



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Evaluación de la actividad adenosinérgica
en la línea celular HCT 116 de
Cáncer Colorrectal (CCR).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO
P R E S E N T A:
Brandon Alfonso Martínez López

JURADO DEL EXAMEN

DIRECTORA: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
ASESORA: DRA. ROSARIO GARCÍA ROCHA
SINODAL: DR. JORGE MONTES HERNÁNDEZ
SINODAL: DRA. CHRISTIAN AZUCENA DON LÓPEZ

Ciudad de México, Junio, 2024.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en colaboración entre el Laboratorio Inmunobiología de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, y el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

La investigación se llevó a cabo gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Clave IN211822; y del Instituto Mexicano del Seguro Social No: R-2023-3602-011.

También se agradece a la cDra. Jessica Lakshmi Prieto Chávez del Centro de Instrumentos de Citometría de Flujo del CMN SXXI, IMSS por su apoyo en la adquisición de muestras.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, pareja y amigos, cuyo amor, apoyo y sacrificio han sido la base de todo mi éxito académico.

*Quiero dedicar un profundo agradecimiento a mi padre, **Alfonso Martínez Salmerón**, cuyo apoyo incondicional ha sido una fuerza motriz fundamental en la culminación de esta tesis.*

Desde el principio de este arduo proceso, tu presencia alentadora y tu sabio consejo han sido pilares sobre los cuales he construido mi camino hacia el éxito académico. Tu ejemplo de trabajo arduo, perseverancia y dedicación ha sido una inspiración constante para mí a lo largo de esta travesía.

Papá, gracias por ser mi guía y mi mentor en esta travesía académica. Tu apoyo incondicional ha sido un regalo que nunca subestimaré, y estoy eternamente agradecido por todo lo que has hecho por mí.

*También quiero dedicar un profundo agradecimiento a mi madre, **María Guadalupe López Coronel**, por su apoyo inquebrantable a lo largo de todo este proceso de investigación y redacción de mi tesis.*

Desde el inicio de este viaje académico, has estado a mi lado, brindándome tu amor, aliento y sabiduría. Tu presencia constante y tu confianza en mí han sido el motor que me impulsó a seguir adelante incluso en los momentos más desafiantes.

Tu paciencia infinita, tus palabras de ánimo y tu sacrificio para ayudarme en cada paso del camino no tienen precio. Tu dedicación y tu inquebrantable fe en mi capacidad han sido un faro de luz en los momentos de duda y desaliento.

Cada logro alcanzado en esta tesis lleva impreso tu amor y tu guía materna. Tu apoyo ha sido fundamental para mi éxito, y no podría haber llegado hasta aquí sin ti a mi lado.

Gracias, mamá, por ser mi roca, mi confidente y mi mayor defensora. Tu amor incondicional y tu apoyo inquebrantable son tesoros que atesoraré por siempre.

A ambos les agradezco infinitamente por su inquebrantable aliento y su constante sacrificio para brindarme las mejores oportunidades. Su amor incondicional y su confianza en mí han sido mi mayor inspiración y motivación para alcanzar mis metas.

*A mis hermanos, **Thania Lizbeth** y **Catherinne Itzel**, les agradezco por su complicidad, por estar siempre a mi lado y por comprender los sacrificios que a veces implicaba mi dedicación a este proyecto. Su apoyo incondicional ha sido fundamental en cada paso de este camino.*

*A mis abuelos, **Raúl López** y **Margarita Coronel**, les agradezco por su sabiduría, sus bendiciones y su eterno cariño. Sus consejos y enseñanzas han sido una guía invaluable en mi vida, y su orgullo por mis logros ha sido una fuente constante de inspiración.*

Quiero dedicar un especial y emotivo agradecimiento a mi querida tía **Imelda López (Meli)**, quien, aunque ya no está físicamente entre nosotros, sigue siendo una inspiración eterna en mi vida y en este trabajo, si no fuera por ella, jamás hubiera entrado a esta carrera

A lo largo de los años, siempre me alentó a perseguir mis sueños y a nunca renunciar a mis metas. Su bondad, su sabiduría y su amor incondicional dejaron una huella imborrable en mi corazón y en mi camino hacia la realización personal y académica, su espíritu vive en cada logro que alcanzo. Su memoria me impulsa a esforzarme aún más, a superar obstáculos y a perseguir la excelencia con determinación y pasión.

De igual forma, quisiera expresar mi profundo agradecimiento a mis amigos de la carrera de biología: **Nayeli R, Jonathan S, Xhail L, Cesar M, Fanny G, Karime C y Mauricio G**, con quienes me divertí y viví grandes momentos de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio **Cesar M, Ana L, Santiago BETANCOURT** y a mi mejorcísimo mejor amigo el **M en C. Luis Antonio (Toño)**, por hacer que mi estadía en el laboratorio fuese de las mejores experiencias de mi vida.

Agradezco especialmente a mi novio **Ricardo Canchola** por su inquebrantable apoyo emocional y por estar siempre dispuesto escucharme y animarme en los momentos más difíciles, desde desveladas hasta los momentos más alegres de mi vida, tu amor y tu compañía han sido el pilar más importante durante este proceso de titulación, tu presencia ha hecho que este viaje académico sea mucho más llevadero y significativo. Te amo.

Asimismo, deseo expresar mi gratitud a mi profesora, la **Dra. María De Lourdes Mora** y a mis asesores, el **Dr. Jorge Hernández** y a la **Dra. Azucena Don López** por su invaluable orientación y sabios consejos a lo largo de este proyecto. Su experiencia y conocimientos han sido fundamentales para mi crecimiento académico y profesional.

En particular, quiero agradecer a la **Dra. Rosario García** y al **Dr. Alberto Monroy** por su dedicación y paciencia al guiarme a lo largo de este proceso de investigación. Sus comentarios perspicaces y su guía experta han sido fundamentales para dar forma a este trabajo.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos aquellos que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este proyecto. Sus aportes, ya sean grandes o pequeños, han sido de gran valor para mí y para el éxito de esta investigación.

A todos ustedes, amigos, familia, pareja y profesores, les estoy profundamente agradecido por haber sido parte de este importante capítulo de mi vida académica. Su apoyo y aliento han hecho posible este logro y siempre lo llevaré en mi corazón con profundo agradecimiento.

¡GRACIAS!

INDICE

Glosario	6
Resumen.	9
Introducción.....	10
Marco Teórico.	11
El Cáncer colorrectal (CCR).	11
La importancia del microambiente tumoral, para la progresión del cáncer.	14
La vía adenosinérgica y su participación en la supresión de la respuesta inmune antitumoral.	14
ARs en el CCR.....	17
ADA y su actividad en las células tumorales.	18
Planteamiento del problema.....	18
Hipótesis	19
Objetivos.....	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Metodología.....	20
Cultivo celular	20
Expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica CD39, CD73, ADA, aRs (A1R, A2AR A2BR y A3R) en la línea celular de CCR (HCT 116).	20
Actividad enzimática de CD39, CD73 y ADA.	21
Ensayo Densitométrico	22
Resultados	22
Expresión de CD39, CD73, ADA, A1R, A2AR A2BR y A3R en la línea celular de CCR (HCT 116).	22
Actividad enzimática de CD39, CD73 y ADA	25
Discusión.....	29
Conclusiones	32
Referencias.....	33

Glosario

A1R: Receptor de adenosina A1

A2AR: Receptor de adenosina A2A

A2BR: Receptor de adenosina A2B

A3R: Receptor de adenosina A3

ACS: American Cancer Society

ADA1: Adenosina desaminasa 1

ADA2: Adenosina desaminasa 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ado: Adenosina

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

APC: Células presentadoras de antígenos

APCP: Adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate. Inhibidor de CD73

ATP: Adenosina trifosfato

bFGF: Factor de crecimiento pleiotrópico

CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer

CCR: Cáncer colorrectal

CD: Células dendríticas

CD26: proteína transmembranal dipeptidil peptidasa-IV

CD39: Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa- 1; E-NTPDasa1

CD73: Ecto- 5'-nucleotidasa; Ecto 5'NTasa

CD80: Molécula CD80

CEI: Células epiteliales intestinales

CIMP: Fenotipo metilador de Islas CpG

COX-2: Prostaglandina – endoperóxido sintasa dos

CpG: Citosina y guanina unida por fosfato

CpG: Islas de citosina y guanina unidos por fosfato

CTL: Linfocitos T citotóxicos

eATP: Adenosina trifosfato extracelular

EHNA: (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine). Inhibidor de ADA

EII: Enfermedades inflamatorias intestinales

FadA: Factor de adherencia de adhesina A

FadA: Proteína de adhesión A

FAP: Poliposis adenomatosa familiar

Fas/FasL: Proteínas de superficie de muerte celular

HLA: Antígeno leucocitario humano

IL-10: Interleucina 10

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

INO: Inosina

LTc: Linfocitos T citotóxicos

MDSC: Células mieloides supresoras

MLH1: MutL Homolog 1

MSC: Células troncales/estromales mesénquimales

MSI: Inestabilidad de microsatélites

NCI: Instituto Nacional del Cáncer

NK: Células asesinas naturales

PD1: Proteína de muerte celular programada 1

PDL1: Ligando de proteína de muerte programada

PGE2: Prostaglandina E2

PNP: Purina nucleósido fosforilasa

POM-1: NTPDase inhibitor sodium polyoxotungstate. Inhibidor de CD39

SFB: Suero fetal bovino

STAT3: Proteína transductor de señales y activador de la transcripción 3

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TLC: Cromatografía en capa fina

TME: Microambiente tumoral

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

β -catenina: Catenina beta

Resumen.

