



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD73 O EL BLOQUEO DE A2AR EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO REDUCE LA EXPRESIÓN DE MRP1
Y FAVORECE SU SENSIBILIDAD AL CISPLATINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CARRERA MARTÍNEZ MONSERRAT

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

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

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD73 O EL BLOQUEO DE A2AR EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO REDUCE LA EXPRESIÓN DE MRP1
Y FAVORECE SU SENSIBILIDAD AL CISPLATINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CARRERA MARTÍNEZ MONSERRAT

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0465/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **24 de abril de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **CARRERA MARTÍNEZ MONSERRAT** con número de cuenta **408042552** con la tesis titulada **“LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD73 O EL BLOQUEO DE AZAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO REDUCE LA EXPRESIÓN DE MRP1 Y FAVORECE SU SENSIBILIDAD AL CISPLATINO”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Vocal: DR. RICARDO LÓPEZ ROMERO
Vocal: DRA. MARÍA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ
Secretario: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 05 de junio de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

RCHT/EARR/rcht

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A CONACyT por el apoyo recibido con la beca con número de CVU 579767.

Al IMSS por el financiamiento al proyecto con número de registro R-2018-3602-015.

A mi tutor principal, Dr. Alberto Monroy García por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y brindarme todo el apoyo necesario y guiarme con paciencia a lo largo de mi desarrollo profesional durante maestría y doctorado.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Benny Weiss Steider y Dr. Juan José Montesinos Montesinos por su valiosísima mentoría.

AGRDECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Estoy infinitamente agradecida con mi mamá y mi papá, por su apoyo y amor incondicional. A mis abuelas y abuelos que ya han trascendido, pero siempre me inculcaron la importancia de la educación para poder contribuir a la sociedad, además de ser grandes ejemplos de perseverancia y tenacidad.

A Marco por acompañarme en todo momento, escucharme cuando más lo necesitaba y mostrarme nuevas formas de ver la vida, por tu calidez y el ánimo que siempre me das para continuar con mis proyectos, por comprenderme y por luchar día a día por tus sueños, te admiro mucho.

A mis amigas Karen, Monse, Marlene, Atziri, Bere, por sus consejos, las experiencias y los momentos increíbles. A mis sobrinos, José María, Gael, Aranza y a mi hermana Julieta y a la Sra. Juanita que ya es parte de la familia.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología y Cáncer, especialmente a la Dra. Rosario García Rocha y a Gabriela Espinoza; a Toño, Santi, Angelica, Anita, César y Brandon por la excelente convivencia. A Suhei que nos ayuda a mantener en orden y limpio el laboratorio.

A Victor Adrián Cortés Morales, a la Dra. María Luisa Escobar Sánchez y al Dr. Antonio Daniel Martínez Gutiérrez que amablemente colaboraron conmigo en distintas etapas del proyecto.

Al gran grupo de trabajo del Laboratorio de Inmunobiología de la UMIES, FES-Zaragoza. A todos los miembros de la UIMEO por permitirme formar parte del grupo, en especial al Dr. Hector Mayani.

Al Centro de Instrumentos de Citometría de Flujo de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, especialmente a la M. en C. Jessica Lakshmi Prieto Chávez por su valiosa asesoría y apoyo técnico.

A mis sinodales Dra. Rebeca López Marure, Dra. María Isabel Soto Cruz, Dr. Ricardo López Romero, Dra. María Antonieta Chávez González, por su tiempo y aportaciones a mi proyecto.

ÍNDICE

Página

Índice de figuras.	
Índice de tablas.	
Lista de abreviaturas.	
Resumen.	1
Abstract.	2
Introducción	3
Cáncer	3
Cáncer Cérvico-Uterino	3
Etapas de progresión del CaCu	5
Recurrencia	6
Tratamientos para CaCu	7
Quimioterapia Convencional	7
Anticuerpos monoclonales en combinación con quimioterapia	8
Inmunoterapia con linfocitos T	8
Vacunas	10
Mecanismo de acción del CP	11
Resistencia a CP (RCP) en CaCu	13
Aumento del flujo de salida (Extrusión)	16
MRPs	17
MRP1	18
Estructura de MRP1	19
Inhibición de MRP1	21
Vía CD73-Adenosina	22
Vía CD73-Adenosina y quimiorresistencia	22
Vía CD73-Adenosina en CaCu	23
Justificación	23
Planteamiento del problema	24
Hipótesis	24
Objetivos.	24

Metodología	25
Resultados	
Los receptores de adenosina A1AR, A2AR, A2BR Y A3R se expresan en líneas celulares de CaCu	30
Ado incrementa la expresión de MRP1 en células de CaCu a través de A2AR	31
La inhibición de CD73 disminuye la expresión de MRP1 en células de CaCu	33
La inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR disminuye la capacidad extrusiva de las células de CaCu a través de MRP1	34
La inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR favorecen la quimiosensibilidad al CP de las células de CaCu	36
Discusión	40
Conclusión	45
Perspectivas	45
Referencias bibliográficas	46
Anexo I Artículo requisito para obtención de grado	65
Anexo II Artículo en colaboración	75

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Tratamientos para CaCu avanzado y recurrente	7
Figura 2	Muerte celular inducida por CP	12
Figura 3	Mecanismos celulares y moleculares de RCP en CaCu	16
Figura 4	Estructura de MRP1	20
Figura 5	Etapas del ciclo de extrusión llevadas a cabo por MRP1	21
Figura 6	Quimiorresistencia en cáncer relacionada con la vía CD73-Adenosina	23
Figura 7	Expresión de los receptores de adenosina en las células de CaCu	30
Figura 8	Efecto de Ado y el bloqueo de ARs en la expresión de MRP1 en células de CaCu	32
Figura 9	Efecto de la inhibición de CD73 en la expresión de MRP1 en células de CaCu	34
Figura 10	La inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR en las células de CaCu disminuye la capacidad extrusiva en las células de CaCu a través de MRP1	36
Figura 11	Efecto de CP en la viabilidad de células de CaCu inhibidas en la expresión de CD73 o con bloqueo en A2AR	39
Figura 12	Resumen gráfico	45

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Estadios del CaCu de acuerdo con la FIGO	5
Tabla 2 Mecanismos de Resistencia al CP en CaCu	13
Tabla 3 Anticuerpos utilizados para la detección de Receptores de Adenosina (ARs)	26

LISTA DE ABREVIATURAS

A1R	Receptor de adenosina A1
A2AR	Receptor de adenosina A2A
A2BR	Receptor de adenosina A2B
A3R	Receptor de adenosina A3
ABC	Casete de unión a ATP
ABCC1	Miembro 1 de la subfamilia C del caset de unión a ATP
AND	Ácido desoxirribonucleico
Ado	Adenosina
AMP	Adenosín monofosfato
ANOVA	Análisis de la varianza
ApG	Aducto formado por la unión de adenina platino y guanina
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
Ars	Receptores de adenosina
ATHENA	Abordar LA necesidad de un diagnóstico avanzado de VPH
ATP	Adenosín trifosfato
ATP7A	ATPasa alfa transportadora de cobre
ATP7B	ATPasa beta transportadora de cobre
Bcl-2	Proteína anti apoptótica descrita en linfoma de células B
BCRP	Proteína de quimiorresistencia en cáncer de mama
FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia
CaCu	Cáncer cervicouterino
Calceína	Calceína acetoximetil
AM	
CD39	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa
CD73-Adenosina	Vía que inicia con la hidrólisis de AMP por CD73 para producir adenosina
CP	CP
Ctrl	Transportador de cobre
DOC	Detección Oportuna del Cáncer
E6	Proteína transformante E6 del Virus de Papiloma Humano
E7	Proteína transformante E6 del Virus de Papiloma Humano
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GpG	Aducto formado por la unión de guanina platino y guanina
GSH	Glutación reducido
GS-X	Bombas de extrusión que pueden transportar conjugados de GSH
HPV	Virus de Papiloma Humano
HSP	Proteínas de choque térmico

IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
IL-10	Interleucina-10
JAK-STAT	Cinasa Janus/transductor de señal y activador de la transcripción
kDa	Kilodalton
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MDR	Resistencia a múltiples fármacos (por las siglas en inglés Multi Drug Resistance)
MDR1	Gen de resistencia a múltiples fármacos
MEK/ERK1/2	Proteína cinasa activada por mitógenos / Proteína cinasa regulada extracelularmente
MK-571	Inhibidor de MRP1
MMR	Reparación de errores de apareamiento
MRPs	Familia de proteínas de resistencia a múltiples fármacos
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NF- κB	Factor nuclear kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
P-gp	Glicoproteína-P
p53	Proteína tumoral p53
Pap	Prueba de Papanicolaou
PD-L1	Ligando 1 de muerte celular programada
PI3K / AKT	Fosfatidil inositol 3 cinasa/ proteína cuinasa b de serina/treonina
pS	pSiren (vector vacío)
pSiren/siRNA-CD73	vector pSiren que contiene un siRNA dirigido a CD73
RCP	Resistencia a CP
RE	Retículo endoplásmico
SEM	Error estándar de la media
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TF-PAR2	Factor tisular-Receptor 2 activado por proteasa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TM	Segmentos transmembrana
TWIST1	Factor de transcripción hélice-bucle-hélice de la Familia Twist
USA	Estados Unidos de América
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo
Wnt	Familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless)
WT	Wild tipe (tipo silvestre o parental)
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
5-FU	5-fluorouracilo

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un problema de salud pública a nivel mundial, su incidencia y mortalidad es predominante en países en desarrollo. El agente anticanceroso más utilizado para el tratamiento de CaCu es el cisplatino (CP), el cual presenta una de las mejores tasas de efectividad y costo, sin embargo, uno de los problemas es que algunas células tumorales tratadas, desarrollan mecanismos de resistencia a CP (RCP) como el aumento en la extrusión, el cual está mediado por transportadores ABC que expulsan los fármacos hacia el exterior de las células disminuyendo su efecto intracelular e impidiendo que ejerza su efecto citotóxico. En CaCu uno de los transportadores ABC más importantes es MRP1, el cual se expresa en el 85% de los tumores.

Se ha reportado que el receptor A3R regula la expresión de MRP1 en glioblastoma, por lo que en este estudio analizamos la participación de la vía CD73-Adenosina en la RCP mediada por MRP1 en células tumorales de CaCu.

En este estudio encontramos que en células tumorales de CaCu, CaSki y HeLa, la Ado aumenta la expresión de MRP1 de manera dependiente de la concentración. Además, en las células CaSki y HeLa, inhibidas en la expresión de CD73 con un siRNA, o tratadas con el antagonista ZM24138 específico para A2AR disminuyó significativamente la expresión de MRP1 y su capacidad para extruir calceína AM. Al tratar las células con MK-571, un inhibidor específico de MRP, disminuyeron su capacidad extrusiva en comparación con las células no tratadas. Finalmente, al realizar ensayos de IC₅₀ se observó que la modulación de MRP1 observada en las células CaSki y HeLa mediante la inhibición de la expresión de CD73 o con bloqueo de A2AR, favoreció de la sensibilidad de estas células a CP, este efecto fue similar al efecto de bloquear directamente MRP1.

Este estudio provee la primera evidencia de que la inhibición de CD73 y el bloqueo de la señalización de Ado a través de A2AR modulan negativamente la expresión de MRP1 en células de CaCu favoreciendo su quimiosensibilización al tratamiento con CP, lo cual puede ser de gran utilidad para establecer estrategias que permitan revertir la RCP en pacientes con CaCu avanzado o recurrente.

ABSTRACT

Cervical uterine cancer (CC) is a global public health problem, with its incidence and mortality being predominant in developing countries. The most used anticancer agent for CaCu treatment is cisplatin (CP), which has one of the best rates of effectiveness and cost. However, one of the problems is that some treated tumor cells develop cisplatin resistance (CPR) mechanisms, such as increased extrusion mediated by ABC transporters that expel the drugs out of the cells, reducing their intracellular effect and preventing their cytotoxic effect. In CaCu, one of the most important ABC transporters is MRP1, which is expressed in 85% of tumors.

It has been reported that the A3R receptor regulates the expression of MRP1 in glioblastoma. Therefore, in this study, we analyzed the involvement of the CD73-Adenosine pathway in MRP1-mediated CPR in CaCu tumor cells.

In this study, we found that in CaCu tumor cells, CaSki and HeLa, adenosine (Ado) increases the expression of MRP1 in a concentration-dependent manner. Furthermore, in CaSki and HeLa cells, inhibition of CD73 expression using siRNA or treatment with the A2AR-specific antagonist ZM24138 significantly decreased the expression of MRP1 and its ability to extrude calcein-AM. Treating the cells with MK-571, a specific MRP inhibitor, reduced their extrusion capacity compared to untreated cells. Finally, IC50 assays showed that modulating MRP1 observed in CaSki and HeLa cells through CD73 expression inhibition or A2AR blockade enhanced their sensitivity to CP. This effect was similar, to directly blocking MRP1.

This study provides the first evidence that inhibiting CD73 and blocking adenosine signaling through A2AR negatively modulate the expression of MRP1 in CaCu cells, enhancing their chemosensitization to CP treatment. This finding could be useful in establishing strategies to reverse CPR in patients with advanced or recurrent CaCu.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la presencia de células anormales con alteraciones en el genoma, las cuales se dividen descontroladamente y tienen la capacidad de diseminarse a los tejidos adyacentes y órganos distantes en donde pueden interrumpir los procesos biológicos normales a través de la invasión celular y metástasis (OMS, 2023).

CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Uno de los tipos de cáncer ginecológicos más frecuentes es el cáncer cérvico-uterino (CaCu), el cual ocupa el cuarto lugar en incidencia y es la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial en mujeres en edad reproductiva. En México ocupa el tercer lugar en incidencia y segundo lugar en mortalidad, lo cual representa un grave problema de salud pública (Sung H *et al.*, 2021).

Existen varios factores de riesgo que pueden desencadenar el desarrollo del CaCu, incluidos: polimorfismos genéticos, múltiples parejas sexuales, múltiples partos, uso de anticonceptivos orales, dieta y tabaquismo, sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la infección persistente por virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) es el principal factor causal y está implicada en más del 99% de los casos (Lutkowska A., *et al.*, 2017; Liu Z. *et al.*, 2015). La mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y no son clínicamente evidentes ya que en el 70-90% de las mujeres infectadas su sistema inmune es capaz de eliminar la infección en 12 a 30 meses (Evander, M., *et al.*, 1995), por lo que se estima que solo el 1 % de las mujeres que en algún momento han tenido infección con VPH desarrollan CaCu (Tindle R., 2002). La edad promedio de las pacientes con CaCu es de alrededor de 45 a 50 años, pero puede afectar a mujeres desde los 20 años o incluso más jóvenes (Parkin MD., *et al.*, 1999).

El desarrollo de CaCu tiene un tiempo de progresión largo, en el cual la infección persistente por VPH induce cambios en el epitelio cervical y que en el transcurso de 1 a 10 años puede progresar a carcinoma invasivo (Castellanos-Morales M., 2003).

El CaCu es prevenible y su tratamiento es relativamente fácil cuando el diagnóstico es oportuno. La experiencia de países desarrollados ha permitido demostrar que la mejor opción para disminuir la mortalidad por CaCu es la detección y el tratamiento temprano de lesiones precursoras y lesiones malignas, lo cual se logra mediante la implementación de programas de detección oportuna de CaCu.

En México se implementaron desde 1974 programas nacionales de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), enfocados en la detección de CaCu mediante la prueba de Papanicolaou (Pap) (SSA, 2002). Sin embargo, hasta la fecha dicha neoplasia sigue siendo una de las principales causas de muerte para las mujeres mexicanas ya que ha sido difícil establecer y mantener un programa de tamizaje efectivo. En lugar de ser una herramienta para la detección oportuna, en el 80% de los casos el Pap detecta lesiones de CaCu ya muy avanzadas y de estas pacientes a pesar de recibir tratamiento el 70% desarrollará persistencia o recurrencia de la enfermedad (Coronel-Martínez, J., *et al.*, 2014).

Desde 2014, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó la primera prueba de ADN para virus del papiloma humano (VPH) llamada prueba Cobas®, la cual detecta en una muestra citológica la presencia de 14 tipos de VPH de alto riesgo (con resultados separados para VPH16 y VPH18), por lo que, con base en los resultados obtenidos, si hay presencia de VPH 16 o 18, la paciente debe ser referida a colposcopia, pero si están presentes algunos de los otros 12 tipos de VPH de alto riesgo, se le realizará a la paciente una citología cervical para determinar la necesidad de ser referida a evaluación colposcópica. En el caso de que una prueba sea negativa, la paciente debe realizarse su control regular cuyo intervalo debe ser decidido por el médico tratante según las condiciones de riesgo de la paciente.

Esta decisión de la FDA está basada en el estudio ATHENA (Addressing THE need for Advance HPV diagnostic) (Castle, P., *et al.*, 2011) publicado en 2011 y un reanálisis en 2013 (Cox JT., *et al.*, 2013) y a partir de los resultados que obtuvieron, este esquema de pesquisa de cáncer cérvico-uterino se ha implementado en E.U.A., Canadá y Europa debido a su seguridad y reducción casi a la mitad de las pruebas requeridas, con la consiguiente reducción en el costo de los programas de tamizaje (Wright TC., *et al.* 2015).

La situación en México con respecto a la detección a través de prueba primaria (Cobas) aún no se realiza de manera rutinaria en las instituciones de salud pública. Se puede acceder a una prueba de este tipo en laboratorios clínicos privados en los cuales los precios son poco accesibles. Es probable que este retraso en la implementación de este tipo de cribado repercuta en que la detección del CaCu se siga realizando en etapas avanzadas.

El CaCu tiene un impacto negativo en las mujeres que lo padecen, afectando en diversos aspectos: en el ámbito personal disminuye la calidad de vida (Zhang, L., *et.al.*, 2022), en términos sociales, representa una gran pérdida de años de vida productiva que contribuye al deterioro económico del país y a la ruptura de su tejido social, provocando graves desajustes en la integración y dinámica familiar (SSA, 2002). Adicionalmente, debido al gran número de pacientes que requieren tratamientos el costo para las instituciones públicas que lo atienden es elevado (Hernández-Hernández D., *et al.*, 2015).

ETAPAS DE PROGRESIÓN DEL CaCu

De acuerdo con la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, el CaCu presenta cuatro etapas de progresión (**Tabla 1**) (Pecorelli S. 2009).

TABLA 1. Estadios del CaCu de acuerdo con la FIGO

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
IA1	Invasión <3mm prof. <7mm extensión
IA2	Invasión 3–5mm prof. <7mm extensión

Continuación **Tabla 1**

IB1	>5mm ó visible <4 cm.
IB2	Visible >4 cm.
IIA	Invade 1/3 sup vagina s/parametrios
IIA1	<4 cm
IIA2	>4 cm
IIB	Invade parametrios parcialmente
IIIA	Invade 1/3 inf vagina sin llegar a pared pélvica
IIIB	Invade pared pélvica / hidronefrosis / IRC
IVA	Invade mucosa de vejiga o recto
IVB	Metástasis a distancia

En etapas tempranas esta enfermedad se puede tratar con cirugía, radiación y/o quimioterapia, produciendo curas entre 80 y 90% en etapa I y 60% en la etapa II (Yu, S. & Garcia, A. 2015), sin embargo, en los países en desarrollo, los programas de tamizaje basados en la prueba de Pap es deficiente, ya que cuando el CaCu se diagnostica, el 80% de las pacientes se encuentra en etapas avanzadas (III en adelante) o con metástasis, en donde el porcentaje de supervivencia a un año después del tratamiento disminuye notablemente, llegando a ser de 10-20% en etapa IV (Díaz-Padilla I., *et al.*, 2013; Coronel-Martínez, J., *et al.*, 2014). En consecuencia, se necesitan desarrollar nuevos enfoques terapéuticos que mejoren los resultados del tratamiento en estas pacientes para mejorar la supervivencia (Uyar, D. & Rader, J., 2014).

RECURRENCIA

La enfermedad recurrente se define como el crecimiento local del tumor o el desarrollo de metástasis a distancia, seis meses o más, después de la regresión completa de la lesión tratada; en tanto que, si se detecta dentro de los primeros seis meses después de completar el tratamiento primario, se le denomina persistencia (Choi J, 2000). Se estima que la edad promedio de las mujeres con recurrencia de CaCu es de 40-45 años. En relación con el

estadio clínico inicial, la frecuencia de la enfermedad recurrente es: etapa IB, cercana al 10%; etapa IIA, 17%; IIB, 23%; III, 42% y IVA, 74% (Peiritti M, *et al.*, 2012).

TRATAMIENTOS PARA CaCu

En la actualidad existen diversos tratamientos para el CaCu, que van desde quimioterapia convencional con un fármaco o combinaciones de fármacos, quimiorradioterapia, anticuerpos monoclonales ya sea solos o en combinación con quimioterapia y terapias experimentales como el uso de linfocitos T modificados que eliminan a las células infectadas con VPH (**Figura 1**). En la siguiente sección se explica brevemente algunas ventajas y desventajas para cada uno de estos regímenes de tratamiento.

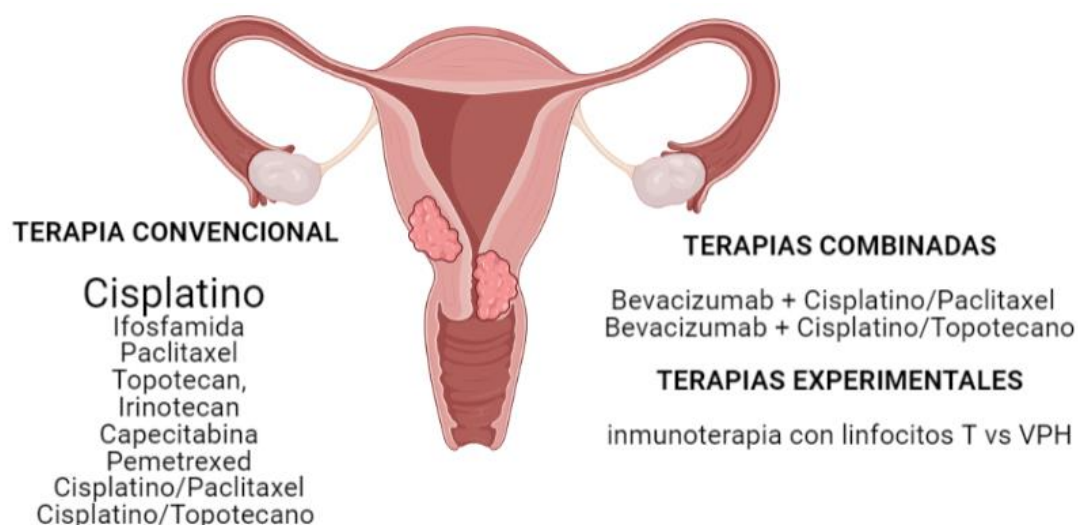


Figura 1. Tratamientos para CaCu avanzado y recurrente. En la figura se enlistan las terapias convencionales, combinadas y experimentales que han sido probadas para el tratamiento del CaCu, dentro de las cuales, sobresale el cisplatino, siendo el más utilizado en la práctica clínica. Figura creada en BioRender.com.

QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL

En la actualidad el CP (CP) es el agente quimioterapéutico más utilizado para el tratamiento de CaCu avanzado y recurrente (Lorusso, D., *et al.*, 2014). El CP fue sintetizado por

primera vez por M. Peyrone en 1844, sin embargo, fue hasta la década de los 1960s cuando las observaciones iniciales de Rosenberg (Rosenberg, B., *et al.*, 1965) señalaron que los productos de la electrólisis generados por los electrodos de platino eran capaces de inhibir la división celular de *Escherichia coli*, creando mucho interés en su posible uso para inhibir la proliferación de células tumorales. Fue hasta 1978 que el CP fue aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer (Kelland, L. 2007).

Tradicionalmente el CP ha sido considerado el fármaco más efectivo para el tratamiento de CaCu en etapas avanzadas, ya que al administrarlo en conjunto con radioterapia se observó una disminución del 30 a 60% en el riesgo de muerte por CaCu (Thigpen T, *et al.*, 1981). Existen más agentes quimioterapéuticos que se utilizan para el tratamiento de CaCu en etapas avanzadas, incluyen ifosfamida, paclitaxel, topotecán, irinotecán, capecitabina y pemetrexed, aunque con menores tasas de respuesta en comparación con CP (Coleman E, *et al.*, 1986; Fleming GF, *et al.*, 1996; Muderspach LI, *et al.*, 2001; Verschraegen CF *et al.*, 1997; Garcia A *et al.*, 2007; Goedhals L *et al.*, 2006).

La evidencia actual sugiere que los regímenes de combinación a base de platino pueden ser más eficaces, dentro de las combinaciones más comunes se encuentran: CP/paclitaxel y CP/topotecán. La combinación de CP y paclitaxel produce una tasa de respuesta más alta y una supervivencia libre de progresión mejorada en comparación con el CP como agente único, pero no mejora la supervivencia general, aunque existen beneficios potenciales a la calidad de vida (Moore DH, *et al.*, 2004). Por otro lado, la combinación de CP y topotecán en comparación con CP como agente único mostró una mejora en la tasa de respuesta general (Long HJ, *et al.*, 2005).

ANTICUERPOS MONOCLONALES EN COMBINACIÓN CON QUIMIOTERAPIA

En la actualidad, también se encuentran disponibles tratamientos más selectivos basados en una mayor comprensión de la biología tumoral y de las características de los subtipos de

tumores específicos. Es el caso de los anticuerpos monoclonales, para CaCu sólo se ha determinado la efectividad de Bevacizumab, el cual tiene como objetivo la inhibición del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para inhibir el crecimiento de vasos sanguíneos causando una disminución de oxígeno y nutrientes al tumor (Tewari, K *et al.*, 2017).

Algunos estudios han sugerido que la combinación de bevacizumab y quimioterapia es efectiva en CaCu (Wright JD., *et al.*, 2006; Takano M, *et al.*, 2009). En una prueba clínica, la mitad de los pacientes fueron tratados con topotecán con paclitaxel y la otra mitad con CP y paclitaxel. Además, aproximadamente la mitad de los pacientes en cada uno de estos grupos de tratamiento recibieron Bevacizumab junto con la quimioterapia. La adición de Bevacizumab a la quimioterapia combinada se asoció con una mejora de 3.7 meses de supervivencia general. Las tasas de respuesta fueron del 48% con bevacizumab y el 36% con quimioterapia sola.

Como consecuencia, se aprobó Bevacizumab por la FDA para su uso en el CaCu avanzado y recurrente. Sin embargo, hay un aumento en el costo que debe ser tomado en cuenta ya que al adicionar Bevacizumab el tratamiento es 10 veces más costoso en comparación con la quimioterapia convencional (Phippen N, *et al.*, 2015) por lo que la viabilidad económica para aplicarlo a la población general es demasiado baja.

INMUNOTERAPIA CON LINFOCITOS T

Se ha reportado el uso de inmunoterapia con linfocitos infiltrantes del tumor dirigidos a VPH humanos, aunque este tipo de terapias aún se encuentran en etapas experimentales. En un estudio, se aislaron linfocitos T del tejido tumoral y se cultivaron *in vitro*, se analizó su reactividad hacia péptidos de las proteínas virales E6 y E7 del VPH, se seleccionaron los linfocitos más reactivos y se expandieron, posteriormente se infundieron en las pacientes, de las pacientes que recibieron la infusión de linfocitos, una de ellas logró una respuesta

parcial a los 22 meses y 2 lograron una respuesta completa a los 15 meses (Hinrichs CS, *et al.*, 2014).

VACUNAS

Las vacunas para VPH basadas en el uso de partículas tipo virales (VLPs) han mostrado un avance importante en la prevención de la enfermedad contra los genotipos de VPH-16 y VPH-18, las cepas responsables de 70% de los cánceres cérvico-uterinos. En los primeros ensayos clínicos de vacunas contra el VPH-16 y VPH-18 se encontró una alta eficacia contra la infección por estos genotipos en niñas adolescentes (La Torre G, *et al.*, 2007). Posteriormente se adicionaron dos cepas VPH-6 y VPH-11 en una vacuna tetravalente que ofrece una prevención eficaz de las lesiones cervicales precancerosas (Lu B, *et al.*, 2011; Lehtinen M, Dillner J., 2013). En los países de ingresos altos se observó que en las adolescentes y jóvenes 13 a 19 años, respectivamente, que fueron vacunadas, las infecciones de VPH-16 y VPH-18 disminuyeron en un 68% (Lowy DR, Schiller JT, 2012). Los programas de inmunización contra el VPH comenzaron en 2007, principalmente en países de ingresos altos (Bonanni P, *et al.*, 2011), donde los estudios han demostrado claros beneficios (Gervais F, *et al.*, 2017), sin embargo, en los países de ingresos bajos y medianos, persisten las barreras económicas en los sistemas de salud pública para completar los esquemas de vacunación en grandes porcentajes de la población (Bello FA, *et al.*, 2011).

En la actualidad, a pesar del éxito de las terapias combinadas, el uso de anticuerpos monoclonales y la inmunoterapia no se han adoptado de manera extensiva en la práctica clínica debido al elevado costo, poco personal especializado y a la falta de infraestructura necesaria, por lo que sólo han sido aplicadas en una población muy pequeña de pacientes.

En contraste con las terapias antes mencionadas, el agente quimioterapéutico más utilizado para CaCu sigue siendo el CP ya que es el fármaco que tiene la mejor relación efectividad-costado (McKim A, *et al.*, 2016), sin embargo, aún queda un problema por resolver y es el desarrollo de quimiorresistencia a la cual se atribuye el 90% de los fallos en el tratamiento

dando como resultado un fracaso terapéutico y eventualmente la muerte de las pacientes con cáncer (Lippert T, *et al.*, 2008).

MECANISMO DE ACCIÓN DEL CP

El ingreso del CP a la célula está mediado por el transportador de cobre Ctr1 en mamíferos (Ishida, S., *et al.*, 2002). Una vez que ingresa al citoplasma, los átomos de cloruro del CP son desplazados por moléculas de agua, este producto hidrolizado es un potente electrófilo que puede reaccionar con cualquier nucleófilo, incluidos los átomos de nitrógeno en los ácidos nucleicos. El CP se une al centro reactivo N7 en los residuos de purina y puede causar daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células cancerosas y formar aductos, de los cuales 90% son GpG y 10% son ApG intracatenarios, bloqueando la división celular y dando como resultado la muerte celular apoptótica (**Figura 2**) (Dasari, S & Tchounwou P. 2014).

El CP también puede inducir apoptosis a través de la generación de estrés oxidativo, que afecta principalmente a la mitocondria, lo que resulta en la pérdida de grupos sulfhidrilo de las proteínas mitocondriales, inhibición de la captación de calcio y reducción de potencial de membrana mitocondrial (Saad S *et al.*, 2004), lo que puede inducir la apoptosis a través de la vía extrínseca e intrínseca (Ozben, T., 2007). El incremento en el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO) puede resultar tanto en la apoptosis como en la necrosis de las células cancerosas (Hampton, M. & Orrenius, S., 1997). Las ERO también pueden inducir la muerte celular al reducir la autofagia, que es un proceso auto catabólico que implica el secuestro de contenidos citoplasmáticos (organelos agotados y agregados de proteínas) para su degradación en lisosomas (Shrivastava, A. *et al.*, 2011)

El CP ha sido considerado el fármaco más activo y es ampliamente utilizado para el tratamiento del CaCu, sin embargo, algunas células pueden presentar resistencia, ya sea intrínseca o adquirida, lo que compromete seriamente la eficacia del tratamiento (Shen, D. *et al.*, 2012). De hecho, en la actualidad el CP sigue siendo parte de los esquemas de tratamiento para CaCu en todo el mundo (McKim, A. 2016), incluso forma parte de la lista de medicamentos esenciales de la OMS (<https://www.who.int/>). En el caso particular de

México, la quimioterapia con CP se encuentra en las guías de práctica clínica para el tratamiento del CaCu de acuerdo con el Programa Nacional de Salud (SSA, 2010), por lo cual es de suma importancia investigar los mecanismos por los cuales se desarrolla quimiorresistencia con la finalidad de mejorar los esquemas de tratamiento con este fármaco.

