agonista de A2AR y A2BR (CGS-21680) sobre la viabilidad de las células tumorales MS751, las células tumorales fueron incubadas en presencia del reactivo 7-AAD para viabilidad celular, y posteriormente se analizó el porcentaje de células no viables mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 4, el porcentaje de células no viables en la condición basal de cultivo fue de 11.62%; mientras que en el control de muerte celular (C.M), en presencia de H₂O₂, el porcentaje de células no viables fue de 83.99%. La adición de Ado a las células tumorales tuvo un ligero incremento en la muerte de las células tumorales, ya que solo se encontró 13.26% de células no viables. De manera interesante, cuando se adicionó el antagonista ZM241385 en

presencia de Ado, se observó un incremento notable en el porcentaje de células no viables (22.92%); mientras que la adición de MRS1754 en presencia de Ado, mantuvo la viabilidad de las células tumorales similar a la condición basal. Por otro lado, la adición del agonista CGS-21680 ya sea solo o en presencia de los antagonistas ZM2413 y MRS1754, indujo 12.33%, 12.32% y 13.36% de células MS751 no viables. No obstante, la adición solo del antagonista ZM2413 indujo 15.79% de células no viables (Figura 5, Gráfico 2). Sugiriendo que la señalización a través del A2AR puede proteger a las células tumorales de la inhibición de la proliferación y muerte celular ante la presencia de Ado.



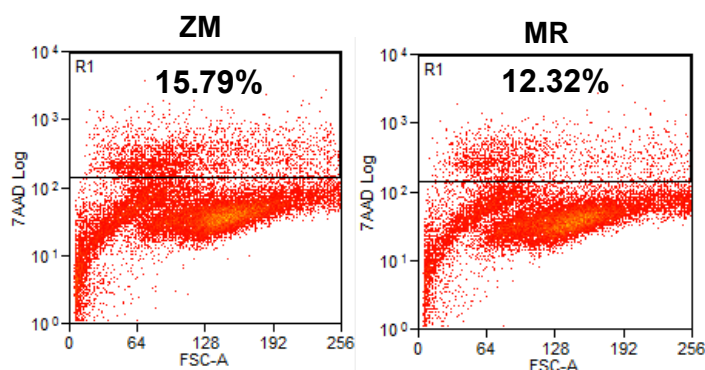
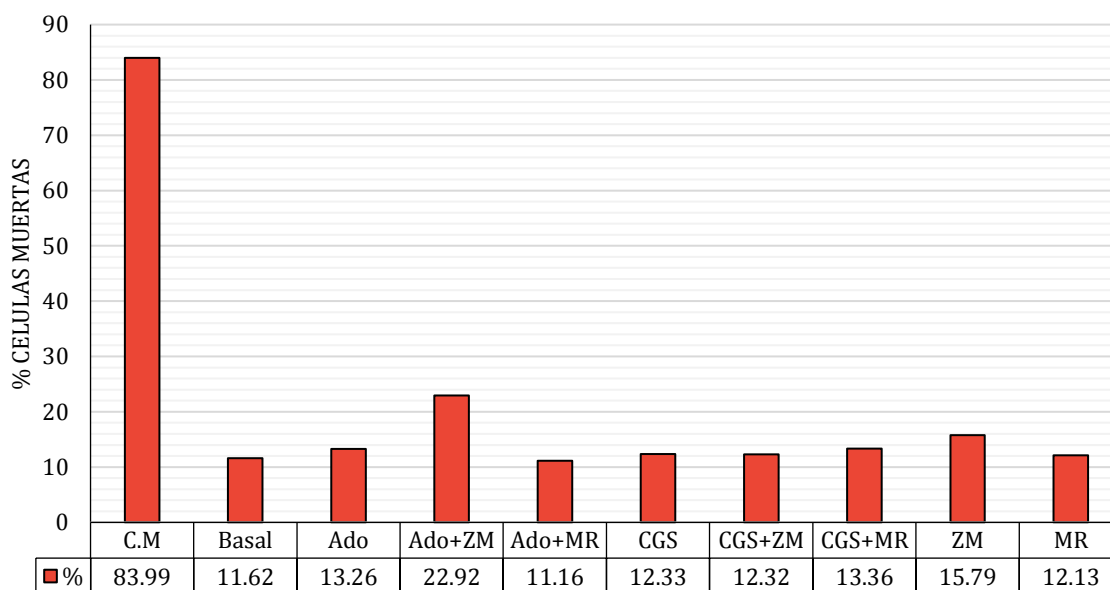


Figura 5. Efecto de Ado sobre la viabilidad de las células de CaCu. Células tumorales de CaCu de la línea MS751 fueron cultivadas durante 48 hrs bajo las siguientes condiciones: con solo medio de cultivo basal (Basal); en presencia de 1% de Peróxido de Hidrógeno, control positivo de muerte celular (C.M); 10µM de Adenosina (Ado); Ado + ZM241385 (antagonista del A2AR) (Ado+ZM); Ado + MRS1754 (antagonista de A2BR) (Ado+MR); 10µM de CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ZM; CGS+MR; ZM y MR. Los antagonistas ZM y MR fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de Ado o CGS a una concentración de 10µM. Después de 48hrs de cultivo se adicionó 5µL del colorante 7-AAD y la viabilidad celular se analizó mediante citometría de flujo. Se muestra la selección de la región correspondiente a las células viables en una gráfica Dot plot FSC-A vs 7-AAD de un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.



Gráfica 2. Representación gráfica del efecto de Ado sobre la viabilidad de las células de CaCu. Se muestran los porcentajes de células MS751 muertas (no viables) teñidas con 7-AAD, después de 48hrs de cultivo en presencia de los siguientes tratamientos: con solo medio de cultivo basal (Basal); en presencia de 1% de Peróxido de Hidrógeno, control

positivo de muerte celular (C.M); 10µM de Adenosina (Ado); Ado + ZM241385 (antagonista del A2AR) (Ado+ZM); Ado + MRS1754 (antagonista de A2BR) (Ado+MR); 10µM de CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ZM; CGS+MR; ZM y MR. Los antagonistas ZM y MR fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de Ado o CGS a una concentración de 10µM.

Efecto de Ado sobre la morfología de células tumorales de CaCu.

Es conocido que Ado favorece la capacidad migratoria de las células tumorales al inducir cambios morfológicos de tipo mesenquimal (Ohta 2016; Antonioli et al, 2016). Con la finalidad de analizar el efecto de Ado sobre la morfología de células tumorales de CaCu, células MS751 fueron cultivadas durante 48 hrs en presencia de las diferentes condiciones de cultivo.

Después del tiempo de cultivo, se observó que la adición de Ado, a diferencia de la condición basal, modificó la unión y distribución de las células tumorales MS751 en el cultivo, además de inducir cambios morfológicos de tipo mesenquimal caracterizados por la presencia de prolongaciones del citoesqueleto en forma dendrítica y de filopodios. De manera interesante, la adición del antagonista ZM241385 disminuyó notablemente la formación de las prolongaciones celulares, observándose células de mayor tamaño, amorfas y muertas, a diferencia de aquellas en donde se adicionó MRS1754, en donde solo se observó disminución de la formación de prolongaciones celulares (Figura 6).

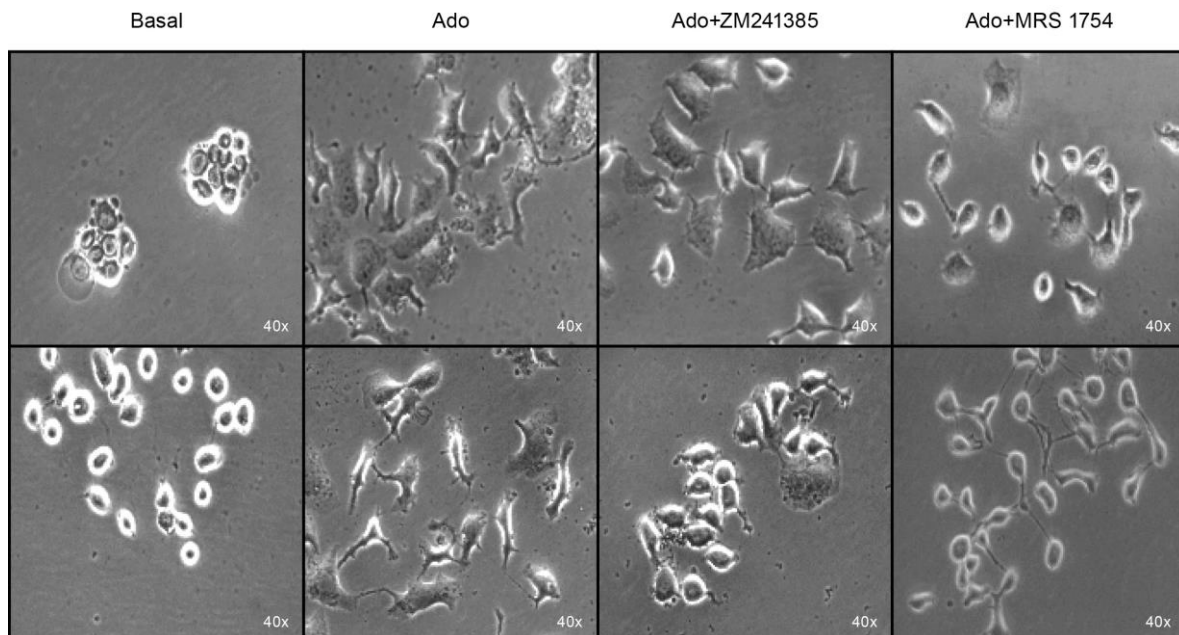


Figura 6. Efecto de Ado en la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 48 hrs en presencia de medio de cultivo basal (Basal); 10 μ M de Adenosina (Ado); Ado+ ZM241385 (antagonista de A2AR); Ado + MRS1754 (antagonista de A2BR). Los antagonistas fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de Ado a una concentración de 10 μ M. Se muestran fotografías con objetivo 40x en contraste de fases. Se muestran los datos de un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