El Cáncer colorrectal (CCR) es un problema de salud pública a nivel mundial, esto debido a que su detección se realiza de forma tardía, teniendo así una mortalidad del 80%, es importante mencionar que los tratamientos (cirugía regional, quimioterapia, radioterapia y quimio-radioterapia) para este cáncer son ineficientes en etapas muy avanzada, esto es debido a que el CCR presenta diferentes mecanismos moleculares, los cuales le confieren la capacidad de evadir la respuesta inmune antitumoral; Uno de estos mecanismos es la vía adenosinérgica, en el cual el ATP que se encuentra a altas concentraciones ($<50 \mu\text{M}$) en el TME, es hidrolizado a adenosina (Ado) a través de la ectonucleotidasa CD39, que hidroliza ATP/ADP a AMP y la ectonucleotidasa CD73 que hidroliza finalmente el AMP a Ado, para posteriormente ser desaminada a inosina (INO) a través de la enzima adenosina desaminasa ADA. En relación a este mecanismo, se ha reportado que una gran cantidad de tumores malignos utilizan esta vía para inhibir las diferentes respuestas inmunitarias antitumorales, por lo que el estudio de esta vía, la convierte en un blanco terapéutico potencial para revertir la respuesta antitumoral presente en células de CCR. Es por eso que, con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la vía adenosinérgica, en este estudio se analizó la expresión y actividad de las enzimas CD39, CD73 y ADA, así como la expresión de los receptores de Ado (A1, A2A, A2B y A3) en la línea celular HCT 116 de CCR, ya que ha sido utilizada en diferentes estudios biomédicos relacionados con la proliferación, tumorigenicidad, metástasis y resistencia a fármacos. Dicho esto, en este estudio se encontró que las células de la línea celular HCT 116 expresan las ectoenzimas CD39 y CD73, como también a la enzima ADA, esto tanto en membrana como de manera total (intracelular y membrana); al mismo tiempo se encontró que estas enzimas (CD39, CD73 y ADA) presentan actividad funcional para la hidrólisis de ATP/ADP, AMP a Ado y posteriormente de Ado a INO, de igual forma, en los sobrenadantes de las células HCT 116 se detectó la presencia de HIPO, lo cual sugiere la presencia de la enzima PNP, la cual es la encargada de la hidrólisis de INO a HIPO. Para los receptores de Ado (A1, A2A, A2B y A3) se detectó una menor expresión de los receptores A2A y A3 en comparación con los receptores A1 y A2B, que, de acuerdo a diferentes estudios, sugiere un mecanismo protector de estas células tumorales ante la señalización de Ado. En así, que la línea celular HCT 116 representa un modelo interesante

para describir la participación de la vía adenosinérgica en la protección de las células tumorales ante el sistema inmune.

Introducción

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), se define al cáncer como una enfermedad por la que algunas células del cuerpo se multiplican o proliferan sin un control y se diseminan a otras partes del cuerpo (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que el 90% de los casos se detectan de forma tardía, siendo así su mortalidad del 80%, esto debido a que no causa síntomas hasta etapas avanzadas del mismo (Torrecillas, *et al.*, 2019). En este contexto, el tratamiento tradicional para este padecimiento es la cirugía regional (cirugía en la zona del tumor), criocirugía, quimioterapia, radioterapia o en casos especiales una combinación de estas dos últimas, (quimioradioterapia) si se trata de una etapa muy avanzada (López, 2013). Sin embargo, en ocasiones, estos tratamientos no son eficaces para eliminar esta enfermedad, debido a la presencia de diversos mecanismos moleculares que les confieren a las células tumorales la capacidad de evadir la respuesta inmune antitumoral.

Dentro de esta evasión de la respuesta inmune, las células tumorales pueden desarrollar varias estrategias para eludir la detección y destrucción por parte del sistema inmunológico (Clayton, *et al.*, 2011). Una de ellas es a través de la vía adenosinérgica, en donde se lleva a cabo la fosfohidrólisis de los nucleótidos de ATP/ADP y AMP a través de las ectoenzimas CD39 y CD73 respectivamente, generando como producto Ado (Antonioli, *et al.*, 2013). La generación de altos niveles de Ado promueve el crecimiento de las células tumorales, la angiogénesis, como también inhibe la producción de citocinas TH1 y contribuye en la supresión de las células T CD8⁺ y NK, esto a través de su señalización con los receptores (A1R, A2AR, A2BR y A3R) en las células tumorales, así favoreciendo sus actividades protumorales y permitiendo la evasión inmune del tumor (Antonioli, *et al.*, 2013; Gao, *et al.*, 2014). Además de los efectos de Ado en el crecimiento tumoral, se ha reportado que el nivel alto de esta misma induce a apoptosis en las células tumorales (Yang, *et al.*, 2011), por lo que la desaminación de Ado a través de la enzima ADA, resulta crucial para evadir dicha apoptosis (Nakajima, *et al.*, 2015).

Por lo tanto, resulta importante el conocimiento de la vía adenosinérgica en el CCR, con el fin de promover estrategias terapéuticas; Así bien, la utilización de la línea celular HCT 116 de CCR en este estudio, es de vital relevancia ya que son representativas de un adenocarcinoma y han sido utilizadas ampliamente en una variedad de estudios biomédicos relacionados con la proliferación y resistencia a fármacos en el CCR.

Marco Teórico.

El Cáncer colorrectal (CCR).

El CCR constituye aproximadamente del 9 al 10% de todos los nuevos cánceres diagnosticados en el mundo, en los hombres, este cáncer tiene el tercer lugar de incidencia, detrás del cáncer de pulmón y próstata (en este orden); en mujeres, también se encuentra en el tercer lugar por detrás del cáncer de seno y cuello uterino (Instituto Nacional del Cáncer, 2023).

De acuerdo con el Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), cada año en México se diagnostican cerca de 15, 000 nuevos casos y más de 7, 000 muertes de personas con CCR, colocándolo desde el año 2020 en la segunda causa de muerte por cáncer, solo por detrás del cáncer de seno; esto debido a que aproximadamente el 95% de los casos de CCR se detecta de manera tardía (IMSS, 2023; OPS, 2016).

Dentro de las causas del desarrollo del CCR se encuentran las mutaciones, las cuales suceden durante el proceso de replicación y progresión celular, dichas mutaciones pueden ser causa de factores genéticos y/o ambientales (Rodríguez, *et al.*, 2015). En el caso de los factores genéticos, podemos mencionar el síndrome de Lych que se caracteriza por ser un error en el gen mutL homolog 1 (MLH1 por sus siglas en ingles), el cual está encargado del proceso de reparación y duplicación del ADN; al igual que el síndrome de Lych, la poliposis adenomatosa familiar (FAP), es una condición hereditaria en donde se desarrollan numerosos pólipos en el colon, esto a causa de una mutación en el gen adenomatous polyposis coli. En el contexto de dichos factores, es importante mencionar que el 5% de las personas que padecen CCR presentan cambios genéticos hereditarios que pueden ser causantes de diferentes subtipos de CCR. Dentro de los factores ambientales, de acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer (ACS por sus siglas en inglés: American Cancer Society) se puede

mentar el sobrepeso u obesidad, la inactividad física, la mala alimentación, el alcoholismo, el tabaquismo y la edad avanzada.

Dichos factores ambientales pueden dar origen a distintas enfermedades inflamatorias (principalmente en el tracto digestivo), como lo es la mala alimentación, ya que las dietas ricas en grasas y bajas en fibra puede causar aumento de los ácidos biliares que causan modificación en la microbiota, ya que, dicho estado de inflamación, disminuye los niveles de oxígeno aumentando a su vez la cantidad de bacterias anaerobias, las cuales se ha relacionado con la formación de neoplasias, inflamación crónica e interferencia con la respuesta inmune (Ballinger, *et al.*, 2017; Calva, *et al.*, 2009; Rodríguez, *et al.*, 2015).