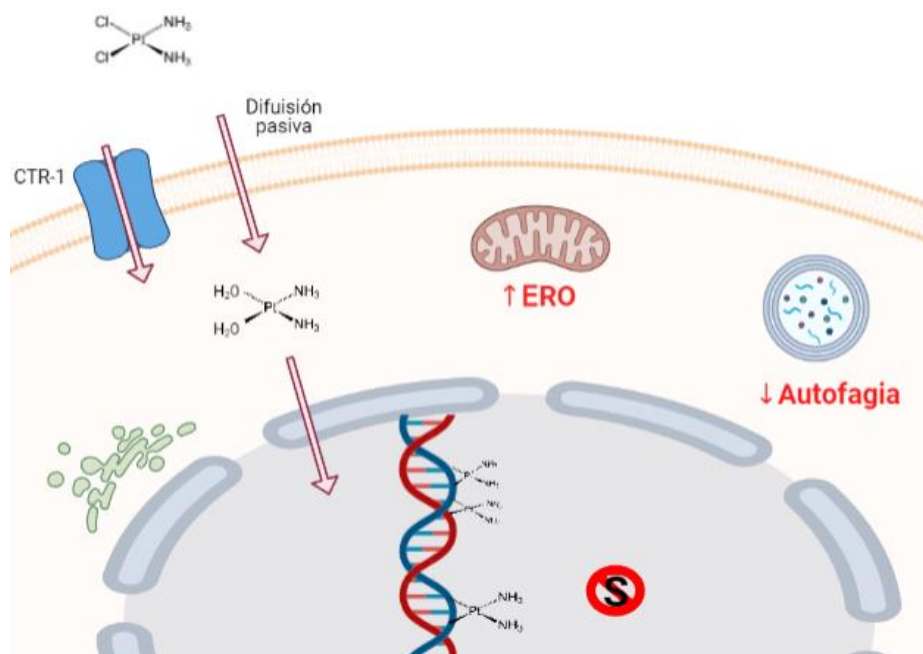


Figura 2. Muerte celular inducida por cisplatino. Hay 3 principales mecanismos por los cuales el cisplatino puede inducir apoptosis, el más importante es el que está relacionado con la formación de aductos en el DNA, lo cual impide que la célula pueda sintetizar la copia de DNA en la fase S. Otros mecanismos complementarios incluyen el aumento en las especies reactivas de oxígeno (ERO) que puede inducir apoptosis por vía intrínseca y extrínseca, y adicionalmente la reducción de la autofagia. Figura creada en BioRender.com

momento en que se desarrolla. La quimiorresistencia intrínseca existe antes de que se administren los medicamentos al paciente, lo que tiene como consecuencia una eficacia reducida del tratamiento, mientras que la quimiorresistencia adquirida se caracteriza por la reducción gradual de la eficacia de un fármaco después del tratamiento (Bell D.W., *et al.*, 2005; Ma C, *et al.*, 2011). La quimiorresistencia es un problema grave que hace que el desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer sea largo y costoso (Vasiliou V, *et al.*, 2009; Projan SJ, 2003), por lo que es necesario conocer los mecanismos que conducen a la quimiorresistencia para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos con mayor éxito.

RESISTENCIA AL CP (RCP) EN CaCu

Los mecanismos de quimiorresistencia intrínseca y adquirida pueden coexistir durante la progresión y el tratamiento del tumor. Los mecanismos de quimiorresistencia adquirida pueden ser totalmente diferentes a los de la quimiorresistencia intrínseca o pueden ser una expansión selectiva de la quimiorresistencia intrínseca.

El grado de quimiorresistencia intrínseca determina la sensibilidad de cierto grupo de células cancerosas a un fármaco específico por lo que se deberían realizar análisis genómicos y bioquímicos antes de diseñar el plan de tratamiento farmacológico para combatir una posible quimiorresistencia preexistente, y posteriormente, monitorear el desarrollo de resistencia adquirida para ajustar los esquemas terapéuticos. En la **Tabla 2** se describen específicamente los mecanismos de resistencia a CP (RCP) en CaCu, los cuales son representados esquemáticamente en la **Figura 3**.

Tabla 2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A CP EN CaCu

MECANISMO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
1) Reducción de la acumulación intracelular del fármaco	La captación reducida (1.1), el aumento de la extrusión (1.2) y la inactivación por las proteínas que contienen tiol (1.3) contribuyen a la reducción de la acumulación intracelular de CP.	(Shen D, 2012)
2) Aumento de la reparación de daños al ADN	Las células pueden identificar el daño al ADN inducido por CP mediante múltiples vías de reparación del ADN, incluyendo la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (2.1) y la reparación de errores de apareamiento (MMR) (2.2).	(Dasari S, <i>et al.</i> , 2014; Torii Y, <i>et al.</i> , 2014; Bai ZL, <i>et al.</i> 2012; Martelli L, <i>et al.</i> , 2009; Zhang Y <i>et al.</i> , 2010)

3) Inhibición de la apoptosis	En las vías de apoptosis extrínseca e intrínseca intervienen proteínas múltiples, como las de la familia Bcl-2 y p53, la disfunción de estas proteínas puede conducir al desarrollo de la RCP. Las células de CaCu con RCP con frecuencia sobre expresan proteínas anti apoptóticas. Por ejemplo, Brozovic <i>et al.</i> , encontraron que Bcl-2 tenía un aumento en la expresión en células HeLa con RCP en comparación con las células HeLa parentales. La supresión de las proteínas efectoras pro apoptóticas también contribuye al desarrollo de la RCP.	(Brozovic A, <i>et al.</i> , 2004; Chen J, <i>et al.</i> , 2002; Siddik ZH, 2003)
4) Activación de la transición epitelio-mesénquima (TEM)	En los últimos años, se ha reconocido cada vez más el papel de la TEM en la RCP adquirida. Se observó que, al silenciar la expresión de un factor de transcripción maestro de la TEM, TWIST1 por ARNi en células HeLa se disminuye la expresión de P-gp y las células fueron más sensibles al CP.	(Zhu K, <i>et al.</i> , 2012)
5) Resistencia intrínseca de las Células Troncales de Cáncer	Las células troncales de cáncer son una subpoblación celular dentro del tumor que es altamente resistente a varios agentes quimioterapéuticos ya que expresan altos niveles de transportadores de resistencia a múltiples fármacos.	(Dean, M, <i>et al.</i> , 2005)
6) Aumento en la expresión de chaperonas de respuesta al estrés	Las chaperonas o proteínas de choque térmico (HSP) son proteínas involucradas en las respuestas generales al estrés. Debido a que el CP induce daño al ADN y consecuentemente da como resultado la apoptosis, las HSP se han observado sobre expresadas en las células que presentan RCP.	(Shen D, <i>et al.</i> , 2012)

Continuación **Tabla 2**

7) Aumento en la autofagia	La autofagia es un proceso por el cual las células digieren sus propios organelos dañados. Recientemente se ha demostrado que ésta contribuye a la RCP en algunos tipos de células y la inhibición de la autofagia puede aumentar la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos. Con respecto al CaCu, se ha observado que el CP induce la autofagia en células HeLa, y la inhibición de la autofagia induce estrés en el retículo endoplásmico (RE) y, por lo tanto, aumenta la citotoxicidad del CP.	(Liu B, <i>et al.</i>, 2010; Xu Y, <i>et al.</i>, 2012)
8) Alteraciones en vías de señalización	Las vías de señalización incluyen una amplia gama de mecanismos moleculares que inducen la resistencia a los fármacos. Las principales que participan en la RCP en CaCu son: SAPK/JNK, Wnt / β-catenina, Sonic Hedgehog, NF-kB, PI3K / AKT, Notch EGFR y TF-PAR2 JAK-STAT, MAPK y P53.	(Brozovic A, <i>et al.</i>, 2004; Siddik ZH, <i>et al.</i>, 2003; Xu, H, <i>et al.</i>, 2019; Zhang, Y, <i>et al.</i>, 2010; Yang, M, <i>et al.</i>, 2018; Sharma, A, <i>et al.</i>, 2019; Zheng X, <i>et al.</i>, 2014; Maruyama, W, <i>et al.</i>, 2016; Shu, X, <i>et al.</i>, 2015; Zhao, C, <i>et al.</i>, 2018; Wang, X <i>et al.</i>, 2018; de Almeida, V. H, <i>et al.</i>, 2018; Huang, L, <i>et al.</i>, 2018; Wang X, <i>et al.</i>, 2000; Basu A, <i>et al.</i>, 2005; Garzetti GG, <i>et al.</i>, 1995; Saito T, <i>et al.</i>, 2004)

9) Alteraciones epigenéticas	Hasta el momento, de las alteraciones epigenéticas que se han analizado con relación a la RCP se encuentra la metilación del ADN (9.1) y la desregulación en la expresión de múltiples microRNAs como: miR-21, miR-3p, miR-125a, miR-130a miR-155, miR-182 y miR-214 (9.2).	Lei C, <i>et al.</i> , 2012; Pouliot LM, <i>et al.</i> , 2013; Wang F, <i>et al.</i> , 2013; Fan, Z., <i>et al.</i> , 2016; Feng, C., <i>et al.</i> 2016; Song, J., <i>et al.</i> , 2017; Zhang, J. <i>et al.</i> 2018)
-------------------------------------	---	---

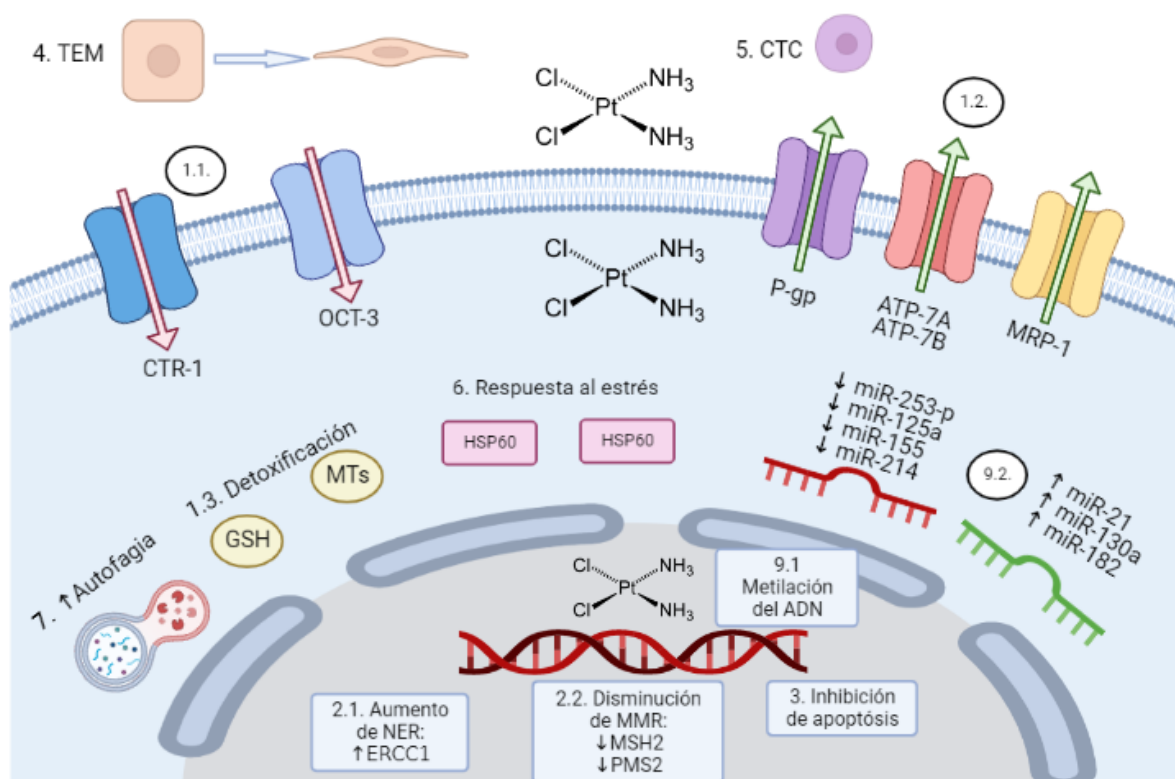


Figura 3. Mecanismos celulares y moleculares de RCP en CaCu. Se muestran ejemplos de cada mecanismo descrito en la Tabla 2. Modificado de: Zhu H, *et al.* 2016. Imagen creada en BioRender.com

AUMENTO DEL FLUJO DE SALIDA (EXTRUSIÓN)

En el presente trabajo nos enfocaremos en el mecanismo de extrusión, en el cual, la eliminación de los fármacos hacia el exterior de la célula (extrusión) se lleva a cabo por

transportadores que utilizan la hidrólisis de ATP para bombear moléculas a través de la membrana, los cuales se conocen como ATPasas de transporte y conforman una gran superfamilia que incluye a los transportadores ABC (por las siglas en inglés ATP-binding cassette) (Pedersen PL, 2007), la cual se puede dividir en siete subfamilias de acuerdo con sus secuencias genómicas y estructuras (Taylor NM., *et al.*, 2017).

Estos transportadores cubren un amplio espectro de sustratos, desde pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, como aminoácidos, azúcares, nucleósidos, vitaminas y grupos de metales a compuestos orgánicos más grandes, incluyendo péptidos, moléculas lipídicas, oligonucleótidos y polisacáridos (Wilkens, S, *et al.*, 2015), así como de múltiples antineoplásicos, medicamentos, xenobióticos y metabolitos (Cole, S. 2014).

Algunos de los transportadores ABC que participan en la regulación de la RCP en CaCu son: glicoproteína P (P-gp) (Sakaeda T, *et al.*, 2002); las ATPasas ATP7A y ATP7B (Zisowsky J., *et al.*, 2007; Beretta, G., *et al.*, 2004; Doherty B, *et al.*, 2014); y la proteína de resistencia a múltiples fármacos MRP1 (Roy, M & Mukherjee S, 2014), en esta última nos enfocaremos en el presente trabajo ya que es la que se ha reportado que se encuentra hasta en el 85 % de los tumores en pacientes con CaCu.

MRPs

La familia de proteínas de resistencia a múltiples fármacos o MRPs (por las siglas en inglés de Multi drug Resistance Protein) fue descrita por primera vez en 1992 cuando Susan Cole y Roger Deeley clonaron el gen que codifica a la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP1) cuya familia está compuesta por 7 miembros (MRP1 a MRP7) (Cole, S *et al.*, 1992). MRP1, MRP4 y MRP5 están ampliamente distribuidos en el cuerpo, mientras que MRP2, MRP3 y MRP6 se han observado principalmente en hígado, riñones e intestino (Kool M, *et al.*, 1997; Kool M, *et al.*, 1999; Lee K, *et al.*, 1998; Belinsky MG, *et al.*, 1998; Kiuchi Y, *et al.*, 1998; König J *et al.*, 1999). MRP1 y MRP3 se localizan en membranas basolaterales de las células (Flens M, *et al.*, 1996; Kool M, *et al.*, 1999; König J, *et al.*, 1999; Paulusma C, *et al.*, 1997; Schaub T, *et al.*, 1997). Se ha reportado que MRP1, MRP2, MRP3 y MRP5 favorecen la extrusión de los fármacos quimioterapéuticos de las células tumorales (Zhu, H., *et al.*, 2016). En ese sentido, se han realizado numerosos esfuerzos para

solucionar la farmacoresistencia provocada por estos transportadores a través del uso de inhibidores, sin embargo, hasta ahora el uso de inhibidores de primera y segunda generación han mostrado niveles inaceptables de toxicidad y/o bajos efectos inhibidores (Adamska, A & Falasca, M 2018).

MRP1

Esta bomba de extrusión exporta tanto endobióticos como xenobióticos y, por lo tanto, influye en procesos fisiológicos distintos de la distribución de fármacos (Cascorbi, 2011; Cole, 2014). También se ha demostrado que MRP1 transporta fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades no malignas, incluidos algunos opiáceos, antidepresivos, estatinas y antibióticos.

Con respecto al cáncer se ha observado que MRP1 desempeña un papel importante en la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos usados para leucemia mieloblástica y linfoblástica aguda, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de mama y neuroblastoma (Cole, 2014). La sobreexpresión de MRP1 en una gama de cánceres está relacionada con aumento en la recaída y disminución en la supervivencia general lo cual lo hace un marcador de importancia clínica (Alisi *et al.*, 2013; Diestra *et al.*, 2003; Haber *et al.*, 2006; Semsei *et al.*, 2012; Vulsteke *et al.*, 2013; Zhang B., *et al.*, 2012).

Específicamente en CaCu, se ha reportado que la RCP está asociada con la sobreexpresión de MRP1 (Roy, M & Mukherjee S. 2014). En un estudio en que se analizaron los perfiles genéticos de 50,000 pacientes con distintos tipos de cáncer se observó que el 81% eran positivos para MRP1 y específicamente de las 5,000 pacientes de CaCu, el 85% expresaron MRP1, posicionando a esta bomba de extrusión como la más importante al compararla con las bombas P-gp (cuya expresión se presentó en el 10% de las pacientes) y BCRP (en el 70%) (Feldman, R. *et al.*, 2015).

ESTRUCTURA DE MRP1

MRP1 es una proteína codificada por el gen ABCC1 localizado en el cromosoma 16 (16p13.1), tiene un peso molecular de 190 kDa y contiene 1580 aminoácidos (Cole *et al.*, 1992; Slovak *et al.*, 1993). La proteína está conformada por un polipéptido único compuesto por 17 segmentos transmembrana (TM) dividido en tres dominios transmembranales (TMD0, TMD1 y TMD2). TMD1 y 2 trabajan en colaboración para formar un poro permeable en el que los sustratos pueden viajar desde la región citoplásmica al espacio extracelular de forma selectiva y de manera dependiente de la energía (**Figura 4a**) (Rees *et al.*, 2009).

De los dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en la región citoplasmática, solo el dominio de unión a nucleótidos ubicado en el NBD2 es responsable de hidrolizar ATP y proporcionar energía para la traslocación (Johnson & Chen, 2017). Este dominio contiene una porción N-terminal en la región extracelular TMD0 que se enlaza al núcleo del transportador a través de un enlazador Lo (**Figura 4b**) (Conseil *et al.*, 2019).

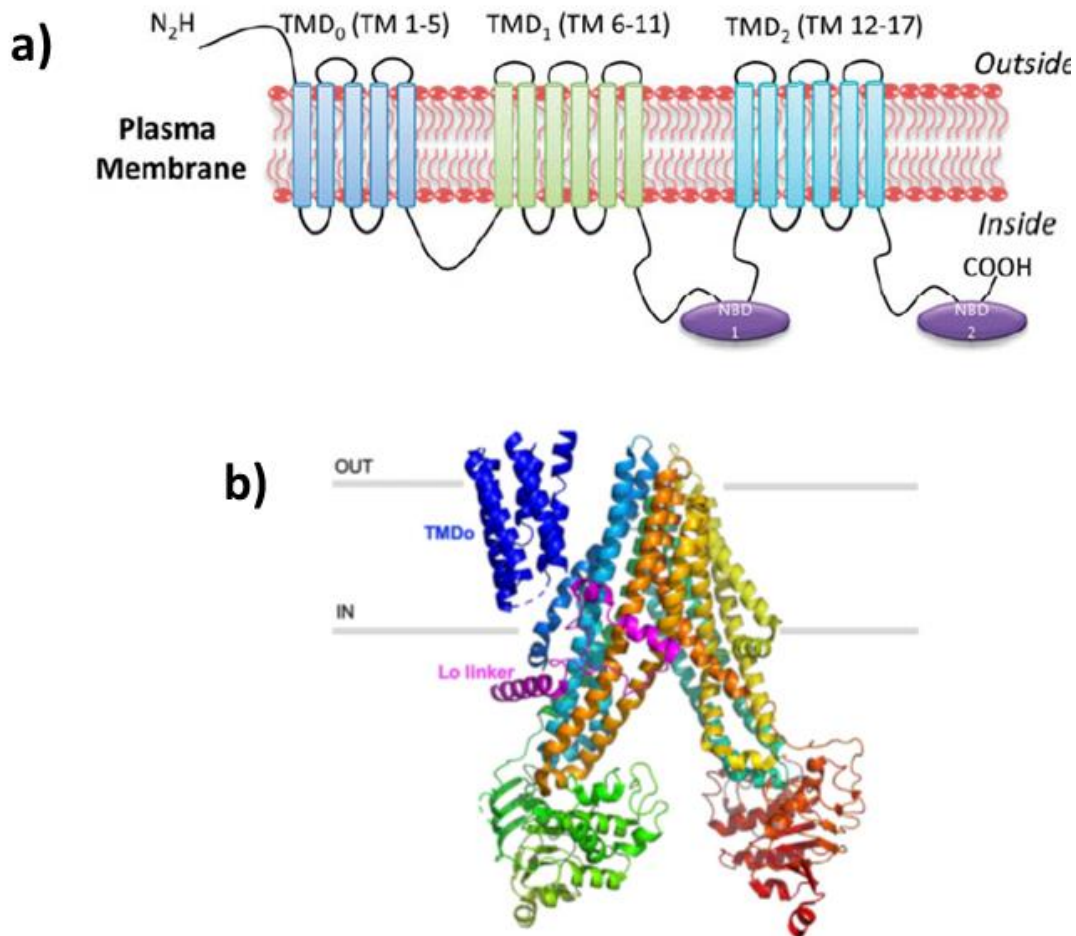


Figura 4. Estructura de MRP1. a) Modelo de 2D que muestra los distintos dominios de la proteína. b) Modelo 3D de MRP1 donde se representa la estructura conformacional de la proteína en la membrana. Tomadas de: a) Lu J, et al, 2015; b) Johnson y Chen, 2017.

El sitio de unión al sustrato del transportador ABCC1 está formado por dos haces, TM1 y TM2, y los residuos de la cara interior de cada uno de estos haces son muy diferentes (Conseil *et al.*, 2019). TM1 tiene residuos cargados positivamente mientras que TM2 tiene residuos hidrofóbicos. La región cargada positivamente por lo general se une a la región de GSH (glutación), mientras que la región rica en residuos hidrofobos se une al sustrato (Johnson & Chen, 2017). Varios reportes indican que la exportación de CP puede ser mediada por MRP1, MRP2, MRP3 y MRP5 (Borst P, *et al.*, 2000; Galluzzi L, *et al.*, 2012). El grupo de Ishikawa demostró que el CP y GSH pueden formar un complejo 1:2 que puede eliminarse de las células por una bomba GS-X como los MRPs, por lo que la formación del complejo GS-platino se considera una parte importante del metabolismo celular del CP para

su eliminación de las células tumorales (Ishikawa, *et al.*, 1993). Las etapas del ciclo de extrusión ejercido por MRP1 se representan en la **Figura 5**.

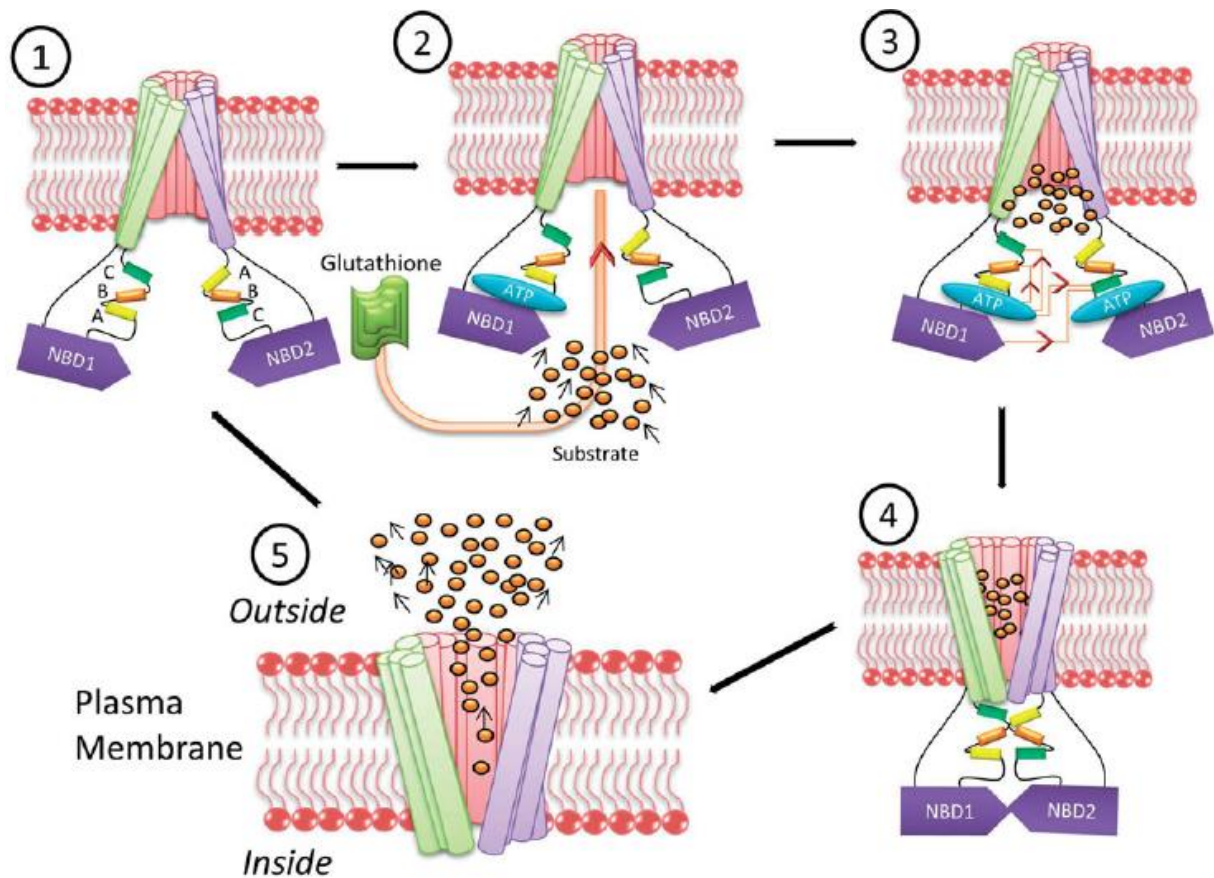


Figura 5. Etapas del ciclo de extrusión llevadas a cabo por MRP1. (1) comienza en su estado de reposo, (2) un sustrato conjugado con GSH o GSH solo se une a un sitio de alta afinidad provocando cambios conformacionales, lo que resulta en el reclutamiento de ATP a los NBD, (3) los NBD se dimerizan, lo que provoca más cambios conformacionales en los TMD, (4) el cierre de los NBD desencadena un cambio conformacional de los TMD que pasan de estar abiertos afuera y cerrados adentro, permitiendo que el sustrato unido a los NBD se mueva hacia el entorno extracelular y se libere (5). El ATP se hidroliza en ADP, el dímero NBD se desestabiliza y los TMD vuelven al estado de reposo (1) (Lu J, *et al.*, 2015).

INHIBICIÓN DE MRP1

Por otro lado, se han descrito una gran variedad de inhibidores para MRPs, específicamente para MRP1, Gakeler y colaboradores desarrollaron a MK-571 (Gekeler *et al.*, 1995), sin embargo, hasta la fecha no se han utilizado en ensayos clínicos debido a su alta toxicidad y baja estabilidad, por lo cual la quimiorresistencia mediada por MRP1 aún sigue siendo un problema por resolver.

En este sentido, es necesario contrarrestar la quimiorresistencia para mejorar la efectividad de los tratamientos. Una de las vías que se han estudiado en este contexto es la vía CD73-Adenosina, la cual, de acuerdo con múltiples reportes, participa en el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos en distintos tipos de cáncer (**Figura 6**).

VÍA CD73-ADENOSINA

La vía C73-adenosina está conformada por ectonucleotidasas de membrana, incluyendo CD39 y CD73. En esta vía los nucleótidos ATP/ADP que se encuentran en altas concentraciones (50-100µM) en el microambiente tumoral (Vaupel P. & Multhoff G., 2016), son hidrolizados de manera secuencial por CD39 para generar AMP y finalmente por CD73 para generar el nucleósido adenosina (Ado) (Zimmermann, H., *et al.*, 2012). La Ado extracelular tiene actividad de señalización que está mediada por 4 receptores de adenosina (ARs) específicos: A1R, A2AR, A2BR y A3R, éstos se localizan en la superficie celular y están acoplados a proteínas G (Antonioli L., *et al.*, 2016).

VÍA CD73-ADENOSINA Y QUIMORRESISTENCIA

Se reportó que Ado regula la resistencia a vincristina en glioblastoma multiforme a través de la señalización de A3R y aumento de la expresión de MRP1 (Quezada, C, *et al.*, 2013). En otro trabajo se observó que al inhibir A1R y A2BR se sensibilizaron las células de glioblastoma multiforme en etapa IV al tratamiento con tomozolomida (Daniele, S. *et al.* 2014). De manera similar se describió que A3R regula la quimiorresistencia a vincristina en células similares a troncales de glioblastoma a través de MRP1 (Torres, A. *et al.* 2016). Por otro lado, se describió que al inhibir CD73 o A2AR se puede sensibilizar a las células de cáncer de mama triple negativo al tratamiento con doxorrubicina (Loi, S, *et al.*, 2013)

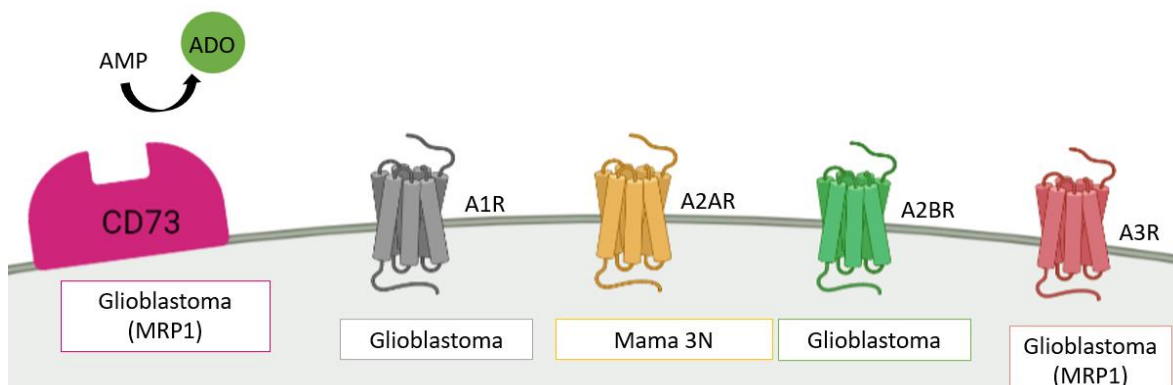


Figura 6. Quimiorresistencia en cáncer relacionada con la vía CD73-Adenosina. En tumores de glioblastoma y cáncer de mama se ha reportado que la generación de Ado por la actividad de CD73 y la señalización de Ado a través de A1R, A2AR, A2BR y A3R promueven el desarrollo de quimiorresistencia a tomoxolamida, doxorubicina y vincristina. Imagen de diseño propio.

VÍA CD73-ADENOSINA EN CaCu

Nuestro grupo de investigación ha encontrado que la expresión de CD73 y los ARs (particularmente A2AR, A2BR y A3R) incrementan en los tejidos tumorales de CaCu respecto a los tejidos de cérvix normal, particularmente en estados avanzados de la enfermedad (Torres-Pineda, 2015). Asimismo, se ha reportado que las líneas celulares CaSki, SiHa, HeLa y ROVA, positivas a la infección por VPH, expresan mayores niveles de CD73 en la membrana celular en relación con las líneas celulares C33A y VIBO, negativas a la infección por VPH, además de producir altas concentraciones de Ado (Mora-García, *et al.*, 2017). Además, reportamos que la vía CD73-Adenosina es importante para incrementar las características protumorales de las células de CaCu, incluyendo una mayor expresión de MRP1 (García-Rocha, *et al.*, 2022).

JUSTIFICACIÓN

Por tanto, en este estudio, examinamos el efecto de CD73 y la interacción de Ado con los ARs en la expresión de MRP1 en células CaCu para determinar si está relacionada con la RCP, y si al bloquear CD73 o los ARs, se pueden quimiosensibilizar a las células al tratamiento con CP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que las células de CaCu expresan CD73 en la membrana y son capaces de producir grandes cantidades de Ado y que la vía CD73-Adenosina es importante para incrementar las características protumorales de las células de CaCu, incluyendo una mayor expresión de MRP1. Con base en lo anterior, en este estudio nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿La vía CD73-Adenosina participa en la inducción de MRP1 e incrementa la RCP en células de CaCu?

¿El bloqueo de CD73 o de la señalización de Ado con los ARs permitirá sensibilizar a las células de CaCu al tratamiento con CP?

HIPÓTESIS

La expresión de MRP1 es regulada por la vía CD73-Adenosina, por lo tanto, participa en el desarrollo la resistencia a CP en las células de CaCu.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar la participación de la vía CD73-Adenosina en la generación de resistencia a CP en células de CaCu CaSki y HeLa

Objetivos Particulares:

- 1.- Determinar la expresión de los ARs en células de CaCu.
- 2.- Analizar la participación de la actividad de los ARs en la inducción de la expresión de MRP1 en células de CaCu.
- 3.- Analizar la participación de CD73 en la regulación de la expresión de MRP1 en células de CaCu
- 4.- Determinar si la inhibición de CD73 o el bloqueo de los ARs está relacionado con la actividad de extrusión de MRP1.
- 5.- Determinar si la inhibición de CD73 o el bloqueo de los ARs sensibiliza a las células tumorales de CaCu al tratamiento con CP.

METODOLOGÍA

Cultivos celulares: Las líneas celulares de CaCu, CaSki (VPH-16⁺) y HeLa (VPH-18⁺), fueron cultivadas con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/μl de penicilina, 100 U/μl de estreptomicina y mantenidas en condiciones de esterilidad, a 37 °C con 5% de CO₂ en un ambiente de humedad saturante.