Por otra parte, la adición de CGS-21680, agonista de A2AR y A2BR, al cultivo de células MS751, también indujo cambios en la organización de las células en el cultivo, modificando la distancia entre células, además de cambios morfológicos de tipo mesenquimal similares a los inducidos por Ado, principalmente con prolongaciones de tipo filopodio. La adición del antagonista ZM 241385, a diferencia del antagonista MRS1754, disminuyó la formación de las prolongaciones celulares, además de observarse la presencia de células muertas en el cultivo celular. En contraste, la adición de MRS 1754, generó menor cantidad células muertas, y las prolongaciones celulares fueron mantenidas (Figura 7).

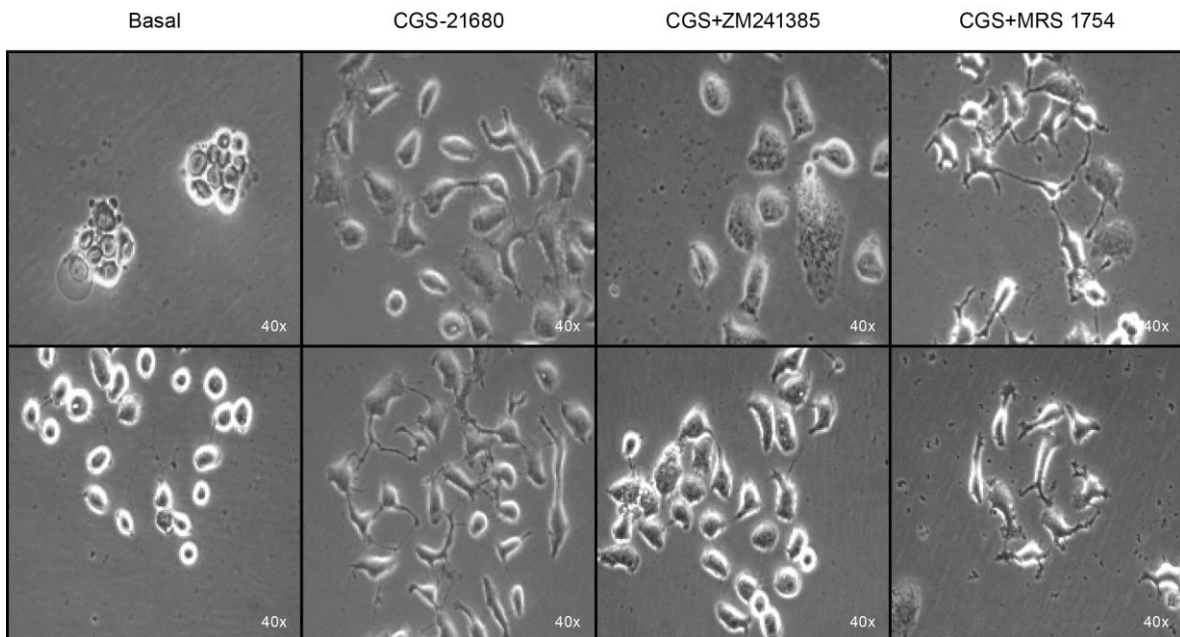


Figura 7. Efecto de CGS-21680 en la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 48 hrs en presencia de medio de cultivo basal (Basal); 10 μ M de CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ ZM241385 (antagonista de A2AR); y CGS+ MRS1754 (antagonista de A2BR). Los antagonistas fueron adicionados 30 minutos antes de la adición

de CGS a una concentración de 10 μM . Se muestran fotografías con objetivo 40x en contraste de fases. Se muestran los datos de un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

Por otra parte, la adición de ya sea ZM241385 o MRS1754 al cultivo de las células tumorales MS751, no indujo cambios morfológicos de tipo mesenquimal en las células tumorales (Figura 8). Sugiriendo que la señalización de Ado o CGS-21680 es importante para la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en las células tumorales.

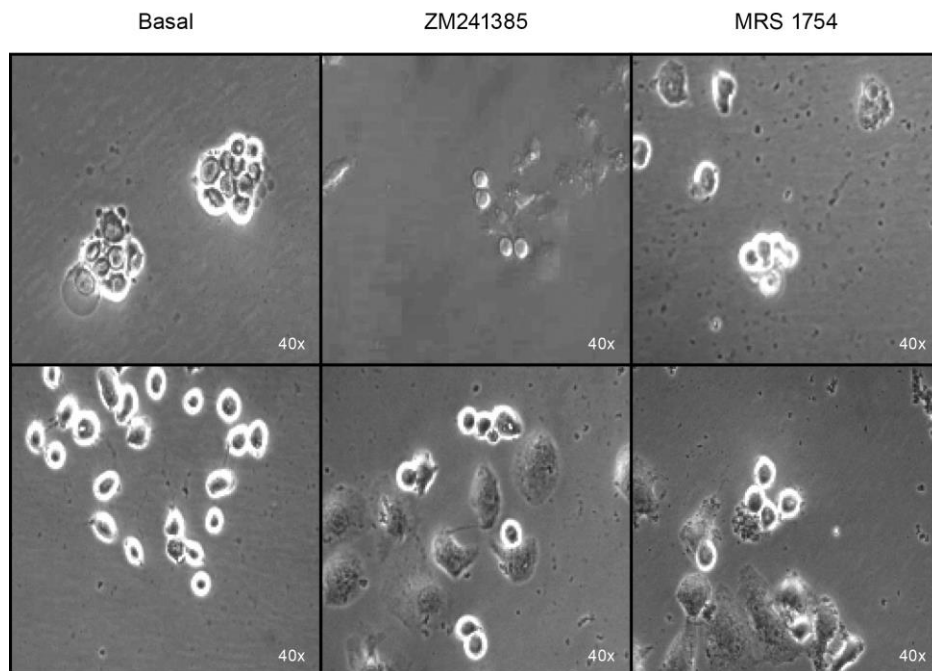


Figura 8. Efecto de ZM241385 y MRS1754 en la inducción de cambios morfológicos de tipo mesenquimal en células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 48 hrs en presencia de medio de cultivo basal (Basal); ZM241385 (antagonista de A2AR); y MRS1754 (antagonista de A2BR). Se muestran fotografías con objetivo 40x en contraste de fases. Se muestran los datos de un ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

Efecto de Ado sobre la migración de células tumorales de CaCu.

Para examinar si el tratamiento con Ado modificaba la capacidad migratoria de las células tumorales MS751, se utilizó un ensayo de Scratch o herida en cultivos en monocapa de las células tumorales cultivadas durante 24 hrs bajo las diferentes condiciones. Después de generar la herida en la monocapa celular, los cultivos

fueron lavados para eliminar las células desprendidas y mantenidas en cultivo bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T0) y después de 24 hrs.

El área del rasgado a T0 se consideró como el 100% del área a cubrir. Con ayuda del programa ImageJ, se determinó el número de pixeles que presentaba esta área al tiempo T0 y después de 24 horas. Con esos datos se calculó el porcentaje de cierre del rasgado en cada condición, como se describió en la metodología.

Bajo la condición basal de cultivo, se observó que las células tumorales presentaron un porcentaje de cierre de 33%, mientras que la adición de Ado incrementó el cierre del área lesionada a un 49.55%. Es importante mencionar que la adición del antagonista ZM241385 al cultivo de las células MS751 en presencia de Ado, redujo la capacidad migratoria a 20.98%; mientras que la adición del antagonista MRS1754, mantuvo la migración de las células de manera similar a la condición basal (Figura 9, Gráfica 3).