La formación del CCR comienza con la transformación de la mucosa del epitelio normal en epitelio hiperproliferativo, en donde las células epiteliales intestinales (CEI) pierden su organización y estructura, que de acuerdo con la secuencia adenoma-carcinoma, se adquiere la capacidad de formar adenomas, los cuales son un crecimiento benigno que se origina en las células glandulares del revestimiento del colon, posteriormente estos adenomas pueden adquirir la capacidad de invadir tejidos circundantes y propagarse a otros órganos a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático, transformándose así en adenocarcinomas, (Terzić, *et al.*, 2010).

Después de que se realiza el diagnóstico de CCR, se lleva a cabo el proceso de estadificación, en el cual se identifica la etapa o estadio de desarrollo en la que se encuentra el tumor. En el CCR se pueden identificar cinco etapas (I- V) (Figura 1), en la etapa I, las células cancerosas se encuentran sólo en el revestimiento interno del colon, en la etapa II, el tumor se ha propagado más allá del revestimiento interno, pero permanece dentro del colon y no se ha propagado a los ganglios linfáticos, mientras que en la etapa III el cáncer colorrectal se extiende a través de la capa de músculo más externa de la pared del colon, pero no se ha propagado a los ganglios linfáticos. En la etapa IV el cáncer ha alcanzado a los ganglios linfáticos y en la etapa V el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo a través de estos ganglios (Ayuso, *et al.*, 2007; MSKCC, 2023).

Durante el desarrollo del CCR las células tumorales pueden eludir la vigilancia inmunológica a través de diferentes mecanismos tales como: la formación de un microambiente tumoral (TME, del inglés, tumor microenvironment) inmunosupresor; modulando negativamente la

vía de procesamiento y presentación antigénica; y regulando negativamente la proliferación, activación y señalización de linfocitos T específicos. Además, las células tumorales pueden secretar diversos factores inflamatorios (prostaglandina E2 (PGE2)) e inmunosupresores (TGF- β , Fas soluble, indoleamina 2,3-dioxigenasa, IL-10 y fosfatidilserinas solubles), así como factores que favorecen la angiogénesis (VEGF), dando como resultado la supresión de respuestas inmunitarias adaptativas antitumorogénicas (Jacobo, *et al.*, 2017; Caja, *et al.*, 2018; Pickup, *et al.*, 2017). En el caso del CCR los tumores expresan antígenos que no se encuentran completamente definidos, por lo que la respuesta inmune desencadenada no es totalmente adecuada, ya que el reconocimiento es ineficiente. Durante el proceso tumoral, la inflamación del epitelio del colon puede causar mutaciones en las células neoplásicas, lo cual favorece el crecimiento y la propagación del tumor (Bowen, *et al.*, 2020; Giraldo, *et al.*, 2015). Diversas investigaciones centradas en el CCR han reportado que la alteración en la expresión de moléculas estimuladoras y de adhesión, como en el caso de la disminución de CD80, desempeñan un papel importante en el mecanismo de escape del tumor. De igual forma, la inducción de apoptosis del linfocito T por diferentes mecanismos como Fas/FasL, PD1/PDL1 y la vía STAT3 se han reportado como nuevas vías de escape tumoral, para favorecer la evasión y progresión del CCR (Muro, *et al.*, 2007).

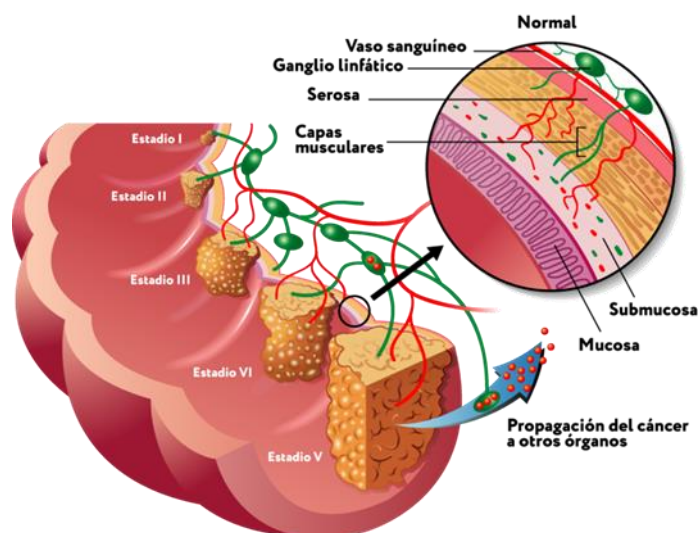


Figura 1. Etapas CCR. Estadio I: El cáncer se encuentra en su etapa más temprana y en la capa superficial del colon; Estadio II: El tumor ha crecido a la segunda y tercera capa, midiendo aproximadamente 2 cm; Estadio III: El cáncer se ha extendido a la capa más profunda del colon, sin alcanzar todavía los ganglios; Estadio IV: El tumor ha crecido y se ha extendido a los ganglios linfáticos; Estadio V: El cáncer se ha propagado a otros órganos a través de los ganglios linfáticos (Ayuso, *et al.*, 2007).

La importancia del TME, para la progresión del cáncer.

El TME está formado por células cancerosas, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, células innatas linfoides, células dendríticas (CD), células mieloides supresoras (MDSC por sus siglas en inglés, myeloid-derived suppressor cells), linfocitos T y B, así como el estroma tumoral y áreas de necrosis (Borros, 2020). El porcentaje de las células cancerosas reales dentro de un tumor puede variar significativamente, dependiendo del tipo histológico, el sitio de la arquitectura del tumor (margen invasivo o el centro hipóxico y a menudo necrótico de las lesiones más avanzadas), estadio de la enfermedad y de tratamientos anteriores (Kalinski, 2017, Haslam, *et al.*, 2017).

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs por sus siglas en inglés cancer associated fibroblasts), que residen en el estroma tumoral participan activamente en la regulación del desarrollo tumoral, mientras que las células troncales/estromales mesénquimales (MSC por sus siglas en inglés, mesenchymal stem/stromal cells) y adipocitos regulan diferentes funciones en las células malignas durante el desarrollo del tumor (Han, *et al.*, 2015; Karnoub, *et al.*, 2007; Nieman *et al.*, 2013). Las células endoteliales constituyen otro componente importante del TME, las cuales participan en la vascularización del tumor, el cual le confiere la capacidad de transportar nutrientes, como también el oxígeno necesario para las células cancerosas, además de servir como ruta para la generación de metástasis (Pietila, *et al.*, 2016). Otro de los componentes del TME es la actividad proinflamatoria presente, la cual es esencial para el desarrollo de tumores, como la inflamación crónica, que en este sentido se ha relacionado con la formación de tumores, así mismo, las células tumorales poseen la capacidad de evadir y suprimir el sistema inmune, con el fin de asegurar su supervivencia (Kanterman, *et al.*, 2012; Monroy-Mora, 2019).

La vía adenosinérgica y su participación en la supresión de la respuesta inmune antitumoral.

Recientemente, se ha reportado que en el centro hipóxico del tumor se da un aumento importante de la concentración de Ado como resultado de la fosfohidrólisis secuencial de nucleótidos de adenina (ATP/ADP y AMP) que se encuentran en concentraciones superiores a 50 μ M. La fosfohidrólisis es efectuada por la actividad de ectonucleotidasas, dispuestas principalmente en la membrana de las células tumorales, células endoteliales, células

estromales mesenquimales y células inmunosupresoras presentes en el TME. Esta ruta hidrolítica es conocida como vía adenosinérgica (Góngora, J, *et al.*, 2005; Pérez, 2013; González, 2020), en donde ATP/ADP son hidrolizadas a AMP por la ectoenzima CD39 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa1, ENTPD1; EC 3.6.1.5), y el AMP resultante a Ado por la actividad de la 5-éctonucleotidasa (CD73, EC 3.1.3.5) (Bahreyni, *et al.*, 2018; Robson, *et al.*, 2006; Zimmermann, *et al.*, 2012). Es importante mencionar que la mayoría de las actividades de señalización extracelular de la Ado están mediadas por 4 receptores que están acoplados a proteínas G en la membrana de células blanco, los cuales se dividen en cuatro subtipos (A1R, A2AR, A2BR, y A3R) (Bours, *et al.*, 2006; Fredholm, *et al.*, 2001; Linden, *et al.*, 2001), alternatively, la Ado puede ser desaminada a través de la enzima adenosina desaminasa (ADA), que la convierte en INO (Figura, 2). La ADA ha sido identificada en humanos, mediante dos isoformas, siendo la primera la adenosina desaminasa-1 (ADA1) y la adenosina desaminasa-2 (ADA2) (Antonioli, *et al.*, 2012), en donde la ADA1 es la más común, ya que se expresa en todos los tejidos, como en los eritrocitos, cumpliendo la función de reducir los niveles intracelulares de Ado (Niitsu, *et al.*, 1998; Aldrich, *et al.*, 2000), la cual es toxica para las células; de manera alterna, la ADA1 puede interactuar con la proteína transmembranal dipeptidil peptidasa-IV (CD26), para mantenerse en la superficie celular y regular los niveles de Ado de manera extracelular, (Ungerer, *et al.*, 1992).