Citometría de flujo para analizar la expresión de los Receptores de Adenosina: En las líneas celulares CaSki y HeLa se determinó la expresión de A1R, A2AR, A2BR, A3R mediante citometría de flujo para lo cual se diseñó un panel de anticuerpos en el software Fluoro Finder, específicamente para el citómetro FACS Canto II de BD, y se obtuvo el panel de anticuerpos de la **Tabla 3**, para los cuales se realizó una titulación para determinar la dilución adecuada para realizar los ensayos tomando en cuenta las instrucciones de cada fabricante.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la detección de las moléculas de la vía CD73-Ado

MARCADOR	FLUOROCROMO	MARCA/ NÚMERO DE CATÁLOGO	DILUCIÓN UTILIZADA	LOCALIZACIÓN DEL EPITOPO
A1R	Alexa Fluor 647	Bioss/s- 4235R-A647	1:100	Extracelular
A2AR	PE	Novus Biologicals/ NBP1- 39474PE	1:100	Intracelular
A2BR	Alexa Fluor 750	Bioss/ s- 5900R-A750	1:20	Extracelular
A3R	FITC	Biorbyt/ orb399642	1:200	Extracelular

Los experimentos se realizaron por duplicado, para cada determinación se obtuvieron 1×10^4 eventos en un citómetro BD FACS Canto II y se analizaron con el software Flow Jo 10.

Inhibición de la expresión de CD73. Las células de CaCu inhibidas en la expresión de CD73 fueron obtenidas de un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (García-Rocha, *et al.*, 2019) en donde se utilizaron los siguientes siRNAs de doble cadena dirigidos específicamente contra los genes de CD73: NM_001204813.1 and NM_002526.3: siRNA-1, GAT CCG CCA CTA GCA TCT CAA ATA TTT CAA GAG AAT ATT TGA GAT GCT AGT GGT TTT TTA CGC GTG; and siRNA-2, AAT TCA CGC GTA AAA AAC CAC TAG CAT CTC AAA TAT TCT CTT GAA ATA TTT GAG ATG CTA GTG GCG

(RNAi Target Sequence Selector, http://www.clontech.com/MX/Support/Online_Tools). Los RNA de interferencia correspondientes fueron clonados en el vector Psiren-Retro Q (Clontech Laboratories, Inc. USA), como control de transfección se utilizó el vector Psiren-Retro Q vacío (Clontech Laboratories, Inc. USA). La selección de las células con transfección estable se realizó al adicionar 1µl/ml de puomicina (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo ya que el vector pSIREN-Retro Q contiene un gen de resistencia a puomicina.

Citometría de flujo de CD73 y MRP1. Para analizar la expresión de CD73 y MRP1 se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD73 acoplado a PE (Cat: PHA550257 BD) y anti-MRP1 (Cat: MRPM5), el cual fue revelado con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (CAT: F5262 Sigma-Adrich). La expresión de ambos antígenos se realizó en las líneas celulares CaSki y HeLa parentales (WT), transfectadas con el vector vacío (pS) y desreguladas para CD73 (pSiren/siRNA-CD73). Los experimentos se realizaron por duplicado y para cada determinación se obtuvieron 1×10^4 eventos en un citómetro BD FACS Canto II y se analizaron con el software Flow Jo 10. Se normalizó la expresión con respecto a la línea parental (WT) y se realizó una prueba de t de Student para comparar las diferentes condiciones.

Protocolo general de citometría. En general se realizó un protocolo estándar de citometría para analizar la expresión de los ARs, y MRP1. Se fijaron al menos 5×10^5 células con paraformaldehído al 2% incubándolas durante 5 minutos seguido con un lavado, posteriormente si el epítipo del anticuerpo en cuestión es intracelular se realizó la permeabilización de las células añadiendo 250 µL de saponina 0.03% e incubando durante 10 minutos seguido de un lavado, posteriormente se bloqueó con 100 µL de SFB seguido de un lavado, posteriormente se añadieron los anticuerpos y se incubaron durante 30 minutos, seguido de un lavado y finalmente se agregó paraformaldehído al 1% para fijar. En el caso de la citometría para CD73 el protocolo es similar, únicamente se omiten los dos primeros pasos de fijación y permeabilización.

Inhibición de la actividad de los ARs. Con la finalidad de analizar el efecto de la interacción de Ado con los ARs en la regulación de la expresión de MRP1 en las líneas celulares CaSki y HeLa, se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos y se

utilizaron antagonistas selectivos para los ARs en una concentración equimolar de 10 μ M: A1R (DPCPX); A2AR (ZM241385), A2BR (MRS1754), y A3R (MRS1523) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los antagonistas de ARs se incubaron durante 30 minutos para permitirles bloquear a los receptores y finalmente se adicionó 1mM de Adenosina, se dejaron durante 48 h y se analizó la expresión de MRP1 mediante citometría de flujo como se mencionó previamente, se utilizó la prueba ANOVA de una vía para comparar el efecto de los diferentes tratamientos en la expresión de MRP1.

Determinación de IC_{50} . Para analizar el efecto del CP, se hicieron dos grupos experimentales: 1) Células sin tratamiento (WT), células con vector vacío (pS) y células inhibidas en CD73 (pSiren/siRNA-CD73); y 2) Células WT, células tratadas con 1mM de adenosina y células tratadas con 10 μ M del antagonista de A2AR (ZM241385) e incubadas en presencia de 1mM de adenosina. Se sembraron 2×10^3 células por pozo en placas de 6 pozos y se adicionaron los estímulos correspondientes, después de 48 horas se adicionaron diferentes concentraciones de CP (1, 3.15, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μ M) tomando como referencia las concentraciones utilizadas de CP para obtener la IC_{50} de cada línea celular de CaCu, consultado en la siguiente página: (<https://www.cancerrxgene.org/compound/Cisplatin/1005/overview/ic50>). Después de 24 horas de incubación, se analizó la viabilidad mediante la técnica colorimétrica de CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, USA), en donde a cada pozo de cultivo se adicionaron 20 μ l del reactivo y las células se incubaron durante 4 horas, al finalizar este tiempo se determinó la absorbancia a 490 nm en el equipo multimodal de lectura de placas GloMax Explorer (Promega, USA). Este método colorimétrico permite determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad o quimiosensibilidad ya que la cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Los datos obtenidos de los triplicados experimentales se transformaron, se normalizaron y se realizó una regresión no lineal dosis respuesta en la que los valores del inhibidor en X (concentración de CP) se transformaron a logaritmos y se compararon con los valores normalizados de la respuesta (viabilidad) en Y, y se graficaron las medias. Se utilizó una curva de referencia para las condiciones WT. Posteriormente se analizó mediante una prueba de ANOVA de una vía, la diferencia entre el IC_{50} de las distintas condiciones.

Análisis de la extrusión mediada por MRP1. Para determinar el nivel de extrusión mediado por MRP1 se utilizó el kit Vybrant Multidrug Resistance Assay Kit (Molecular Probes, Oregon USA) haciendo una adecuación al protocolo. Brevemente, se utilizó el colorante fluorogénico calceína AM que contiene el kit, y se utilizó el inhibidor MK-571, específico de MRP1, en lugar de verapamil, en concentraciones desde 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ M (Santa Cruz Biotechnology). Se hicieron dos grupos experimentales: 1) Células sin tratamiento (WT) y células desreguladas para CD73 (pSiren/siRNA-CD73-); y 2) Células WT y células tratadas con 1mM de adenosina y 10 μ M del antagonista de A2AR (ZM241385). Después de cultivarlas durante 48 h con los tratamientos se despegaron y se utilizaron 5×10^5 células por pozo por duplicado para cada concentración, en placas de 96 pozos de fondo U, se añadieron las distintas concentraciones del inhibidor MK-571 en 50 μ l de medio, y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, a continuación se añadieron 50 μ l de calceína AM y se incubaron nuevamente a 37 °C durante 15 minutos, seguido de centrifugación 5 min a 2,000 rpm y dos lavados con medio de cultivo frío, al final las células se resuspendieron en 200 μ l de medio de cultivo frío y se colocaron en una placa Cornig oscura de poliestireno no tratada de fondo plano (Cat:3915) para cuantificar la fluorescencia en el lector de microplacas multimodo GloMax Explorer con un filtro de emisión de 500-550 nm y con el filtro de excitación Azul 475 nm. Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de fluorescencia y se utilizó ANOVA de una vía para comparar el efecto de los diferentes tratamientos con respecto a las células sin tratamiento.

Análisis estadístico: Los datos numéricos se presentan como el valor promedio $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las comparaciones se evaluaron utilizando análisis estadístico en GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Prism software, USA). Las diferencias con $p < 0.05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

Los receptores de adenosina A1AR, A2AR, A2BR Y A3R se expresan en líneas celulares de CaCu

Se analizó mediante citometría de flujo el nivel de expresión de CD73 y de los ARs en las células tumorales CaSki y HeLa (**Figura 7**). La expresión de todos los receptores es positiva en ambas líneas celulares.

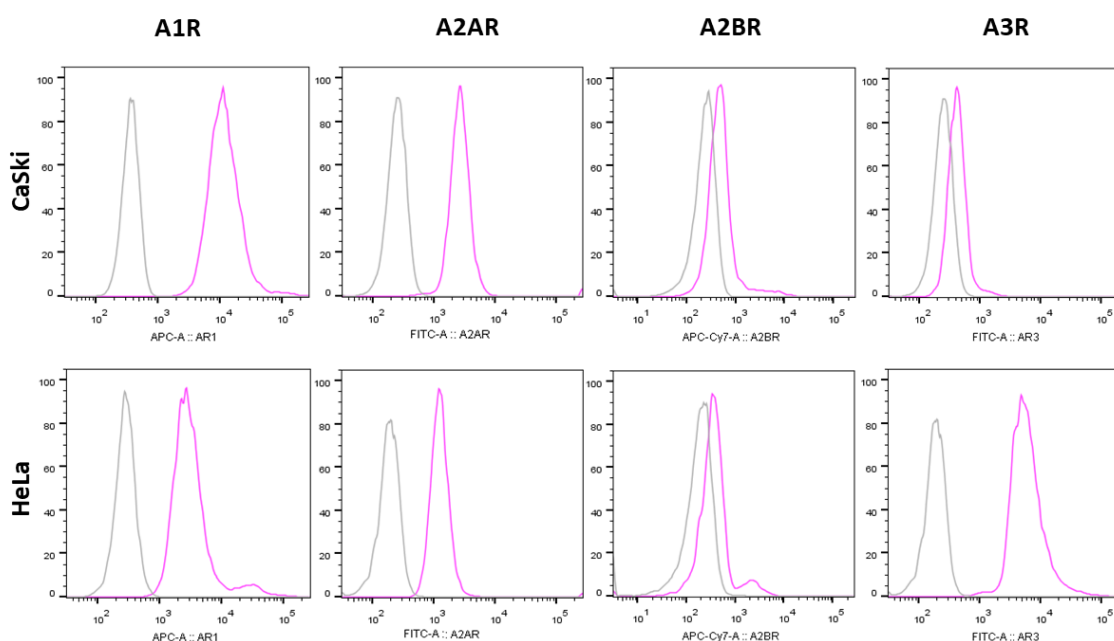


Figura 7. Expresión de los receptores de adenosina en las células de CaCu. Se muestra la expresión de A1R, A2AR, A2BR y A3R en las células CaSki y HeLa (histogramas en color rosa) y la autofluorescencia de cada tipo celular (histogramas en color gris). Histogramas representativos de tres experimentos independientes.

A excepción de A2BR la expresión de A1R, A2AR y A3R entre ambas líneas celulares fue

heterogénea, encontrándose mayor expresión de A1R y A2AR en CaSki en relación con HeLa y de A3R en HeLa respecto a CaSki.

Con base en estos resultados se confirmó que en ambas líneas celulares de manera basal se expresan los 4 ARs, por lo cual se podrá analizar si tiene una relación con la regulación de MRP1.

Ado incrementa la expresión de MRP1 en células de CaCu a través de A2AR.

Estudios recientes han reportado que la señalización de Ado a través de ARs es capaz de regular la expresión de MRP1 en varios tipos tumorales y promover la quimiorresistencia (Loi, S, *et al.*, 2013; Quezada, C, *et al.*, 2013; Torres A, *et al.*, 2016; Yan A, *et al.*, 2019).

Con la finalidad de analizar el efecto de Ado en la expresión de MRP1 en células de CaCu, las líneas celulares CaSki y HeLa fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de Ado (0.001, 0.001, 0.01, 0.1 y 1mM) durante 48h y la expresión de MRP1 fue analizada mediante citometría de flujo. En ambas líneas celulares se observó un incremento de MRP1 dependiente de la concentración de Ado, encontrándose el mayor incremento (30%) a la concentración de 1mM (**Figura 8a**).

Posteriormente, para identificar el AR por el cual Ado señala para inducir la expresión de MRP1, las células CaSki y HeLa fueron cultivadas en presencia de 1mM de Ado y en presencia o ausencia de 10μM de cada uno de los siguientes antagonistas específicos de cada receptor: DPCPX (A1R), ZM241385 (A2AR), MRS1754 (A2BR) y MRS1523 (A3R). De manera interesante, se observó que el bloqueo de A2AR con ZM241385 revirtió de manera significativa el incremento en el nivel de expresión de MRP1 inducido por Ado en ambas líneas celulares. De hecho, los niveles de MRP1 obtenidos con el bloqueo, fueron inferiores a los de la expresión basal de esta proteína (**Figura 8b**), sugiriendo que la señalización de Ado a través de A2AR es importante para mantener la expresión de MRP1 en estas células tumorales.

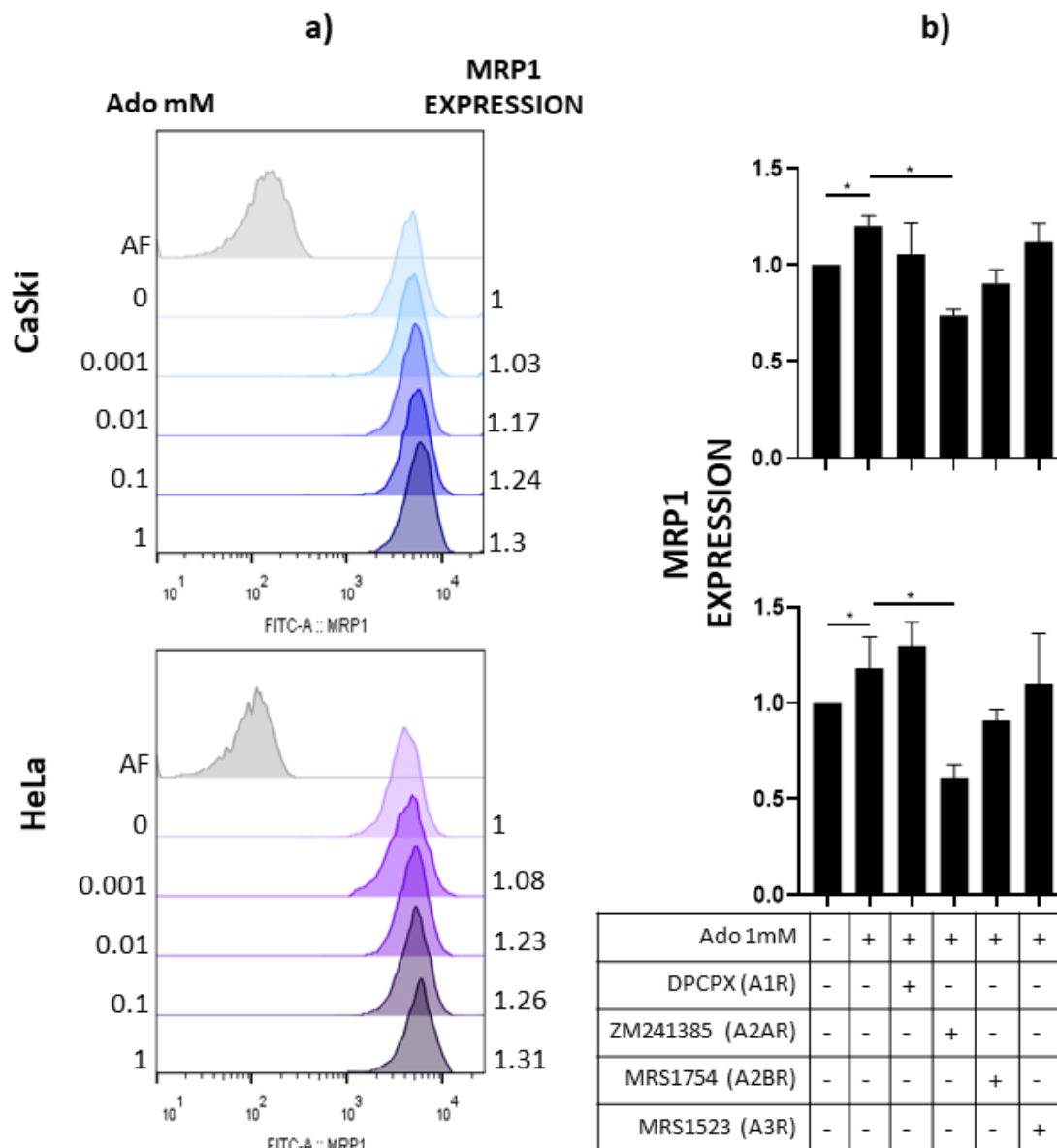


Figura 8. Efecto de Ado y el bloqueo de ARs en la expresión de MRP1 en células de CaCu. a) Las células CaSki y HeLa (1×10^5) fueron cultivadas por 48h con diferentes concentraciones de Ado (0, 0.001, 0.01, 0.1 y 1mM) y la expresión de MRP1 fue analizada por citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia de MRP1 en las células cultivadas en ausencia de Ado fue normalizado a 1. AF, Autofluorescencia. Histogramas representativos de tres experimentos independientes. b) Expresión de MRP1 en las células CaSki y HeLa cultivadas en presencia de 1mM de Ado y en presencia (+) o ausencia (-) de 10 μ M de los antagonistas específicos de los ARs. Datos representativos de 3 experimentos independientes $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ANOVA de una vía.

La inhibición de CD73 disminuye la expresión de MRP1 en células de CaCu.

La vía CD73-Adenosina en las células tumorales se ha asociado con la promoción de la quimiorresistencia a diferentes agentes antineoplásicos (Loi, S, *et al.*, 2013; Quezada, C, *et al.*, 2013; Torres A, *et al.*, 2016; Yan A, *et al.*, 2019). Para determinar si CD73 participa en la regulación de la expresión de MRP1 en las células de CaCu, nosotros utilizamos células CaSki y HeLa que previamente fueron inhibidas en la expresión de CD73 utilizando el vector pSiren que contiene un siRNA dirigido a CD73 (pS/siRNA-CD73) y que mostraron muy baja capacidad para hidrolizar el AMP a Ado (García-Rocha R, *et al.*, 2019).

La expresión de CD73 en las células CaSki-pS/siRNA-CD73 y HeLa-pS/siRNA-CD73 fue significativamente menor a la mostrada por las células CaSki y HeLa parentales, CaSki-WT y HeLa-WT, o a la mostrada por las células transfectadas solo con el vector pSiren, CaSki-pS y HeLa-pS, respectivamente. De manera interesante, en las células CaSki-pS/siRNA-CD73 y HeLa-pS/siRNA-CD73 se observó una disminución significativa en la expresión de MRP1 respecto a los controles CaSki-WT y HeLa-WT, y a las células CaSki-pS y HeLa-pS, respectivamente (**Figura 9**). Estos resultados sugieren que CD73 es importante para el mantenimiento de la expresión de MRP1 en las células tumorales de CaCu.

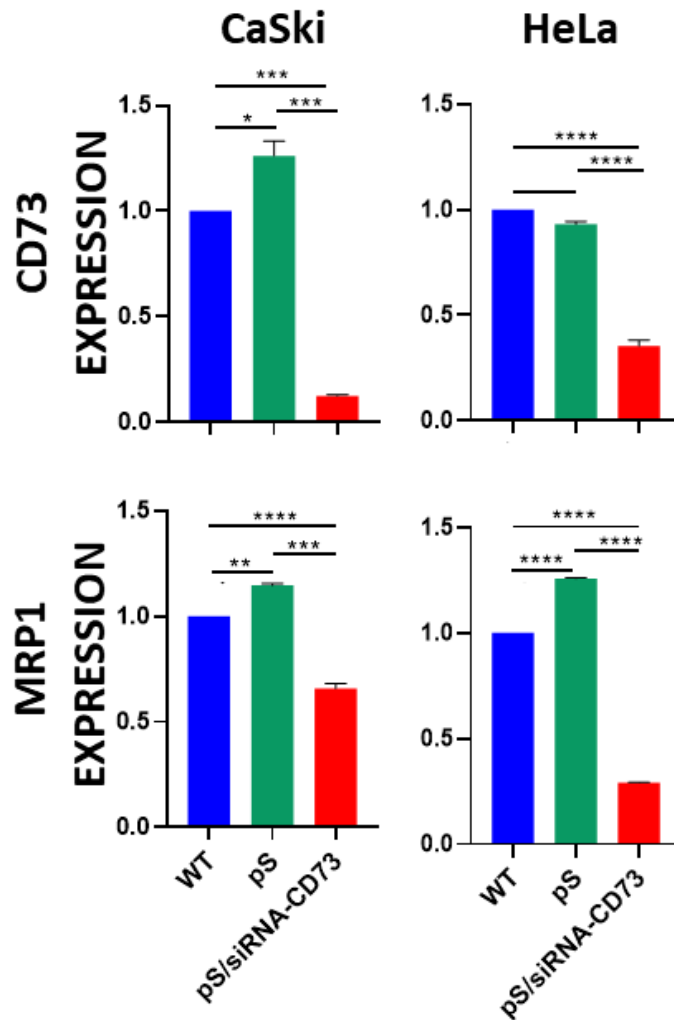


Figura 9. Efecto de la inhibición de CD73 en la expresión de MRP1 en células de CaCu. Células CaSki y HeLa inhibidas en la expresión de CD73 mediante transfección con el vector pSiren conteniendo un siRNA dirigido a CD73 (pS/siRNA-CD73, barras en color rojo) fueron analizadas en la expresión de MRP1 mediante citometría de flujo. Las células CaSki y HeLa parentales (WT, barras en color azul) y las células transfectadas solo con el vector pSiren (pS, barras en color verde), fueron utilizadas como controles. La intensidad media de fluorescencia de MRP1 en las células parentales fue normalizado a 1. Datos representativos de 3 experimentos independientes $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía.

La inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR disminuye la capacidad extrusiva de las células de CaCu a través de MRP1.

Con la finalidad de conocer si la inhibición de la expresión de CD73 o el bloqueo de A2AR afectaba la capacidad extrusiva de las células de CaCu a través de MRP1, las células de

CaCu fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de MK-571 (0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M y 100 μ M) el cual es un inhibidor específico de MRP1, y en presencia del colorante fluorogénico calceína AM el cual es fluorescente debido a la actividad de esterasas en el citoplasma. La inhibición de la actividad de MRP1 en las células CaSki-WT y HeLa-WT fue dependiente de la concentración utilizada de MK-571, la cual fue revelada por el incremento en el porcentaje intracelular de calceína fluorescente (barras en color azul), encontrándose la mayor cantidad de calceína fluorescente intracelular a la concentración de 100 μ M de MK-571 en ambas líneas celulares (**Figura 10**).

De manera interesante, las células CaSki-pS/siRNA-CD73 presentaron incrementos significativos en el porcentaje de calceína fluorescente retenida intracelularmente en relación con CaSki-WT cuando se utilizaron concentraciones $\geq 40\mu$ M de MK-571 (**Figura 10a, barras en color rojo**); mientras que no se observó dicho efecto en las células HeLa-pS/siRNA-CD73 en relación con HeLa-WT en cualquiera de las concentraciones utilizadas de MK-571 (**Figura 10b, barras en color rojo**).

Por otro lado, las células CaSki-Ado+ZM241385 y HeLa-Ado+ZM241385 presentaron incrementos significativos en el porcentaje de calceína fluorescente retenida intracelularmente en relación con CaSki-WT y HeLa-WT a concentraciones $\geq 60\mu$ M y $\geq 20\mu$ M de MK-571, respectivamente (**Figuras 10b y 10d, barras en color púrpura**).

En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR tiene efecto importante en la reducción de la capacidad extrusiva mediada por MRP1 en las células de CaCu.

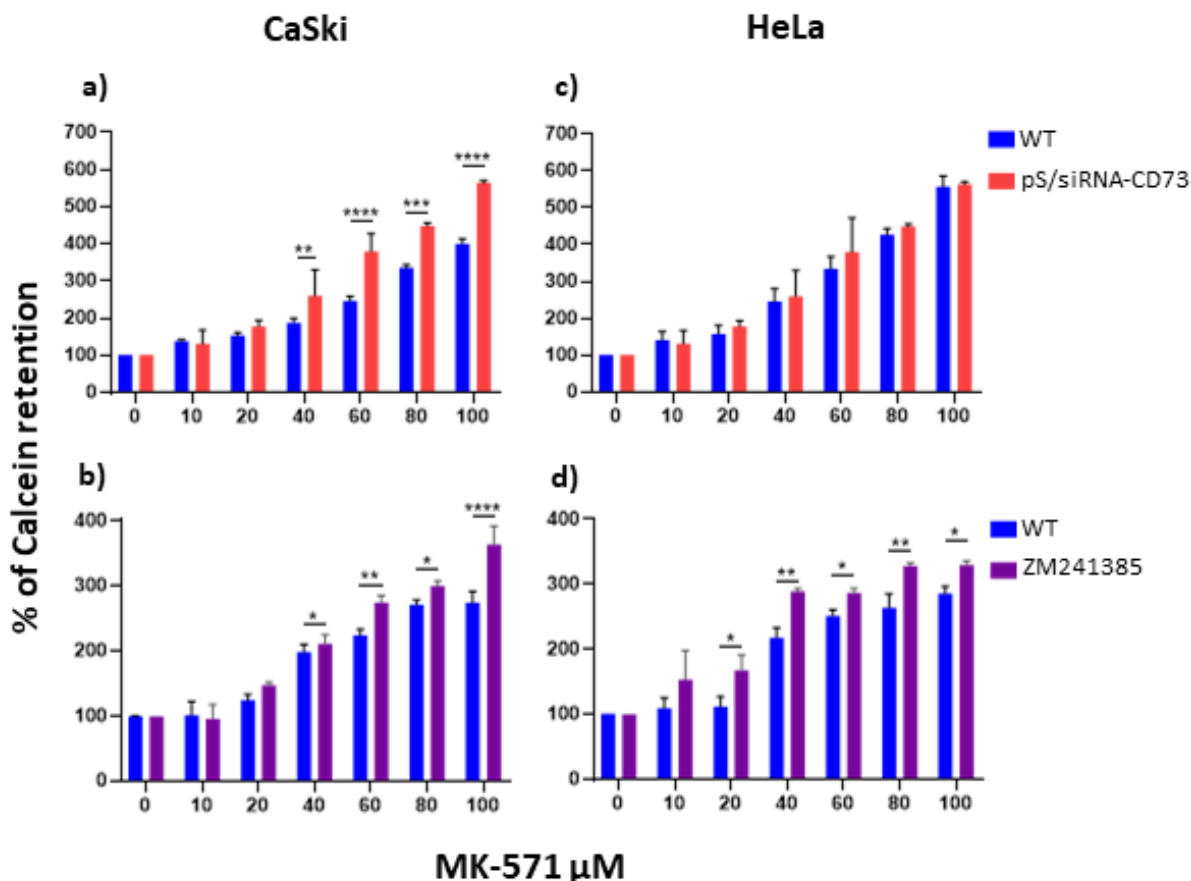


Figura 10. La inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR en las células de CaCu disminuye la capacidad extrusiva en las células de CaCu a través de MRP1. a) Células CaSki-WT y CaSki-pS-siRNA-CD73; b) Células CaSki-WT y CaSki-Ado+ ZM241385; c) Células HeLa-WT y HeLa -pS-siRNA-CD73; y d) Células HeLa-WT y HeLa-Ado+ ZM241385, 5×10^5 de cada una de ellas, fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ M) de MK-571, inhibidor específico de MRP1, y en presencia del colorante fluorogénico calceína AM como sustrato de MRP1. El contenido intracelular de calceína fluorescente en las células CaSki-WT y HeLa-WT en ausencia de MK-571 fue normalizado a 100%. Datos representativos de 3 experimentos independientes $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$, ANOVA de una vía.

La inhibición de CD73 o el bloqueo de A2AR favorecen la quimiosensibilidad al CP de las células de CaCu

La RCP ha sido asociada con un aumento en la expresión de MRP1 en tumores de CaCu (Roy, M & Mukherjee S. 2014; Feldman, R., *et al.*, 2015). Tomando en consideración que la inhibición de la expresión de CD73 o el bloqueo de A2AR disminuyó significativamente

la expresión de MRP1 y la capacidad extrusiva mediada por esta proteína en las células CaSki y HeLa, se determinó el efecto de CP en la viabilidad de las células tumorales de CaCu bajo estas condiciones. Para ello se cultivaron las células tanto CaSki y HeLa inhibidas para CD73 y con ZM241385 para bloquear A2AR en presencia de diferentes concentraciones de CP (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μ M) durante 24 h.

Las células CaSki-pS/siRNA-CD73 y HeLa-pS/siRNA-CD73 fueron significativamente más quimiosensibles al CP en relación con las células CaSki-WT o HeLa-WT, respectivamente (**Figura 11a**). Con base en las curvas de viabilidad, los valores de IC₅₀ obtenidos para CaSki-WT, CaSki-pS y CaSki-pS/siRNA-CD73 fueron: 31.87 μ M, 30.86 μ M y 19.64 μ M, respectivamente; y para HeLa-WT, HeLa-pS y HeLa-pS/siRNA-CD73 fueron 22.2 μ M, 22.34 μ M y 16.52 μ M, respectivamente (**Figura 11d**).

Por otro lado, las células CaSki-Ado y HeLa-Ado presentaron un incremento en los valores de IC₅₀ de CP en relación con CaSki-WT y HeLa-WT, respectivamente, confirmando que la Ado induce un aumento en la quimiorresistencia, por el contrario, se observó que las células CaSki-Ado+ZM241385 y HeLa-Ado+ZM241385 fueron significativamente más quimiosensibles al tratamiento con CP en relación con las células CaSki-WT y HeLa-WT, respectivamente (**Figura 11b**).

Los valores de IC₅₀ obtenidos para CaSki-Ado y CaSki-Ado+ZM241385 fueron 42 μ M y 11.62 μ M, respectivamente; y para HeLa-Ado y HeLa-Ado+ZM241385 fueron: 26.26 μ M y 15.83 μ M respectivamente (**Figura 11d**) lo que indica una sensibilización al CP al bloquear A2AR.

Por otro lado, es importante mencionar que el incremento en la sensibilidad a CP observado en las células de CaCu disminuidas en la expresión de CD73 o con bloqueo en A2AR fue comparable al obtenido en las células de CaCu tratadas con 100 μ M de MK-571, un inhibidor específico de MRP1 (Gekeler V, *et al.*, 1995) cuyos valores de IC₅₀ obtenidos fueron 14.76 μ M en CaSki y 10.77 μ M en HeLa (**Figura 11d**).

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de CD73 y la señalización de Ado a través de A2AR son importantes para el mantenimiento de la expresión de MRP1 y la RCP

en las células de CaCu, y que la inhibición de CD73 o bloqueo de A2AR favorece la quimiosensibilidad de estas células a CP, lo cual podría ser de utilidad para mejorar la terapia con CP en pacientes con CaCu avanzado o recurrente.