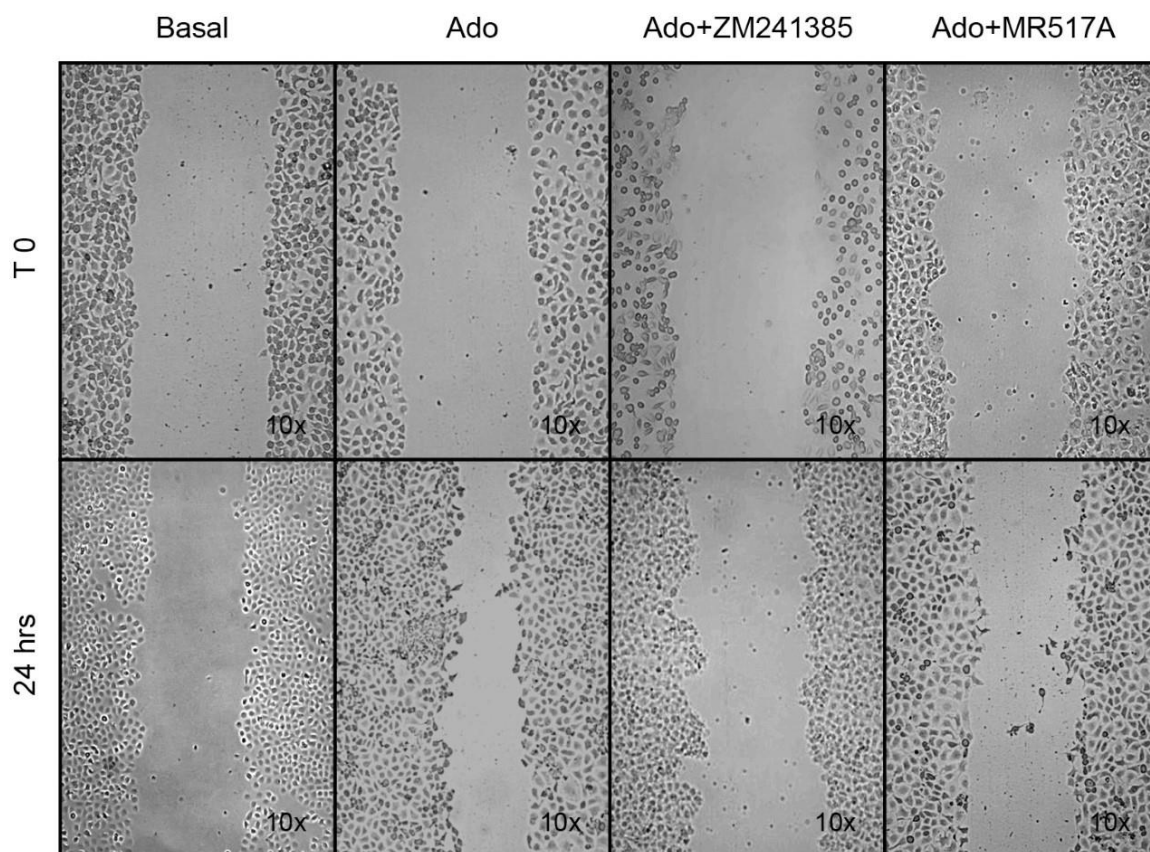
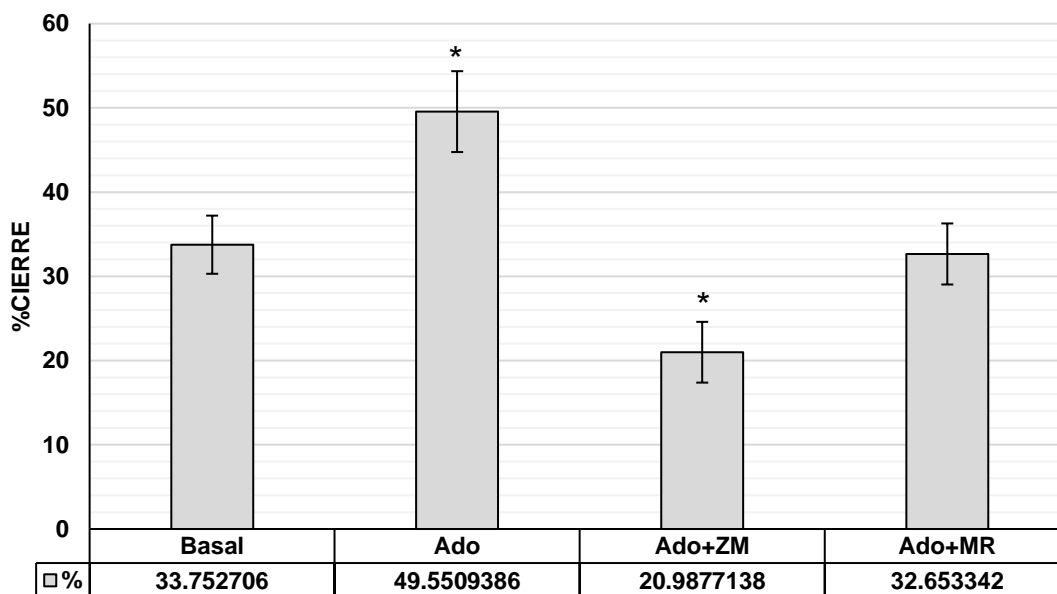


Figura 9. Efecto de Ado sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 24 hrs en presencia de medio de cultivo basal (Basal); 10 μ M de Adenosina (Ado); Ado + ZM241385 (antagonista de A2AR); Ado + MRS1754 (antagonista de A2BR). Los antagonistas fueron adicionados 30 minutos antes

de la adición de Ado a una concentración de $10\mu\text{M}$. La monocapa celular fue rasgado con la punta de una micropipeta de $10\mu\text{L}$, los cultivos fueron lavados para eliminar las células desprendidas con solución de lavado y posteriormente mantenidos bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T0) y después de 24 hrs cultivadas bajo las condiciones. Se muestran fotografías con objetivo 10x de un ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.



Grafica 3. Efecto de Ado sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu.

Células MS751 fueron cultivadas durante 24 hrs en presencia de medio de cultivo (Basal); $10\mu\text{M}$ de Adenosina (Ado); Ado + ZM241385 (antagonista de A2AR); Ado + MRS1754 (antagonista de A2BR). Los antagonistas fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de Ado a una concentración de $10\mu\text{M}$. La monocapa celular fue rasgado con la punta de una micropipeta, los cultivos fueron lavados para eliminar las células desprendidas y posteriormente mantenidos bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T0) y después de 24 hrs. Se muestran los porcentajes de cierre del área lesionada después de 24 hrs en cada condición de cultivo. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente. * denota la diferencia significativa a una $p < 0.05$ en relación con la condición basal.

Por otra parte, la adición del agonista CGS-21680 incrementó la capacidad de cierre de las células MS751 a un 42.9%, y la adición del antagonista ZM241385 en presencia de CGS-21680 mantuvo la capacidad migratoria similar a la condición

basal (30%); mientras que la adición de MRS 1754 en presencia de CGS-21680, incremento la capacidad de cierre a 39% (Figura 10, Gráfica 4).