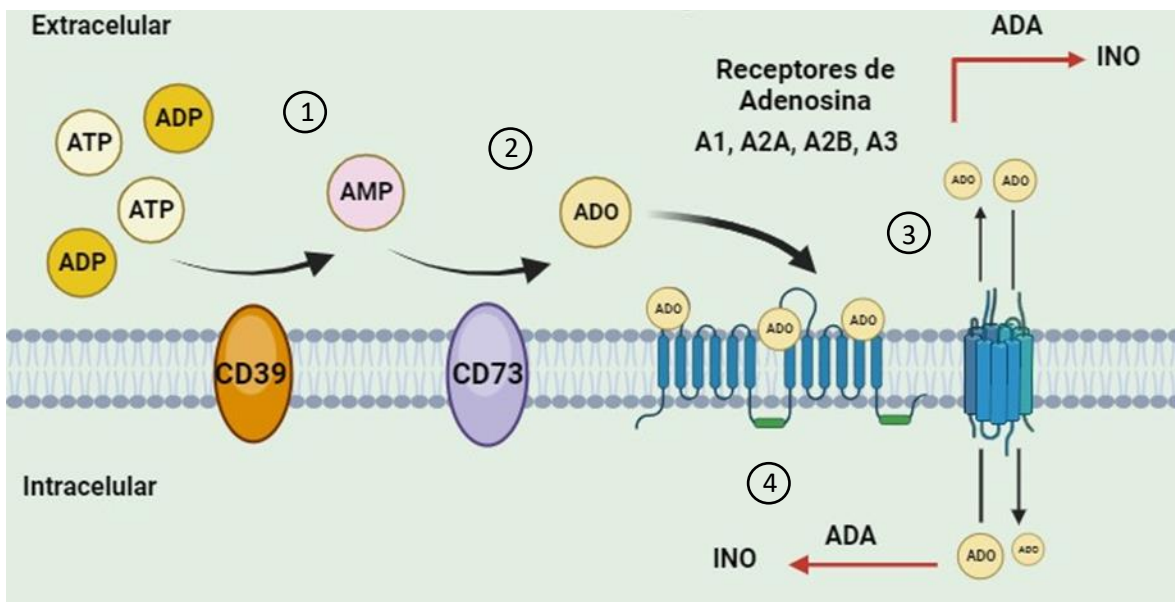
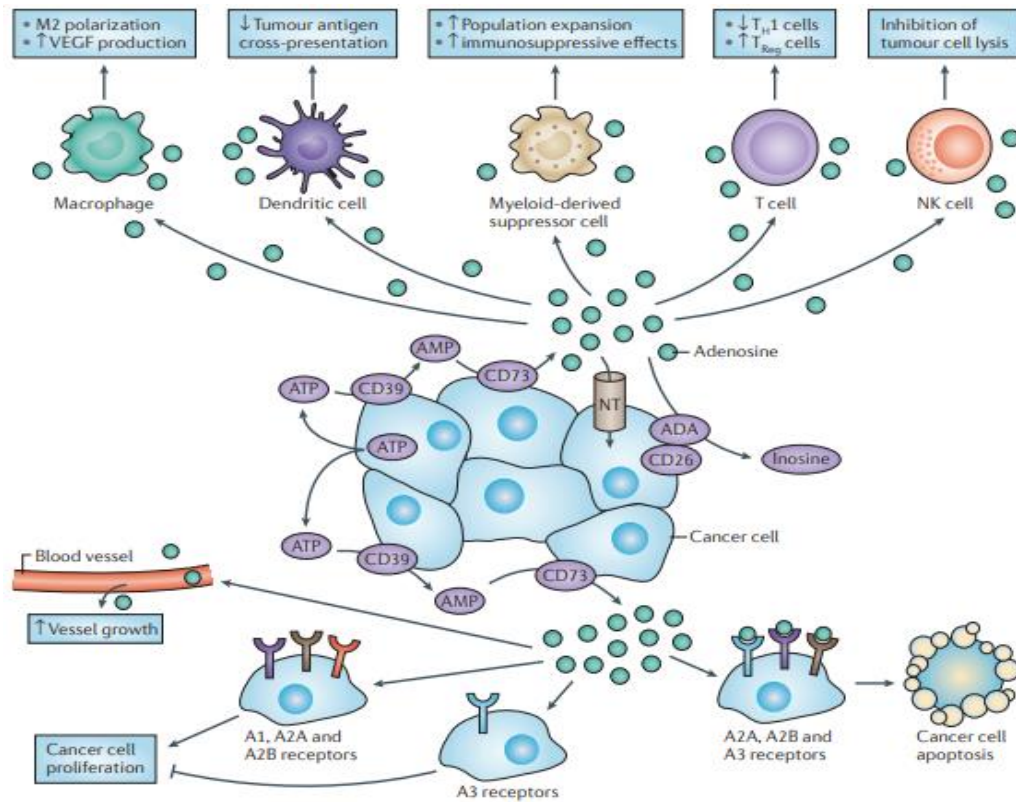


Figura 2. Esquema de señalización de la vía adenosinérgica. (1) Desaminación del ATP/ADP a AMP, (2) Desaminación del AMP por CD73 para producir Ado, (3) Interacción de Ado con sus receptores de membrana, (4) Desaminación de Ado por la enzima ADA para producir INO. Modificado de Schwab, 2016.

Los receptores A1R y A2AR son de alta afinidad, su EC50 (Half maximal effective concentration, por sus siglas en ingles) para Ado se encuentra en el rango de 0.2-0.7 μ M;



mientras que los receptores A2B y A3 presentan baja afinidad para la Ado, presentando EC50 mayor a 24 μ M (Fredholm, *et al.*, 2001). La Ado ejerce diversos efectos en el hospedero: cuando interactúa con el receptor de alta afinidad A2A, puede modular la supresión de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (LTc), macrófagos, células B, neutrófilos, NK y de DC (Kasama, *et al.*, 2015; Nikbakht, *et al.*, 2016; Sitkovsky, *et al.*, 2004; Young, *et al.*, 2014); y cuando interactúa con A2AR y A2BR induce la producción de TGF- β en diferentes tipos celulares, causando efectos antiinflamatorios y de inmunorregulación, los cuales, en condiciones normales, protegen al hospedero de una activación inmunitaria excesiva y de respuestas inflamatorias que podrían resultar en daños en los tejidos (Regateiro, *et al.*, 2011; García-Rocha, *et al.*, 2019), (Figura 3).

Figura 3. La vía adenosinérgica y la progresión tumoral. La vía adenosinérgica participa en la creación de un TME inmunotolerante mediante la regulación de las funciones de las células inmunitarias e inflamatorias, como los macrófagos, las CD, las MDSC, las células T y las células NK. La vía adenosinérgica también regula el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir con la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis de las células cancerosas a través de los ARs que se expresan en las células cancerosas y las células endoteliales, respectivamente. Los tumores sólidos expresan niveles elevados de CD39 y CD73, así como niveles bajos de transportadores de nucleósidos (NT) con respecto a las células sanas, ectoadenosina desaminasa y su cofactor CD26, lo que conduce a un aumento de la señalización de adenosina en el entorno del cáncer. ADA, adenosina desaminasa; JNK, quinasa amino-terminal JUN; TH1, T ayudante 1; TReg, T reguladora; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular (Antonioli, *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que la expresión de CD73 mantiene una correlación positiva con respecto al grado de evolución del tumor (Zhang, B., *et al.*, 2015; Allard, B., *et al.*, 2012); y de acuerdo con Eroglu, *et al.*, (2000), se ha reportado que las células tumorales de la línea CT26 de CCR expresan altos niveles de CD73 y son capaces de suprimir las actividades efectoras de LTc al generar grandes cantidades de Ado a partir de la hidrólisis de AMP (Noh, *et al.*, 2022).

De forma particular, se ha demostrado que la activación de AR1 induce quimiotaxis de células tumorales de melanoma y CCR, (Woodhouse, *et al.*, 1998), en el caso de A2AR a través de la expresión de factores angiogénicos como VEGF y bFGF, son capaces de inducir el crecimiento del cáncer de próstata, CCR y pulmón (Lutty, *et al.*, 2003; Holmes, *et al.*, 2007). Estudios *in vivo* han demostrado un efecto opuesto de Ado con respecto a A2BR en el desarrollo tumoral, principalmente el uso de agonistas no específicos para este receptor induce apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 (CAS 3) en las líneas celulares de cáncer de ovario y de CCR con alta expresión de A2BR (Hiajahmadi, *et al.*, 2015). De igual forma se ha reportado que la activación de A3R inhibe el crecimiento de tumores de CCR, próstata y melanoma (Lui, *et al.*, 2014).

ARs en el CCR.