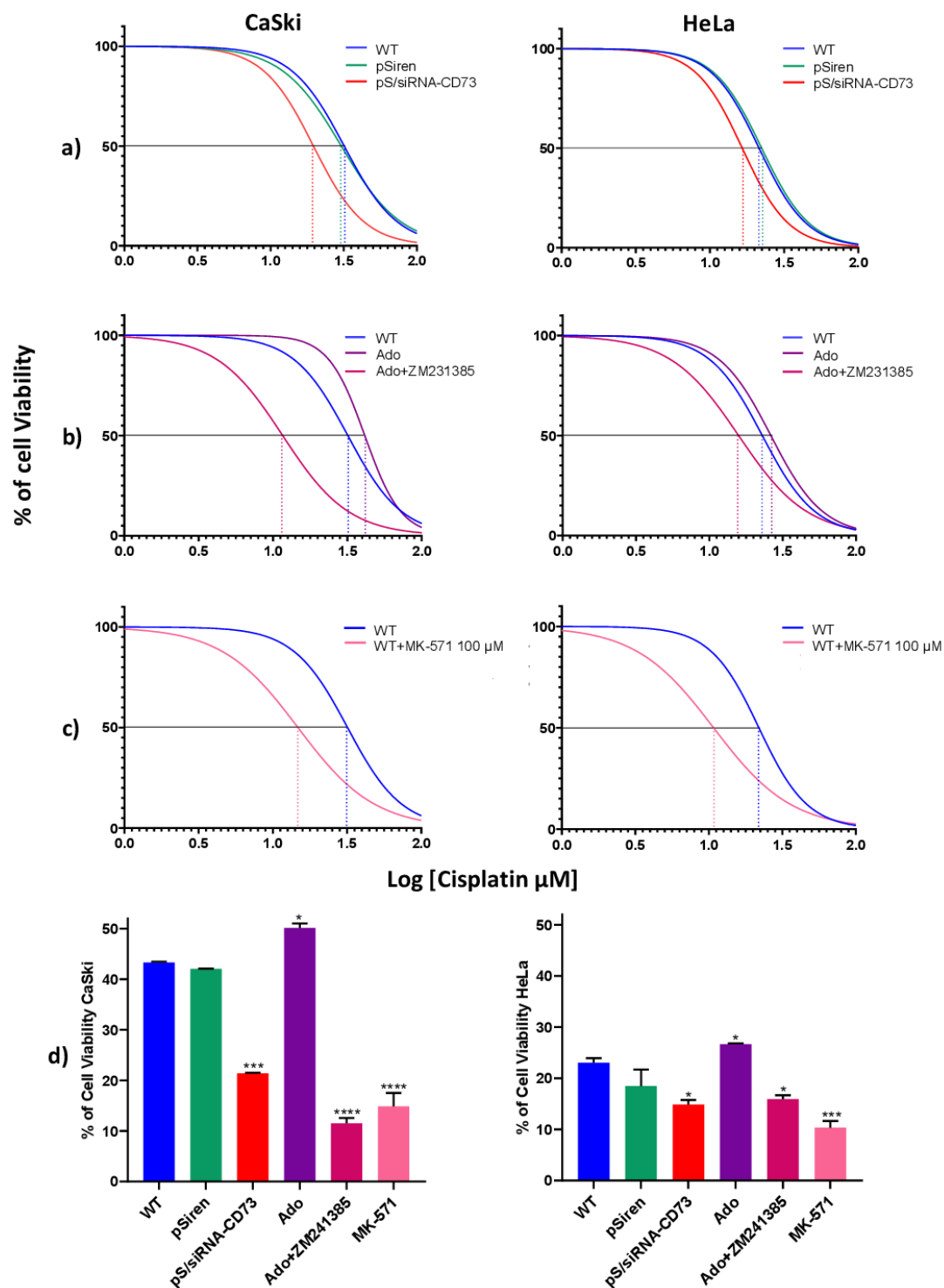


Figura 11. Efecto de CP en la viabilidad de células de CaCu inhibidas en la expresión de CD73 o con bloqueo en A2AR. El efecto de diferentes concentraciones de CP (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μ M) fue evaluado mediante ensayos de la viabilidad en las siguientes condiciones: a) células CaSki y HeLa parentales (WT), transfectadas con el vector pSiren (pSiren), o transfectadas con el vector pSiren conteniendo un siRNA

dirigido a CD73 (pS/siRNA-CD73); b) células CaSki y HeLa parentales (WT), tratadas con 1mM de Ado (Ado), o tratadas con Ado en presencia de 10 μ M del antagonista de A2AR (Ado+ZM241385); c) células CaSki y HeLa parentales (WT) o células CaSki y HeLa tratadas con 100 μ M de MK-571; d) análisis de ANOVA de una vía donde se compara el IC₅₀ cada una de las condiciones con el control (WT), datos representativos de 3 experimentos independientes $\pm$ SEM. *p < 0.05, ***p < 0.001 y ****p < 0.0001; e) valores de IC₅₀ de CP para cada condición con el intervalo de confianza (R²). Los IC₅₀ se calcularon usando la versión 8 de GraphPad Prism empleando los valores de OD de cada condición y las concentraciones de CP [μ M] transformados a logaritmo y normalizados de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

El objetivo farmacológico de los agentes quimioterapéuticos contra células cancerosas es administrar la suficiente cantidad de fármaco para inducir apoptosis de las células malignas (Yuan T, *et al.*, 2021). Sin embargo, la reducción en la acumulación del fármaco, debido a la presencia de transportadores ABC pueden estar involucrados en un aumento en el eflujo de estos agentes, disminuyendo así su eficacia y contribuyendo al desarrollo de MDR (Munoz M, *et al.*, 2007).

Entre estos transportadores, la proteína MRP1 es responsable de la extrusión de un amplio espectro de sustratos a través de la membrana plasmática, incluyendo antineoplásicos como doxorrubicina, vincristina, paclitaxel, irinotecán, metotrexato y CP (Poku VO, Hiram SH, 2022). Por esta razón, el objetivo de identificar moduladores de MRP1 es de gran interés para la investigación oncológica y de gran valor clínico en el tratamiento de la MDR.

En este contexto, una gran variedad de moduladores de MRP1, los cuales incluyen derivados de fitoquímicos, terapia basada en miRNAs e inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), han tenido efectos significativos en la regulación de la actividad de este transportador, sin embargo, uno de los desafíos encontrados en los ensayos clínicos ha sido su baja eficacia y seguridad cuando se aplica en modelos *in vivo* (Poku VO, Hiram SH, 2022).

Por otro lado, estudios recientes han reportado que la generación de Ado, a través de la actividad biológica de CD73, participa de manera importante en el desarrollo de la quimiorresistencia a vincristina en células tumorales de glioblastoma debido al incremento en la expresión MRP1 (Loi S, *et al.*, 2013; Quezada C, *et al.*, 2013; Torres A, *et al.*, 2016; Yan A, *et al.*, 2020).

En el presente estudio encontramos que Ado modula positivamente la expresión de MRP1 en células tumorales de CaCu de manera dependiente de la concentración, lo que implica que las altas concentraciones de Ado ($>50\mu\text{M}$) en el microambiente tumoral producidas por la hidrólisis de los nucleótidos de adenina a través de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, lo cual es característico de los tumores ginecológicos (Bahreyni A, *et al.*, 2018) contribuyen a mantener niveles altos de MRP1 en las células tumorales de CaCu, lo cual podría contribuir al desarrollo de RCP en las pacientes.

En un estudio previo observamos que la inhibición en la expresión de CD73 en células de CaCu redujo la capacidad de estas células para generar Ado a partir de la hidrólisis de AMP (García-Rocha R, *et al.*, 2019). De manera interesante, en el presente estudio observamos que en las células con inhibición de la expresión de CD/#, CaSki-pS/siRNA-CD73 y HeLa-pS/siRNA-CD73, se disminuye significativamente la expresión de MRP1, probablemente debido a la disminución de la producción de Ado, disminuyendo su actividad de señalización a través de los ARs.

En concordancia con lo anterior, observamos que la señalización de Ado a través de A2AR puede ser importante en el mantenimiento de la expresión de MRP1 en las células tumorales CaSki y HeLa, debido a que el bloqueo de A2AR con el antagonista específico ZM241385, fue capaz de revertir el incremento en el nivel de expresión de MRP1 inducido por Ado en ambas líneas celulares.

En conjunto estos resultados nos sugieren que la actividad de CD73 y la señalización a través de A2AR pueden ser claves en la inducción de MRP1 en CaCu. Resultados similares se han observado en células similares a troncales de glioblastoma humano, en las que la

interacción de Ado con A3R favorece el aumento en la expresión de MRP1 a través de la vía de señalización PI3K/Akt (Torres A, *et al.*, 2016). En células de carcinoma hepatocelular (HCC), la señalización de Ado con A2AR indujo activación de Rap1 y el reclutamiento de P110 β en la membrana plasmática para promover la producción de PIP3 y la fosforilación de Akt (Ma XL, *et al.*, 2019), lo cual nos proporciona un indicio sobre la vía de señalización que podría estar activando la Ado a través de A2AR, para inducir el aumento en la expresión de MRP1.

Por otra parte, el transportador MRP1 se ha encontrado expresado en líneas celulares de CaCu (Roy, M & Mukherjee, S) y aproximadamente en 85% de los tumores de CaCu, en donde el tratamiento de CaCu avanzado o recurrente con CP se ha asociado con bajas tasas de respuesta (10- 20%) y de remisión completa (8-12%) (Leath, CA, *et al.*, 2014). Por tanto, la disminución en la expresión de MRP1 en los tumores de estas pacientes sería de gran utilidad para favorecer la quimiosensibilidad a CP. En el presente trabajo observamos la inhibición en la expresión de CD73 o el bloqueo de A2AR en células de CaCu disminuye de manera significativa la expresión de MRP1 y su capacidad extrusiva.

Con respecto a la actividad de extrusión de MRP1, cuando las células con inhibición en la expresión de CD73 o bloqueadas en A2AR fueron tratadas con MK-57, inhibidor específico de MRP, se observó una mayor retención de calceína en comparación con las células no tratadas, es decir, que al aumentar la concentración intracelular del fármaco, estaríamos hablando de una quimiosensibilización, este efecto se observa principalmente en la línea celular CaSki. Resultados similares, se ha observado en células de glioblastoma multiforme, en donde la disminución de la expresión de CD73, a través del empleo de siRNAs, ha sido efectiva para revertir la quimiorresistencia a vincristina (Torres A, *et al.*, 2016; Yan A, *et al.*, 2019).

Para probar si la modulación de MRP1 observada en las células CaSki y HeLa mediante la inhibición de la expresión de CD73 o con bloqueo de A2AR es capaz de sensibilizar a estas células al tratamiento con CP, se observó que efectivamente, requieren menores concentraciones de CP con respecto a las células tumorales parentales. Por tanto, si la

modulación de MRP1 a través de la inhibición de CD73 o el bloqueo de la señalización de Ado a través de A2AR ocurre en otras líneas celulares de CaCu, esta estrategia podría ser de utilidad para revertir la RCP en pacientes con CaCu, aunque con los resultados obtenidos podemos sugerir que el efecto es independiente al tipo de VPH, ya que el efecto se observa tanto en células CaSki (VPH-16⁺) y HeLa (VPH-18⁺).

Con respecto a A2AR se sabe que es un receptor de alta afinidad para adenosina (Muller-Haegeler S, *et al.*, 2014; Olah ME, & Stiles GL., 1995), y además es ampliamente distribuido en la superficie de la mayoría de las células inmunitarias (Young A, *et al.*, 2018; Halpin-Veszeleiova K, *et al.*, 2020; Ohta A & Sitkovsky M, 2009).

Se observó a través de un análisis bioinformático, empleando datos del Cancer Genome Atlas (TCGA), que en 32 tipos de cáncer, la sobreexpresión de A2AR en los tumores de pacientes se asocia con un peor pronóstico en comparación con aquellos que presentaron baja expresión de A2AR, lo que sugiere que la señalización de Ado sobre A2AR puede tener un papel importante en la progresión tumoral (Sun, C, *et al.*, 2022). De hecho, la quimiorresistencia asociada con la señalización de Ado sobre A2AR ha sido reportada en células de cáncer de mama triple negativo, debido a que el tratamiento de las células tumorales con antagonistas específicos para A2AR mejoró el efecto de doxorubicina para inducir apoptosis en las células tumorales (Armand P, *et al.*, 2013).

Por otro lado, también se ha observado que la expresión de A2AR en las células efectoras del sistema inmune juega un papel importante en la respuesta a la quimioterapia, en un estudio se observó que pacientes con cáncer de mama triple negativo con baja expresión de A2AR en las células T CD8⁺ mostraron una mejor respuesta al tratamiento neoadyuvante con 5FU, doxorubicina y ciclofosfamida en comparación con pacientes cuyos linfocitos T CD8⁺ mostraron mayor expresión de A2AR (Ruiz-Rodríguez, V. *et al.*, 2021).

De manera interesante, en estudios previos de nuestro grupo de investigación, se observó que el bloqueo de A2AR en células de CaCu, redujo su capacidad para producir las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β (García-Rocha R, *et al.* 2019). Estos resultados

en conjunto sugieren que la inhibición farmacológica de A2AR podría por un lado, mejorar la respuesta inmune antitumoral al evitar la supresión inmune, y por otro lado, sensibilizar a las células tumorales para hacer más eficiente la quimioterapia, lo que ha llevado a proponer que la intervención de la señalización de Ado a través de A2AR sea una alternativa en la terapia contra el cáncer (Sun C, *et al.*, 2022).

Actualmente, varios agentes específicos para atenuar las actividades de A2AR y CD73 están siendo evaluados en las terapias contra el cáncer en múltiples ensayos clínicos. Estos ensayos pretenden evaluar la seguridad asociada ya sea a través de la inhibición de CD73 (Siu LL, *et al.*, 2018; Luke J, *et al.*, 2019) o mediante el bloqueo de la señalización de Ado a través de A2AR (Chiappori A, *et al.*, 2018, Buisseret L, *et al.*, 2021; Fong L, *et al.*, 2020) para revertir los efectos supresores de Ado sobre la inmunidad antitumoral al ser utilizados como monoterapia o junto con inhibidores de puntos de control inmune o agentes antineoplásicos (Powderly J, *et al.*, 2019).

En este contexto, algunos ensayos clínicos preliminares que incluyeron el uso del anticuerpo anti-CD73, BMS-986179, (Siu LL, *et al.*, 2018) y CPI-006 (Luke J, *et al.*, 2019) y algunos antagonistas de A2AR, NIR178 (PBF-509) (Chiappori A, *et al.*, 2018), inupadenant (EOS-850) (Buisseret L, *et al.*, 2021) y Ciforadenant (CPI-444) (Fong L, *et al.*, 2020; Harshman LC, *et al.*, 2020), así como el antagonista dual A2AR/A2BR, AB928, (Seitz L, *et al.*, 2019; Powderly J, *et al.*, 2019), han sido bien tolerados por los pacientes en las pruebas clínicas y han mostrado tener efectos alentadores en el tratamiento del cáncer. En otro ensayo clínico en donde se incluyeron 68 pacientes con cáncer de próstata que recibieron el antagonista de A2A ciforadenant (CPI-444) o ciforadenant (CPI-444) más terapia con atezolizumab (anti PD-L1) se observó actividad antitumoral principalmente con el tratamiento combinado (Harshman LC, *et al.*, 2020).

Estas experiencias clínicas indican que los antagonistas de A2AR son bien tolerados en pacientes con cáncer avanzado, aunque aún se realizan más estudios para determinar su eficacia. Asimismo, será importante conocer si estas estrategias también tienen efecto en la disminución de la expresión de los transportadores participantes en la extrusión de los

agentes antineoplásicos en las células tumorales con el objetivo de mejorar los tratamientos del cáncer a base de quimioterapia.

CONCLUSIÓN

Este estudio proporciona la primera evidencia que demuestra que la inhibición de CD73 o el bloqueo de la señalización de A2a a través de A2AR modula negativamente la expresión de MRP1 en células CaCu, aumentando la acumulación intracelular del cisplatino, lo que favorece su sensibilidad al tratamiento con CP (**Figura 12**). Este descubrimiento puede tener importancia clínica como blanco terapéutico para revertir la RCP en pacientes con CaCu avanzado o recurrente.

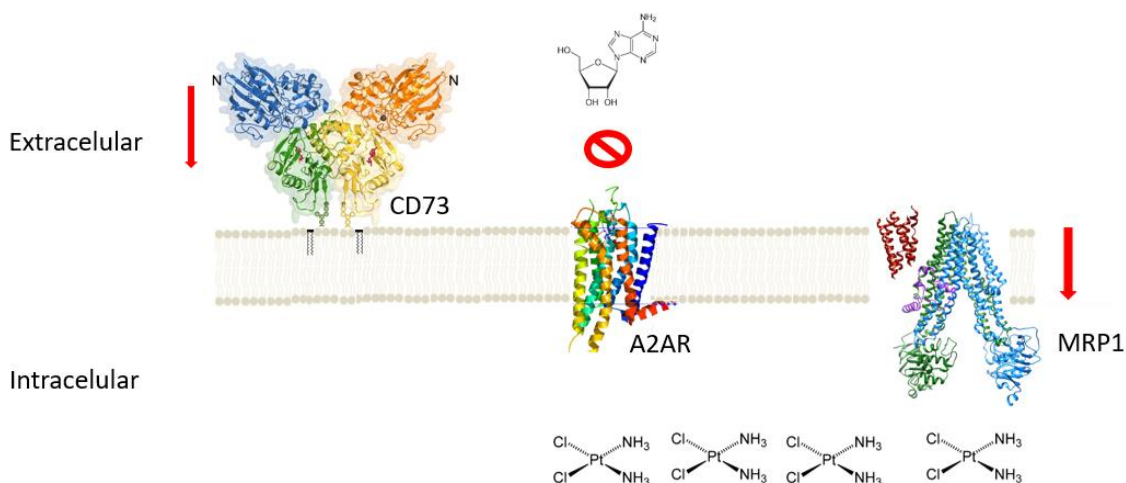


Figura 12. Resumen gráfico. La disminución en la expresión de CD73 y el bloqueo de A2AR induce una disminución en la expresión de la bomba de extrusión MRP1, lo cual tiene como efecto la disminución en la concentración intracelular de cisplatino, lo cual favorece la respuesta al tratamiento con CP.

PERSPECTIVAS

El desarrollo de MDR es una de las principales causas de falla en la quimioterapia del cáncer. Para contrarrestar este fenómeno, actualmente se desarrollan enfoques integrales evaluando las propiedades físicas de cada tipo tumoral (carga tumoral, tasa de crecimiento

y localización) y haciendo estudios moleculares (mutaciones, sobre expresión de genes, miRNAs etc.) para establecer bases de datos que permitan diseñar tratamientos personalizados y adaptables, los cuales en la mayoría de los casos implican un alto costo (Boehm J.S, *et al.*, 2021). En este sentido, una de las perspectivas actuales es buscar fármacos nuevos, o el reposicionamiento de algunos ya conocidos, de menores costos, que se aplican para algunos síntomas, con el fin de revertir la MDR. Con base en los resultados de este estudio, sería interesante evaluar algunos fármacos que tengan efecto en la regulación de la expresión de CD73 y/o A2AR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamska, A., & Falasca, M. (2018). ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: what is the way forward? *World Journal of Gastroenterology*, 24(29), 3222-3238. DOI:10.3748/wjg.v24.i29.3222

Alisi, A., Cho, W.C., Locatelli, F., & Fruci, D. (2013). Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 24706-24725. DOI:10.3390/ijms141224706

Antonioli, L., Blandizzi, C., Malavasi, F., Ferrari, D., & Haskó, G. (2016). Anti-CD73 immunotherapy: A viable way to reprogram the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 5(9), e1216292. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1216292

Armand, P., Nagler, A., Weller, E.A., Devine, S.M., Avigan, D.E., Chen, Y.B., *et al.* (2013). Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31, 4199-4206. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.3685.

Bahreyni, A., Samani, S., Rahmani, F., Behnam-Rassouli, R., Khazaei, M., Mikhail R., Parizadeh, M., Avan, A. Hassanian, S. (2018). Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer. *J Cell Physiol.* 233(3):1836-1843 doi: 10.1002/jcp.25944. Epub 2017 May 23.

Bai, Z.L., Wang, Y.Y., Zhe, H., He, J.L., & Hai, P. (2012). ERCC1 mRNA levels can predict the response to cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy of locally advanced

cervical squamous cell carcinoma. *Radiation Oncology*, 7, 221. DOI: 10.1186/1748-717X-7-221.

Basu, A., & Tu, H. (2005). Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4), 1068-1073 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.06.199.

Belinsky, M. G., Bain, L. J., Balsara, B. B., Testa, J. R., & Kruh, G. D. (1998). Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 1735-1741. DOI: 10.1093/jnci/90.22.1735

Bell, D. W., Gore, I., Okimoto, R. A., Godin-Heymann, N., & Sordella, R. *et al.* (2005). Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nature Genetics*, 37, 1315-1316. DOI: 10.1038/ng1671

Bello, F. A., Enabor, O. O., & Adewole, I. F. (2011). Human papilloma virus vaccination for control of cervical cancer: a challenge for developing countries. *African Journal of Reproductive Health*, 15, 25-30. PMID: 21987934

Beretta, G., Gatti, L., Tinelli, S., *et al.* (2004). Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochemical Pharmacology*, 68(2), 283-291. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.03.022.

Boehm, J. S., Garnett, M. J., Adams, D. J., Francies, H. E., Golub, T. R., Hahn, W. C., Iorio, F., McFarland, J. M., Parts, L., & Vazquez, F. (2021). Cancer research needs a better map. *Nature*, 589(7843), 220-225. DOI: 10.1038/d41586-021-00182-0

Bonanni, P., Levi, M., Latham, N. B., *et al.* (2011). An overview on the implementation of HPV vaccination in Europe. *Human Vaccines*, 7, 128-135. DOI: 10.4161/hv.7.0.14575

Borst, P., *et al.* (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(16), 1295-1302. DOI: 10.1093/jnci/92.16.1295

Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., *et al.* (2004). Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and Fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *International Journal of Cancer*, 112(6), 974-985. DOI: 10.1002/ijc.20522.

Buisseret, L., Rottey, S., De Bono, J. S., Migeotte, A., Delafontaine, B., Manickavasagar, T., & Kotecki, N. (2021). Phase 1 Trial of the Adenosine A2A Receptor Antagonist Inupadenant (EOS-850): Update on Tolerability, and Antitumor Activity Potentially Associated With the Expression of the A2A Receptor Within the Tumor. *Journal of Clinical Oncology*, 39(15_suppl), 2562.

CancerRxGene. Cisplatin. Recuperado marzo 2021, de: <https://www.cancerrxgene.org/compound/Cisplatin/1005/overview/ic50>

Cascorbi, I. (2011). P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb. Exp. Pharmacol.* (201), 261–283. DOI: 10.1007/978-3-642-14541-4_6.

Castellanos-Morales, M. (2003). Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Rev Fac Med UNAM*, 46(2), 64-66.

Castle, P., Stoler, M., Wright Jr, T., Sharma, A., Wright, T. & Behrens, C. (2011). Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*, 12, 880. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70188-7

Chao CC. (1994). Enhanced excision repair of DNA damage due to cis-diamminedichloroplatinum(II) in resistant cervix carcinoma HeLa cells. *Eur J Pharmacol.* ;268(3):347–355. doi: 10.1016/0922-4106(94)90059-0

Chen, J., Xiong, J., Liu, H., Chernenko, G. & Tang, SC. (2002). Distinct BAG-1 isoforms have different anti-apoptotic functions in BAG-1-transfected C33A human cervical carcinoma cell line. *Oncogene*, 21(46), 7050–7059. DOI: 10.1038/sj.onc.1205845.

Chiappori, A., Williams, C.C., Creelan, B.C., Tanvetyanon, T., Gray, J.E., Haura, E.B., Thapa, R., Chen, D.-T., Beg, A.A., Boyle, T.A., *et al.* (2018). Phase I/II study of the A2AR antagonist NIR178 (PBF-509), an oral immunotherapy, in patients (pts) with advanced NSCLC. *Journal of Clinical Oncology*, 36.

Choi, JI., Kim, SH., Seong, CK., Sim, JS., Lee, HJ., Do, KH. (2000). Recurrent uterine cervical carcinoma: spectrum of imaging findings. *Korean J Radiol*, 1(4), 198-207. DOI: 10.3348/kjr.2000.1.4.198

Cole, S. (2014). Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *The Journal Of Biological Chemistry*, 289(45), 30880–30888. DOI: 10.1074/jbc.R114.609248.

Cole, S. (2014). Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 54, 95–117. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135959

Cole, S., Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M.V. Duncan, G.R. Deeley. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258, 1650-1654. DOI: 10.1126/science.1360704.

Coleman, E., Harper, P.G., Gallagher, C., *et al.* (1986). A phase II study of ifosfamide in advanced and relapsed carcinoma of the cervix. *Cancer Chemother Pharmacol*, 18, 280-283 DOI: 10.1007/BF00273403.

Conseil, G., Arama-Chayoth, M., Tsfadia, Y., & Cole, S. P. C. (2019). Structure guided probing of the leukotriene C4binding site in human multidrug resistance protein 1 (MRP1; ABCC1). *FASEB j.* 33(10), 10692–10704. DOI:10.1096/fj.201900140R

Coronel-Martínez, J., Rivera-Rubí, L. M., Azuara-Forcelledo, H., & Floriano-Sánchez, E. (2014). Tratamiento en cáncer cervicouterino localmente avanzado. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(4), 67-70.

Cox, J. T., Castle, P. E., Behrens, C. M., Sharma, A., Wright, T. C., Jr., & Cuzick, J. (2013). Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV16/18: Results from the ATHENA HPV study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(3), 184.e1. DOI:10.1016/j.ajog.2012.10.897

Daniele, S., Zappelli, E., Natali, L., Martini, C., & Trincavelli, M. L. (2014). Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: A new strategy to sensitize glioblastoma stem cells to chemotherapy. *Cell Death and Disease*, 5, e1539. DOI:10.1038/cddis.2014.482

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. DOI:10.1016/j.ejphar.2014.07.025

de Almeida, V. H., dos Santos Guimarães, I., Almendra, L. R., Rondon, A. M., Tilli, T. M., de Melo, A. C., Sternberg, C., & Monteiro, R. Q. (2018). Positive crosstalk between EGFR and the TF-PAR2 pathway mediates resistance to cisplatin and poor survival in cervical cancer. *Oncotarget*, 9(55), 30594-30608. DOI:10.18632/oncotarget.25788

Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, 5(4), 275-284. DOI:10.1038/nrc1590

Diaz-Padilla, I., Monk, B. J., Mackay, H. J., & Oaknin, A. (2013). Treatment of metastatic cervical cancer: Future directions involving targeted agents. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 85(3), 303-314. DOI:10.1016/j.critrevonc.2012.08.005

Diestra, J. E., Condom, E., Del Muro, X. G., *et al.* (2003). Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: Biological and clinical implications. *Journal of Urology*, 170, 1383–1387. DOI: 10.1097/01.ju.0000080088.98406.17

Doherty, B., Lawlor, D., Gillet, J. P., Gottesman, M., O’Leary, J. J., & Stordal, B. (2014). Collateral sensitivity to cisplatin in KB-8-5-11 drug-resistant cancer cells. *Anticancer Research*, 34(1), 503–507. PMID: 24403508

Evander, M., Edlund, K., Gustafsson, A., Jonsson, M., Karlsson, R., Rylander, E., & Wadell, G. (1995). Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *Journal of Infectious Diseases*, 171(4), 1026–1030. DOI: 10.1093/infdis/171.4.1026

Fan, Z., Cui, H., Yu, H., Ji, Q., Kang, L., Han, B., Wang, J., Dong, Q., Li, Y., & Yan, Z. (2016). MiR-125a promotes paclitaxel sensitivity in cervical cancer through altering STAT3 expression. *Oncogenesis*, 5(2), e197. DOI: 10.1038/oncsis.2016.3

Feldman, R., Sandeep Reddy, B., Abbott, B., & Castro, M. (2015). Drug efflux pump expression in 50,000 molecularly-profiled cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 33(15), 151108-11108. DOI: 10.1200/JCO.2015.33.15_suppl.151108

Feng, C., Ma, F., Hu, C., Ma, J.-a., Wang, J., Zhang, Y., Wu, F., Hou, T., Jiang, S., & Wang, Y. (2018). SOX9/miR-130a/CTR1 axis modulates DDP-resistance of cervical cancer cell. *Cell Cycle*, 17(4), 448–458. DOI: 10.1080/15384101.2018.1437833

Fleming, G. F., Fowler, J. M., Waggoner, S. E., Copeland, L. J., Greer, B. E., *et al.* (1996). Paclitaxel has moderate activity in squamous cervix cancer. A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 14, 792-795. DOI: 10.1200/JCO.1996.14.3.792

Flens, M., Zaman, G., Van der Valk, P., Izquierdo, M., Schroeijers, A., Scheffer, G., De Haas, C. J. L. M., Meijer, R. J. & Scheper, R. J. (1996). Tissue distribution of the multidrug

resistance-associated protein. *The American Journal of Pathology*, 148, 1237-1247. PMID: 8644864 PMCID: PMC1861521

Fong, L., Hotson, A., Powderly, J. D., Sznol, M., Heist, R. S., Choueiri, T. K., *et al.* (2020). Adenosine 2a receptor blockade as an immunotherapy for treatment-refractory renal cell cancer. *Cancer Discovery*, 10(1), 40-53. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0980

Galluzzi, L., *et al.* (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–1883.

Garcia, A., Blessing, J., Darcy, K., *et al.* (2007). Phase II clinical trial of capecitabine in the treatment of advanced, persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix with translational research: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology*, 104, 572-579.

García-Rocha, R., Monroy-García, A., Hernández-Montes, J., Weiss-Steider, B., Gutiérrez-Serrano, V., Del Carmen Fuentes-Castañeda, M., Ávila-Ibarra, L.R., Don-López, C.A., Torres-Pineda, D.B., & de Lourdes Mora-García, M. (2019). Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine*, 118, 71-79. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.09.018

García-Rocha, R., Monroy-García, A., Carrera-Martínez, M., Hernández-Montes, J., Don-López, C., Weiss-Steider, B., Monroy-Mora, K., Ponce-Chavero, MA., Montesinos-Montesinos, JJ., Escobar-Sánchez, M., Molina Castillo, G., Chacón-Salinas, R., Vallejo-Castillo, L., Pérez-Tapia, S., Mora-García, M. (2022). Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production. *Cell Biochem Funct.* 40(7):760-772. DOI: 10.1002/cbf.3742.

Garzetti, G.G., Ciavattini, A., Lucarini, G., *et al.* (1995). Modulation of expression of p53 and cell proliferation in locally advanced cervical carcinoma after neoadjuvant combination chemotherapy. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 63(1), 31–36. DOI: 10.1016/0301-2115(95)02216-t.

Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K.H., *et al.* (1995). The leukotriene LTD4 receptor antagonist Mk571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208, 345–352. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1344.

Gervais, F., Dunton, K., Jiang, Y., *et al.* (2017). Systematic review of costeffectiveness analyses for combinations of prevention strategies against human papillomavirus (HPV) infection: a general trend. *BMC Public Health*, 17, 283. DOI: 10.1186/s12889-017-4076-3.

Goedhals, L., van Wiyk, A., Smith, B.L., & Fourie, S.J. (2006). Pemetrexed (alimta, Ly231514) demonstrates clinical activity in chemonaive patients with cervical cancer in a phase II single-agent trial. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16, 1172-1178. DOI: 10.1111/j.1525-1438.2006.00451.x

Haber, M., Smith, J., Bordow, S.B., *et al.* (2006). Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 1546–1553. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.6196.

Halpin-Veszeleiova, K., & Hatfield, S. M. (2020). Oxygenation and A2AR Blockade to Eliminate Hypoxia/HIF-1alpha-Adenosinergic Immunosuppressive Axis and Improve Cancer Immunotherapy. *Current Opinion in Pharmacology*. DOI: 10.1016/j.coph.2020.07.005.

Hampton, M., & Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, 414, 552-556. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01068-5

Harshman, L. C., Chu, M., George, S., Gordon, B., Hughes, M., Carthon, B. C. & Hahn, N. M. (2020). Adenosine Receptor Blockade With Ciforadenant Plus +/- Atezolizumab in Advanced Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC). *Journal of Clinical Oncology*, 38(6_suppl), 129. DOI:10.1200/JCO.2020.38.6_suppl.129

Hernández-Hernández, D., Apresa-García, T., & Patlán-Pérez, R. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(Supl 2), S154-161. PMID: 26462510

Hinrichs, C. S., Stevanovic, S., Draper, L., *et al.* (2014). HPV-targeted tumor-infiltrating lymphocytes for cervical cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 5s. DOI: 10.1016/j.omto.2021.07.006

Huang, L., & Rao, W. (2018). SiRNA interfering STAT3 enhances DDP sensitivity in cervical cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22, 4098-4106. DOI: 10.26355/eurrev_201807_15401

Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 14298-14302. DOI: 10.1073/pnas.162491399

- Ishikawa, T., & Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 20116-20125 PMID: 8376370
- Johnson, Z. L., & Chen, J. (2017). Structural basis of substrate recognition by the multidrug resistance protein MRP1. *Cell*, 168(6), 1075-1085.e9. DOI:10.1016/j.cell.2017.01.041
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584. DOI:10.1038/nrc2167
- Kiuchi, Y., Suzuki, T., Hirohashi, T., Tyson, C. A., & Sugiyama, Y. (1998). cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Letters*, 433(1-2), 149-152. DOI:10.1016/S0014-5793(98)00899-5
- König, J., Rost, D., Cui, Y., & Keppler, D. (1999). Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*, 29(4), 1156-1163. DOI:10.1002/hep.510290418
- Kool, M., De Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Van Eijk, M. J., Juijn, J. A., ... & Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Research*, 57(16), 3537-3547. PMID: 9270026
- Kool, M., Van der Linden, M., De Haas, M., Baas, F., & Borst, P. (1999). Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Research*, 59(1), 175-182. PMID: 9892204
- Kool, M., Van der Linden, M., De Haas, M., Scheffer, G. L., De Vree, J. M., Smith, A. J., & Borst, P. (1999). MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6914-6919. DOI:10.1073/pnas.96.12.6914
- La Torre G, de Waure C, Chiaradia G, *et al.* HPV vaccine efficacy in preventing persistent cervical HPV infection: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2007;25:8352–8. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.09.027.
- Leath CA, Straughn JM. (2013). Chemotherapy for advanced and recurrent cervical carcinoma: Results from cooperative group trials. *Gynecol Oncol.* 2013;129:251–257. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.12.035.