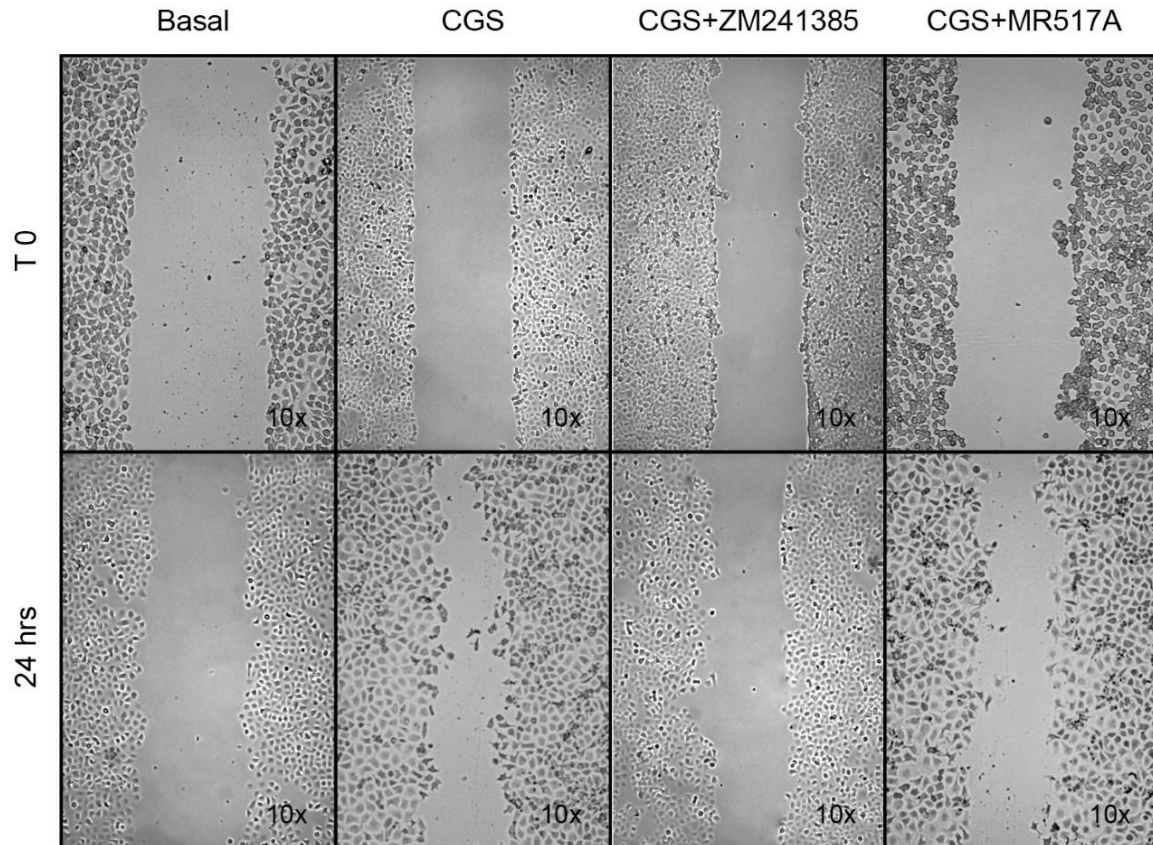
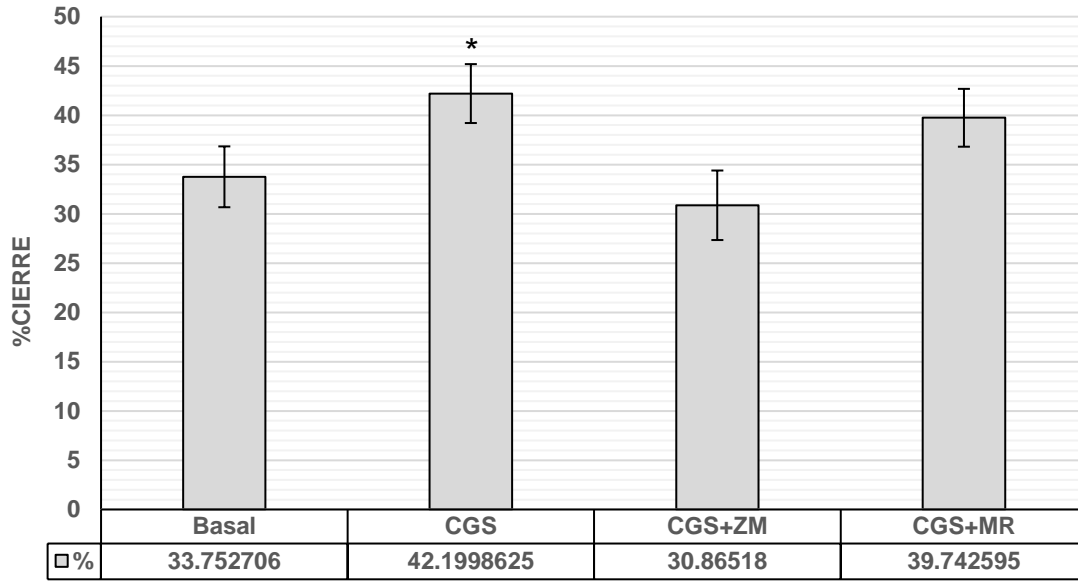


Figura 10. Efecto de Efecto de CGS-21680 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 24 hrs en presencia de medio de cultivo basal (Basal); 10 μ M de CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ ZM241385 (antagonista de A2AR); y CGS+ MRS1754 (antagonista de A2BR). Los antagonistas fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de CGS a una concentración de 10 μ M. La monocapa celular fue rasgada con la punta de una micropipeta, los cultivos fueron lavados con solución de lavado para eliminar las células desprendidas y posteriormente mantenidos bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T0) y después de 24 hrs cultivadas bajo las condiciones. Se muestran fotografías con objetivo 10x de un ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.



Gráfica 4. Efecto de CGS-21680 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 24 hrs en presencia de medio de cultivo (Basal); 10 μ M de CGS-21680 (Agonista de A2AR y A2BR) (CGS); CGS+ ZM241385 (antagonista de A2AR); y CGS+ MRS1754 (antagonista de A2BR). Los antagonistas fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de CGS a una concentración de 10 μ M. La monocapa celular fue rasgada con la punta de una micropipeta, los cultivos fueron lavados para eliminar las células desprendidas y posteriormente mantenidos bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T0) y después de 24 hrs. Se muestran los porcentajes de cierre del área lesionada después de 24hrs en cada condición de cultivo. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente. * denota la diferencia significativa a una $p < 0.05$ en relación con la condición basal.

Finalmente, con la finalidad de analizar el efecto *per se* de los antagonistas ZM241385 y MRS1754 sobre la capacidad migratoria de las células tumorales MS751, se observó que las células tumorales cultivadas con medio de cultivo basal presentaron un porcentaje de cierre promedio de 34%, mientras que las células tratadas con ZM241385 y MRS1754 mostraron un porcentaje de cierre de (26% y 32%) respectivamente (Figura 11, Gráfica 5).

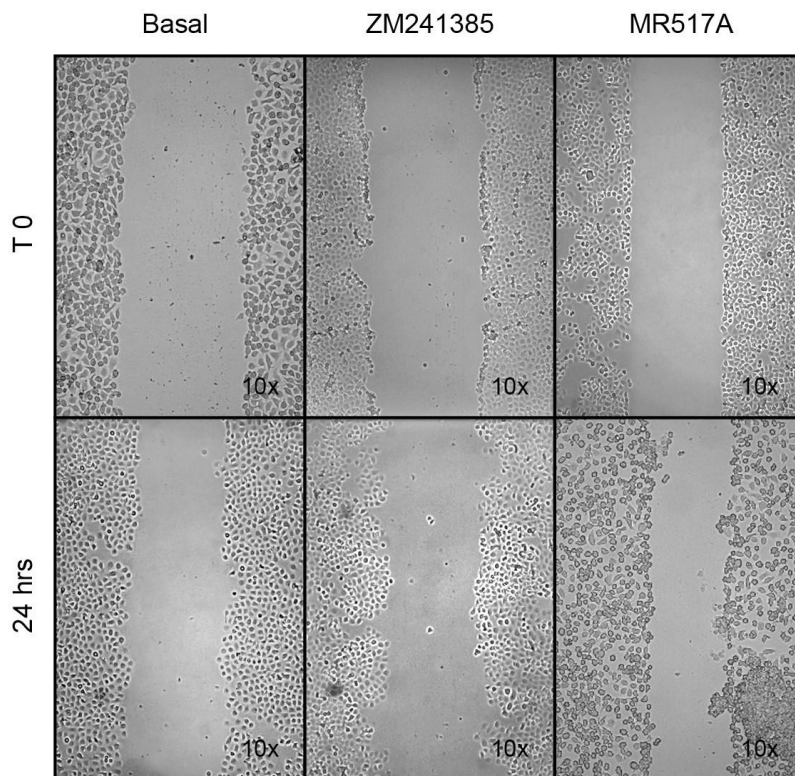
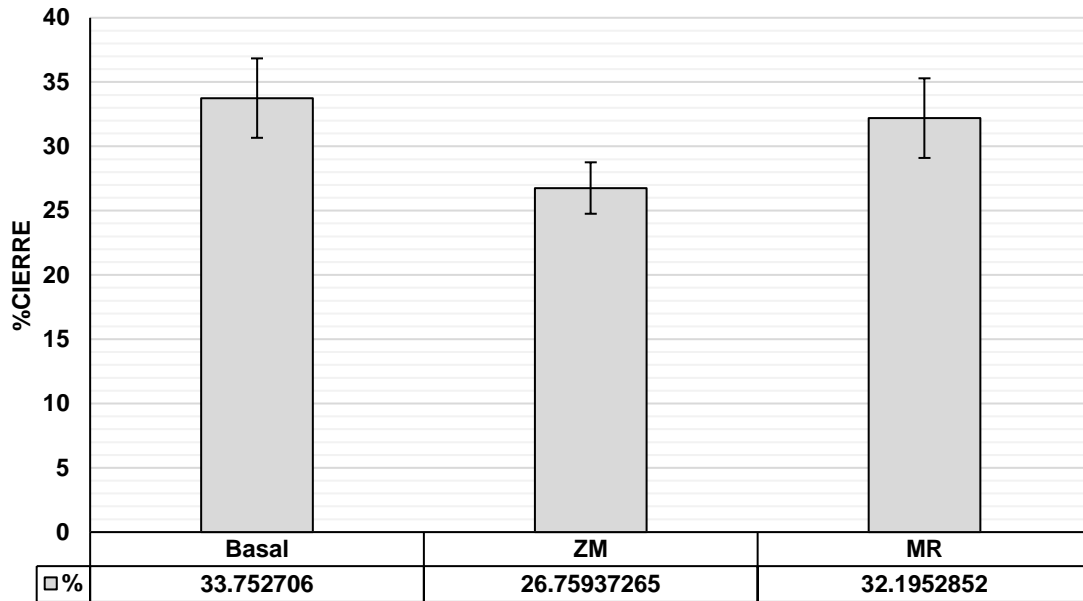


Figura 11. Efecto de ZM241385 y MRS1754 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 24 hrs en presencia de medio de cultivo (Basal); ZM241385 (antagonista de A2AR); y MRS1754 (antagonista de A2BR). La monocapa celular fue rasgada con la punta de una micropipeta, los cultivos fueron lavados con solución de lavado para eliminar las células desprendidas y posteriormente mantenidos bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T0) y después de 24 hrs cultivadas bajo las condiciones. Se muestran fotografías con objetivo 10x de un ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.