En el caso particular del CCR estos receptores pueden influir de manera positiva en la evasión de la respuesta inmune; En este sentido, se ha observado un incremento en la expresión del receptor A1 en células CW2 de CCR, esto en comparación con células sanas de tejido provenientes del recto, (Khoo, *et al.*, 1996). Para el receptor A2A en CCR Yasuda, *et al.*, (2009) analizó el efecto de la inhibición de este receptor en células Caco-2, esto a través del uso del antagonista del receptor A2A (PMPX), en donde se observó que el efecto

inmunosupresor de las células T se vio disminuido por el incremento de Ado; En el caso de A2BR, Molck, *et al.*, (2016) reportaron que la inhibición a través del inhibidor MRS1754, regula a la baja la progresión y el crecimiento tumoral del CCR de manera dependiente de la dosis, en donde también se reportó que la vía A2B-Ado incrementa la expresión de CD73; Así mismo, Madi, (2004) realizó una comparación en la expresión de A3R en tejidos sanos y tumorales, en donde reveló niveles de este receptor significativamente más altos en tumor.

ADA y su actividad en las células tumorales.

La ADA, es una enzima polimórfica del catabolismo de las purinas que cataliza la desaminación de adenosina y 2'-deoxyadenosina para producir INO y 2'-deoxyinosina (dINO) respectivamente, liberándose amonio en el proceso (Gakis, 1996). Al mismo tiempo, se ha sugerido que la Ado es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales, ya sea por la vía intracelular o extracelular. De manera intracelular, la Ado que es introducida al citoplasma a través de los transportadores de nucleósidos (NTs por sus siglas en inglés nucleoside transporters), se convierte en AMP por la acción de la adenosina cinasa (AK). El AMP producido, activa a su vez, a la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), la cual es responsable de inducir apoptosis (Tsuchiya, *et al.*, 2015; Yang, *et al.*, 2011; Nakajima, *et al.*, 2015). De manera extracelular, la Ado induce apoptosis mediante su interacción con los receptores de Ado, principalmente a través de la interacción con A1R y A2AR en células tumorales de CCR (Yasuda, *et al.*, 2009; Tamura, *et al.*, 2012; Panjehpur, *et al.*, 2007). De igual forma, estudios recientes han reportado que la enzima ADA puede tener un efecto protector ante las altas concentraciones de Ado en dichas células (Monroy-Mora, 2019).

Planteamiento del problema

La Ado juega un papel importante en la evasión y supresión de la respuesta inmune antitumoral, y en la promoción de la proliferación, invasión y metástasis de las células tumorales al interactuar con los receptores de Ado (A1, A2A, A2B, A3). Por lo que se ha propuesto a las ectonucleotidasas CD39 y CD73, participantes en la generación de Ado en el TME, sean un blanco terapéutico contra el cáncer (Monroy-Mora, 2019). Por otra parte, se ha propuesto que la desaminación de Ado a INO, a través de la actividad enzimática de ADA, es un mecanismo de las células tumorales para protegerse de la apoptosis. Esto que ha llevado a proponer que la inhibición de ADA pueda ser una estrategia terapéutica contra el cáncer.

(Nakajima, *et al.*, (2015). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que existen niveles elevados de Ado en el microambiente tumoral del CCR (Nakajima, *et al.*, 2015), lo cual pudiera estar asociado con el comportamiento de las células cancerosas y supresión de la respuesta inmune antitumoral, por lo que resulta relevante conocer la actividad adenosinérgica en las células tumorales de CCR. Por tanto, este estudio se llevó a cabo para conocer la actividad adenosinérgica de las células HCT 116 de CCR, las cuales han sido utilizadas ampliamente en una variedad de estudios biomédicos relacionados con la proliferación del cáncer de colon y sus correspondientes inhibidores.

Hipótesis

Se sabe que los niveles elevados de Ado en el TME inhiben la respuesta inmune antitumoral y promueven la proliferación, migración, metástasis, quimio y radio-resistencia de las células tumorales. Además, estudios recientes indican que la desaminación de Ado a INO, mediante la actividad enzimática de ADA, puede proteger a las células tumorales de la apoptosis. En este sentido se sabe que la expresión de CD39, CD73 y ADA se encuentra relacionada con el desarrollo de los tumores de CCR. Por otro lado, las células HCT 116 de CCR han sido utilizadas como modelo de varios estudios biomédicos debido a su alta capacidad proliferativa, de resistencia a drogas y metástasis. En consecuencia, se espera que estas células presenten una importante capacidad de generar Ado a partir de la hidrólisis de los nucleótidos ATP/ADP y AMP mediante la actividad de las enzimas CD39 y CD73, respectivamente; además de presentar importante capacidad para desaminar al Ado mediante la actividad de ADA.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la expresión y actividad funcional de moléculas de la vía adenosinérgica en la línea celular HCT116 de CCR.

Objetivos particulares

- Analizar la expresión de moléculas de la vía adenosinérgica: CD39, CD73, ARs (A1, A2A, A2B, A3) y ADA en la línea celular HCT 116 de CCR.

- Determinar la actividad enzimática de CD39, CD73 y ADA en la línea celular HCT116 de CCR.

Metodología

Cultivo celular

En este estudio, se utilizó la línea celular HCT 116 de CCR la cual se aisló de un tumor de colon de un varón adulto. Esta línea celular se caracteriza por tener una mutación en el codón 13 del protooncogén *ras*. La línea HCT 116 fue cultivada en medio RPMI-1640 (Gibco®, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco®, NY, USA) y antibióticos: 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco®, NY, USA). Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora (Scientific®, USA) a una temperatura de 37°C y a 5% de CO₂ en un ambiente de humedad saturante.

Expresión de las moléculas que participan en la vía adenosinérgica CD39, CD73, ADA, aRs (A1R, A2AR A2BR y A3R) en la línea celular de CCR (HCT 116).

La expresión de CD39, CD73, ADA y ARs (A1R, A2AR A2BR y A3R) en las células HCT 116 fueron analizadas mediante la técnica de citometría de flujo. Para ello, un total de 1×10^6 células fueron colocadas en tubos para citometría de flujo de 5 ml (Falcon, USA). Los anticuerpos monoclonales (mAb) utilizados para identificar a cada una de las moléculas fueron los siguientes: anti-CD39 (Bioscience, USA), anti-CD73/PE (BD Pharmingen, USA), anti-A1R/Alexa fluor 647 (Bioss antibodies, USA), anti-A2AR/PE (Novus, USA), anti-A2BR/Alexa Fluor 750 (Bioss antibodies, USA), anti-A3R/ FITC (Biorby, USA) y un mAb primario anti-ADA (Creative Diagnostic, USA), el cual fue revelado con un mAb secundario anti-IgG marcado con PE (R&D Systems, USA). El análisis de las moléculas antes mencionadas, se determinó tanto en membrana como de manera total (membrana e intracelular). Para la detección en membrana, las células fueron lavadas con buffer de lavado (PBS/SFB 2%), posteriormente se adicionaron los mAb y se incubaron durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados y por último se fijaron las células con 200 µl de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1%. Las células fueron almacenadas a 4°C, y protegidas de la luz hasta su adquisición en un citómetro de flujo. Para la detección total, 5×10^5 células fueron colocadas en tubos para citometría de flujo de 5 ml (Falcon, USA). Posteriormente se lavaron una vez con buffer de lavado (saponina (Sigma

Aldrich, USA) 0.1%/SFB 2%) y después se añadió solución fijadora (paraformaldehído/SFB 2%) y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron los tubos a 250 g y se decantó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 250 µl de buffer de permeado (saponina 0.3%/SFB 2%) y se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron, se decantó el sobrenadante, se añadieron 100 µl de SFB e incubar durante 30 min a 4°C. Posteriormente se añadió 1 ml de PBS/2%, para después centrifugar y decantar. Después se adicionaron los mAb y las células se incubaron durante 30 min a 4°C y en obscuridad. Transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados con buffer de lavado (saponina 0.1%/ SFB 2%). Por último, se fijaron las células con 200 µl de paraformaldehído al 1%, los tubos se almacenaron a 4°C y se protegieron de la luz. El análisis de las células se realizó mediante la adquisición de 10,000 eventos en un citómetro de flujo espectral Aurora (Cytek Biosciences, USA). Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo v. 10.4 (BD Biosciences, USA).

Actividad enzimática de CD39, CD73 y ADA.