- Lee, K., Belinsky, M. G., Bell, D. W., Testa, J. R., & Kruh, G. D. (1998). Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance associated protein canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Research*, 58, 2741-2747. DOI:10.1016/j.cell.2017.01.041
- Lehtinen, M., & Dillner, J. (2013). Clinical trials of human papillomavirus vaccines and beyond. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 400–410. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.95
- Lei, C., Wang, Y., Huang, Y., *et al.* (2012). Up-regulated miR155 reverses the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF and increases chemo-sensitivity to cisplatin in human Caski cervical cancer cells. *PLoS One*, 7(12), e52310. DOI: 10.1371/journal.pone.0052310
- Lippert, T., Ruoff, H. J., & Volm, M. (2008). Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. *Arzneimittelforschung*, 58, 261-264. DOI: 10.1055/s-0031-1296504
- Liu, B., Cheng, Y., Liu, Q., Bao, J. K., & Yang, J. M. (2010). Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1154–1164. DOI: 10.1038/aps.2010.119
- Liu, Z., Liu, W., Liu, Y., Ye, X., & Chen, S. (2015). Multiple sexual partners as a potential independent risk factor for cervical cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(9), 3893-3900. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.9.3893
- Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P., Darcy, P., Smyth, M., & Stagg, J. (2013). CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27), 11091-11096. DOI: 10.1073/pnas.1222251110
- Long, H. J., Bundy, B. N., Grendys, E. C., *et al.* (2005). Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 4626-4633. DOI: 10.1200/JCO.2005.06.230
- Lorusso, D., Petrelli, F., Coinu, A., Raspagliesi, F., & Barni, S. (2014). A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 133, 117–123. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.02.031

Lowy DR, Schiller JT. Reducing HPV-associated cancer globally. *Cancer Prev Res* 2012;5:18–23

Lu, B., Kumar, A., Castellsagué, X., Giuliano, AR., Villa, LL. (2011). Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 11, 13. DOI: 10.1186/1471-2334-11-13

Lu, J., Pokharel, D., & Bebawy, M. (2015). MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metabolism Reviews*, 47(4), 406-419. DOI: 10.3109/03602532.2015.1065268

Luke, J., Merchan, J., Harshman, L., Marron, T., Powderly, J., Barve, M., ... & Figg, W. D. (2019). Immunobiology and clinical activity of CPI-006, an anti-CD73 antibody with immunomodulating properties in a phase 1/1b trial in advanced cancers. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 2505. DOI: 10.1186/s40425-019-0773-3

Lutkowska, A., Roszak, A., & Jagodziński, P. P. (2017). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type gene 1937 A> G polymorphism as a risk factor for cervical cancer progression in the Polish population. *Pathology & Oncology Research*, 23(2), 317-322. DOI: 10.1007/s12253-016-0133-y

Ma, C., Wei, S., & Song, Y. (2011). T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *Journal of Thoracic Disease*, 3(1), 10-18. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2011.02.01

Ma, XL., Shen, M. N., Hu, B., Wang, B. L., Yang, W. J., Lv, L. H., & Zhang, X. G. (2019). CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110 and predicts poor prognosis. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 37. DOI: 10.1186/s13045-019-0723-0

Martelli, L., Ragazzi, E., Di Mario, F., Basato, M., & Martelli, M. (2009). Cisplatin and oxaliplatin cytotoxic effects in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumor cells: time and mode of application dependency. *Anticancer Research*, 29(10), 3931-3937. PMID: 19846902

Maruyama, W., Shirakawa, K., Matsui, H., Matsumoto, T., Yamazaki, H., Sarca, A. D. & Takaori-Kondo, A. (2016). Classical NF- κ B pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1466-1471. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.078

McKim, A., Walter, A. C., Sheely, K. M., Manahan, K. J., & Geisler, J. P. (2016). An economic analysis of cisplatin alone versus cisplatin doublets in the treatment of women with advanced or recurrent cervical cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 37(3), 353-356. PMID: 27641958

Moore, D. H., Blessing, J., McQuellon, R., *et al.* (2004). Phase III study of cisplatin with or without paclitaxel in stage IVB, recurrent, or persistent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 3113-3119. DOI: 10.1200/JCO.2004.11.052

Mora-García, M., Ávila-Ibarra, L. R., García-Rocha, R., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., Don-López, C. A., Gutiérrez-Serrano, V., Titla-Vilchis, I. J., Fuentes-Castañeda, M. C., Monroy-Mora, A., Jave-Suárez, L. F., Chacón-Salinas, R., Vallejo-Castillo, L., Pérez-Tapia, S. M., & Monroy-García, A. (2017). Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular Immunology*, 320, 46-55. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.08.013

Muderspach LI, Blessing JA, Levenback C, Moore JL Jr. (2001). A phase II study of topotecan in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology*, 81, 213-215. DOI: 10.1006/gyno.2001.6161

Muller-Haegele S, Muller L, Whiteside TL. (2014). Immunoregulatory Activity of Adenosine and its Role in Human Cancer Progression. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(7), 897-914. DOI: 10.1586/1744666X.2014.917946

Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. (2007) Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 59(12):752-757. doi:10.1080/15216540701736285

Ohta A, Sitkovsky M. (2009). The Adenosinergic Immunomodulatory Drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 501-506. DOI: 10.1016/j.coph.2009.06.007

Olah ME, Stiles GL. (1995). Adenosine Receptor Subtypes: Characterization and Therapeutic Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 581-606. DOI: 10.1146/annurev.pa.35.040195.003053

OMS. (2023). Cancer. Retrieved from https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1

Ozben T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 96, 2181-2196. DOI: 10.1007/s00280-007-0530-9

Parkin MD, Pisani J, Ferlay J. (1999). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 49, 33-6. DOI: 10.3322/canjclin.49.1.33

Paulusma C, Kool M, Bosma P, Schejter G, Ter Borg F, Scheper R, Tytgat G, Borst P, Baas F, Elferink R. (1997). A mutation in the human cMOAT gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 25, 539-542. DOI: 10.1002/hep.510250306

Pecorelli S. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 105(2), 107-108. DOI: 10.1016/j.ijgo.2009.02.011

Pedersen PL. (2007). Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39, 349-355. DOI: 10.1007/s10863-007-9123-9

Peiritti M, Zapardiel I, Zanagnolo V, Landoni Morrow CP, Maggioni A. (2012). Management of recurrent cervical cancer: a review of the literature. *Surg Oncol*, 21(2), e59-e66. DOI: 10.1016/j.suronc.2011.11.001

Phippen N, Leath C, Havrilesky L, Barnett J. (2015). Bevacizumab in recurrent, persistent, or advanced stage carcinoma of the cervix: Is it cost-effective? *Gynecol Oncol*, 136, 43-47. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.10.016

Poku VO, Iram SH. (2022). A critical review on modulators of multidrug resistance protein 1 in cancer cells. *PeerJ*. e12594. DOI:10.7717/peerj.12594

Pouliot LM, Shen DW, Suzuki T, Hall MD, Gottesman MM. (2013). Contributions of microRNA dysregulation to cisplatin resistance in adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res*, 319(4), 566-574. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.11.011

Powderly J, Spira A, Gutierrez R, DiRenzo D, Udyavar A, Karakunnel JJ, *et al.* (2019). Phase I Evaluation of AB928, a Novel Dual Adenosine Receptor Antagonist, Combined With Chemotherapy or AB122 (Anti-PD-1) in Patients (Pts) With Advanced Malignancies. *Ann Oncol*, 30(5_suppl). DOI: 10.1093/annonc/mdz253.078

Projan SJ. (2003). Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr Opin Microbiol*, 6, 427-430. DOI: 10.1016/j.mib.2003.09.002

Quezada, C., Garrido, W., Oyarzún, C., Fernández, K., Rodrigo Segura, R., 3 Melo, R., 3 Casanella, P., 4 Sobrevia, L., San Martín, R. (2013). 5-ectonucleotidase Mediates Multiple-

Drug Resistance in Glioblastoma Multiforme Cells. *J. Cell. Physiol.*, 228, 602-608. DOI: 10.1002/jcp.24226

Rees DC, Johnson E, Lewinson O. (2009). ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 218-227. DOI: 10.1038/nrm2646

Rosenberg, B., Vancamp, L., Krigas, T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature*. 13;205:698-9. DOI: 10.1038/205698a0.

Roy, M & Mukherjee, S. Reversal of Resistance towards Cisplatin by Curcumin in Cervical Cancer Cells. 2014. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (3), 1403-1410. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.3.1403.

Ruiz-Rodríguez, V. M., Turiján-Espinoza, E., Guel-Pañola, J. A., García-Hernández, M. H., Zermeno-Nava, J. J., López-López, N., Bernal-Silva, S., Layseca-Espinosa, E., Fuentes-Pananá, E. M., Estrada-Sánchez, A. M., & Portales-Pérez, D. P. (2021). Chemoresistance in Breast Cancer Patients Associated With Changes in P2X7 and A2A Purinergic Receptors in CD8+ T Lymphocytes. *Frontiers in Oncology*, 11, 594377. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.594377>

Sakaeda T, Nakamura T, Hirai M, *et al.* MDR1 up-regulated by apoptotic stimuli suppresses apoptotic signaling. *Pharm Res.* 2002; 19(9): 1323–1329. doi: 10.1023/a:1020302825511.

Secretaría de Salud (2002). Programa de Acción: Cáncer Cérvico Uterino. Primera Edición. Impreso y hecho en México. ISBN 970-721045-1.

Secretaría de Salud (2010). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento para Cáncer cervicouterino. México.

Saad S., Najjar T, Alashari M. (2004). Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 31:862–867. doi: 10.1111/j.1440-1681.2004.04127.x.

Saito T, Takehara M, Tanaka R, *et al.* (2004). Correlation between responsiveness of neoadjuvant chemotherapy and apoptosis-associated proteins for cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 92(1):284–292. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.09.027.

Schaub T, Kartenbeck J, Koenig J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D. (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical

membrane of kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 1213-1221. doi: 10.1681/ASN.V881213.

Seitz L, Jin LX, Leleti M, Ashok D, Jeffrey J, Rieger A, *et al.* (2019). Safety, Tolerability, and Pharmacology of AB928, a Novel Dual Adenosine Receptor Antagonist, in a Randomized, Phase 1 Study in Healthy Volunteers. *Investigational New Drugs*, 37(4), 711-721. DOI: 10.1007/s10637-018-0715-5

Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, *et al.* (2012). ABCC1 Polymorphisms in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Cell Biology International*, 36, 79-86. DOI: 10.1042/CBI20110149

Sharma A, De R, Javed S, Srinivasan R, Pal A, & Bhattacharyya S (2019). Sonic Hedgehog Pathway Activation Regulates Cervical Cancer Stem Cell Characteristics During Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Cellular Physiology*. DOI: 10.1002/jcp.28344

Shen D, Pouliot L, Hall M, & Gottesman MM (2012). Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting From Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 706-721. DOI: 10.1124/pr.111.005637

Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, & Prasad A (2011). Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-Talk Between Apoptosis and Autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, 1161-1172. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1100

Shu X, Wu J, Sun H, Chi LQ, & Wang JH (2015). PAK4 Confers the Malignance of Cervical Cancers and Contributes to the Cisplatin-Resistance in Cervical Cancer Cells via PI3K/AKT Pathway. *Diagnostic Pathology*, 10(1), 177. DOI: 10.1186/s13000-015-0401-y

Siddik ZH (2003). Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279. DOI: 10.1038/sj.onc.1206933

Siu LL, Burris H, Le DT, Hollebecque A, Steeghs N, Delord JP, *et al.* (2018). Preliminary Phase 1 Profile of BMS-986179, an Anti-CD73 Antibody, in Combination With Nivolumab in Patients With Advanced Solid Tumors. *Cancer Research*, 78(13), CT180. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-CT180

Slovak ML, Ho JP, Bhardwaj G, *et al.* (1993). Localization of a Novel Multidrug Resistance-Associated Gene in the HT1080/DR4 and H69AR Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 53, 3221-3225. PMID: 8319202

Song, J., & Li, Y. (2017). miR-25-3p reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in cisplatin-resistance cervical cancer cells. *Cancer science*, 108(1), 23-31. DOI: 10.1111/cas.13107

Sun, C., Wang, B., & Hao, S. (2022). Adenosine-A2A Receptor Pathway in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 13, 837230. DOI: 10.3389/fimmu.2022.837230

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660

Takano, M., Kikuchi, Y., Kita, T., *et al.* (2009). Complete remission of metastatic and relapsed uterine cervical cancers using weekly administration of bevacizumab and paclitaxel/carboplatin. *Onkologie*, 32, 595-597. DOI: 10.1159/000236436

Taylor, N. M., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504-509. DOI: 10.1038/nature22345

Tewari, K., Sill, M., Penson, R., Huang, H., Ramondetta, L., Landrum, L., Oaknin, A., Reid, T., Leitao, M., Michael, H., DiSaia, P., Copeland, L., Crasman, W., Stehman, F., Brady, M., Burger, R., Thigpen, T., Birrer, M., Waggoner, S., Moore, D., Look, K., Koh, W. J., & Monk, B. (2017). Final overall survival of the phase III randomized trial of chemotherapy with and without bevacizumab for advanced cervical cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *The Lancet*, 390(10103), 1654-1663. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31607-0

Thigpen, T., Shingleton, H., Homesley, H., Lagasse, L., & Blessing, J. (1981). Cisplatin in treatment of advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group. *Cancer*, 48, 899-903. DOI: 10.1002/1097-0142(19810815)48:4<899::aid-cnrc2820480406>3.0.co;2-6.

Tindle, R. (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 59-65. DOI: 10.1038/nrc700

Torii, Y., Kato, R., Minami, Y., Hasegawa, K., Fujii, T., & Udagawa, Y. (2014). ERCC1 expression and chemosensitivity in uterine cervical adenocarcinoma cells. *Anticancer Res*, 34(1), 107–115. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.09.024

Torres, A., Vargas, Y., Uribe, D., Jaramillo, C., Gleisner, A., Salazar-Onfray, F., López, M. N., Melo, R., Oyarzún, C., San Martín, R., & Quezada, C. (2016). Adenosine A3 receptor elicits chemoresistance mediated by multiple resistance-associated protein-1 in human glioblastoma stem-like cells. *Oncotarget*, 7, 67373-67386. DOI: 10.18632/oncotarget.11425

Torres-Pineda, B. (2015). Análisis de la expresión de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/adenosina) en tumores de cáncer de cuello uterino. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Uyar, D., & Rader, J. (2014). Genomics of cervical cancer and the role of human papillomavirus pathobiology. *Clin Chem*, 60, 144-146. DOI: 10.1373/clinchem.2013.212613

Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3, 281-90. DOI: 10.1186/1479-7364-3-3-281

Vaupel, P., & Multhoff, G. (2016). Adenosine can thwart antitumor immune responses elicited by radiotherapy: Therapeutic strategies alleviating protumor ADO activities. *Strahlenther Onkol*, 192(5), 279-287. DOI: 10.1007/s00066-016-0951-6

Verschraegen, C. F., Levy, T., Kudelka, A., *et al.* (1997). Phase II study of irinotecan in prior chemotherapy-treated squamous cell carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol*, 15, 625-631. DOI: 10.1200/jco.1997.15.2.625

Vulsteke, C., Lambrechts, D., Dieudonne', A., *et al.* (2013). Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (ABCC1/MRP1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-)adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC). *Ann Oncol*, 24, 1513-1525. DOI: 10.1093/annonc/mdt013

Wang F, Liu M, Li X, Tang H. (2013). MiR-214 reduces cell survival and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of Bcl2l2 in cervical cancer cells. *FEBS Lett*, 587(5), 488-495. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.053

Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 275(50), 39435-39443. DOI: 10.1074/jbc.M005565200

Wilkins, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7, 14. DOI: 10.12703/P7-14

World Health Organization. (2019). Lista de medicamentos esenciales. Retrieved April 2021, from https://www.who.int/medicines/publications/08_SPANISH_FINAL_EML15.pdf-

Wright JD, Viviano D, Powell Ma, *et al.* (2006). Bevacizumab combination therapy in heavily pretreated, recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 103, 489-493. DOI: 10.1016/j.ygyno.2006.03.044

Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. (2015). Primary Cervical Cancer Screening With Human Papillomavirus: End of Study Results From the ATHENA Study Using HPV as the First-Line Screening Test. *Gynecol Oncol*, 136, 189-197. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.11.076

Xu Y, Yu H, Qin H, *et al.* (2012). Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer Lett*, 314(2), 232-243. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.09.019

Xu, H., Sun, Y., Zeng, L., Li, Y., Hu, S., He, S., Chen, H., Zou, Q., & Luo, B. (2019). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 alpha increases chemosensitivity in cervical carcinoma through suppressing β -catenin signaling. *Cancer biology & therapy*, 20(1), 1-10. DOI: 10.1080/15384047.2018.1528126

Yan, A., Joachims, M. L., Thompson, L. F., Miller, A. D., Canoll, P. D., & Bynoe, M. S. (2019). CD73 promotes glioblastoma pathogenesis and enhances its chemoresistance via A2B adenosine receptor signaling. *Journal of Neuroscience*, 39(22), 4387-4402. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1118-18.2019

Yang, M., Wang, M., Li, X., Xie, Y., Xia, X., Tian, J., Zhang, K., & Tang, A. (2018). Wnt signaling in cervical cancer? *Journal of Cancer*, 9(7), 1277-1286. DOI: 10.7150/jca.23754

Young, A., Ngiow, S. F., Gao, Y. L., Patch, A. M., Barkauskas, D. S., Messaoudene, M., ... & Stannard, K. (2018). A2AR adenosine signaling suppresses natural killer cell maturation in the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 78(4), 1003-1016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2340

Yu, S., & Garcia, A. (2015). Advancements in recurrent and metastatic cervical cancer. *American Journal of Hematology/Oncology*, 11(1).

Yuan T, Sun J, Tian J, Hu J, Yin H, Yin J. (2021). Involvement of ABC transporters in the detoxification of non-substrate nanoparticles in lung and cervical cancer cells. *Toxicology*. 455:152762. doi:10.1016/j.tox.2021.152762

Zhang, B., Liu, M., Tang, H. K., *et al.* (2012). The expression and significance of MRP1, LRP, TOPOIIb, and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 41(2), 141-148. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2011.01087.x

Zhang, J., Li, Y.-H., Liu, H.-L., Zhang, Y., Zhang, Q.-S., & Li, S.-Z. (2018). Correlations of MicroRNA-21 gene polymorphisms with chemosensitivity and prognosis of cervical cancer. *The American Journal of the Medical Sciences*, 356(6), 544-551. DOI: 10.1016/j.amjms.2018.08.008

Zhang, L., Wang, J., Chen, T., Tian, M., Zhou, Q and Ren, J. (2022). Symptom Clusters and Quality of Life in Cervical Cancer Patients Receiving Concurrent Chemoradiotherapy: The Mediating Role of Illness Perceptions. *Front. Psychiatry*. 12:807974. DOI: 10.3389/fpsy.2021.807974

Zhang, Y., Shu, Y. M., Wang, S. F., Da, B. H., Wang, Z. H., & Li, H. B. (2010). Stabilization of mismatch repair gene PMS2 by glycogen synthase kinase 3beta is implicated in the treatment of cervical carcinoma. *BMC cancer*, 10, 58. DOI: 10.1186/1471-2407-10-58

Zhao, C., Lu, E., Hu, X., Cheng, H., Zhang, J.-A., & Zhu, X. (2018). S100A9 regulates cisplatin chemosensitivity of squamous cervical cancer cells and related mechanism. *Cancer management and research*, 10, 3753. DOI: 10.2147/CMAR.S170759

Zheng, X., Lv, J., Shen, Q., *et al.* (2014). Synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin in human cervical carcinoma. *Reproductive Sciences*, 21(10), 1319-1325. DOI: 10.1177/1933719114522081

Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X., & Zhu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1885-1895. DOI: 10.2147/DDDT.S100135

Zhu, K., Chen, L., Han, X., Wang, J., & Wang, J. (2012). Short hairpin RNA targeting Twist1 suppresses cell proliferation and improves chemosensitivity to cisplatin in HeLa human cervical cancer cells. *Oncology Reports*, 27(4), 1027-1034. DOI: 10.3892/or.2012.1654

Zimmermann, H., Zebisch, M., & Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*, 8(3), 437-502. DOI: 10.1007/s11302-012-9309-4

Zisowsky, J., Koegel, S., Leyers, S., *et al.* (2007). Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 73(2), 298-307. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.10.015

Received: 6 January 2023 | Revised: 10 February 2023 | Accepted: 14 February 2023
DOI: 10.1002/cbf.3784

RESEARCH ARTICLE

CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION WILEY

Inhibition of CD73 expression or A2AR blockade reduces MRP1 expression and increases the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin

Montserrat Carrera-Martínez^{1,2,3}  | María de L. Mora-García⁴  |
Rosario García-Rocha⁴  | Benny Weiss-Steider⁴  |
Juan J. Montesinos-Montesinos⁵  | Jorge Hernández-Montes⁴  |
Christian A. Don-López⁴  | Alberto Monroy-García^{1,4} 

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

²Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Ciudad de México, Mexico

³Doctorate Scholarship No. 579767 from CONACyT, Ciudad de México, Mexico

⁴Laboratorio de Inmunobiología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer-UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM, Ciudad de México, Mexico

⁵Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

María de L. Mora García, and Alberto Monroy-García, Oriente 170 No. 160 Colonia Moctezuma 2a Sección, Delegación Venustiano Carranza, C.P. 15530 Ciudad de México, Mexico.
Email: lulumora@yahoo.com and albertomong13@comunidad.unam.mx

Funding information

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: IN211822; Instituto Mexicano del Seguro Social, Grant/Award Number: R-2018-3602-015; CONACyT, Grant/Award Number: 579767

Abstract

Recently, a link between the biological activity of CD73 in solid tumors and multidrug resistance protein (MRP) has been proposed. Cisplatin (CP) is the most widely used anticancer agent to treat advanced and recurrent cervical cancer (CC). However, multidrug resistance protein-1 (MRP1) is overexpressed in approximately 85% of these tumors and has been strongly associated with cisplatin resistance (CPR). In this study, we examine the involvement of CD73 and the interaction of adenosine (ADO) with its receptors (ARs) in MRP1 expression in CC cells. We found that ADO positively modulates MRP1 expression in CC cells in a dose-dependent manner. The inhibition of CD73 expression with a CD73-targeted siRNA and A2AR blockade with the selective antagonist ZM241385 significantly decreased MRP1 expression and the extrusive capacity of CC cells, making them significantly more sensitive to CP treatment than cancer cells treated with MK-751, a specific MRP1 inhibitor. These results suggest CD73 inhibition or blocking ADO signaling through A2AR could be strategies to reverse CPR in patients with advanced or recurrent CC, which is characterized by very low response rates to CP (10%–20%).

KEYWORDS

CD73-adenosine pathway, chemosensitivity, cisplatin resistance, extrusion, MRP1

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2023 The Authors. *Cell Biochemistry and Function* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women and represents a major public health problem worldwide. In 2020, approximately 600,000 new cases and 340,000 deaths were reported, over 80% of which occurred in developing countries.^{1,2} Persistent high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection is a major risk factor for the development of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs), which can progress to high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs) and eventually to CC.³ CC can be treated with surgery, radiation and/or chemotherapy, producing remission in 80%–90% of stage I and 60% of stage II patients. However, in advanced stages (III and IV), the survival rate at 1 year is less than 20%.⁴ Cisplatin (CP) has been used to treat CC since the early 1980s, and it currently remains the most widely used anticancer agent to treat advanced and recurrent CC.^{5,6} CP was synthesized in 1965 and initially used to inhibit bacterial growth, but years later, it was also found to inhibit the growth of cancer cells,⁷ favoring its wide use in the treatment of various malignancies including breast, testicular, ovarian, prostate, head and neck, bladder, and lung cancers, along with refractory non-Hodgkin lymphoma.^{8–10} Its mechanism of action is binding to the reactive N7 center at purine residues to cause DNA damage in cancer cells and form adducts, 90% of which are intrastrand GpG and 10% ApG; these adducts block cell division and cause apoptotic cell death.¹¹ In addition, CP induces oxidative stress in cells by forming reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl and superoxide radicals, which depend on the CP concentration and exposure time.^{12,13} Response rates (10–20%) and complete remission rates (8%–12%) in the treatment of advanced or recurrent CC with CP have been attributed to the resistance some cancer cells can develop through intrinsic mechanisms, such as increased drug extrusion, which mediated by members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, leading to cisplatin resistance (CPR).^{14–17} These transporter proteins regulate the transmembrane efflux of multiple antineoplastic agents, drugs, xenobiotics and metabolites, expelling them into the extracellular space and thus decreasing their intracellular effect.¹⁸

The ABC transporters associated with CPR in CC include P-glycoprotein (P-gp),^{19,20} ATPases ATP7A and ATP7B,^{21–23} and multidrug resistance protein-1 (MRP1), which has been found to be strongly expressed in CC cell lines²⁴ and in approximately 85% of CC tumors.²⁵ Therefore, elucidating the molecular mechanisms underlying the expression of these transporters is important to improve the response to treatment with CP.

Adenosine (ADO) generation and the signaling of this nucleoside in cancer cells have recently been reported play an important role in tumor growth, immunosuppression, immune response evasion, metastasis, and chemoresistance.^{26–29} ADO is produced at sites of metabolic stress associated with hypoxia, ischemia, trauma, or inflammation. It is even produced in the tumor microenvironment (TME) via the adenosinergic pathway, where high concentrations of adenosine triphosphate/adenosine diphosphate (ATP/ADP) above 50 μ M are converted to adenosine monophosphate (AMP) by the

Significance Statement

This study provides the first evidence to show that the inhibition of CD73 or blocking ADO signaling through A2AR negatively modulates MRP1 expression in CC cells, increasing their sensitivity to CP treatment. This finding may have clinical significance as a therapeutic target for reversing CPR in patients with advanced or recurrent CC.

hydrolytic activity of the ectoenzyme CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, ENTPD1; EC 3.6.1.5). These products are subsequently converted to ADO by 5'-ectonucleotidase activity (CD73, EC 3.1.3.5).^{30–32} Most ADO signaling activities are mediated by adenosine receptors (ARs) in the cell membrane, which are coupled to G proteins; these receptors are divided into four subtypes (A1R, A2AR, A2BR, and A3R).^{33–35} Interestingly, both CD73 activity and ADO signaling have been found to be significantly associated with increased cancer cell chemoresistance through the modulation of MRP1 expression. For example, high CD73 expression has been associated with chemoresistance to doxorubicin and poor prognosis in triple-negative breast cancer.³⁶ Likewise, ADO signaling through A3R has also been reported to regulate resistance to vincristine in glioblastoma multiforme cells by increasing MRP1 expression.^{37,38} In a mouse glioblastoma model, CD73 expression and ADO signaling via A2BR were reported to promote glioblastoma pathogenesis and chemoresistance to temozolomide through increased MRP1 expression, respectively.³⁹

We have previously reported that HR-HPV-positive CC cells express high CD73 levels in the cell membrane and have a high capacity to generate ADO.⁴⁰ Furthermore, we reported that this pathway is important for increasing the protumorigenic characteristics of CC cells, including increased MRP1 expression.⁴¹ Therefore, in this study, we examined the effect of CD73 and the interaction of ADO with ARs on MRP1 expression in CC cells. We found that ADO induced an increase in MRP1 expression in CC cells by interacting with A2AR. Inhibiting CD73 expression or blocking A2AR with the selective antagonist ZM241385 decreased MRP1 expression and increased the sensitivity of CC cells to CP compared to cancer cells treated only with MK-751, a specific inhibitor of MRP1. This finding is potentially relevant in clinical practice as a therapeutic target for reversing CPR in patients with advanced or recurrent CC.

2 | METHODOLOGY

2.1 | Cell lines

The CC, CaSki (HPV 16+), and HeLa (HPV 18+) cell lines used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and were tested and found free of mycoplasma. The authenticity of each line was verified using short tandem repeat

(STR) genetic profiling. Cells were cultured in culture dishes with RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 U/μL penicillin, 100 U/μL streptomycin (Gibco), and 5 mM L-glutamine (Gibco) and incubated at 37°C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

2.2 | Cell cultures

To determine the effect of ADO on MRP1 expression, CaSki and HeLa cell lines (1×10^5) were cultured in six-well plates in the presence of different concentrations of ADO (0.001, 0.01, 0.1, and 1 mM) for 48 h. To block the interaction of ADO with ARs, 10 μM (final concentration) of the specific antagonists for A1R (DPCPX), A2AR (ZM241385), A2BR (MRS1754), and A3R (MRS1523) (Sigma-Aldrich) were added 30 min before adding ADO (1 mM, final concentration). The cultures were maintained for 48 h.

2.3 | Flow cytometry

The expression of CD73, MRP1, A1R, A2AR, A2BR, and A3R in CaSki and HeLa cell lines was determined by flow cytometry using the following antibodies: CD73-PE (PHA550257, BD Pharmingen), anti-MRP1 (MRPM5, Abcam), A1R-AF647 (s-4235R-A647, Bioss), A2AR-PE (NBP1-39474PE, Novus Biologicals), A2BR-AF750 (s-5900R-A750, Bioss), and A3R-FITC (orb399642, Biorbyt). The secondary antibody used was FITC-conjugated goat anti-mouse (F5262, Sigma-Aldrich). The experiments were performed in triplicate. For each measurement, 1×10^4 cells were counted on a BD FACS Canto II cytometer and analyzed with Flow Jo 10 software.

2.4 | Effect of CP on cell viability

To determine the effect of CP on the viability of CC cells cultured under the different experimental conditions, 2×10^3 cells were cultured in triplicate in a 96-well plate in the presence of different concentrations of CP (1, 3.15, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM) for 24 h in a final volume of 100 μL. As a negative control, cells were cultured in the absence of CP. Cell viability was determined using CellTiter 96® Aqueous One Solution reagent (Promega) following the manufacturer's instructions. The bioreduction of the tetrazolium compound [3-(4,5 dimethylthiazole-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, internal salt; MTS] to formazan was determined at a wavelength of 490 nm in a multimodal microplate reader (GloMax Explorer, Promega). The percentage of viable cells in each group was calculated based on the optical density (OD) of the negative control, which was normalized to 100%. The IC₅₀ values of CP for each cell type were calculated using GraphPad Prism version 8 using log-transformed and normalized OD values and CP concentrations (μM) from three experiments.

2.5 | Analysis of the extrusive capacity of CC cells

To determine the extrusive capacity of CC cells, 5×10^5 CC cells were cultured in the presence of the fluorogenic dye calcein-AM according to the protocol provided by the manufacturer of the Vybrant Multidrug Resistance Assay Kit (Molecular Probes). Different concentrations of MK-751 (Santa Cruz Biotechnology; 0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 μM), a specific inhibitor of MRP1, were added to these cells, which were cultured in a final volume of 200 μL. The cells were resuspended in 100 μL of cold Opti-MEM culture medium and placed on a dark flat-bottomed polystyrene plate (Corning) to quantify fluorescence in a multimode microplate reader (GloMax Explorer, Promega) with a 500–550 nm emission filter and 475 nm Blue excitation filter.

2.6 | Statistical analysis

All numerical data are shown as the average value $\pm$ SEM of three independent experiments. Comparisons were performed by multivariate statistical analysis in GraphPad Prism version 8 (GraphPad Prism Software). The differences were considered significant at $p < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | ADO increases MRP1 expression in CC cells through A2AR

Recent studies have reported AR-mediated ADO signaling can increase MRP1 expression to promote chemoresistance in various solid tumors.^{36–39} To analyze the effect of ADO on MRP1 expression in CC cells, CaSki and HeLa cell lines were cultured in the presence of different concentrations of ADO (0.001, 0.01, 0.1, and 1 mM) for 48 h, and MRP1 expression was analyzed by flow cytometry. An ADO dose-dependent increase in MRP1 was observed in both cell lines, with the highest increase (30%) at a concentration of 1 mM (Figure 1A). To identify the AR by which ADO signals to induce MRP1 expression, CaSki and HeLa cells were cultured in the presence of 1 mM ADO and in the presence or absence of 10 μM DPCPX, ZM241385, MRS1754, and MRS1523, specific antagonists of A1R, A2AR, A2BR, and A3R, respectively. The expression of ARs was previously analyzed in CaSki and HeLa cell lines. Except for A2BR, the expression of ARs (A1R, A2AR, and A3R) was heterogeneous between the two cell lines, with higher expression of A1R and A2AR in CaSki cells than in HeLa cells and higher expression of A3R in HeLa cells than CaSki cells (Supporting Information: Figure 1). Interestingly, A2AR blockade significantly reversed the ADO-induced increase in MRP1 expression in both cell lines. In fact, the MRP1 levels resulting from the blockade of this receptor were lower than the basal expression levels of this protein in both cell lines (Figure 1B), suggesting that ADO signaling through A2AR is important in maintaining MRP1 expression in these cancer cells.