Gráfica 5. Efecto de ZM241385 y MRS1754 sobre la capacidad migratoria de células tumorales de CaCu. Células MS751 fueron cultivadas durante 24 hrs en presencia de medio de cultivo (Basal); ZM241385 (antagonista de A2AR); y MRS1754 (antagonista de A2BR). La monocapa celular fue rasgada con la punta de una micropipeta, los cultivos fueron lavados para eliminar las células desprendidas y posteriormente mantenidos bajo las mismas condiciones. Se tomaron fotografías inmediatamente después de haber realizado el rasgado (Tiempo, T₀) y después de 24 hrs. Se muestran los porcentajes de cierre del área lesionada después de 24hrs en cada condición de cultivo. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La generación de Ado en el microambiente tumoral a través de la actividad funcional de la vía adenosinérgica constituye uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, ya que la señalización de adenosina sobre receptores purinérgicos tipo 1 (A1R, A2AR, A2BR y A3R) en las células tumorales está relacionada con actividades protumorales tales como: resistencia a drogas, proliferación, migración y metástasis de las células tumorales, además de la supresión de la respuesta inmune antitumoral (Gessi et al., 2007; Airas et al., 1995; Stagg et al., 2010; Wang L et al., 2011). De hecho, en un microambiente tumoral hipóxico la expresión del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) en las células tumorales controla la expresión de diversos genes, entre ellos, los que codifican para las ectonucleotidasas CD39, CD73 (Allard B, 2014; Gacche RN, 2013; Aherne CM, et al, 2011; Feoktistov I et al., 2003; Gořrlach A et al., 2009) y factores de

crecimiento como VEGF y TGF- β , que a su vez, favorecen el flujo sanguíneo intratumoral, además de la proliferación y migración celular (Mujoomdar M, et al, 2004; Dewhirst MW, 2004; Gessi S, et al., 2011). Nuestro grupo de trabajo recientemente reportó que la señalización de Ado sobre A2AR y A2BR en células tumorales de CaCu indujo la producción de TGF- β , y que este factor es importante para mantener de manera autocrina la actividad adenosinérgica en las células tumorales (García-Rocha et al, 2019). Con base en ello, en este trabajo de investigación se analizó el efecto de Ado sobre la proliferación y viabilidad celular, así como en la inducción de cambios morfológicos y migración de células tumorales de CaCu. Para ello, células tumorales MS751 (VPH-18+) fueron cultivadas en presencia de Ado y un agonista de A2AR y A2BR (CGS-21680). De manera interesante, ambas moléculas aumentaron marginalmente la proliferación celular entre 6-8%. Sin embargo, el bloqueo de A2AR con el antagonista específico ZM241385 en presencia de adenosina y CGS-21680, disminuyó la proliferación un 1.8% y 11.2% respectivamente comparándolas con la condición basal; mientras que el bloqueo de A2BR con el antagonista específico MRS1754, indujo aumento en la proliferación celular entre 6.8 y 4.5%, sugiriendo que la señalización a través de los receptores A2A y A2B puede modular la viabilidad y el estatus proliferativo de las células tumorales de CaCu. Por otra parte, el cultivo de las células MS751 en presencia de Ado o CGS-21680, indujo cambios morfológicos de tipo mesenquimal e incrementó la capacidad migratoria de las células tumorales. La adición del antagonista ZM241385, revirtió de manera importante tanto la generación de cambios morfológicos, como la capacidad migratoria de las células tumorales. Sugiriendo un papel relevante de la señalización de Ado sobre A2AR para mantener la viabilidad y capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu.

Se ha demostrado que tanto el ATP como la Ado, generada por la hidrólisis de ATP a través de la vía adenosinérgica, al señalar los receptores purinérgicos dispuestos en la membrana de las células tumorales, causan la entrada de calcio y la activación de múltiples MAP cinasas involucradas en vías asociadas con la proliferación celular y la migración de las células tumorales (Stefano et al., 2007; Wagstaff et al., 2000; Ohta A et al., 2006, Sitkovsky MV et al., 2004). De hecho, la Ado puede activar varias vías de señalización corriente abajo; por ejemplo, se ha reportado que la activación sostenida de A2AR (receptor de alta afinidad para Ado) que reclutan proteínas G, incrementa la actividad de adenilato ciclasa, lo que conduce a la activación en serie de moléculas de señalización como PKA, PLC y PKC, resultando en un aumento de la capacidad proliferativa y migración (Ryzhov S, 2009; Fernandez Gallardo et al., 2016). Por otro lado, la señalización a través de A2BR parece regular la apoptosis, ya que, en células troncales de cáncer de mama, se ha observado que al señalar A2BR con el agonista BAY606583 aumentó la expresión de Bax, se indujo la activación de caspasa-6 y disminuyó la expresión de

Bcl-2 activando en consecuencia la apoptosis (Jafari, et al., 2017). Asimismo, a través de dicha interacción, también se ha reportado que la Ado puede regular la viabilidad celular a través de la inhibición de ERK1/2 en células troncales cancerosas (CSC), la cual puede reducir la viabilidad celular y la formación de esferoides, e inducir apoptosis en las CSCs (Ciccarelli, et al., 2016). ERK1/2 es un miembro importante de la superfamilia de la proteína cinasa activada por mitógeno, desempeña un papel crucial en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis en respuesta a diversos estímulos en el cáncer (Gee. et al., 2001; Mebratu, et al., 2009). Con base en nuestros resultados, observamos que el bloqueo de A2AR en las células MS751 cultivadas en presencia de Ado incrementó ligeramente el número de células no viables, sugiriendo entonces que la señalización de Ado a través de A2AR pueda modificar la viabilidad celular; mientras que, la señalización a través de A2BR, conduzca a disminuir la viabilidad e incrementar la capacidad migratoria de las células tumorales.

Por otra parte, una de las principales funciones de Ado en el cáncer es su capacidad de inhibir la respuesta inmune antitumoral, facilitando la progresión tumoral y la metástasis al hacer que las células tumorales sean resistentes a las células defensoras del huésped (Ghiringhelli et al., 2012; Young et al., 2014). Además, algunos estudios han reportado una relación en la actividad de los nucleósidos con los receptores purinérgicos con la inducción de la transición epitelio mesénquima (TEM) y el incremento de la capacidad migratoria de las células tumorales (Burnstock et al., 2013). En nuestro estudio encontramos que la adición de 10 μ M de Ado indujo cambios morfológicos de tipo mesenquimal en las células tumorales, desarrollando extensiones del citoesqueleto de tipo filopodio y dendrítica, además de crecimiento de las células en varias direcciones. Es importante mencionar que el bloqueo de A2R con el antagonista específico ZM241385, redujo la formación de las extensiones celulares, sin embargo, no corrigió el crecimiento desordenado de las células, lo cual es probable que se deba a la interacción de Ado con receptores diferentes a A2AR y A2BR. En este contexto, recientemente se reportó que la señalización de A3R con Ado en células de cáncer de mama indujo cambios en el patrón de motilidad en las células tumorales, relacionado con la distribución focal de dicho receptor (Ledderose et al., 2016). Cabe destacar que el cambio morfológico en las células MS751 inducido por Ado, también se asoció con un aumento en la capacidad migratoria, ya que de un 33% de cierre de la herida de la monocapa en la condición basal de cultivo, éste incrementó a un 49% cuando se adicionó Ado. No obstante, el bloqueo del A2AR con el antagonista específico ZM241385, redujo el porcentaje de cierre a un 20%. Este efecto fue corroborado al cultivar las células MS751 en presencia de CGS-21680, el cual incrementó el cierre de la herida a un 42%, y fue revertido a un 30% tras la adición del antagonista ZM241385. Estos resultados concuerdan con experimentos realizados con células de cáncer de

mama murino, donde la activación de A2AR con un agonista específico provocó que las células epiteliales tumorales aumentaran su capacidad migratoria (Beavis et al., 2012). Asimismo, Kuzumaki y colaboradores en 2012 demostraron que el uso del antagonista de A2AR, SCH58261, así como la desregulación de A2AR con RNA de interferencia, disminuyeron la viabilidad y capacidad migratoria de la línea H1975 de células no pequeñas de cáncer de pulmón. Además, se ha propuesto que la señalización a través de A2BR module la TEM al cambiar el equilibrio entre las vías PKA y ERK (Giacomelli C, et al. 2018) y se favorezca el crecimiento tumoral (Fernandez-Gallardo M, et al., 2016). En este sentido, también se ha demostrado que la señalización de A2BR mediante Ado en células endoteliales, modula la expresión de factores angiogénicos VEGF, bFGF e IL-8 para inducir la neovascularización en el área que rodea el tumor (Feoktistov I et al., 2002; Dubey RK, 2002).