Para determinar la actividad enzimática de CD39, CD73 y ADA en membrana, 1×10^6 de células de la línea celular HCT 116 de CCR fueron colocadas en microtubos para centrifuga de 0.6 ml (Axygen, USA) en presencia de 50 µl de ATP, ADP, AMP o Ado [5 mM] (Sigma Life Science, USA) y en presencia o ausencia de 5 mM de POM-1(polioxotungstato de sodio), APCP (Adenosine 5'- α,β -methylene diphosphate) (Sigma Life Science, USA), o EHNA (hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) (Sigma Life Science, USA), los cuales son inhibidores específicos de CD39, CD73 y ADA, respectivamente (Monroy-Mora, 2019). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µl. Al inicio de cada cultivo y después de 5 h se tomaron alícuotas de 2 µl de cada sobrenadante y se colocaron sobre laminillas fluorescentes de poliéster para cromatografía en capa fina (CCF) de 7 cm x 9.5 cm, conteniendo sílica gel (Sigma-Aldrich, USA). Como testigos se emplearon muestras de 2 µl de ATP, ADP, AMP, Ado, INO e Hipo (hipoxantina) sintéticas (Sigma Life Science, USA) a una concentración de 5 mM. Para analizar la hidrólisis de ATP, ADP y AMP, las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 2 ml de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol (J.T. BAKER, USA), alcohol isoamílico (J.T. BAKER, USA), etoxietanol (SIGMA-ALDRICH, USA), amoniaco (J.T. BAKER, USA) y agua, en proporciones 9:6:18:9:15, respectivamente. Para analizar los

componentes de la hidrólisis de AMP y Ado, se utilizó una mezcla de solventes compuesta por: isobutanol (J.T BAKER, USA), etilacetato (MEYER, USA), metanol (MEYER, USA) y amoníaco (J.T. BAKER, USA), en proporciones 7:4:3:4, respectivamente. La elución se dejó correr durante 60 minutos en la cámara de elución, y posteriormente se retiró para su secado a temperatura ambiente. Finalmente, los productos generados fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV).

Ensayo Densitométrico

Los productos de la hidrólisis de ATP, ADP, AMP y Ado que fueron revelados mediante las CCF, fueron analizados con ayuda del software ImageJ (NIH, USA). Para ello, se realizó un análisis densitométrico de los componentes que eluyeron a la altura de las moléculas sintéticas que fueron usados como testigos. Los datos densitométricos de cada componente fueron reportados en porcentajes, tomando como referencia de 100% la cantidad total de sustrato hidrolizado por las células.

Resultados

Expresión de CD39, CD73, ADA, A1R, A2AR A2BR y A3R en la línea celular de CCR (HCT 116).

Debido a la relevancia que tiene la vía adenosinérgica en las actividades protumorales de las células malignas, tales como: proliferación, migración, metástasis, quimio y radio-resistencia (Bahreyni, *et al.*, 2018; Robson, *et al.*, 2006; Zimmermann, *et al.*, 2012), así como la evasión de la respuesta inmune (Muller-Heege, *et al.*, 2014), en este estudio se analizó la expresión de moléculas relevantes en esta vía (CD39, CD73, ADA, A1R, A2AR A2BR y A3R) en las células HCT116 de CCR. Para ello, las células fueron marcadas tanto en membrana como de manera total (membrana e intracelular) y analizadas mediante citometría de flujo como se mencionó en la sección de metodología. La expresión de CD39 y CD73 en la membrana fue de 100 y 20 veces menor que la detectada de manera total en las células HCT 116, respectivamente. Los valores de IMF (intensidad media de fluorescencia) de la expresión de CD39 y CD73 en la membrana de las células HCT 116 fueron 89.1 y 50135 (Figura 4A y 4B), respectivamente; mientras que los obtenidos de la expresión total para CD39 y CD73 fueron 91749 y 196369 (Figura 4C y 4D).

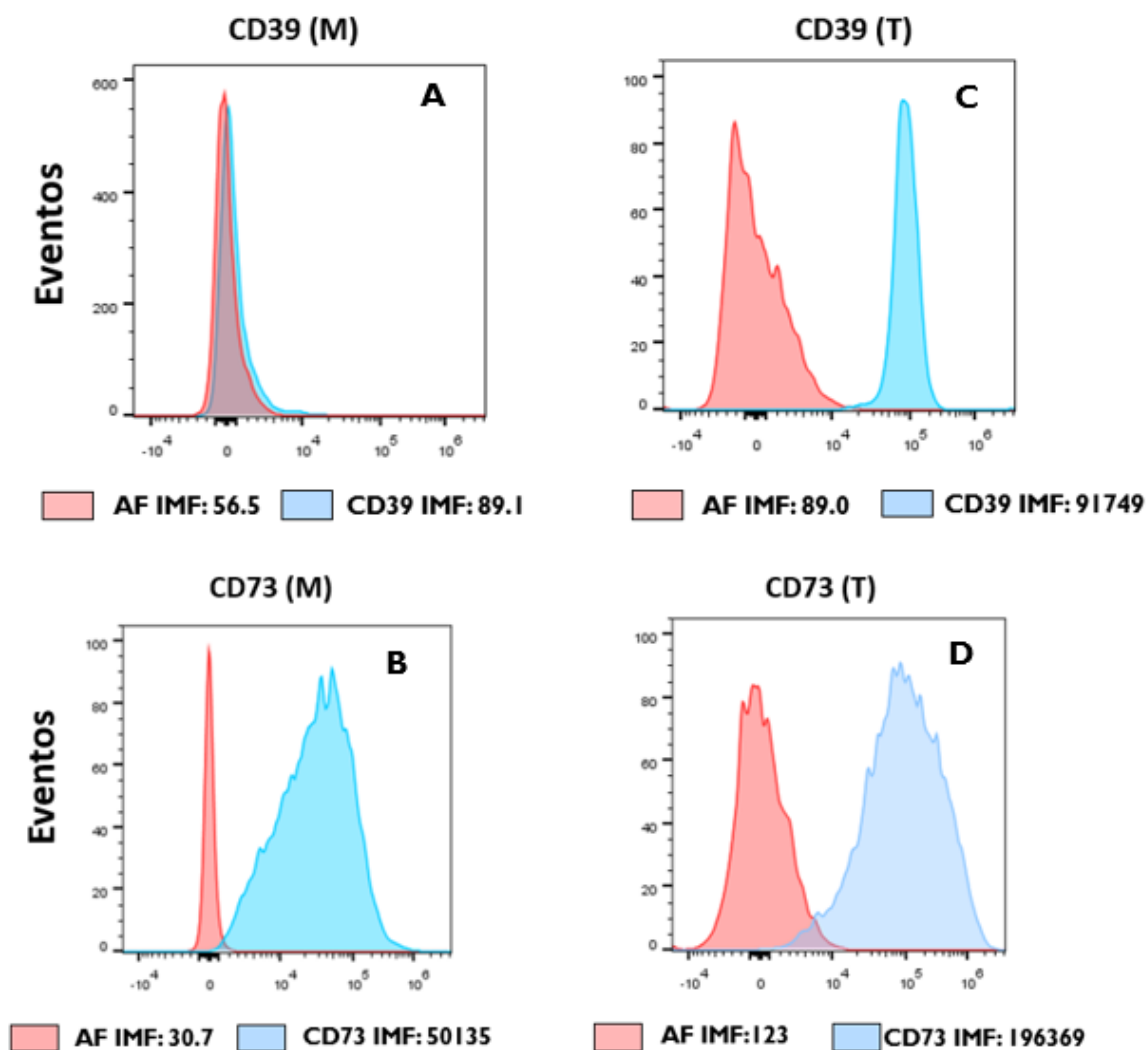


Figura 4. Expresión de CD39 y CD73 en las células HCT116. Las células HCT116 (1×10^6) fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de las moléculas CD39 y CD73 tanto en membrana (M), como total (T), Autofluorescencia (AF). Intensidad media de fluorescencia (IMF).

Por otra parte, se determinó la expresión de ADA en las células HCT 116 utilizando un anticuerpo primario anti-ADA, cuya unión a la molécula blanco fue revelada a través de un anticuerpo secundario. La expresión de ADA en la membrana de las células HCT 116 fue menor, mostrando un valor de IMF de 6113. No obstante, la expresión total de ADA mostró un valor de IMF de 237209, (Figura 5).