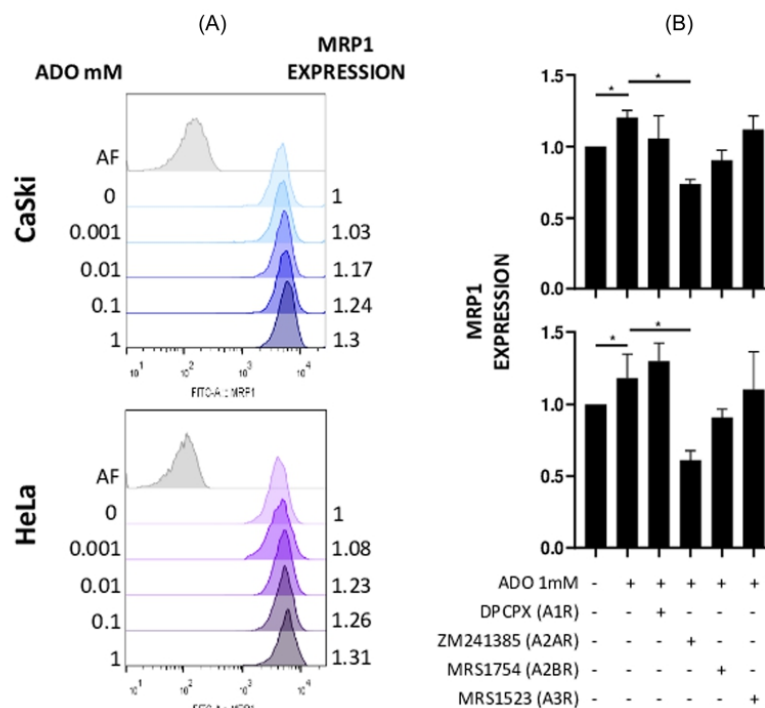


FIGURE 1 Effect of ADO and blockade of ARs on MRP1 expression in CC cells. (A) CaSki and HeLa cells, 1×10^5 of each, were cultured for 48 h with different concentrations of ADO (0, 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mM), and MRP1 expression was analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity of MRP1 in cells cultured in the absence of ADO was normalized to 1. AF, Autofluorescence. Representative histograms from three independent experiments. (B) MRP1 expression in CaSki and HeLa cells cultured in the presence of 1 mM ADO and presence (+) or absence (-) of 10 μ M DPCPX, ZM241385, MRS1754, and MRS1523, specific antagonists of A1R, A2AR, A2BR, and A3R, respectively, which are indicated in parentheses. Representative data from three independent experiments $\pm$ SEM. * $p < .05$, one-way ANOVA.

3.2 | CD73 inhibition decreases MRP1 expression in CC cells

CD73 overexpression in cancer cells has been associated with promoting chemoresistance to different antineoplastic agents.³⁹ To determine whether CD73 participates in regulating MRP1 expression in CC cells, we used CaSki and HeLa cells in which CD73 was previously downregulated using the pSIREN vector containing a siRNA that targets CD73 (pS/siRNA-CD73).⁴² CD73 expression was significantly lower in CaSki-pS/siRNA-CD73 and HeLa-pS/siRNA-CD73 cells than in their respective parental CaSki and HeLa cells (CaSki-WT and HeLa-WT cells, respectively) and in CaSki and HeLa cells transfected only with the vector pSIREN (CaSki-pS, and HeLa-pS, respectively; Figure 2). Interestingly, MRP1 expression was significantly decreased in CaSki-pS/siRNA-CD73 cells compared to CaSki-WT and CaSki-pS cells and in HeLa-pS/siRNA-CD73 cells compared to HeLa-WT and HeLa-pS (Figure 2). These results strongly suggest that the presence of CD73 is important for maintaining MRP1 expression in CC cells.

3.3 | CD73 inhibition or A2AR blockade decreases the extrusive capacity of CC cells

To analyze the effect of inhibiting CD73 expression or blocking A2AR on the extrusive capacity of CC cells, the cells were cultured in the presence of different concentrations of MK-751 (0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 μ M), a specific inhibitor of MRP1,⁴³ and the fluorogenic dye calcein-AM, a substrate of MRP1. The inhibition of MRP1 activity in CaSki-WT and HeLa-WT cells depended on the concentration of MK-751, as revealed by an increase in the intracellular percentage of calcein-AM (blue bars). The amount of intracellular calcein-AM was highest in both cell lines when they were treated with 100 μ M MK751 (Figure 3). Interestingly, CaSki-pS/siRNA-CD73 cells exhibited significant increases in the percentage of intracellularly retained calcein-AM compared to CaSki-WT when using concentrations of MK-751 ≥ 40 μ M (Figure 3A, red bars); however, no such effect was observed in HeLa-pS/siRNA-CD73 cells compared to HeLa-WT at any of the MK-751 concentrations used (Figure 3B, red bars). Conversely, blocking A2AR in CaSki and HeLa cells, CaSki-ADO + ZM241385 and

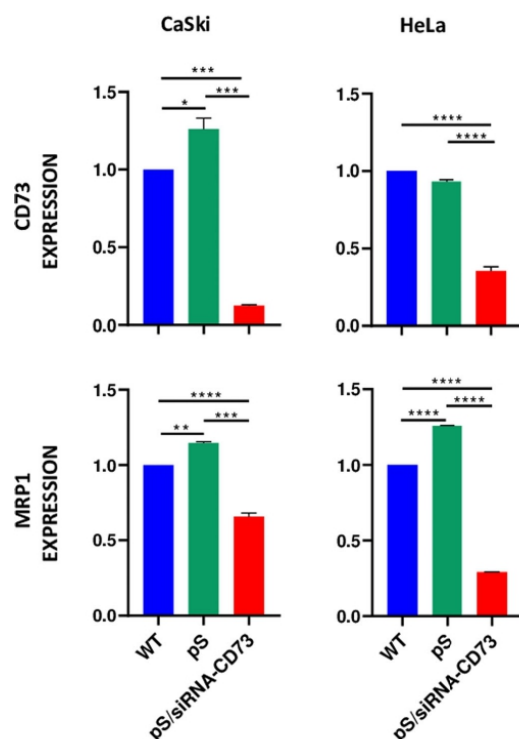


FIGURE 2 Effect of CD73 inhibition on MRP1 expression in CC cells. CaSki and HeLa cells in which CD73 expression was downregulated by transfection with the pSIREN vector containing a siRNA that targets CD73 (pS/siRNA-CD73) were analyzed for MRP1 expression by flow cytometry. Parental CaSki and HeLa cells (WT) and cells transfected only with the pSIREN vector (pS) were used as controls. The mean fluorescence intensity of CD73 and MRP1 expression in the parental cells was normalized to 1. Representative data from three independent experiments $\pm$ SEM. * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$, one-way ANOVA.

HeLa-ADO + ZM241385, respectively, significantly increased the percentage of intracellularly retained calcein-AM compared to CaSki-WT and HeLa-WT at MK-751 concentrations ≥ 60 and ≥ 20 μ M, respectively (Figure 3B,D, purple bars). These results indicate CD73 inhibition or A2AR blockade decreases the extrusive capacity of CC cells.

3.4 | CD73 inhibition or A2AR blockade increases the sensitivity of CC cells to CP

CPR has been associated with MRP1 overexpression in CC tumors.^{24,25} Because the inhibition of CD73 expression or A2AR blockade significantly decreased MRP1 expression and the extrusive capacity of CaSki and HeLa cells, we analyzed the effect of CP on the

viability of CC cells under these conditions. To this end, CaSki-pS/siRNA-CD73 and HeLa-pS/siRNA-CD73 cells, along with the CaSki-ADO + ZM241385 and HeLa-ADO + ZM241385 cells, were cultured for 24 h in the presence of different concentrations of CP (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μ M). CaSki-pS/siRNA-CD73 cells were significantly more sensitive to CP treatment than CaSki-WT or CaSki-pS cells, and HeLa-pS/siRNA-CD73 cells were significantly more sensitive to CP treatment than HeLa-WT or HeLa-pS cells (Figure 4A). Based on the viability curves, the IC₅₀ values obtained for CaSki-WT, CaSki-pS, and CaSki-pS/siRNA-CD73 were 31.87, 30.86, and 19.64 μ M, respectively; for HeLa-WT, HeLa-pS, and HeLa-pS/siRNA-CD73 cells, these values were 22.2, 22.34, and 16.52 μ M, respectively (Figure 4D). Moreover, CaSki-ADO and HeLa-ADO cells showed an increase in the IC₅₀ values of CP compared to CaSki-WT and HeLa-WT, respectively. However, CaSki-ADO + ZM241385 cells were significantly more sensitive to CP treatment than CaSki-WT and CaSki-ADO cells, and HeLa-ADO + ZM241385 cells were significantly more sensitive to CP treatment than HeLa-WT and HeLa-ADO cells (Figure 4B). The IC₅₀ values obtained for CaSki-ADO and CaSki-ADO + ZM241385 cells were 42 and 11.62 μ M, respectively; for HeLa-ADO and HeLa-ADO + ZM241385 cells, these values were 26.26 and 15.83 μ M, respectively (Figure 4D). Notably, the increase in sensitivity to CP observed in CC cells with decreased CD73 expression or in which A2AR was blocked was comparable to that obtained in CC cells treated with 100 μ M MK-751 (CaSki-MK-751 and HeLa-MK-751), which showed IC₅₀ values of 14.76 and 10.77 μ M, respectively (Figure 4C). These results suggest that CD73 expression and ADO signaling through A2AR are important for maintaining MRP1 expression and CPR in CC cells, which could be targeted for improving CP therapy in patients with advanced or recurrent CC.

4 | DISCUSSION

The pharmacological goal of chemotherapeutic agents against cancer cells is to deliver a sufficient amount of the drug to damage these cells.⁴⁴ However, the reduction in drug accumulation due to the presence of ABC transporters may be involved in the efflux of these agents, which decreases their efficacy and contributes to the development of multidrug resistance.⁴⁵ Among these transporters, the MRP1 protein is responsible for the extrusion of a broad spectrum of substrates across the plasma membrane, including antineoplastics, such as doxorubicin, vincristine, paclitaxel, irinotecan, methotrexate, and cisplatin.⁴⁶ Therefore, identifying MRP1 modulators is of great interest for cancer research and of great clinical value in the treatment of multidrug resistance. To this end, a wide variety of MRP1 modulators, including phytochemical derivatives, miRNA-based therapy, and tyrosine kinase inhibitors (TKI), have had significant effects on regulating the activity of this transporter; however, a key challenge encountered in clinical trials has been the efficacy and safety of these modulators.⁴⁷ Recent studies have reported that the generation of ADO, via the biological activity of

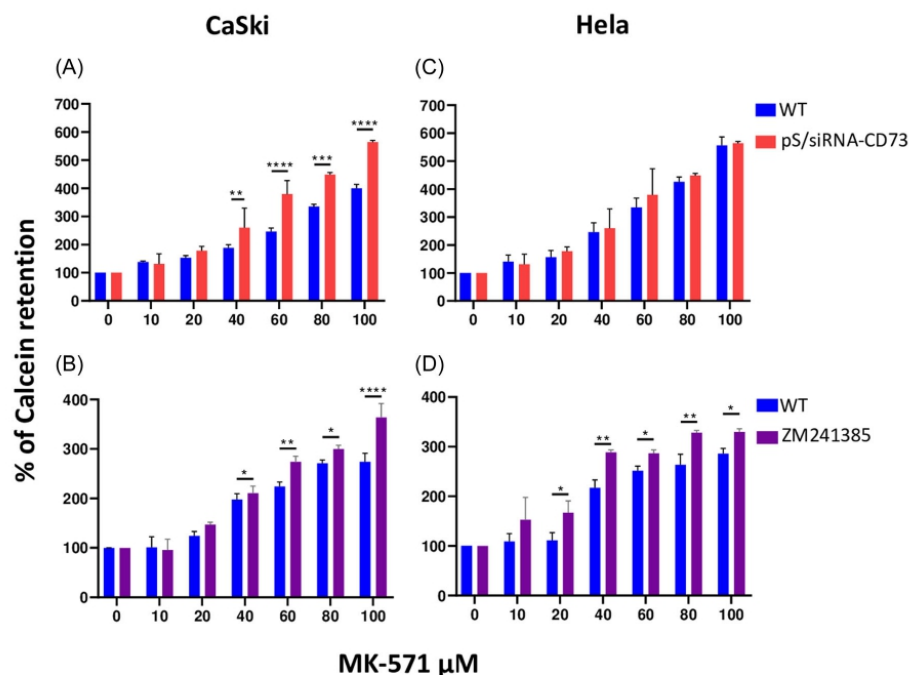


FIGURE 3 CD73 inhibition or A2AR blockade in CC cells decreases the extrusive capacity of CC cells. (A) CaSki-WT and CaSki-pS-siRNA-CD73 cells; (B) CaSki-WT and CaSki-ADO + ZM241385 cells; (C) HeLa-WT and HeLa-pS-siRNA-CD73 cells; and (D) HeLa-WT and HeLa-ADO + ZM241385 cells, 5×10^5 each, were cultured in the presence of different concentrations (0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 μM) of MK-751, a specific inhibitor of MRP1, and the fluorogenic dye calcein-AM, a substrate of MRP1, as described in the materials and methods section. The intracellular calcein-AM content in CaSki-WT and HeLa-WT cells in the absence of MK-751 was normalized to 100%. Representative data from three independent experiments $\pm$ SEM. * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$, and **** $p < .0001$, one-way ANOVA.

CD73, is very important in the development of cancer cell chemoresistance to different drugs due to the maintenance or increase in MRP1 expression.^{36–39} In the present study, we found that ADO positively modulates MRP1 expression in CC cells in a dose-dependent manner. This finding implies that the high concentrations of ADO ($>50 \mu\text{M}$) in the TME produced by the hydrolysis of adenine nucleotides through the ectonucleotidases CD39 and CD73, as occurs in gynecological tumors,³⁰ might contribute to maintaining high levels of MRP1 in CC cells. In a previous study, we found that downregulating CD73 expression in CC cells strongly reduced the ability of these cells to generate ADO from AMP hydrolysis.⁴² Interestingly, we herein observed that CaSki and HeLa cells with downregulated expression of CD73 (CaSki-pS/siRNA-CD73 and HeLa-pS/siRNA-CD73, respectively) showed significantly reduced MRP1 expression. Likewise, we observed that ADO signaling through A2AR is potentially important in maintaining MRP1 expression in CaSki and HeLa cancer cells because A2AR blockade with the specific antagonist ZM241385 strongly reversed the ADO-induced increase in MRP1 expression level in both cell lines. This finding suggests that CD73 activity and A2AR signaling may be key in the induction of MRP1 expression in CC. In this context, the upregulation of MRP1

expression through PI3K/Akt pathways has been reported in human glioblastoma stem-like cells, and this upregulation was mediated by the interaction of ADO with A3R.³⁸ This relationship was also observed in hepatocellular carcinoma (HCC) cells, where A2AR-mediated ADO signaling activates Rap1, which recruits P110 β in the plasma membrane and triggers the production of PIP3 to promote Akt phosphorylation.⁴⁸

The MRP1 transporter is strongly expressed in CC cell lines²⁴ and in approximately 85% of CC cases, and it has been associated with low rates of response (10%–20%) and complete remission (8%–12%) in the treatment of advanced or recurrent CC with CP.²⁵ Therefore, a decrease in MRP1 expression in the tumors of these patients would be very useful to favor chemosensitivity to CP. We observed significantly decreased MRP1 expression and extrusive capacity in CaSki and HeLa cells with downregulated CD73 expression or in which A2AR was blocked. In fact, these cells showed lower extrusive capacity than those cells treated with only the MRP1 inhibitor MK571, suggesting that CD73 inhibition or A2AR blockade may also affect the expression of proteins with extrusive capacity other than MRP1, which will be important to elucidate in subsequent studies. The modulation of MRP1 observed in CaSki and HeLa cells by inhibiting CD73 expression or by A2AR blockade

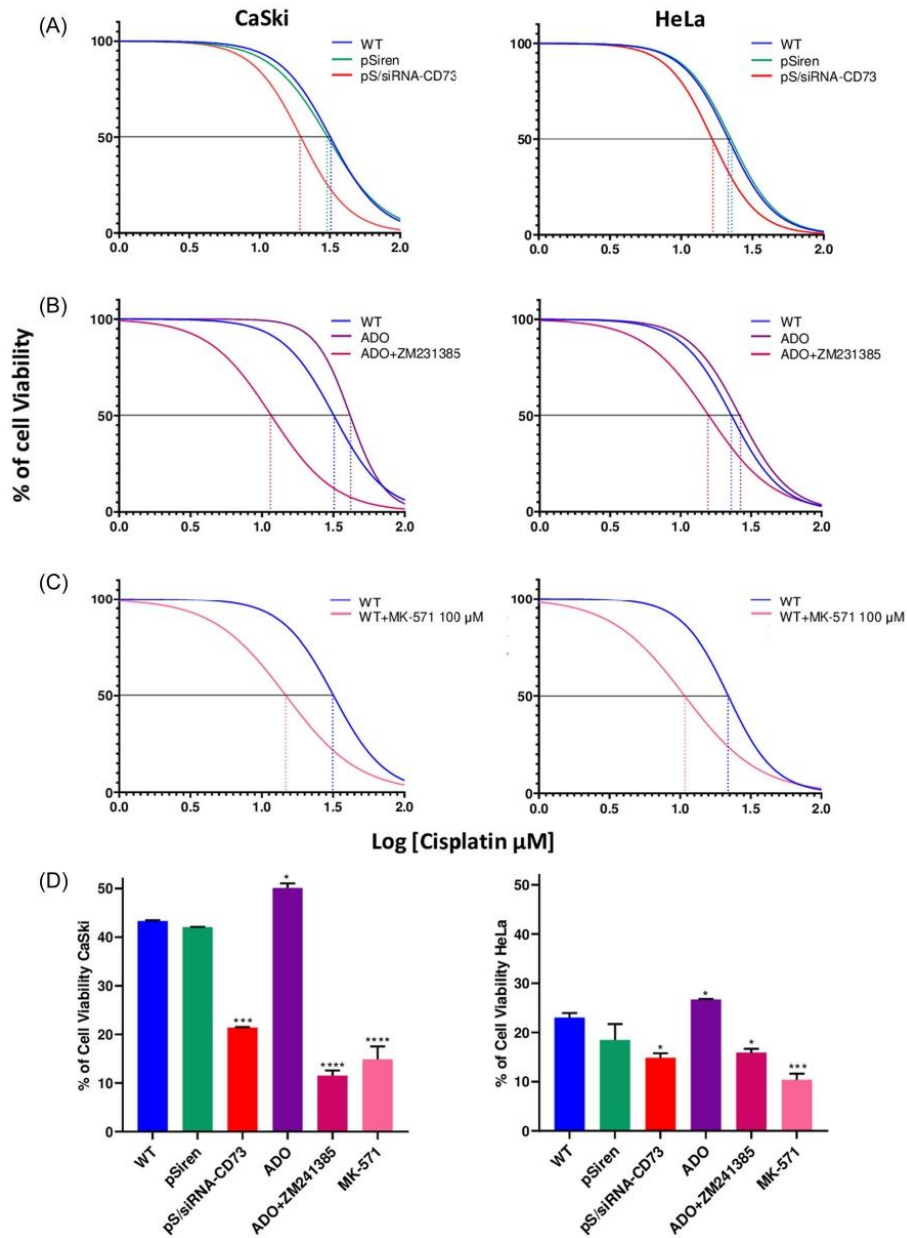


FIGURE 4 Effect of CP on the viability of CC cells with downregulated CD73 expression or in which A2AR was blocked. The effect of different concentrations of CP (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM) was evaluated on the viability of (A) parental CaSki and HeLa cells (WT), cells transfected with pSIREN vector (pSIREN), or cells transfected with pSIREN vector containing a siRNA targeting CD73 (pS/siRNA-CD73); (B) parental CaSki and HeLa cells (WT), treated with 1 mM ADO (ADO) or treated with ADO in the presence of 10 μM A2AR antagonist (ADO + ZM241385); and (C) parental CaSki and HeLa cells (WT) or CaSki and HeLa cells treated with 100 μM MK-751 for 24 h, as described in the materials and methods section. Representative data from three independent experiments. CP IC_{50} values for each cell type were calculated using GraphPad Prism version 8 using log-transformed and normalized OD values and CP concentrations (μM) from three experiments. * $p < .05$; *** $p < .001$, and **** $p < .0001$, one-way ANOVA.

significantly favored the sensitivity of these cells to CP. Specifically, these cells were sensitive to lower concentrations of CP, 25%–39% of the concentration required for parental cells in the CD73-downregulated cells or 29%–64% of the concentration required for parental cells when A2AR was blocked. Therefore, if CD73 inhibition or blocking ADO signaling through A2AR modulates MRP1 in other CC cell lines, this strategy could be useful for reversing CPR in CC patients. The inhibition of CD73 activity by silencing its expression using siRNAs has also been effective in reversing vincristine chemoresistance in primary cultures of glioblastoma multiforme.^{37,38} Conversely, ADO signaling through the high-affinity receptor (A2AR) on the surface of immune cells reportedly leads to the suppression of the antitumor immune response^{49–52} and increased chemoresistance to treatment with different drugs.^{53,54} Therefore, interfering with ADO signaling through A2AR is a possible alternative strategy in cancer therapy.⁵⁵ Currently, several specific agents to attenuate the activities of A2AR and CD73 are being evaluated as cancer therapies in multiple clinical trials. These trials aim to evaluate the safety of either CD73 inhibition^{56,57} or blocking ADO signaling with A2AR^{58–60} to reverse the suppressive effects of ADO on antitumor immunity when used as monotherapy or in conjunction with immune checkpoint inhibitors or antineoplastic agents.^{61,62} Consequently, the effect of these strategies on decreasing the expression of transporters involved in the extrusion of antineoplastic agents in cancer cells must be known to improve chemotherapy-based cancer treatments.

5 | CONCLUSIONS

This study provides the first evidence to show that CD73 inhibition and blocking ADO signaling through A2AR negatively modulate MRP1 expression in CC cells, decreasing their extrusive capacity and sensitizing them to CP treatment. Therefore, CD73 inhibition or blocking ADO signaling through A2AR could be a strategy to reverse CPR in patients with advanced or recurrent CC, which is characterized by very low CP response rates (10%–20%).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Montserrat Carrera-Martínez: Investigation; methodology; writing—original draft. **Rosario García-Rocha, Jorge Hernández-Montes, Christian Azucena Don-López:** Investigation; methodology. **Benny Weiss-Steider and Juan José Montesinos-Montesinos:** Supervision; visualization. **Alberto Monroy-García and María de Lourdes Mora-García:** Conceptualization; funding acquisition; writing—review and editing. All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important content, and all authors approved the final version to be submitted for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was performed with the following funds: The Mexican Social Security Institute (Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS) Grant to the protocol No. R-2018-3602-015 to AMG and DGAPA-PAPIIT Grant no. IN211822 to MLMG. The authors also appreciate the support given to M. en C. Monserrat Carrera Martínez,

student of the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM, by the Doctorate Scholarship No. 579767 from CONACyT. Finally, the authors thank MSc. Jessica Lakshmi Prieto Chávez from the Flow Cytometry Instrument Center of IMSS for support with the flow cytometry analysis.

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data displayed in this publication, including Supporting Information, are available from the corresponding author upon request.

ORCID

Montserrat Carrera-Martínez  <http://orcid.org/0000-0001-5166-223X>

María de L. Mora-García  <https://orcid.org/0000-0001-7989-0162>

Rosario García-Rocha  <http://orcid.org/0000-0003-1789-4832>

Benny Weiss-Steider  <http://orcid.org/0000-0003-4893-530X>

Juan J. Montesinos-Montesinos  <https://orcid.org/0000-0002-1042-3205>

Jorge Hernández-Montes  <http://orcid.org/0000-0003-0825-928X>

Christian A. Don-López  <https://orcid.org/0000-0001-5857-3440>

Alberto Monroy-García  <http://orcid.org/0000-0002-9733-9013>

REFERENCES

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–249. doi:10.3322/caac.21660
- Buskwofe A, David-West G, Clare CA. A review of cervical cancer: incidence and disparities. *J Natl Med Assoc*. 2020;112(2):229–232. doi:10.1016/j.jnma.2020.03.002
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382(9895):889–899. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7
- Díaz-Padilla I, Monk BJ, Mackay HJ, Oaknin A. Treatment of metastatic cervical cancer: future directions involving targeted agents. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;85(3):303–314. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.07.006
- Lorusso D, Petrelli F, Coinu A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2014;133(1):117–123. doi:10.1016/j.ygyno.2014.01.042
- McKim A, Walter AC, Sheely KM, Manahan KJ, Geisler JP. An economic analysis of cisplatin alone versus cisplatin doublets in the treatment of women with advanced or recurrent cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2016;37(3):353–356.
- Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*. 2019;88:102925. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102925
- Tsimberidou AM, Braithe F, Stewart DJ, Kurzrock R. Ultimate fate of oncology drugs approved by the US food and drug administration without a randomized trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6243–6250. doi:10.1200/JCO.2009.23.6018
- Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(1):53–81. doi:10.1016/S0305-7372(03)00139-7
- Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer

- therapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(5):1850-1855. doi:10.1073/pnas.1011379108
11. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
 12. Florea AM, Büsnelberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011;3(1):1351-1371. doi:10.3390/cancers3011351
 13. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):347-359. doi:10.3109/10408441003601836
 14. Leath CA, Straughn JM. Chemotherapy for advanced and recurrent cervical carcinoma: results from cooperative group trials. *Gynecol Oncol*. 2014;29(1):251-257. doi:10.1016/j.ygyno.2012.12.035
 15. Zhu X, Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *DDDT*. 2016;10:1885-1895. doi:10.2147/DDDT.S106412
 16. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):706-721. doi:10.1124/pr.111.005637
 17. Phippen NT, Leath CA, Havrilesky LJ, Barnett JC. Bevacizumab in recurrent, persistent, or advanced stage carcinoma of the cervix: is it cost-effective. *Gynecol Oncol*. 2015;136:43-47. doi:10.1016/j.ygyno.2014.11.003
 18. Cole SP. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem*. 2014;289(45):30880-30888. doi:10.1074/jbc.R114.609248
 19. Roy M, Mukherjee S. Reversal of resistance towards cisplatin by curcumin in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(3):1403-1410. doi:10.7314/apjcp.2014.15.3.1403
 20. Sakaeda T, Nakamura T, Hirai M, et al. MDR1 up-regulated by apoptotic stimuli suppresses apoptotic signaling. *Pharm Res*. 2002;19(9):1323-1329. doi:10.1023/a:1020302825511
 21. Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(2):298-307. doi:10.1016/j.bcp.2006.10.003
 22. Beretta GL, Gatti L, Tinelli S, et al. Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(2):283-291. doi:10.1016/j.bcp.2004.03.022
 23. Doherty B, Lawlor D, Gillet JP, Gottesman M, O'Leary JJ, Stordal B. Collateral sensitivity to cisplatin in KB-8-5-11 drug-resistant cancer cells. *Anticancer Res*. 2014;34(1):503-507.
 24. Chao CC. Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cisdiaminedichloroplatinum (II) in cervix carcinoma HeLa cells: relation to DNA repair. *Mol Pharmacol*. 1994;45:1137-1144.
 25. Feldman R, Abbott BL, Reddy SK, Castro M. Drug efflux pump expression in 50,000 molecularly-profiled cancer patients. *J Clin Oncol*. 2015;33(15 suppl):S11108. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.11108
 26. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(10):611-629. doi:10.1038/s41571-020-0382-2
 27. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*. 2012;72(21):5441-5447. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1600
 28. Yang H, Yao F, Davis PF, Tan ST, Hall SRR. CD73, tumor plasticity and immune evasion in solid cancers. *Cancers*. 2021;13(2):177. doi:10.3390/cancers13020177
 29. Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer*. 2016;2(2):95-109. doi:10.1016/j.trecan.2016.01.003
 30. Bahreyni A, Samani SS, Ghorbani E, et al. Adenosine: an endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2715-2722. doi:10.1002/jcp.26056
 31. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006;2(2):409-430. doi:10.1007/s11302-006-9003-5
 32. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):437-502. doi:10.1007/s11302-012-9309-4
 33. Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelle PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;112(2):358-404. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
 34. Fredholm BB, Ulfman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53(4):527-552.
 35. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:775-787. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.775
 36. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(27):11091-11096. doi:10.1073/pnas.1222251110
 37. Quezada C, Garrido W, Oyarzún C, et al. 5-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *J Cell Physiol*. 2013;228:602-608. doi:10.1002/jcp.24168
 38. Torres A, Vargas Y, Uribe D, et al. Adenosine A3 receptor elicits chemoresistance mediated by multiple resistance-associated protein-1 in human glioblastoma stem-like cells. *Oncotarget*. 2016;7(41):67373-67386. doi:10.18632/oncotarget.12033
 39. Yan A, Joachims ML, Thompson LF, Miller AD, Canoll PD, Bynoe MS. CD73 promotes glioblastoma pathogenesis and enhances its chemoresistance via A_{2B} adenosine receptor signaling. *J Neurosci*. 2019;39(22):4387-4402. doi:10.1523/JNEUROSCI.1118-18.2019
 40. Mora-García ML, Ávila-Ibarra LR, García-Rocha R, et al. Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cell Immunol*. 2017;320:46-55. doi:10.1016/j.cellimm.2017.09.002
 41. García-Rocha R, Monroy-García A, Carrera-Martínez M, et al. Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production. *Cell Biochem Funct*. 2022;40(7):760-772. doi:10.1002/cbf.3742
 42. García-Rocha R, Monroy-García A, Hernández-Montes J, et al. Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine*. 2019;118:71-79. doi:10.1016/j.cyto.2018.09.018
 43. Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208(1):345-352. doi:10.1006/bbrc.1995.1344
 44. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):219-234. doi:10.1038/nrd1984
 45. Yuan T, Sun J, Tian J, Hu J, Yin H, Yin J. Involvement of ABC transporters in the detoxification of non-substrate nanoparticles in lung and cervical cancer cells. *Toxicology*. 2021;455:152762. doi:10.1016/j.tox.2021.152762
 46. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007;59(12):752-757. doi:10.1080/15216540701736285

47. Poku VO, Iram SH. A critical review on modulators of multidrug resistance protein 1 in cancer cells. *PeerJ*. 2022;10:e12594. doi:10.7717/peerj.12594
48. Ma XL, Shen MN, Hu B, et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110 and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):37. doi:10.1186/s13045-019-0724-7
49. Muller-Haegeler S, Muller L, Whiteside TL. Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(7):897-914. doi:10.1586/1744666X.2014.915739
50. Young A, Ngiew SF, Gao Y, et al. A2AR adenosine signaling suppresses natural killer cell maturation in the tumor micro-environment. *Cancer Res*. 2018;78(4):1003-1016. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2826
51. Halpin-Veszeleiova K, Hatfield SM. Oxygenation and A2AR blockade to eliminate hypoxia/HIF-1 α -adenosinergic immunosuppressive axis and improve cancer immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;53: 84-90. doi:10.1016/j.coph.2020.07.005
52. Ohta A, Sitkovsky M. The adenosinergic immunomodulatory drugs. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):501-506. doi:10.1016/j.coph.2009.05.005
53. Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35: 581-606. doi:10.1146/annurev.pa.35.040195.003053
54. Ruiz-Rodríguez VM, Turiján-Espinoza E, Guel-Pañola JA, et al. Chemoresistance in breast cancer patients associated with changes in P2X7 and A2A purinergic receptors in CD8⁺ T lymphocytes. *Front Pharmacol*. 2020;11:576955. doi:10.3389/fphar.2020.576955
55. Sun C, Wang B, Hao S. Adenosine-A2A receptor pathway in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2022;13:837230. doi:10.3389/fimmu.2022.837230
56. Siu LL, Burris H, Le DT, et al. Abstract CT180: preliminary phase 1 profile of BMS-986179, an anti-CD73 antibody, in combination with nivolumab in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res*. 2018;78(13):CT180.
57. Luke J, Merchan J, Harshman L, et al. Immunobiology and clinical activity of CPI-006, an anti-CD73 antibody with immunomodulating properties in a phase 1/1b trial in advanced cancers. *J Immunother Cancer*. 2019;37(15_suppl):S2505.
58. Chiappori A, Williams CC, Creelan BC, et al. Phase I/II study of the A2AR antagonist NIR178 (PBF-509), an oral immunotherapy, in patients (Pts) with advanced NSCLC. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):S9089.
59. Buisseret L, Rottey S, De Bono JS, et al. Phase 1 trial of the adenosine A2A receptor antagonist inupadenant (EOS-850): update on tolerability, and antitumor activity potentially associated with the expression of the A2A receptor within the tumor. *J Clin Oncol*. 2021;39(15-suppl):2562.
60. Fong L, Hotson A, Powderly JD, et al. Adenosine 2a receptor blockade as an immunotherapy for treatment-refractory renal cell cancer. *Cancer Discov*. 2020;10(1):40-53. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0980
61. Willingham SB, Hotson AN, Miller RA. Targeting the A2AR in cancer: early lessons from the clinic. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;53:126-133. doi:10.1016/j.coph.2020.08.003
62. Powderly J, Spira A, Gutierrez R, et al. Phase I evaluation of AB928, a novel dual adenosine receptor antagonist, combined with chemotherapy or AB122 (anti-PD-1) in patients (Pts) with advanced malignancies. *Ann Oncol*. 2019;30(5_suppl):v493.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Carrera-Martínez M, Mora-García MdL, García-Rocha R, et al. Inhibition of CD73 expression or A2AR blockade reduces MRP1 expression and increases the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin. *Cell Biochem Funct*. 2023;1-10. doi:10.1002/cbf.3784

Received: 24 March 2022 | Revised: 2 August 2022 | Accepted: 26 August 2022
DOI: 10.1002/cbf.3742

RESEARCH ARTICLE

CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION WILEY

Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production

Rosario García-Rocha^{1,2} | Alberto Monroy-García^{1,3} |
Monserrat Carrera-Martínez^{3,4} | Jorge Hernández-Montes¹ |
Christian Azucena Don-López¹ | Benny Weiss-Steider¹ |
Katia Alhelí Monroy-Mora¹ | María de los Ángeles Ponce-Chavero^{1,4} |
Juan José Montesinos-Montesinos⁵ | María Luisa Escobar-Sánchez⁶ |
Gabriela Molina Castillo^{1,4} | Rommel Chacón-Salinas^{7,8} |
Luis Vallejo-Castillo^{7,9} | Sonia Mayra Pérez-Tapia^{7,8,10} |
María de Lourdes Mora-García¹

¹Laboratorio de Inmunobiología, UIDCC-UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM, Ciudad de México, México

²Programa de Beca Posdoctoral UNAM DGAPA-PAPIIT, Ciudad de México, México

³Laboratorio de Inmunología y Cáncer, UIMEO, H Oncología, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

⁴Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Ciudad de México, México

⁵Laboratorio de Células Troncales Mesequimales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

⁶Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

⁷Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

⁸Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, ENCB-IPN, Ciudad de México, México

⁹Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN), Ciudad de México, México

¹⁰Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDI-FarBiotec-CONACyT), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Correspondence

María de Lourdes Mora-García, Oriente 170
No. 160 Colonia Moctezuma 2a Sección,
Delegación Venustiano Carranza C.P., Ciudad
de México 15530, México.
Email: mogl@unam.mx

Funding information

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS),
Grant/Award Number: FIS/IMSS/PROT/PRIO/
19/114 (R2018-3602-015); DGAPA-PAPIIT,
Grant/Award Number: IN225519

Abstract

Recently, a link between the biological activity of CD73 and tumorigenicity in solid tumors has been proposed. We previously reported that the generation of adenosine (Ado) by the activity of CD73 in cervical cancer (CC) cells induces transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) production to maintain CD73 expression. In the present study, we analyzed the participation of TGF- β 1 in CD73 expression and the development of protumoral characteristics in CaSki CC cells cultured as tumorspheres (CaSki-T) and in monolayers (CaSki-M). Compared with those in CaSki-M cells, CD73 expression and Ado generation ability were

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2022 The Authors. *Cell Biochemistry and Function* published by John Wiley & Sons Ltd.

significantly increased in CaSki-T cells. CaSki-T cells exhibited enrichment in the CSC-like phenotype due to increases in the expression levels of stem cell markers (CD49f, CK17, and P63; OCT4 and SOX2), greater sphere formation efficiency (SFE), and an increase in the percentage of side population (SP) cells. Interestingly, compared with CaSki-M cells, CaSki-T cells produced a greater amount of TGF- β 1 and presented a marked protumor phenotype characterized by a significant decrease in the expression of major histocompatibility complex class-I (MHC-I) molecules, an increase in the expression of multidrug resistance protein-I (MRP-I) and vimentin, and an increase in the protein expression levels of Snail-1 and Twist, which was strongly reversed with TGF- β 1 inhibition. These results suggest that the presence of TGF- β 1-CD73-Ado feedback loop can promote protumoral characteristics in the CC tumor microenvironment.