En otros estudios se ha encontrado que la activación de A3AR induce la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis en las células tumorales mediante la regulación de varias moléculas como cdk's, ciclinas, proteínas de la familia Bcl-2 y caspasas (Abedi et al., 2014, Aghaei et al., 2011; Kim et al., 2008; Lee y col., 2005). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes por los cuales los receptores adenosinérgicos regulan la proliferación y la migración/invasión de las células tumorales siguen sin ser establecidos, dado que dicha actividad depende tanto de la concentración de Ado como de la afinidad de este nucleósido a cada receptor. En consecuencia, sería importante analizar en estudios posteriores si la señalización de Ado sobre A1R y A3R tendría un efecto sobre las actividades protumorales en las células de CaCu. Lo cual puede ser de gran relevancia para poder establecer nuevas estrategias terapéuticas que incluyan el antagonismo de los receptores adenosinérgicos con quimioterapia, radiación e incluso empleo de bloqueadores de punto de control inmune (CTLA-4, PD-1/PDL-1).

10.CONCLUSIONES

- La señalización de Ado a través de A2AR y A2BR parece mantener la viabilidad y el estatus proliferativo de las células tumorales MS751 de CaCu. Debido a que el bloqueo de estos receptores redujo la viabilidad y proliferación de las células tumorales.
- El antagonismo específico de A2AR revirtió la generación de cambios morfológicos inducidos por Ado en las células tumorales MS751, sugiriendo un papel importante de la señalización a través de este receptor para inducir la TEM en estas células tumorales.
- El antagonismo específico de A2AR revirtió el incremento de la capacidad migratoria inducida por Ado en las células tumorales MS751 de CaCu, sugiriendo un papel en la señalización a través de este receptor para inducir la migración celular.

11. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de profundizar en el análisis de la participación de Ado sobre las actividades protumorales en células de CaCu, sería recomendable:

- Utilizar agonistas específicos para A2AR y A2BR; asimismo analizar la señalización a través de A1R y A3R.
- Para corroborar el papel de A2AR y A2BR en la proliferación, inducción de la TEM y capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu, sería interesante emplear células tumorales desreguladas en la expresión de estos receptores.
- Analizar si el bloqueo de los A2AR y A2BR en un modelo tumoral de CaCu *in vivo* reduce el crecimiento tumoral.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi H, Aghaei M, Panjehpour M, Hajiahmadi S. (2014). "Mitochondrial and caspase pathways are involved in the induction of apoptosis by IB-MECA in ovarian cancer cell lines". *Tumor Biol*35:11027-39.
- Adair T.H. (2005). "Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine". *Am. J. Physiol.* 289. R283-R96.
- Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, Bianchi G, Kroemer G, Pistoia V, Di Virgilio F. (2012). "Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth". *Cancer Res* 72:2957–2969.
- Aherne CM, Kewley EM, Eltzschig HK. (2001). "The resurgence of A2B adenosine receptor signaling". *Biochim. Biophys Acta.* 1808: 1329–1339. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.05.016 PMID: 20546702
- Aghaei M, Panjehpour M, Karami-Tehrani F, Salami S. (2011). "Molecular mechanisms of A3 adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines: involvement of intrinsic pathway". *J Cancer Res ClinOncol* 137:1511-23
- Airas L, Hellman J, Salmi M. (1995). "CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73". *J Exp Med.* 182:1603- 1608.
- Al-Rashida M, Iqbal J. (2014). "Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase, ecto-5'- nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors". *Med Res Rev* 34:703–743.
- Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. (2014). "Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis". *Int J Cancer.* 134: 1466–1473. doi: 10.1002/ijc.28456 PMID: 23982901
- Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. (2013). "Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine". *Nat Rev Cancer.* 13(12):842-57.
- Auchampach JA. (2007). "Adenosine receptors and angiogenesis". *Circ Res.* 101: 1075–1077. PMID: 18040023

- Baravesco I, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Canedo A, Bastini AM. (2008). "The role of ecto-5-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation". *Mol. Cell Biochem.* 319:61-8.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. (2012). "CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses". *Trends Immunol.* 33: 231-237.
- Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. (2016). "Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance". *Immunol Rev.* 274 (1): 290-306.
- Bosch FX, Castellsague X, de Sanjose, S. (2008). "HPV and cervical cancer: screening and vaccination". *Cancer* 98: 15-21.
- Bours M.J, Swennen E.L, Di Virgilio F, Cronstein B.N, Dagnelie P.C. (2006). "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation". *Pharmacol. Ther.* 112: 358-404.
- Burghoff S, Gong X, Viethen C, Jacoby C, Flögel U, Bongardt S, et al. (2014). "Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice". *BMC Cancer.* 14: 898. doi: 10.1186/1471-2407-14-898 PMID: 25465225
- Burnstock G, Di Virgilio F. (2013). "Purinergic signalling and cancer". *Purinergic Signal.* 9, 491-540.
- Bustamante L. M., Marín, S. J. Cardona, D. (2012). "Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006". *Revista Facultad Nacional de Salud Pública,* 30(1), 17-25.
- Carrero Y. (2012). "Patrones de infiltración leucocitaria y de expresión tisular de quimioquinas, factor de crecimiento endotelial vascular y mediaciones del metabolismo oxidativo en lesiones inflamatorias y neoplásicas del cérvix". Tesis de doctorado. Universidad de Alcalá, España.
- Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, Linden J. (2012). "Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors". *J Immunol.* 188: 198-205. doi: 10.4049/jimmunol.1101845.
- Chan, P.K.S. et al. (2012). "Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing". *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 49, 117-136
- Chen Y, Wang H, Lin W, Shuai P. (2017). "ADAR1 overexpression is associated with cervical cancer progression and angiogenesis". *Diagnostic Pathology.* 12:12.

- Cho S, et al. (2006). "In vitro evaluation of adenosine 5"-monophosphate as an imaging agent of tumor metabolism". *JNucl Med.* 47:837-845.
- Choi SB, Park JB, Song TJ, Choi SY. (2011). "Molecular mechanism of HIF-1-independent VEGF expression in a hepatocellular carcinoma cell line". *Int J Mol Med.* 28: 449–454.
- Chow MT, Möller A, Smyth MJ. (2012). "Inflammation and immune surveillance in cancer". *Semin Cancer Biol.* 22 (1): 23- 32
- Ciccarelli C, Vulcano F, Milazzo L, Gravina G.L, Marampon F, Macioce G, Giampaolo A, Tombolini V, Di Paolo V, Hassan HJ, Zani BM. (2016). "Key role of MEK/ERK pathway in sustaining tumorigenicity and in vitro radioresistance of embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population". *Mol Cancer* 15: 16.
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. (2006). "Physiological roles for ecto-50-nucleotidase (CD73)" *Purinergic Signal*2: 351-360.
- Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E. (2001). "Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors". *Medicinal Research Reviews.* 21 (2): 105–128.
- Crosbie E, Einstein M, Franceschi S, et al. (2013). "Human papillomavirus and cervical cancer". *Lancet.* 382(9895): 889-99.
- Dachuan J, Jie F, Wang L, Thompson FL, Liu A, Benjamin JD, Shin T, Curiel TJ, Shang B. (2010). "CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-cell Responses: A novel Mechanism of Tumor-induced Immune suppression". *Cancer.* 70(6):2245-55
- S. Daniele, E. Zappelli, L. Natali, C. Martini, M.L. Trincavelli. (2014). "Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to chemotherapy". *Cell Death Dis* 27:5, e1539.
- Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. (1997). "Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release". *Circ Res.* 81: 154-164.
- Denny L. (2012). "Cytological screening for cervical cancer prevention". *Best Pract Res Clin Ob-stet Gynaecol.*; 26:189-196.
- . Desmet CJ, Gallenne T, Prieur A, Reyat F, Visser NL, Wittner BS, Smit MA, Geiger TR, Laoukili J, Iskit S, Rodenko B, Zwart W, Evers B, et al. (2013). "Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis". *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 5139-44.