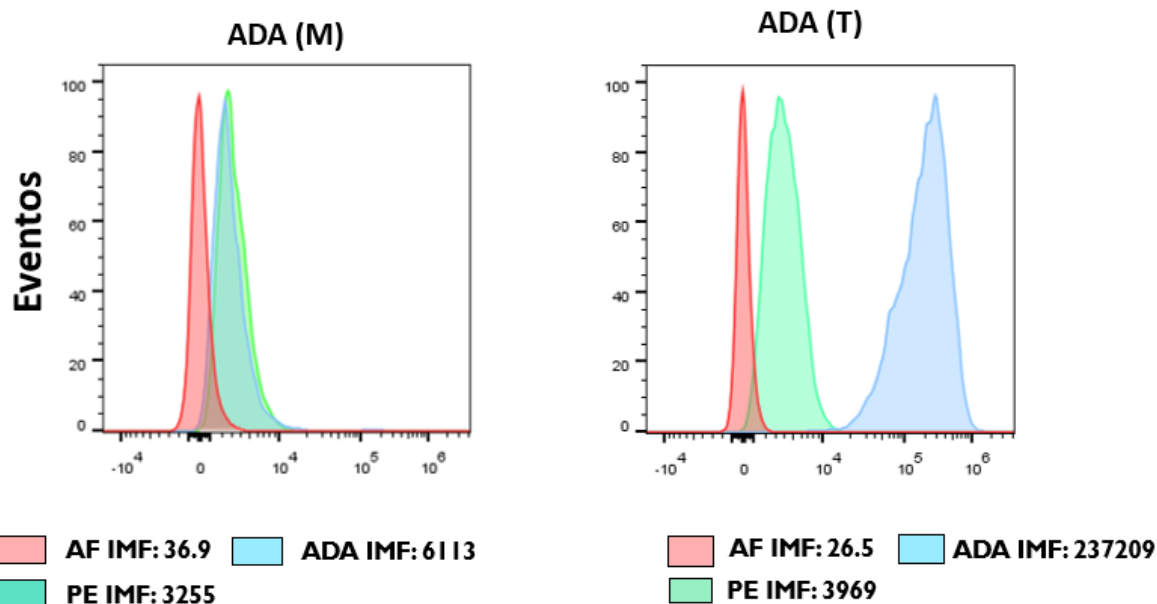


Figura 5. Expresión de ADA en las células HCT 116. Las células HCT116 (1×10^6) fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de la molécula ADA tanto en membrana (M) como de manera total (T), como se mencionó en la sección de materiales y métodos. Autofluorescencia (AF). Intensidad media de fluorescencia (IMF). Ficoeritrina (PE).

Por otro lado, se encontró una expresión diferencial en la expresión de A1R (Figura 6A), A2AR (Figura 6B), A2BR (Figura 6C) y A3R (Figura 7D) en la membrana de las células HCT 116. La expresión de los receptores A2A y A3 fue menor que la de los receptores A1 y A2B, obteniéndose valores de IMF de 34012 para A1R (Figura 6A) y de 5121 para A2AR (Figura 6B), respectivamente; y de 3202 de A2BR (Figura 6C) y 8976 de A3R (Figura 6D).

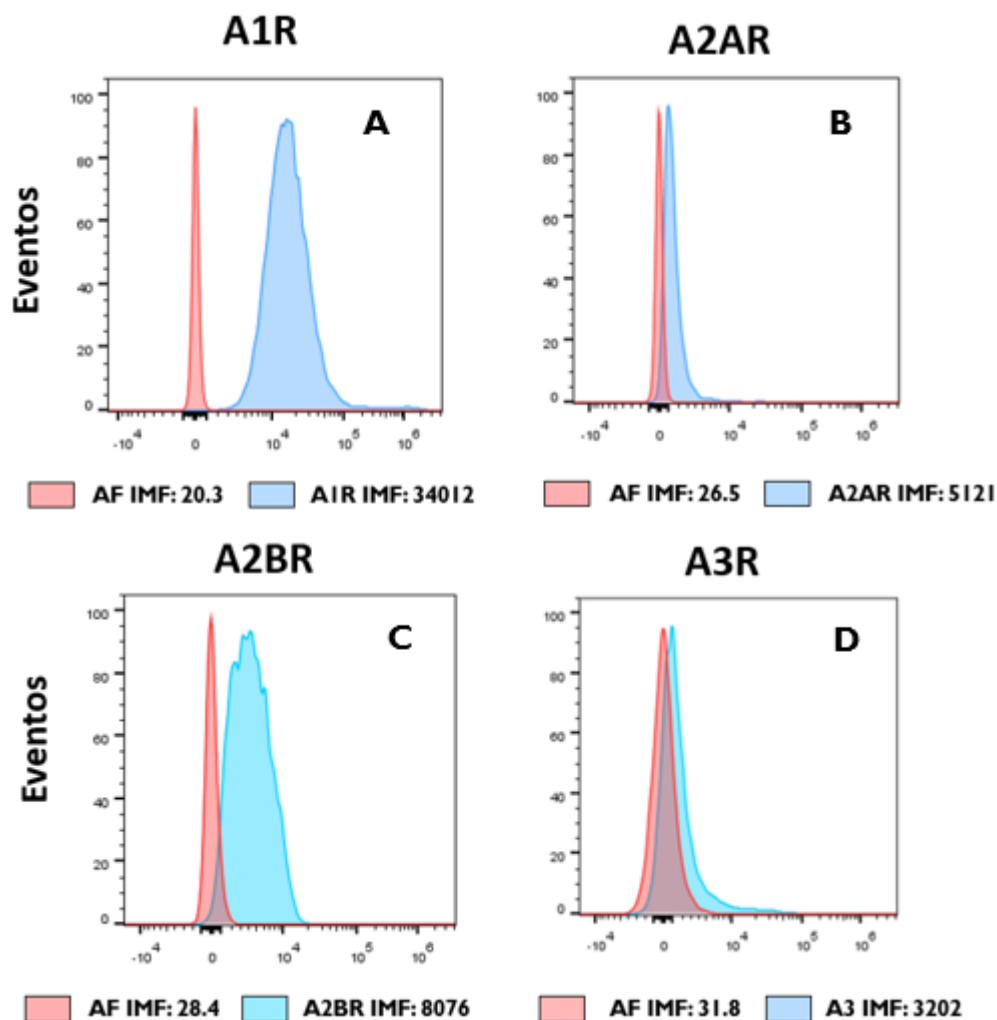


Figura 6. Expresión de los ARs (A1, A2A, A2B y A3) en las células HCT 116. Las células HCT116 (1×10^6) fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de los ARs (A1, A2A, A2B y A3) en membrana como se mencionó en la sección de materiales y métodos. Autofluorescencia (AF). Intensidad Media de Fluorescencia (IMF).

Actividad enzimática de CD39, CD73 y ADA.

Con la finalidad de analizar la capacidad de las células HCT 116 de CCR para hidrolizar a los nucleótidos ATP/ADP y AMP mediante la actividad de las enzimas CD39 y CD73 respectivamente, 1×10^6 células HCT 116 fueron incubadas en presencia de 5 mM de ATP, ADP o AMP; y en presencia o ausencia de 5 mM de POM-1 (Inhibidor específico de CD39) o de APCP (Inhibidor específico de CD73). Después de 5 h de incubación, se tomaron 2 μ l de cada uno de los sobrenadantes y los productos de la hidrólisis, separados a través de la CCF, fueron analizados por densitometría. Como se observa en la figura 7, después de la hidrólisis de ATP, se observó un residual de 20% de ATP no hidrolizado, 65% de ADP y

15% de AMP. La adición de POM-1 a las células incubadas con ATP, inhibió parcialmente la hidrólisis de ATP, ya que el 35% de ATP fue hidrolizado en ADP (25%) y AMP (10%). Por otro lado, al incubar las células HCT 116 en presencia de ADP, se observó que aproximadamente el 29% fue hidrolizado a AMP, y la adición de POM-1 al cultivo de las células solo redujo en aproximadamente 15% la conversión de ADP a AMP.

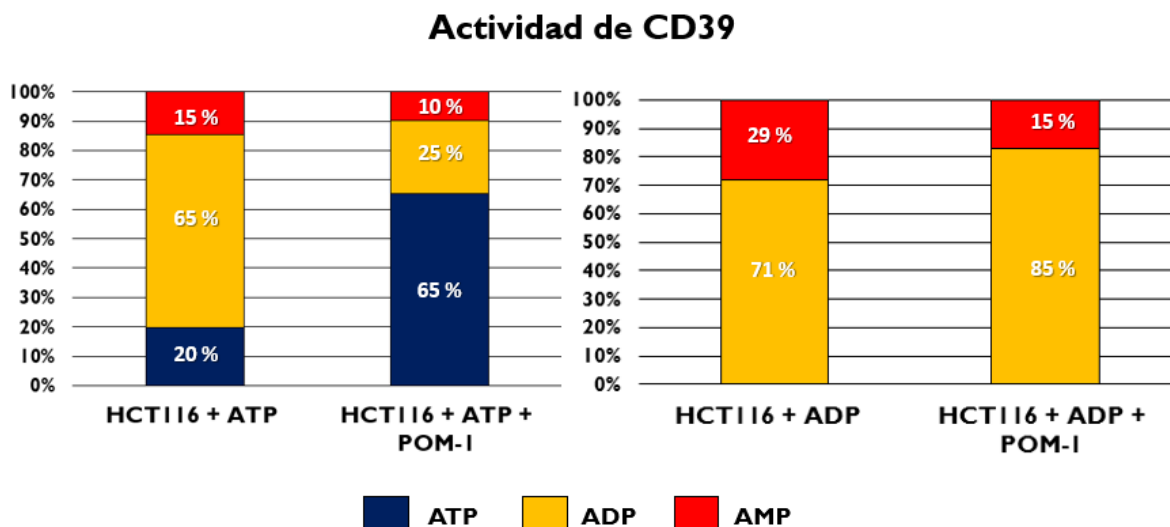


Figura 7. Productos de la hidrólisis de ATP y ADP llevados a cabo por las células HCT 116 de CCR a través de actividad funcional de la ectonucleotidasa CD39. Para analizar la actividad funcional de CD39 en las células HCT 116, 1×10^6 células fueron incubadas a 37°C en presencia de 5 mM de los sustratos ATP o ADP y en presencia o ausencia de 5 mM de POM-1, inhibidor de la ectonucleotidasa CD39. Después de 5 h, los productos de la hidrólisis fueron separados por CCF y analizados mediante densitometría usando el software ImageJ. ATP (barra azul), ADP (barra amarilla) y AMP (barra roja).