KEYWORDS

cancer stem-like (CSC-like) cells, CD73, cervical cancer, protumor phenotype, TGF- β 1, tumorspheres

1 | INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the fourth most common type of cancer in women and represents a major public health problem worldwide. In 2020, approximately 600,000 new cases and 340,000 deaths were reported, more than 80% of which occurred in developing countries.¹ Persistent infection by high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is one of the main risk factors for the development of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs), which can progress to high-grade lesions (HSILs) and eventually to CC.² The immune response against HPV antigens can eliminate most infections and precursor lesions; however, some women exposed to HR-HPV will develop cancer, suggesting that other risk factors may be involved.³ Recently, intrinsic factors related to the generation of adenosine (Ado) and the signaling of this nucleoside in tumor cells have been proposed to play important roles in tumor growth, immunosuppression, evasion of the immune response, metastasis, and chemoresistance, among other mechanisms.^{4–7} Ado is produced at sites of metabolic stress associated with hypoxia, ischemia, trauma, or inflammation and even in the tumor microenvironment (TME) through the adenosinergic pathway. In the TME, high concentrations of adenosine triphosphate/adenosine diphosphate (ATP/ADP) greater than 50 μ M are hydrolyzed to adenosine monophosphate (AMP) by the ectoenzyme CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, ENTPD1; EC 3.6.1.5) and subsequently to Ado by the activity of 5'-ectonucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5).^{8–10} Most of the extracellular signaling activities of Ado are mediated by receptors on the cell membrane that are coupled to G proteins; these receptors are divided into four subtypes (A1R, A2AR, A2BR, and A3R).^{11–13}

Purinergic signaling has been associated with the development and maintenance of cancer stem-like (CSC-like) cells, which have the ability to initiate tumors due to their property of self-renewal and

Significance statement

This study provided the first evidence that high CD73 expression associated with high TGF- β 1 production by cervical cancer cells cultured as tumorspheres strongly contributes to the induction of protumoral characteristics related to tumor progressions, such as migration and invasiveness, immune evasion, immunosuppression, and chemoresistance.

unlimited proliferation and play critical roles in tumor metastasis, relapse, and resistance to therapy.¹⁴ Recent evidence indicates that transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) is one of the most prominent extrinsic factors of the microenvironment in solid tumors and initiates a transcriptional program in carcinoma cells that participates in cellular plasticity toward the epithelial-mesenchymal transition (EMT).¹⁵ After EMT activation, cells generally eliminate the expression of epithelial markers, such as E-cadherin, and instead express mesenchymal markers, including vimentin, fibronectin, and certain master transcription factors that induce EMT, such as Zeb1, Twist, Snail, and Slug, which regulate the expression of genes associated with most mesenchymal states of carcinoma cells to facilitate their invasiveness and motility.^{16–18} In addition, TGF- β 1 present in the TME is a driver of CD73 expression, and the activity of this nucleotidase has been suggested to positively regulate the expression of genes associated with stem cells^{19,20} and cellular plasticity in solid tumors.⁶

Several studies have reported that in nonadherent and serum-free conditions, the in vitro tumorsphere formation assay is a functional method to produce tumor cultures enriched in

subpopulations of CSC-like cells and a microenvironment where cell behavior can be studied under different experimental conditions.^{21–25} In addition, a positive correlation has been reported among CD73 expression in tumor cells, the ability to form tumorspheres *in vitro*, and tumor progression,²⁶ suggesting a link between increased CD73 expression and tumorigenesis. Our research group has reported that HR-HPV-positive CC tumor cells highly express CD73 in the cell membrane and have a high capacity to generate Ado²⁷ and that Ado signaling in these tumor cells promotes TGF- β 1 production to maintain CD73 expression.²⁸ Therefore, in this study, we analyzed the participation of TGF- β 1 in the expression of CD73 and protumoral markers in CaSki cells cultured as tumorspheres (CaSki-T) and in monolayers (CaSki-M). We found that CSC-like characteristics, including a stem cell phenotype, sphere formation efficiency (SFE), and side population (SP) cells, increased in CaSki-T cells. Likewise, compared with CaSki-M cells, in CaSki-T cells, we observed a significant increase in CD73 expression and the capacity to hydrolyze AMP and generate Ado. Interestingly, CaSki-T cells produced a greater amount of TGF- β and presented a marked protumor phenotype, which was reversed when these cells were cultured in the presence of neutralizing anti-TGF- β , suggesting that the TME is important for maintaining CD73 expression and potentially the production of immunosuppressive factors such as TGF- β 1 to favor the protumor phenotype in CC cells. This study provides the first evidence that the TGF- β 1–CD73–Ado feedback loop strongly contributes to the induction of protumoral characteristics in CC and may have clinical importance as a therapeutic target.

2 | METHODS

2.1 | Tumor cell culture

CC CaSki (HPV-16+) cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were cultured under adherent conditions as a monolayer/2D using RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 U/ μ l penicillin, and 100 U/ μ l streptomycin (Gibco) and maintained under sterile conditions at 37°C with 5% CO₂ in a saturated humidity environment. For culture in tumorspheres, CaSki cells were seeded (1×10^4 cells per well) in ultralow-adhesion six-well plates (Corning Costar) using 2 ml of reduced-serum medium (Opti-MEM; Gibco) containing 0.5% FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Gibco), 1% nonessential amino acids, GlutaMAX (Gibco), and 20 ng/ml rhEGF and rhFGFb (R&D Systems) and maintained under sterile conditions at 37°C with 5% CO₂ in a saturated humidity environment. On Day 7 of culture, the tumorspheres were mechanically disaggregated and reseeded under the same conditions. After two consecutive reseeds (Day 21 of culture), the tumorspheres were characterized, and the tumor cells within each sphere were analyzed to determine their phenotypic and functional characteristics; the same analyses were conducted for the tumor cells cultured in monolayers.

2.2 | SFE

Cells from monolayer tumor cell cultures or tumorspheres were seeded (1×10^4) in ultralow adhesion plates in Opti-MEM medium (2 ml/well). After 14 days, the number of spheres with a diameter greater than 200 μ m was determined using the following formula: % SFE = (total number of spheres/10,000) $\times$ 100.

2.3 | Characterization of tumorspheres

After 21 days of culture, the tumorspheres reached an approximate diameter of 200–300 μ m. Some were fixed for 24 h in a 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin, and then a microtome was used to slice 5- μ m sections that were subsequently processed for staining with hematoxylin-eosin (H-E). To analyze the structure, the tumorspheres were fixed in 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 2 h. Subsequently, they were incubated in 1% osmium tetroxide (OsO₄) in PBS and embedded in EPON resin, after which they were sliced into ultrathin sections and stained with 4% uranyl acetate and 0.4% lead citrate. The sections were evaluated in a JEOL 1010 transmission electron microscope operated at 80 kV. Digital images were obtained with a Hamamatsu camera.

2.4 | SP assay

Tumor cells from monolayers or tumorsphere cultures (1×10^6) were incubated for 1 h in the presence or absence of 10 μ M Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). In some cases, to block Hoechst efflux, cells were stained in the presence of 50 μ M verapamil (Sigma-Aldrich), as previously described.²⁹ The cells were then washed twice with PBS, and the percentage of cells that excluded the dye was analyzed using a FACSAria IIu flow cytometer (BD Biosciences). The data obtained were analyzed using FlowJo 10 software.

2.5 | Flow cytometry

Tumor cells from monolayer cultures or tumorspheres were analyzed by flow cytometry to determine the expression of core markers, that is, CD49f, CK17, P63, OCT4, and SOX2, using the following antibodies: anti-CD49f-APC (R&D Systems); anti-CK17-AF488 (Bioss); anti-P63-AF647 (Bioss); anti-OCT4 (rabbit anti-human; Abcam); and anti-SOX2 (mouse anti-human, Abcam). For the analysis of CD73, major histocompatibility complex class-I (MHC-I), MRP-1, E-cadherin, vimentin, Snail, and Twist, the following antibodies were used: anti-CD73-PE (mouse anti-human, BD, Pharmingen); W6/32 (mouse anti-human, which recognizes the conformational epitope of the α chains of the human leucocyte antigen (HLA)-A, HLA-B and HLA-C molecules associated with β 2-microglobulin), which was generously donated by Dr. Gerd Moldenhauer of the German Cancer

Research Center, Heidelberg, Germany; anti-MRP1 antibody Abcam; anti-E-cadherin-PerCP-Cy 5.5 (BD, Pharmingen); anti-vimentin-Alexa Fluor 488 (BD, Pharmingen); anti-Snail Mouse monoclonal Abcam (Cambridge); and anti-Twist Mouse monoclonal Abcam (Cambridge). The secondary antibodies used were goat anti-rabbit PE (R&D Systems) and goat antimouse Fluorescein IsoTioCyanate (Sigma-Aldrich). For intracellular staining, tumor cells were fixed for 10 min with a 2% paraformaldehyde solution (Sigma-Aldrich) and subsequently permeated with 0.2% saponin (Sigma-Aldrich) supplemented with 2% FBS. For each determination, 3×10^4 events were obtained in a FACSAria III cytometer (BD Biosciences), and the data were analyzed using FlowJo 10.

2.6 | mRNA expression

To analyze the mRNA expression of CD73 in CC cells, RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was obtained from 500 ng of RNA using a High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). CD73 expression was determined by end-point reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The G6PDH gene was used as an internal control. RT-PCR was performed in a volume of 25 μ l in accordance with the instructions of the manufacturer of Master Mix PCR (Promega), and the reactions were run in TC1000-G equipment (DLAB NT). The amplified RT-PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel (Invitrogen). The gel was stained with GelRed (Biotium), and a UV transilluminator (UVP Biodyne-H System) was used to visualize the amplified products. The following primers were used: CD73 sense, 5'GCACTATCTGGTTCACCGTGT'3 and CD73 anti-sense, 5'CCTTCCACACCATTAATTC'3; G6PDH sense, 5'GCTACGCTCGGATCTTGTTTC'3; and G6PDH antisense 5'CCCAGTGCTTTTCGCTCT'3.

2.7 | Quantification of TGF- β 1 and inhibition of TGF- β 1 activity

A Quantikine ELISA kit for human TGF- β 1 (R&D Systems, Inc.) was used to quantify the TGF- β 1 content in the supernatants of CC cell cultures. To neutralize the biological activity of TGF- β 1 produced in the cell cultures, anti-TGF- β 1, anti-TGF- β 2, and anti-TGF- β 3 neutralizing antibodies (anti-TGF- β , R&D) were added following the manufacturer's protocol.

2.8 | Enzymatic activity of CD73

To analyze the hydrolytic activity of CD73 in tumor cells cultured in monolayers or tumorspheres, 1×10^6 cells were cultured in the presence of 5 mM AMP in 100 μ l of Opti-MEM medium (Gibco) supplemented with 1% dialyzed FBS. The supernatant was collected after 4 h. The presence of Ado was detected by thin layer

chromatography (TLC) and ultraperformance liquid chromatography (UPLC) (UPLC Acquity, Waters). To analyze the samples by TLC, 1 μ l of each supernatant was spotted on plates covered with fluorescent silica gel (Sigma-Aldrich Co.). The samples were eluted for 1 h using a mobile phase composed of isobutanol:isoamyl alcohol:ethanol:ammonia:water (9:6:18:9:15), as previously reported,²⁷ and 5 mM AMP, Ado, and inosine (Ino) (Sigma-Aldrich) were used as standard controls. The compounds were visualized using a UV transilluminator (UVP Biodyne-H System). A UPLC system (UPLC Acquity, Waters) was used to quantify the amount of Ado generated in cell cultures in the presence of AMP. Quantitative analysis of samples using standard quantities of synthetic Ado was carried out with Empower 3 software (Waters), as previously reported.²⁷ Briefly, the mobile phase consisted of 0.5% acetonitrile, 5% methanol, and 94.5% sodium acetate buffer 0.25 M, pH 6.3. Supernatant samples were centrifuged at 13,000 rpm, filtered on Amicon membranes with a cutoff of 3000 Da, and subsequently diluted 1:200 with the mobile phase mixture. The run conditions were as follows: flow rate of 1.0 ml/min, UV detection at 254–260 nm, 2.0 min retention time, room temperature, and a LiChrospher 5- μ m RP-18e 100 Å (size 125 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m particle size) reversed-phase column. Ado was quantified by comparing the retention time of the sample with that of the synthetic Ado used as a standard.

2.9 | Statistical analysis

The numerical data are presented as the average value $\pm$ SEM of three independent experiments. Comparisons were evaluated with multivariate statistical analysis using GraphPad Prism version 7 (GraphPad Prism software). Differences were considered significant when $p < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Culturing CC cells as tumorspheres enriched the population with CSC-like characteristics

The tumorsphere formation assay uses a functional approach to analyze the self-renewal capacity of cells in the presence of subpopulations of CSC-like cells.²⁵ CaSki cells derived from an epidermoid carcinoma of the cervix were maintained under standard culture conditions, either as a monolayer/2D (CaSki-M) or in ultralow adhesion plates to form tumorspheres/3D (CaSki-T) (Figure 1A). After two consecutive reseeds (21 days of culture), the SFE of the tumor cells was analyzed. Interestingly, compared with that of CaSki-M cells, the SFE of CaSki-T cells increased significantly (Figure 1B). The CaSki-T cells formed through this culture system were compact and generally showed a size greater than 200 μ m (Supporting Information: Figure 1A,B). Transmission electron microscopy revealed a large number of intercellular focal adhesions (asterisks in Supporting Information: Figure 1C,D). Compared with CaSki-M cells, CaSki-T

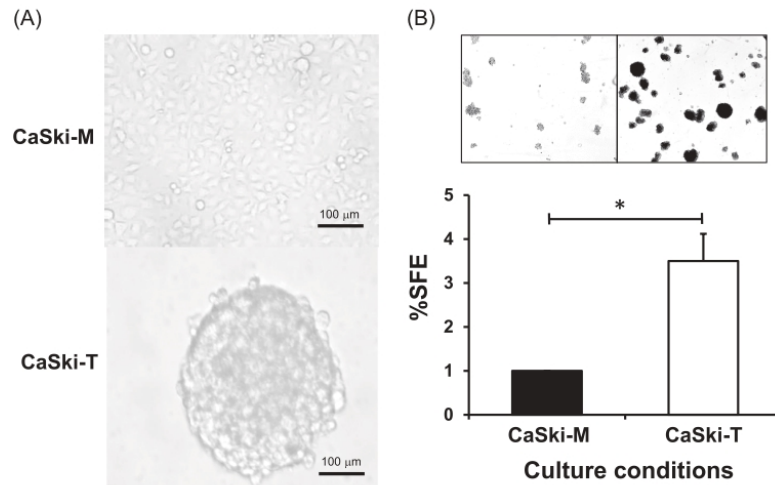


FIGURE 1 CaSki cells in monolayer cultures and as tumorspheres and their sphere formation efficiency. (A) Microphotographs ($\times 40$ magnification) of CaSki cells in a monolayer culture (CaSki-M) and as tumorspheres (CaSki-T). (B) Sphere formation efficiency (SFE) of the cells maintained in each culture condition and photographs of the cells after 21 days of culture in ultralow adhesion plates. Representative data from three independent experiments $\pm$ SEM. *Significant difference at $p < .01$.

cells exhibited greater expression of the stem cell markers CD49f, CK17 and P63, OCT4 and SOX2 (Figure 2A). In addition, a higher percentage of SP cells was present in CaSki-T cells than in CaSki-M cells, 0.46% and 0.18%, respectively. Verapamil treatment strongly reduced Hoechst efflux, reducing the percentage of SP cells among CaSki-T and CaSki-M cells to 0.093% and 0.070%, respectively (Figure 2B). These results suggest that CaSki cells cultured as tumorspheres increase the CSC-like characteristics of CaSki cells and, therefore, their self-renewal capacity.

3.2 | CC cells cultured as tumorspheres exhibited increased expression of CD73 and adenosinergic activity

The expression and activity of CD73 in tumor cells are influenced by conditions in the cellular microenvironment.³⁰ To determine whether CD73 expression was different in CaSki cells cultured in monolayers or as tumorspheres, CD73 expression in CaSki-M and CaSki-T cells was analyzed by flow cytometry. Compared with CaSki-M cells, CaSki-T cells exhibited increased levels of CD73 protein (Figure 3A) and mRNA (Figure 3B). This increase was associated with a greater capacity of CaSki-T cells to generate Ado from AMP hydrolysis (black arrows, Figure 3C upper). The Ado concentrations detected in CaSki-M and CaSki-T supernatants were 81.9 ± 6.5 and 121.23 ± 8.9 nM, respectively (Figure 3C down). However, the addition of APCP (selective inhibitor of CD73) in both cell cultures strongly decreased the ability of tumor cells to hydrolyze AMP. The Ado concentrations

detected in the presence of APCP were 19.6 ± 3.9 and 40.24 ± 5.9 nM, respectively (Figure 3C lower).

3.3 | CC cells cultured as tumorspheres produce high amounts of TGF- β 1

TGF- β 1 is an important factor in maintaining CD73 expression in CC tumor cells.²⁸ accordingly, TGF- β 1 levels were assessed in CaSki-M and CaSki-T cultures. The TGF- β 1 content in the culture supernatant of CaSki-T cells was significantly higher than that in the culture supernatant of CaSki-M cells (Figure 4A). To determine the influence of this factor on CD73 expression, a neutralizing anti-TGF- β antibody was added to the cells when culturing. Interestingly, a significant reduction in CD73 was observed in CaSki-M ($>25\%$) and CaSki-T ($>15\%$) cells (Figure 4B), suggesting that TGF- β 1 produced by CC cells helps maintain CD73 expression in an autocrine manner.

On the other hand, we have previously reported that CaSki cells downregulated CD73 expression by using a pSIREN vector containing a siRNA targeting CD73 (CaSki-pS-siRNA-CD73), which strongly reduced TGF- β production.²⁸ Therefore, we analyzed TGF- β 1 production by these cells when cultured as tumorspheres. Interestingly, compared with tumorspheres formed by CaSki cells transfected only with pSIREN vector (CaSki-pS-T), CaSki-pS/siRNA-CD73-T cells formed only noncompact cellular aggregates (Supporting Information: Figure 2A) and showed a reduced SFE percentage (Supporting Information: Figure 2B). In addition, we detected lower TGF- β 1 production in the culture supernatant of these cells than in

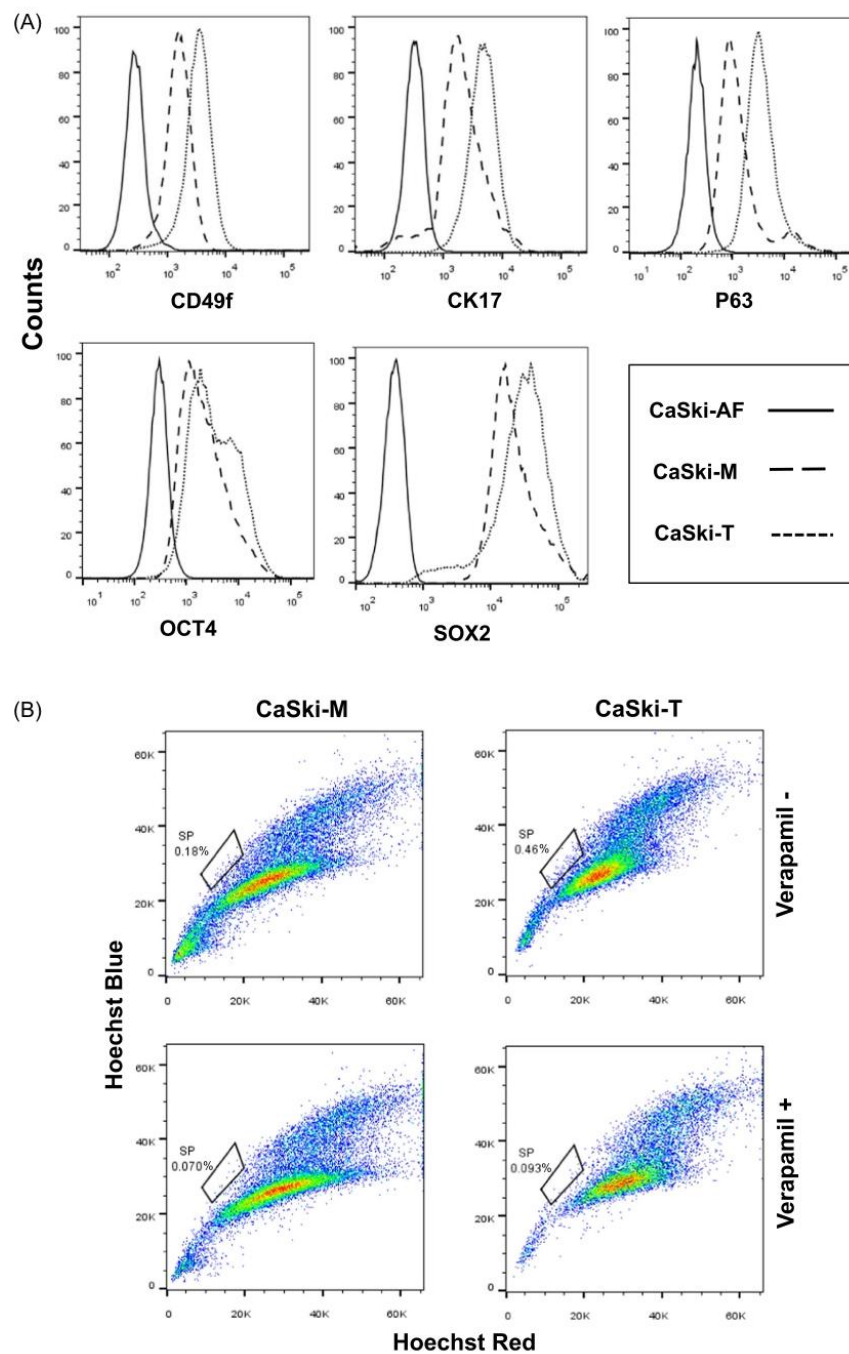


FIGURE 2 (See caption on next page)

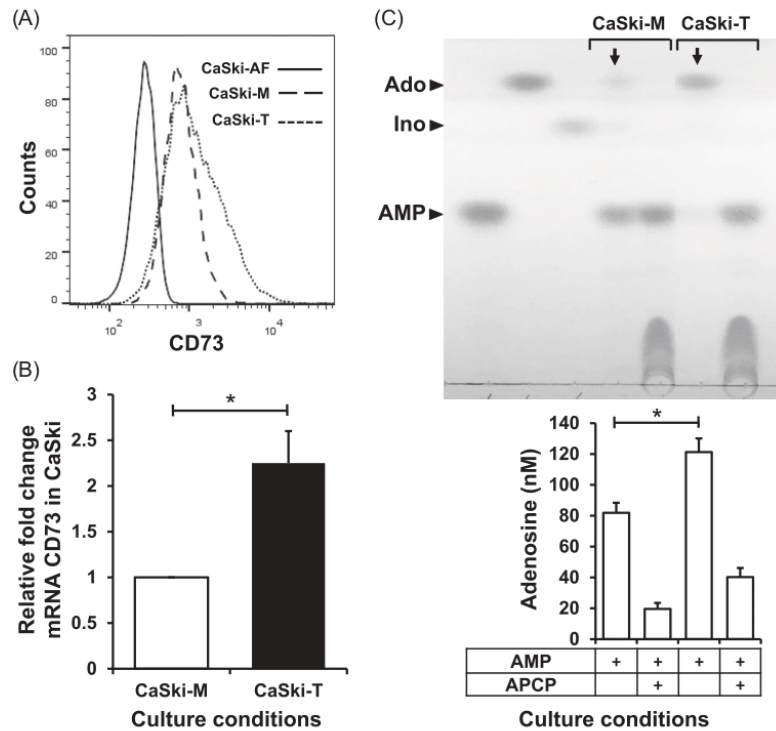


FIGURE 3 Expression and activity of CD73 in CaSki cells cultured in monolayers and as tumorspheres. Expression of CD73 protein (A) and CD73 mRNA (B) in CaSki cells cultured in monolayers (CaSki-M), which was normalized to 1, or as tumorspheres (CaSki-T). (C) The ability of CaSki-M and CaSki-T cells to generate Ado via AMP hydrolysis was analyzed by thin layer chromatography (TLC) (upper) and ultraperformance liquid chromatography (UPLC) using standard concentrations of synthetic Ado (lower). Representative data from 3 independent experiments $\pm$ SEM. CaSki-AF, CaSki autofluorescence. *Significant difference at $p < .01$.

the culture supernatant of CaSki-pS-T cells (Supporting Information: Figure 2C).

3.4 | TGF- β favors a protumor phenotype in CC cells cultured as tumorspheres

TGF- β plays an important role in the plasticity of tumor cells, including the regulation of EMT and the induction of protumoral mechanisms such as evasion of the immune response, migration, invasion, and chemoresistance, among others.^{31,32} Therefore, to determine whether this factor, produced in greater quantities by

CaSki-T cells than CaSki-M cells, was important for maintaining the protumoral phenotype, the expression levels of E-cadherin, vimentin, MHC-I, MRP-1, Snail-1, and Twist were analyzed in CaSki cells maintained in both culture conditions.

Compared with CaSki-M cells, CaSki-T cells exhibited a significant increase in the expression levels of proteins related to the EMT state, such as vimentin, Snail, and Twist, and a reduced expression level of N-cadherin (Figure 5A). In addition, compared with CaSki-M cells, CaSki-T cells exhibited a significant decrease in the expression of MHC-I molecules and increased expression of MRP-1 (Figure 5B). Interestingly, the addition of neutralizing anti-TGF- β antibody to the tumorsphere cultures significantly modified the expression of the

FIGURE 2 Stem markers and side populations among CaSki cells cultured in monolayers and as tumorspheres. (A) The expression of stem cell markers (CD49f, CK17 and P63, OCT4, and SOX2) in CaSki cells cultured in monolayers (CaSki-M) and as tumorspheres (CaSki-T) is shown. CaSki-AF, autofluorescence of CaSki cells. Representative results from three independent trials. (B) CaSki-M or CaSki-T cells were stained with Hoechst 33342 and analyzed by flow cytometry to assess side population (SP) cells, a subpopulation with a high dye exclusion capacity. Plots of total cells and cells stained with Hoechst 33342 are shown; the SP cells are grouped in a quadrangle. Verapamil was used to block Hoechst efflux from SP cells. Representative results from three independent trials are shown.

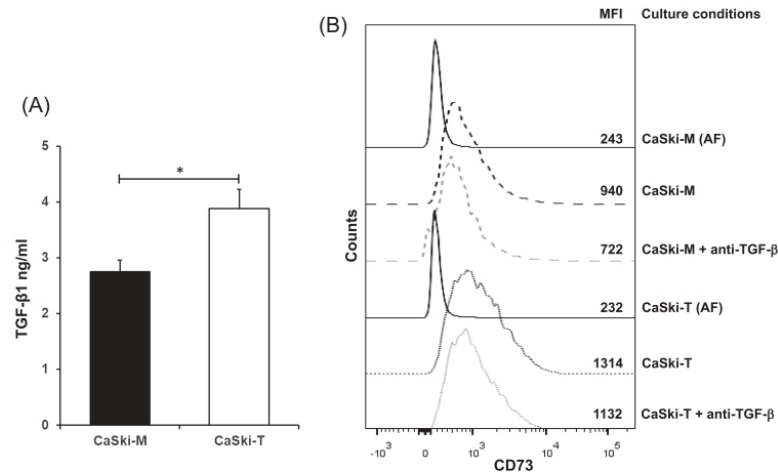


FIGURE 4 Transforming growth factor-beta (TGF-β1) produced by CaSki cells cultured in monolayers and as tumorspheres and their CD73 expression. (A) The contents of TGF-β1 in the culture supernatants of CaSki cells cultured in monolayers (CaSki-M) or as tumorspheres (CaSki-T). (B) CD73 expression in CaSki-M and CaSki-T cells cultured in the presence or absence of a neutralizing anti-TGF-β antibody. Representative data from three independent experiments ±SEM. *Significant difference at $p < .05$. AF, autofluorescence; MFI, mean fluorescence intensity.

protumoral markers, decreasing vimentin, Snail, Twist, and MRP-1 expression and increasing E-cadherin and MHC-I expression to levels comparable to those observed in CaSki-M cells (Figure 5A,B). Moreover, compared with CaSki-T cells, we also observed that CaSki-pS/siRNA-CD73-T cells strongly modified the levels of proteins related to the EMT state, decreasing vimentin, Snail, and Twist and increasing E-cadherin (Supporting Information: Figure 3). These results suggest that TGF-β1 produced in the micro-environment of tumorspheres is important in the induction of protumoral characteristics in CaSki-T cells.