- Dewhirst MW, Richardson R, Cardenas-Navia I, Cao Y. (2004). “The relationship between the tumor physiologic microenvironment and angiogenesis. *Hematol Oncol Clin N Am.* 18(5):973-90.
- Doorbar, J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. (2015). “Human papillomavirus molecular biology and disease association”. *Rev. Med. Virol.* 25, 2–23
- van Doorslaer, K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, Sun Q, Kaur R, Huyen Y, McBride AA. (2017) “The papillomavirus episteme: a major update to the papillomavirus sequence database”. *Nucleic Acids Res* 45, D499–506.
- Dranoff G. 2004. “Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy”. *Nat Rev Cancer.* 4 (11) 11-22.
- Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. (2002). “A2B adenosine receptors stimulate growth of porcine and rat arterial endothelial cells”. *Hypertension*; 39: 530–535. PMID: 11882603
- Eini H, Frishman V, Yulzari R, Kachko L, Lewis E.C, Chaidmovitz C, Douvdevani A. (2015). “Caffeine promotes anti-tumor response during tumor initiation: Involvement of the adenosine A2A receptor”. *Elsevier.* 12348: 1-9.
- Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, et al. (2002). “Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation”. *Circ Res*; 90: 531–538. PMID: 11909816
- Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. (2003). “Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors”. *Circ Res.* 92: 485–492. PMID: 12600879
- Fernandez-Gallardo M, Gonzalez-Ramirez R, Sandoval A, Felix R. (2016). “Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells”. *PLoS One.* 11: e0167445.
- Finn OJ. (2012). *Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer.* *Ann Oncol.* 23 (8): 6-9
- Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. (2001). “Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells”. *Biochem Pharmacol.*; 61: 443-8.
- Fredholm BB, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. (2007). “Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling”. *Prog Neurobiol* 83: 263-276.

-Furuta S, Watanabe L, Doi S, Horiuchi H, Matsumoto K, Kuzumaki N, et al. (2012). "Subdiaphragmatic vagotomy increases the sensitivity of lumbar Aδ primary afferent neurons along with voltage-dependent potassium channels in rats". *Synapse*. 66:95-105.

-García- Rocha R, Monroy-García A, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Gutiérrez-Serrano V, Del Carmen Fuentes-Castañeda M, Ávila-Ibarra LR, Don-López CA, Torres-Pineda DB, de Lourdes Mora-García M. (2019). "Cervical cancer cells produce TGF-β1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-β1". *Cytokine*. 118:71-79.

-Gacche RN, Meshram RJ. (2013). "Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth". *Prog Biophys Mol Biol*. 113: 333–354.

-Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, (2001). "Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer". *Int J Cancer* 95, 247–254

-Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA. (2001). "Adenosine receptors and cancer". *Biochim Biophys Acta*. 1808: 1400–1412.

-Gessi S, Vrani k, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, Mac-Lennan S, Borea PA. (2007). "Adenosine and lymphocyte regulation. Purinergic Signalling; 3: 109-116.

-Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. (2012). "Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape". *J Biomed Biotechnol*. 2012: 473712.

-Giacomelli C, et al. (2018) "The A2B adenosine receptor modulates the epithelialmesenchymal transition through the balance of cAMP/PKA and MAPK/ERK pathway activation in human epithelial lung cells". *Front Pharmacol* 9:54

-Godde NJ, Sheridan JM, Smith LK, Pearson HB, Britt KL, Galea RC, Yates LL, Visvader JE, Humbert PO. (2014). "Scribble modulates the MAPK/Fra1 pathway to disrupt luminal and ductal integrity and suppress tumour formation in the mammary gland". *PLoS Genet*. 2014; 10: e1004323. doi: 10.1371/journal.pgen.1004323.

-Globocan, IARC, (2012), Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.

-Go"rlach A (2009). "Regulation of HIF-1α at the transcriptional level". *Curr Pharm Des*. 15: 3844–3852. PMID: 19671046

- Gustafsson L, Pontén J, Bergström R, Adami HO. (1997). "International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening". *Int J Cancer*. 71:159-165.
- Hajjahmadi S, Panjehpour M, Aghaei M, Mousavi S. (2015). "Molecular expression of adenosine receptors in OVCAR-3, Caov-4 and SKOV-3 human ovarian cancer cell lines". *Res Pharm Sci*. 10: 43-51.
- Hajjahmadi S, Panjehpour M, Aghaei M, Shabani M, (2015). "Activation of A2b adenosine receptor regulates ovarian cancer cell growth: involvement of Bax/Bcl-2 and caspase-3". *Biochem Cell Biol* 93, 321–329
- Hanahan D, Weinberg R. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell*. 144 (5): 646-674
- Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. (2008). "Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases". *Nat Rev Drug Discov*. 7: 759-70.
- Hasko G, Pacher P, Deitch EA, Vizi ES, 2007. "Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors". *Pharmacol. Ther.* 113. 264–275.
- Hastie C, et al. (2005). "Combined affinity labelling and mass spectrometry analysis of differential cell surface protein expression in normal and prostate cancer cells". *Oncogene*. 24:5905-5913.
- Häusler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Hönig A, Dietl J, Wischhusen J. (2014). "Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion". *Am J Transl Res* 6:129–139.
- Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Chandran PA, Engel JB, Hönig A, Ossadnik M, Horn E, Fischer B, Krockenberger M, et al. (2011). "Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity". *Cancer Immunol Immunother* 60(10):1405–1418.
- Hunter MI, Monk, BJ, Tewari KS. (2008). "Cervical neoplasia in pregnancy. Part 1: screening and management of preinvasive disease". *Obstet Gynecol*. 199:3-9.
- IARC. Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. 2018. Consultado en http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2018/pdfs/pr263_E.pdf.

-IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2007. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 90. Human Papillomaviruses.

- Jacobson KA, Gao ZG. 2006. "Adenosine receptors as therapeutic targets". *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5 (3): 247–64.

- Jafari SM, Joshaghani HR, Panjehpour M. Aghaei M. Zargar Balajam N, (2017) "Apoptosis and cell cycle regulatory effects of adenosine by modulation of GLI-1 and ERK1/2 pathways in CD44+ and CD24- breast cancer stem cells". *Cell Prolif* ;50(4).

-Seyyed Mehdi Jafari, Hamid Reza Joshaghani, Mojtaba Panjehpour, Mahmoud Aghaei. (2017). "A2B adenosine receptor agonist induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer stem cells via ERK1/2 phosphorylation". *Cell Oncol*. 41(1), 61–72.

-Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, et al. (2010). "CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression". *Cancer Res*. 70:2245-55; PMID:20179192

- Kalhan A, Gharibi B, Vazquez M, Jasani B, Neal J, Kidd M, Modlin IM, Pfragner R, Rees DA, Ham J. (2012). "Adenosine A2A and A2B receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy". *Purinergic Signal*. 8(2):265-74.

- Kim SJ, Min HY, Chung HJ, Park EJ, Hong JY, Kang YJ, Shin DH, Jeong LS, Lee SK. (2008). "Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-CI-IB-MECA, a novel A3 adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells". *Cancer Lett* 264:309-15.

-Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, Yoshimura A. (2009). "Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein". *Immunity*. 30:37283.

-Koszałka P, Gołuńska M, Stanisławowski M, Urban A, Stasiłojć G, Majewski M, et al. (2015). "CD73 on B16F10 melanoma cells in CD73-deficient mice promotes tumor growth, angiogenesis, neovascularization, macrophage infiltration and metastasis". *Int J Biochem Cell Biol*. 69: 1–10

- Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, et al. (2012). "Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer". *PLoS One*. 7: e44368; PMID:23144692.

- Lee EJ, Min HY, Chung HJ, Park EJ, Shin DH, Jeong LS, Lee SK. (2005). "A novel adenosine analog, thio-CI-IB-MECA, induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells". *BiochemPharmacol* 70:918-24
- Jie Lana, Haiquan Lub, Debangshu Samantab, Shaima Salmanb, You Lua, Gregg L. Semenzab. (2018). "Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment". *PNAS*. vol. 115. No.41.
- Ledderose C, Hefti MM, ChenY, Bao Y, Seier T, Li L, Woehrle T, Zhang J, Junger WG. (2016). "Adenosine arrest breast cancer cell motility by A3 receptor. *Springer*. 12:673-685.
- Ma DF, Kondo T, Nakazawa T, Niu DF, Mochizuki K, Kawasaki T, Yamane T, Katoh R. (2012). "Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. *Hum Pathol*". 41: 1550-7. doi: 10.1016/j.humpath.2010.04.008.
- McColl, S. R. et al. (2006). "Immunomodulatory impact of the A2A adenosine receptor on the profile of chemokines produced by neutrophils". *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 187–189, doi: 10.109
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y, (2009). "How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?". *Cell Cycle* 8, 1168–1175
- Mediero A, Frenkel SR, Wilder T, HeW, Mazumder A, Cronstein BN. (2012). "Adenosine A2A receptor activation prevents wearparticle-induced osteolysis". *Sci Transl Med* 4(135):135-165
- Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani k, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG. Borea PA. (2005). "A3 Adenosine receptors modulate hipoxia-inducible factor-1 α expression in human A375 melanoma cells".*Neoplasia*; 7 (10): 894-903.
- Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski m, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz E, Wang Y, Liu S. (2005). "RNA interference targetinof A1 receptor overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished ratesof cell proliferation and induction of apoptosis". *Cancer Biol* 4: 1355-1360.
- Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, Young A, Kalimutho M, Stannard K, et al. (2016) . "Adenosine 2B receptor expression on cancer cells promotes metastasis". *Cancer Res*. 76:4372–4382. doi: 10.1158/0008- 5472.CAN-16-0544 PMID: 27221704

- Moodley M. (2005). "Update on pathophysiologic mechanisms of human papillomavirus". *Obstet Gynecol* 17: 61-64.
- Moshkovich O, Lebrun-Harris L, Makaroff L et al. (2015). "Challenges and opportunities to improve cervical cancer screening rates in US Health centers through patient-centered medical home transformation". *Adv Prev Med.*:182073.
- Mousavi S, Panjehpour M, Izadpanahi MH, Aghaei M. (2015). "Expression of adenosine receptor subclasses in malignant and adjacent normal human prostate tissues. *The prostate*. 75(7):735-47.
- Mujoomdar M, Benett A, Hoskin D, Blay J. (2004). "Adenosine stimulation of proliferation of breast carcinoma cell lines: Evaluation of the [3 H] thymidine assay system and modulatory effects of the cellular microenvironment in vitro". *J Cell Physiol.*; 201: 429–438. doi: 10.1002/jcp.20089 PMID: 15389546
- Muñoz N, Bosch FX, De San Jose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study. *NEngl JMed*. 348(6):518-527.
- Narod S, (2016). "Can advanced-stage ovarian cancer be cured?". *Nat Rev. Clin. Oncol-* 13, 255-261.
- Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Likashev D, Wong MK, et al. (2006). "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ohta A. (2016). "A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment". *Front Immunol*. 29; 7:109.
- M.E. Olah, G.L. Stiles, (1995). "Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 35. 581–606.
- Oliveira BM, Lott CJ, Saldanha AF. (2016). "Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. Springer. Review article.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Cáncer de mama: prevención y control. Carga de cáncer de mama*.
- Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva: "Cáncer". (2018). Consultado en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

- Chithra Devi Palani, Lalitha Ramanathapuram, Aroonwan Lam-ubol, Zoya B. Kurago. (2017). "Toll-like receptor 2 induces adenosine receptor A2a and promotes human squamous carcinoma cell growth via extracellular signal regulated kinase 1/2". *Oncotarget*. Pp:6814-6829.
- Park M, Lee S. (2008). "Cell Cycle and Cancer". *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 60-65.
- Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. (2008). "Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase". *PLoS One* 3: e2599.
- Piersma s J. (2011). "Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cancer Microenvironment*. 4(3), 361-375.
- Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. (2008). "The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression". *Br J Cancer*. 99:1375-9; PMID:18797460.
- Ralevic V, Burnstock G. (1998). "Receptors for purines and pyrimidines". *Pharmacol Rev* 50(3):413-92.
- Ramanathan M, Pinhal-Enfield G, Hao I, Leibovich SJ. (2007). "Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter". *Mol Biol Cell*. 18:14-23; PMID:17065555; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-07-0596>
- Rangel g, Garay T, Arellano R. (2007). "El ATP como neurotransmisor quimico extracelular". *Revista Mexicana de Neurociencia*; 8 (3): 276-285.
- Ryzhov S, et al. (2009). "Differential role of the carboxy-terminus of the A2B adenosine receptor in stimulation of adenylate cyclase, phospholipase Cbeta, and interleukin-8". *Purinergic Signal* 5:289–298.
- Ryzhov, S., Novitskiy, S.V., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A.E., Carbone, D.P., Biaggioni, I., Dikov, M.M., Feoktistov, I. (2008). "Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth". *Neoplasia* 10, 987–995
- Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Fujikawa H, et al. (2011). "Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy". *Int J Oncol* 2011; 38:655-63.
- Scheibner KA, Boodoo S, Collins S, Black KE, ChanLi Y, Zarek P, et al. (2009). "The adenosine a2a receptor inhibits matrix-induced inflammation in a novel fashion". *Am J Respir Cell Mol Biol*. 40:2519; PMID:18703794

- Sitkovsky MV. (2009). "T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response". *Trends Immunol.* 30: 102–8.
- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. (2008). "Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia". *Clin Cancer* 14:5947-5952.
- Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, et al. (2004). "Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors". *Annu Rev Immunol*
- Soutter WP, de Barros Lopes A, Fletcher A et al. (1997). "Invasive cervical cancer after con-servative therapy for cervical intraepithelial neoplasia". *Lancet.* 349:978-980.
- Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A,Ayscue L, JinA, Mitchell B. (2004). "Role of strogen receptor in the regulation of ecto-5"-nucleotidaes and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:708-717.
- Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Möller A, Darcy PK, et al. (2012). "CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis". *Cancer Res.* 72:2190-6
- Stagg J, Divisekera U, Duret H, et al. (2011). "CD73-Deficient mice have increased antitumor inmunity and are resistan to experimental metástasis. *Research Cancer;* 71: 2892-2900.
- Stagg J,Divisekaraa U, McLaughlina N, Sharkeya J, Pommeyb S, Denoyerd D, Dwyer K, Smytha M. (2010). "Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metástasis. *Pnas.* 107:1547-1552.
- Stefano L, Rossler OG, Griesemer D, Hoth M, Thiel G. (2007). "P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca(2+) rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1". *J Cell Physiol* 213:36–44
- Thierry J.P, Acloque H, Huang R.Y, Nieto M.A. (2009). "Epithelial-mesencgymal transitions in development and disease. *Cell*139, 871-890.
- Tirado GL, Mohar BA, López CM, Garcia CA, Franco MF, Borges G. (2005). "Factores de riesgo de cáncer cervico uterino invasor en mujeres mexicanas". *Salud publica Mex* 47:342-350.
- Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, Chen GM, Gendoo DMA, Haibe-Kains B, Karn T, et al. (2015). "CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer". *Cancer Res* 75(21):4494-503.

- Vaisy A, Lotfinejad S, Zhian F. (2014). "Risk of cancer with combined oral contraceptives use among Iranian women". *Asian Pac J Cancer Prev*.15:5517-5522.
- van der Putten C, Zuiderwijk-Sick EA, van Straalen L, de Geus ED, Boven LA, Kondova I, IJzerman AP, Bajramovic JJ. (2009). "Differential expression of adenosine A3 receptors controls adenosine A2A receptor-mediated inhibition of TLR responses in microglia". *J Immunol*. 182:7603–12.
- Vázquez-Cuevas FG, Martínez-Ramírez AS, Robles-Martínez L, Garay E, GarcíaCarrancá A, Pérez-Montiel D, Castañeda-García C, Arellano RO. (2014). "Paracrine Stimulation of P2X7 Receptor by ATP Activates a Proliferative Pathway in Ovarian Carcinoma Cells". *J Cell Biochem* 115:1955–1966.
- Di Virgilio F, Adinolfi E. (2016). "Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth". *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2016.206.
- Volonté C, D'Ambrosi N. (2009). "Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters". *FEBS J* 276:318–329.
- Wagstaff SC, Bowler WB, Gallagher JA, Hipskind RA. (2000). "Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells". *Carcinogenesis* 21:2175–2181
- Wang L, Fan J, Thompson L, Zhang Y, Shin T, Curiel T, Zhang B. (2011). "CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice". *J Clin Invest*. 121(6):2371-2382.
- Wang L, Zhou X, Zhou T. (2008). "Ecto-5-nucleotidases promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 134:365-372.
- Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG, Jacobson KA. (2013). "A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signal*". 9: 271-80. doi: 10.1007/s11302-012-9350-3.
- Yihong Zhou¹, Xi Chu¹, Fei Deng¹, Liang Tong¹, Guoxiong Tong¹, Ye Yi¹, Jianye Liu¹, Jin Tang¹, Yuxin Tang¹, Yang Xia² and Yingbo Dai. (2017). "The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway". *Impactjournals Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 30)).
- Young A, Mittal D, Stannard K, Yong M, Teng MW, Allard B, Stagg J, Smyth MJ. (2014). "Co-blockade of immune checkpoints and adenosine A(2A) receptor suppresses metastasis". *Oncoimmunology* 3(10): 958952.

-Zhang B. (2010). "CD73: A novel target for cancer immunotherapy". *Cancer Research*; 70 (16): 6407-6411.

-Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. (2012). "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases". *PMC. Purinergic Signal*. 8(3):437-502.