4 | DISCUSSION

The role of TGF-β1 in the progression and metastasis of various types of cancer, including prostate, breast, colorectal, liver, and CCs, is well known.^{33–35} For CC, TGF-β1 has been suggested to play a dual role during disease development, either as an anti-oncogenic factor in precancerous cervical lesions or as a promoter in advanced stages.^{36,37} In fact, the presence of TGF-β1 in the tissue and plasma of patients with CC is positively correlated with the expression of HR-HPV oncogenes³⁸ and with the degree of disease progression.^{39–42} However, the molecular mechanisms by which the production of TGF-β1 promotes tumorigenesis in CC have not been completely elucidated. A growing body of evidence supports the protumorigenic role of CD73 and Ado signaling in solid tumors.⁶ In this context, we provided evidence that CC cell lines positive for HPV-AR infection, mainly CaSki cells, express significantly higher levels of CD73 on the membrane than cells negative for HPV infection, which is associated with a greater ability to generate Ado

and to inhibit the proliferation, activation, and effector function of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) through interactions with its A2AR.²⁷ In addition, we also reported that Ado signaling through A2AR and A2BR in CC tumor cells plays an important role in the induction of TGF-β1 secretion and expression. Likewise, we demonstrate that TGF-β1 produced through this pathway maintains CD73 expression in CC tumor cells.²⁹ Therefore, in this study, we analyzed the participation of TGF-β1 in CD73 expression and in the development of protumoral characteristics in CC CaSki cells cultured as tumorspheres (CaSki-T) and in monolayers (CaSki-M). CaSki cell tumorspheres are compact structures formed by cells joined together by focal adhesions. The expression of CD73 and the capacity to generate Ado were significantly higher in CaSki-T cells than in CaSki-M cells. As reported in previous studies,^{43–45} CaSki-T cells were enriched in CSC-like characteristics due to increases in the expression of stem cell markers (CD49f, CK17 and P63, OCT4 and SOX2), greater SFE, and an increase in the percentage of PS cells. CaSki-T cells also produced higher amounts of TGF-β1 than CaSki-M cells and exhibited a markedly protumoral phenotype characterized by a significant increase in the expression levels of proteins related to the EMT state, such as vimentin, Snail, and Twist, and a reduced expression level of N-cadherin. In addition, CaSki-T cells exhibited a significant decrease in the expression of MHC-I molecules and increased expression of MRP-1. Interestingly, these phenotypes were reversed when a neutralizing anti-TGF-β antibody was added to the tumorsphere cultures, decreasing vimentin, Snail, Twist, and MRP-1 expression and increasing E-cadherin and MHC-I expression to levels comparable to those observed in CaSki-M cells. These results suggest that the three-dimensional microenvironment generated in tumorspheres is important for maintaining the expression of CD73 and

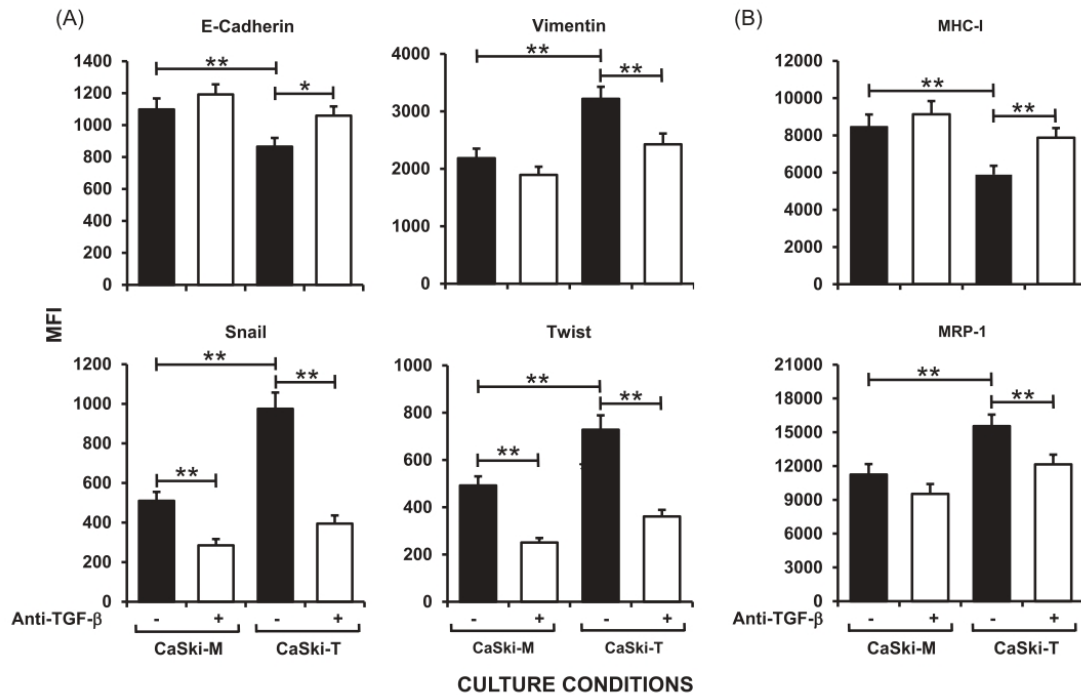


FIGURE 5 Anti-TGF- β reverses the protumor phenotype in CaSki cells cultured as tumorspheres. Cultures of CaSki cells in monolayers (CaSki-M) or as tumorspheres (CaSki-T) were maintained for 14 days in the presence or absence of neutralizing anti-TGF- β antibody. (A) Expression levels of proteins related to the EMT state: E-cadherin, vimentin, Snail, and Twist. (B) Protein expression levels of MHC-I and MRP-1. Representative data from 3 independent experiments $\pm$ SEM. ***Significant differences at $p < .05$ and $p < .01$, respectively. EMT, epithelial-mesenchymal transition; MHC-I, major histocompatibility complex class-I; MRP-1, multidrug resistance protein-1; TGF- β 1, transforming growth factor-beta 1.

potentially the production of immunosuppressive factors such as TGF- β 1 to favor a protumor phenotype in CaSki cells. In fact, the transcriptional activation of CD73 within the TME is primarily influenced by hypoxic conditions mediated by the activation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)⁴⁶ and the presence of immunosuppressive factors, such as TGF- β 1, that can stabilize HIF-1 α .⁴⁷

A large number of studies conducted with different types of cancer have shown that the biological activity of CD73 is closely related to stem cell promotion and the expression of genes associated with EMT,^{19,20} metastasis,^{48,49} evasion of the immune response,⁶ and tumor escape.^{50,51} However, unlike that in most solid cancer types, CD73 expression in cervical tumors, as well as tumors of the genitourinary system such as ovarian serous cystadenocarcinoma (OV), testicular germ cell tumors (TGCT), uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC), uterine carcinosarcoma (UCS), bladder urothelial carcinoma (BLCA), kidney chromophobe (KICH), and prostate adenocarcinoma (PRAD), is decreased compared to normal tissues, probably due to the common embryological origin (the intermediate mesoderm) of the reproductive and urinary systems.^{4,6} Nevertheless, we have observed that independent of the HPV

genotype, cell lines derived from CC tumors can exhibit different CD73 expression levels and Ado generation capabilities.²⁷ Additionally, differences in cellular phenotypes have been reported, probably due to the microenvironment of origin; for instance, SiHa and HeLa cell lines show a mesenchymal-like phenotype, while CaSki cells, which were obtained from omentum metastases, exhibit an epithelial phenotype.⁵² In addition, CD73 function can differ in the same cell type from different tissues and within tumors, and the tumor cells themselves can differ in relation to CD73 expression compared to adjacent stromal cells. The expression and activity of CD73 may also diverge depending on the stage of tumor development and different factors in the microenvironment leading to tumor progression.^{4,6}

On the other hand, in nonadherent and serum-free conditions, the in vitro tumorsphere formation assay has been considered a functional method to produce tumor cultures enriched in subpopulations of CSC-like cells and a microenvironment where cell behavior can be studied under different experimental conditions.^{21–25} However, a recent in silico analysis carried out by Iser et al.⁴³ related to CD73 expression on cells derived from CSC-enriched tumorspheres using microarray gene expression profiles of 7 GSE datasets from the

Expression Omnibus Database (GEO) reported that protocols for CSC induction or isolation, as well as the maintenance conditions or exposure to treatments, presented significant differences among the studies analyzed. In addition, similar to their results obtained from SiHa cells, they reported that in human primary cervical cells isolated from healthy tissue, the human anaplastic thyroid cancer cell line (THJ-11 T cells),⁵³ and breast cancer cell lines from human primary tumors,⁵⁴ a decrease in the CD73 expression of CSC-enriched tumorspheres compared to monolayer cells was evident. In contrast, the CaSki CC cell line⁵⁵ and human prostate cancer stem cell (PCSC)⁵⁶ primary lines showed enhanced CD73 expression in spheres compared to monolayers, while in a cell line derived from human primary HPV-negative pharyngeal squamous tumor cells⁵⁷ and primary cells from human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC),⁵⁸ no significant differences were observed between spheres and monolayers. However, in accordance with the study by Bajaj et al.,⁵⁵ we also found enhanced CD73 expression in CaSki tumorspheres compared to monolayers; however, we detected a significant increase in TGF- β 1 production in spheres than in monolayer cell cultures, which was associated with an increased expression level of proteins related to the EMT state in these cells, such as vimentin, Snail, and Twist, and a reduced expression level of N-cadherin. Interestingly, this phenomenon was reversed when neutralizing anti-TGF- β 1 was added to cell cultures, and when CaSki cells with downregulated CD73 expression were cultured as tumorspheres, lower TGF- β 1 production was detected in the culture supernatant, which was associated with decreased levels of vimentin, Snail, and Twist and an increased level of E-cadherin in these cells, indicating the importance of CD73 expression and increased TGF- β 1 production to promote the protumoral characteristics of CaSki cells when cultured as tumorspheres.

Similar results were obtained in tumorspheres formed by ovarian cancer cells, where high expression of CD73 and increased expression of transcription factors related to EMT, such as Snail-1, Snail-2, and Twist-2, were observed when compared with those in epithelial cells of the Fallopian tube.²⁰ In addition, deregulation of the CD73 gene resulted in the low expression of key EMT genes, such as Snail-1, Twist-2, and Zeb-1, and a decrease in the mesenchymal phenotype of tumor cells, allowing a decrease in N-cadherin and vimentin and an increase in E-cadherin.²⁰ In our study, the increase in protumoral characteristics observed in CaSki-T cells was largely dependent on the autocrine production of TGF- β 1 because inhibition of this factor in cell cultures strongly reversed the manifestation of these characteristics in tumor cells. Indeed, TGF- β signaling is a key event contributing to the invasion and dissemination of tumor cells because of the induction of genes associated with EMT (Snail-1, Snail-2, Zeb-1/2, and Twist) and transcriptional repression of E-cadherin.⁵⁹ In CaSki-T cells, a significant increase in the expression of vimentin and the transcription factors Snail-1 and Twist was noted, which was significantly higher in CaSki-T cells than in CaSki-M cells. Snail-1 expression is correlated with the degree of tumor evolution, lymph node metastasis in various types of tumors, and a poor prognosis for patients with metastatic cancer. Recent studies indicate

that Snail-1 causes metabolic reprogramming, induces CSC-like traits in tumor cells, and promotes drug resistance, tumor recurrence, and metastasis.⁶⁰ Therefore, the increase in protumoral characteristics observed in CaSki-T cells may be related to Snail-1 overexpression resulting from the culture conditions. Therefore, in subsequent studies, analyzing whether high CD73 expression and the promotion of protumoral characteristics, such as overexpression of proteins related to EMT associated with high TGF- β 1 production, occur in other CC cell lines cultured as tumorspheres will be interesting.

In the context of tumor development and progression, at least two important functions of CD73 have been described: (a) the catalytic activity of this enzyme to generate Ado from AMP hydrolysis and (b) the ability of CD73 to promote adhesion and modulate cell migration. Accordingly, the low CD73 expression found in CC spheres has been hypothesized to be related to tumor progression, leading to tumor migration and invasiveness.⁴³ Interestingly, our results provide evidence that high CD73 expression in CC spheres, which is related to high TGF- β 1 production, also results in the promotion of protumoral characteristics related to tumor progression, such as migration and invasiveness, immune evasion, immunosuppression, and chemoresistance, suggesting that both functions of CD73 can be relevant in CC progression.

In a comprehensive molecular study of CC, the *TGFBR2* gene, which is present exclusively in cervical squamous tumors, was reported to be significantly mutated in more than 70% of the tumors analyzed,⁶¹ illustrating the clinical importance of this route as a therapeutic target. In agreement with the present study, the alterations reported in the TGF- β signaling pathway in CC⁶¹ can contribute significantly to the activity of the adenosinergic pathway and therefore promote tumorigenesis in the CC TME.

5 | CONCLUSION

This study provided evidence that high CD73 expression associated with high TGF- β 1 production by CC cells cultured as tumorspheres strongly contributes to the induction of protumoral characteristics related to tumor progression, such as migration and invasiveness, immune evasion, immunosuppression, and chemoresistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Rosario García-Rocha and **Montserrat Carrera-Martínez**: Investigation, methodology, writing – original draft. **Katia Alhelí Monroy-Mora**, **María de los Ángeles Ponce-Chavero**, **María Luisa Escobar-Sánchez**, and **Gabriela Molina Castillo**: Investigation, methodology. **Christian Azucena Don-López**, **Juan José Montesinos-Montesinos**, **Benny Weiss-Steider**, and **Jorge Hernández-Montes**: Supervision, visualization. **Rommel Chacón-Salinas**, **Luis Vallejo-Castillo**, and **Sonia Mayra Pérez-Tapia**: Resources, validation. **María de Lourdes Mora-García** and **Alberto Monroy-García**: Conceptualization, Funding acquisition, writing – review and editing. All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important

content, and all authors approved the final version to be submitted for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was performed with the following funds: DGAPA-PAPIIT Grant No: IN225519 to MLMG; and the Mexican Social Security Institute (Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)) Grant No.: FIS/IMSS/PROT/PRIO/19/114 (R-2018-3602-015) to AMG. We also thank MSc. Jessica Lakshmi Prieto Chávez from the Flow Cytometry Instrument Center of IMSS for support with the flow cytometry analysis. Finally, the authors thank the "Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) para Fermoquímicos y Biotecnológicos (LANSEIDiFarBiotec-CONACYT)" for facilitating the use of the UPLC system.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data displayed in this publication, including Supporting Information, are available from the corresponding author upon request.

ORCID

Rosario García-Rocha  <http://orcid.org/0000-0003-1789-4832>
 Alberto Monroy-García  <http://orcid.org/0000-0002-9733-9013>
 Jorge Hernández-Montes  <http://orcid.org/0000-0003-0825-928X>
 Christian Azucena Don-López  <http://orcid.org/0000-0001-5857-3440>
 Benny Weiss-Steider  <http://orcid.org/0000-0003-4893-530X>
 Juan José Montesinos-Montesinos  <http://orcid.org/0000-0002-1042-3205>
 Gabriela Molina Castillo  <http://orcid.org/0000-0001-5699-8920>
 Rommel Chacón-Salinas  <http://orcid.org/0000-0002-4500-0253>
 Luis Vallejo-Castillo  <http://orcid.org/0000-0002-9532-3472>
 Sonia Mayra Pérez-Tapia  <http://orcid.org/0000-0002-2818-8522>
 María de Lourdes Mora-García  <http://orcid.org/0000-0001-7989-0162>

REFERENCES

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382(9895):889-899. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7
- Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res*. 2017;231:21-33. doi:10.1016/j.virusres.2016.11.023
- Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(10):611-629. doi:10.1038/s41571-020-0382-2
- Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*. 2012;72(21):5441-5447. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1600
- Yang H, Yao F, Davis PF, Tan ST, Hall SRR. CD73, tumor plasticity and immune evasion in solid cancers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):177. doi:10.3390/cancers13020177
- Antonoli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Hasko G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer*. 2016;2(2):95-109. doi:10.1016/j.trecan.2016.01.003
- Bahreyni A, Samani SS, Ghorbani E, et al. Adenosine: an endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2715-2722. doi:10.1002/jcp.26056
- Robson SC, Seigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006;2(2):409-430. doi:10.1007/s11302-006-9003-5
- Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):437-502. doi:10.1007/s11302-012-9309-4
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;112(2):358-404. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 53(4), 527-552. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734617>
- Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:775-787. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.775
- Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, Lenz G, Batista LFZ. Tumor propagating cells: drivers of tumor plasticity, heterogeneity, and recurrence. *Oncogene*. 2020;39(10):2055-2068. doi:10.1038/s41388-019-1128-4
- Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(10):611-629. doi:10.1038/nrclinonc.2017.44
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29(34):4741-4751. doi:10.1038/ncr.2010.215
- Aiello NM, Maddipati R, Norgard RJ, et al. EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. *Dev Cell*. 2018;45(6):681-695. doi:10.1016/j.devcel.2018.05.027
- Ma XL, Hu B, Tang WG, et al. CD73 sustained cancer-stem-cell traits by promoting SOX9 expression and stability in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):11. doi:10.1186/s13045-020-0845-z
- Lupia M, Angiolini F, Bertalot G, et al. CD73 regulates stemness and epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer-initiating cells. *Stem Cell Reports*. 2018;10(4):1412-1425. doi:10.1016/j.stemcr.2018.02.009
- Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, et al. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *Int J Oncol*. 2016;48(2):657-669. doi:10.3892/ijo.2015.3299
- Song L, Ye W, Cui Y, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a biomarker for clear cell renal carcinoma stem-like cells. *Oncotarget*. 2017;8(19):31977-31992. doi:10.18632/oncotarget.16667
- Yu J, Liao X, Li L, et al. A preliminary study of the role of extracellular 5'-nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*. 2017;53(2):132-140. doi:10.1007/s11626-016-0089-y
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111. doi:10.1038/35102167

25. Zhang J, Zhang Y, Cheng L, et al. (2018). Enrichment and characterization of cancer stem-like cells in ultra-low concentration of serum and non-adhesive culture system. *Am J Transl Res*, 10(5), 1552-1561. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29887968>
26. Ma XL, Shen MN, Hu B, et al. CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110beta and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):37. doi:10.1186/s13045-019-0724
27. Mora-Garcia ML, Avila-Ibarra LR, Garcia-Rocha R, et al. Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cell Immunol*. 2017;320:46-55. doi:10.1016/j.cellimm.2017.09.002
28. Garcia-Rocha R, Monroy-Garcia A, Hernandez-Montes J, et al. Cervical cancer cells produce TGF-beta1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF-beta1. *Cytokine*. 2019;118:71-79. doi:10.1016/j.cyt.2018.09.018
29. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183(4):1797-1806. doi:10.1084/jem.183.4.1797
30. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*. 2017;276(1):121-144. doi:10.1111/immr.12528
31. Papageorgis P. TGFbeta signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. *J Oncol*. 2015;2015:587193. doi:10.1155/2015/587193
32. Zhao Y, Ma J, Fan Y, et al. TGF-beta transactivates EGFR and facilitates breast cancer migration and invasion through canonical Smad3 and ERK/Sp1 signaling pathways. *Mol Oncol*. 2018;12(3):305-321. doi:10.1002/1878-0261.12162
33. Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*. 2009;19(1):89-102. doi:10.1038/cr.2008.316
34. Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):49-59. doi:10.1016/j.cytogr.2009.11.008
35. Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M. Intracellular and extracellular TGF-beta signaling in cancer: some recent topics. *Front Med*. 2018;12(4):387-411. doi:10.1007/s11684-018-0646-8
36. Zhu H, Luo H, Shen Z, Hu X, Sun L, Zhu X. Transforming growth factor-beta1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer. *Tumour Biol*. 2016;37(6):7075-7083. doi:10.1007/s13277-016-5028-8
37. Principe DR, Doll JA, Bauer J, et al. TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(2):369. doi:10.1093/jnci/djt369
38. Iancu IV, Botezatu A, Goia-Rusanu CD, et al. TGF-beta signalling pathway factors in HPV-induced cervical lesions. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2010;69(3):113-118. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21434587>
39. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18 Pt 1):5262-5270. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1157
40. Comerçi JT Jr., Runowicz CD, Flanders KC, et al. Altered expression of transforming growth factor-beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer*. 1996;77(6):1107-1114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635131>
41. Daniel CW, Robinson SD. Regulation of mammary growth and function by TGF-beta. *Mol Reprod Dev*. 1992;32(2):145-151. doi:10.1002/mrd.1080320210
42. Wu HS, Li YF, Chou CI, Yuan CC, Hung MW, Tsai LC. The concentration of serum transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) is decreased in cervical carcinoma patients. *Cancer Invest*. 2002;20(1):55-59. doi:10.1081/cnv-120000366
43. Iser IC, de Andrade Mello P, Davies S, et al. A three-dimensional microenvironment alters CD73 expression in cervical cancer. *Cell Biochem Funct*. 2021;39(6):780-790. doi:10.1002/cbf.3649
44. Bajaj J, Maliekal TT, Vivien E, et al. Notch signaling in CD66+ cells drives the progression of human cervical cancers. *Cancer Res*. 2011;71(14):4888-4897. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0543
45. Lopez J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, Perez-Plasencia C, Garcia-Carranca A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*. 2012;12:48. doi:10.1186/1471-2407-12-48-7
46. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*. 2002;110(7):993-1002. doi:10.1172/JCI15337
47. McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, Richard DE, Dubois CM. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24171-24181. doi:10.1074/jbc.M604507200
48. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1547-1552. doi:10.1073/pnas.0908801107
49. Zhang B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncotarget*. 2012;1(1):67-70. doi:10.4161/onc.1.1.18068
50. Ujhazy P, Berleth ES, Pietkiewicz JM, et al. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer*. 1996;68(4):493-500. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19961115)68:4<493::AID-IJC15%3E3.0.CO;2-6
51. Nguyen AM, Zhou J, Sicairos B, Sonney S, Du Y. Upregulation of CD73 confers acquired radioresistance and is required for maintaining irradiation-selected pancreatic cancer cells in a mesenchymal state. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(2):375-389. doi:10.1074/mcp.RA119.001779
52. Rosendo-Chalma P, Antonio-Vejar V, Bigoni-Ordóñez GD, Patiño-Morales CC, Cano-García A, García-Carranca A. CDH1 and SNAI1 are upregulated by E7 from human papillomavirus types 16 and 18. *Int J Oncol*. 2020;57(1):301-313. doi:10.3892/ijo.2020.5039
53. Reeb AN, Lin RY. Microarray analysis identifies a unique molecular signature of human thyroid cancer stem cells. *J Thyroid Disord Ther*. 2014;4(2):1-5. doi:10.4172/2167-7948.1000179
54. Lehmann C, Jobs G, Thomas M, Burtcher H, Kubbies M. Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol*. 2012. 41(6). 1932-1942. doi:10.3892/ijo.2012.1654
55. Bajaj J, Maliekal TT, Vivien E, et al. Notch signaling in CD66+ cells drives the progression of human cervical cancers. *Cancer Res*. 2011;71(14):4888-4897. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0543
56. Maria Ana Duhagon MA, Hurt EM, Sotelo-Silveira JR, Zhang X, Farrar WL. Genomic profiling of tumor initiating prostatespheres. *BMC Genomics*. 2010;11:324. doi:10.1186/1471-2164-11-324
57. Ihler F, Gratz R, Wolff HA, et al. Epithelial-mesenchymal transition during metastasis of HPV-negative pharyngeal squamous cell carcinoma. *BioMed Res Int*. 2018;2018:7929104. doi:10.1155/2018/7929104
58. Van den Broeck A, Gremeaux L, Topal B, Vankelecom H. Human pancreatic adenocarcinoma contains a side population resistant to gemcitabine. *BMC Cancer*. 2012;12:354. doi:10.1186/1471-2407-12-354
59. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2767. doi:10.3390/ijms20112767

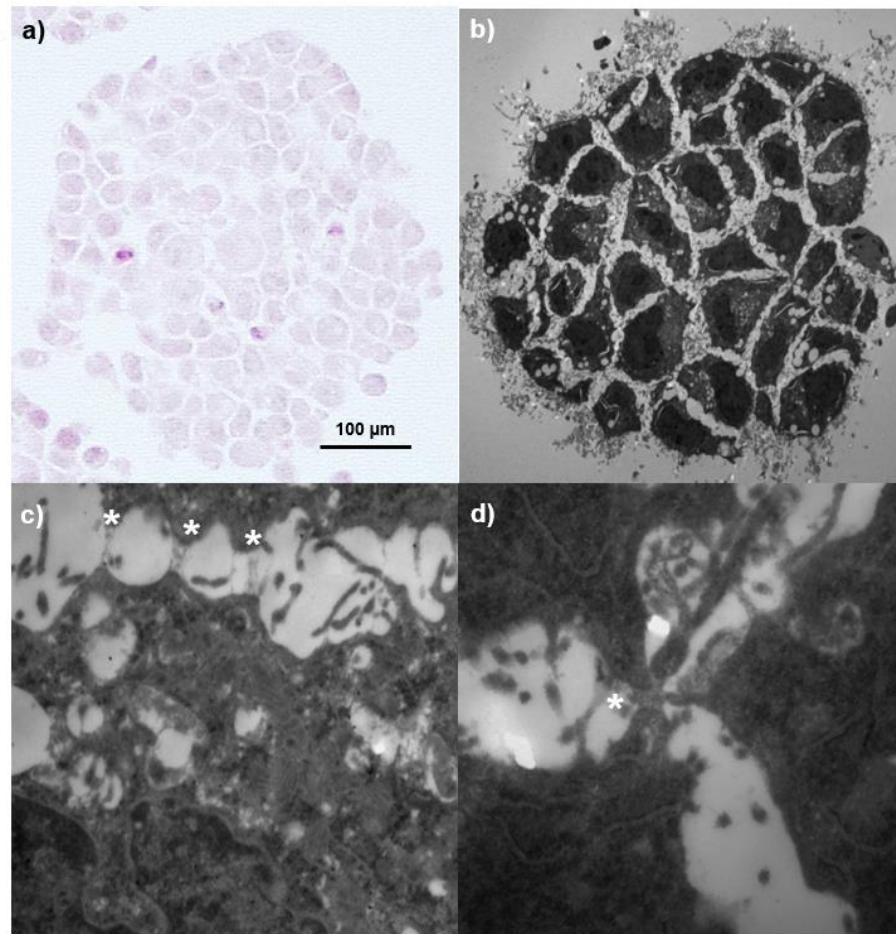
60. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The role of Snail in EMT and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;13(9):963-972. doi:10.2174/15680096113136660102
61. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 2017;543(7645):378-384. doi:10.1038/nature21386

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

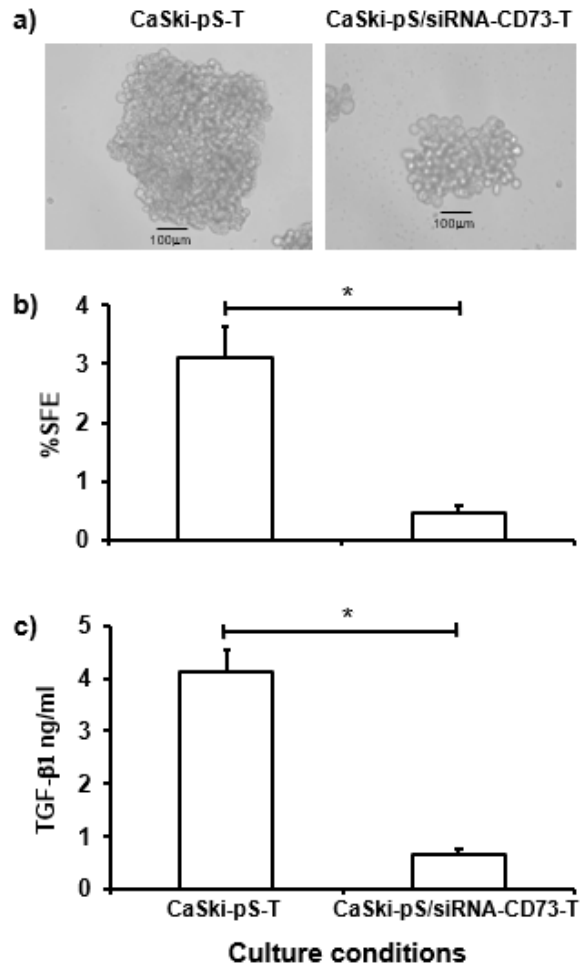
How to cite this article: García-Rocha R, Monroy-García A, Carrera-Martínez M, et al. Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production. *Cell Biochem Funct* 2022;1-13. doi:10.1002/cbf.3742

Supplementary
Figure 1



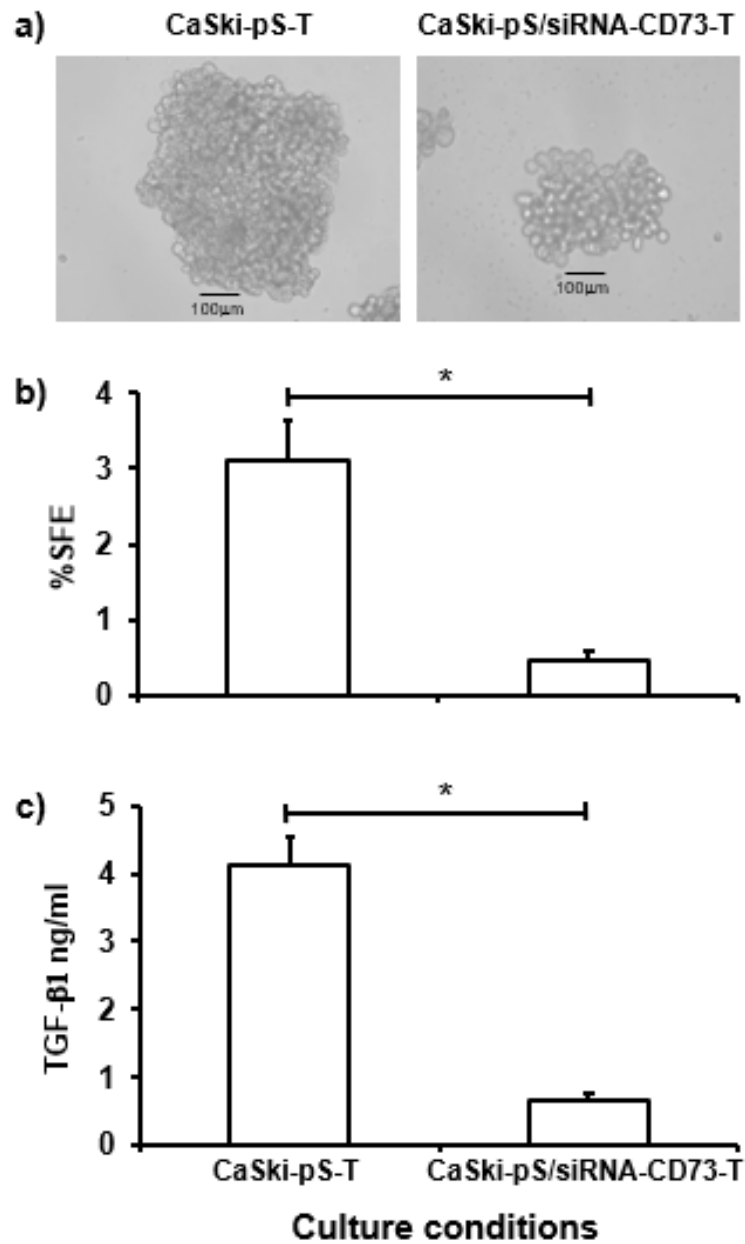
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Structure of CaSki cell tumorspheres. Tumorspheres formed by CaSki cells in ultralow adherence cultures for 21 days were fixed and processed for microscopic analysis. a) The structure of a tumorsphere stained with H-E and observed under an optical microscope at 40 $\times$ magnification. Cross section of a tumorsphere observed using a transmission electron microscope at 2,000 $\times$ (b), 30,000 $\times$ (c), and 50,000 $\times$ (d). Focal intercellular adhesions are indicated with asterisks (*).

Supplementary
Figure 2



SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Characteristics of CaSki cells inhibited in CD73 when cultured as tumorspheres. a) Microphotographs (40× magnification) of CaSki cells transfected with pSIREN vector and pSIREN containing an siRNA targeting CD73 cultured as tumorspheres, CaSki-pS-T, and CaSki-pS/siRNA-CD73-T. b) Percentage of sphere formation efficiency (SFE) of the cells derived from CaSki-pS-T and CaSki-pS/siRNA-CD73-T cells. c) TGF-β1 contents in the supernatants of CaSki-pS-T and CaSki-pS/siRNA-CD73-T cells. Representative data from 3 independent experiments ± SEM. * Significant difference at $p < 0.001$.

Supplementary
Figure 2



SUPPLEMENTARY FIGURE 3. CaSki cells with CD73 inhibition modify the expression levels of proteins related to the EMT state. The expression levels of E-cadherin, vimentin, Snail, and Twist in CaSki-T, CaSki-pS-T, and CaSki-pS/siRNA-CD73-T cells are shown. AF, autofluorescence. 2° Ab, cells stained with secondary antibody.