Por otro lado, después de 5 h de incubación, las células HCT 116 fueron capaces de hidrolizar el 90% de AMP. De manera interesante, se observó que el 49% de los productos de la hidrólisis correspondió a Ado, 9% INO y 32% a hipoxantina (HIPO). Estos resultados indican que además de la presencia de ADA en las células HCT 116, otras enzimas participantes en la catálisis de nucleósidos, tal como purina nucleósido fosforilasa (PNP), que convierte a la INO en Hipo, están presentes en estas células. Por otra parte, la adición de APCP a las células HCT 116, inhibió casi totalmente la hidrólisis de AMP, obteniéndose 5% de Ado en los sobrenadantes (Figura 8).

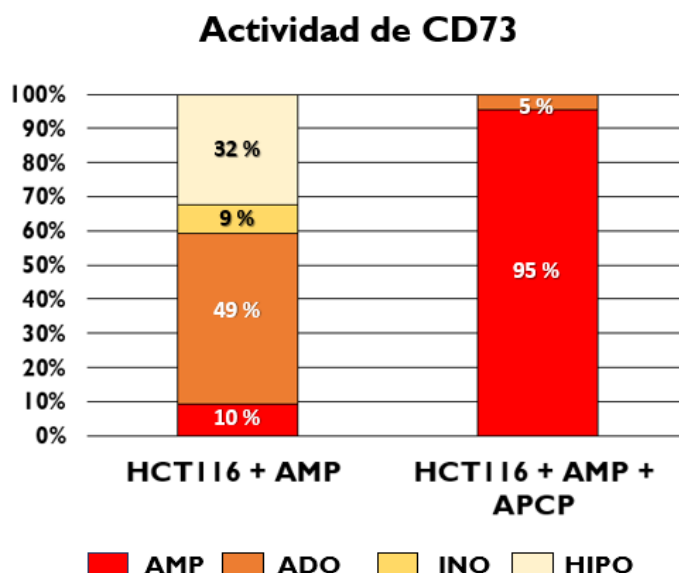


Figura 8. Productos de la hidrólisis de AMP llevados a cabo por las células HCT 116 de CCR a través de actividad funcional de la ectonucleotidasa CD73. Para analizar la actividad funcional de CD73 en las células HCT 116, 1×10^6 células fueron incubadas a 37°C en presencia de 5 mM de AMP y en presencia o ausencia de 5mM de APCP, inhibidor de la ectonucleotidasa CD73. Después de 5 h, los productos de la hidrólisis fueron separados por CCF y analizados mediante densitometría usando el software ImageJ. AMP (barra roja), Ado (barra naranja), INO (barra amarilla), Hipo (barra beige).

Para determinar la actividad de ADA, 1×10^6 células HCT 116 fueron incubadas en presencia de 5 mM de Ado. Para inhibir la actividad de ADA se adicionó 1mM de EHNA, un inhibidor específico de ADA. Después de 5 h de incubación, las células HCT 116 fueron capaces de desaminar aproximadamente el 60% de Ado. Los productos detectados en el sobrenadante correspondieron a Ado (40%), INO (39%) e Hipo (21%). La adición de EHNA a las células HCT 116, inhibió cerca del 95% la capacidad de estas células para desaminar a la Ado, ya

que aproximadamente el 5% de los productos resultantes correspondieron a INO (2.5%) e Hipo (2.5%) (Figura 9).

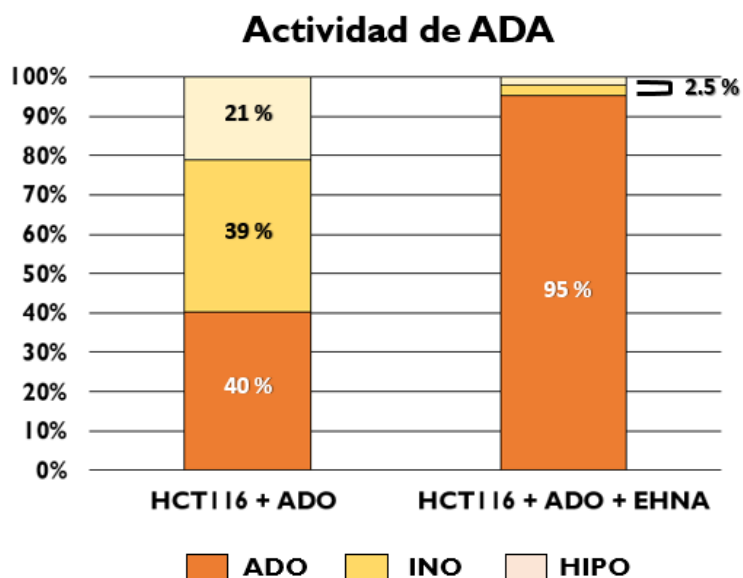


Figura 9. Productos de la desaminación de Ado llevada a cabo por las células HCT 116 de CCR a través de actividad funcional de Adenosina Desaminasa. Para analizar la actividad funcional de ADA en las células HCT 116, 1×10^6 células fueron incubadas a 37°C en presencia de 5 mM de Ado y en presencia o ausencia de 1mM de EHNA, inhibidor de ADA. Después de 5 h, los productos de la desaminación fueron separados por CCF y analizados mediante densitometría usando el software ImageJ. Ado (barra naranja), INO (barra amarilla), HIPO (barra beige).

Discusión

A través de la vía adenosinérgica, el ATP que se encuentra en el microambiente tumoral en grandes cantidades ($>50 \mu\text{M}$), es hidrolizado a Ado por la actividad funcional de las ectonucleotidasas de superficie celular: CD39, la cual hidroliza ATP y ADP en AMP y CD73 que hidroliza AMP en Ado. Se ha reportado que una gran cantidad de tumores malignos utilizan esta vía para inhibir las respuestas inmunitarias antitumorales (Bahreyni, *et al.*, 2018; Robson, *et al.*, 2006; Zimmermann, *et al.*, 2012), lo cual ha llamado a proponer a las ectonucleotidasas CD39 y CD73 como blancos terapéuticos para revitalizar la inmunidad antitumoral y erradicar a las células tumorales (Allard *et al.*, 2016). En el caso particular de CCR, se ha reportado que la expresión de CD73 en el tumor se asocia significativamente con el estadio clínico del mismo y con el riesgo de desarrollar metástasis a distancia (Yano *et al.*, 2003; Yano, 2004; Aerts *et al.*, 2011). Este fenómeno también se ha relacionado con menor infiltración de linfocitos T CD8⁺ CD45⁺ en el sitio del tumor, lo cual se ha logrado revertir tras la aplicación de anticuerpos terapéuticos anti-CD73 a los pacientes (Yun-Shan, *et al.*, 2023), sugiriendo entonces, la relevancia de esta vía en la regulación de la respuesta inmune antitumoral en CCR. Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la expresión y actividad funcional de moléculas participantes en la vía adenosinérgica en CCR, en este estudio se analizó la expresión de las enzimas CD39, CD73, ADA y de los receptores de Ado (A1, A2A, A2B y A3), así como la actividad funcional de las enzimas CD39, CD73 y ADA en la línea celular HCT 116 de CCR, la cual ha sido utilizada en diversos estudios biomédicos relacionados con la proliferación, tumorigenicidad, metástasis y resistencia a fármacos, entre otros (Rajput, *et al.*, 2008; Pengxi, *et al.*, 2016; Kaeser, M., *et al.*, 2004).

Las células HCT 116 presentaron una expresión distinta de las enzimas CD39, CD73 y ADA, dado que los contenidos de estas enzimas de manera intracelular se encontraron en una mayor proporción respecto a los detectados en la membrana celular. En el caso de CD39, a pesar de observar muy bajos niveles de expresión de CD39 en la membrana de las células HCT 116, éstas fueron capaces de hidrolizar de manera eficiente el ATP (5 mM) adicionado al cultivo celular, después de 5 h el 80% de este nucleótido fue hidrolizado a ADP (65%) y AMP (15%). No obstante, estas células no fueron eficaces para hidrolizar eficientemente al ADP adicionado a los cultivos, probablemente debido a la diferencia en las presentaciones de las

sales de ATP (Mg) y ADP (Na), en donde se sabe que la actividad de la enzima CD39 es óptima en presencia de Mg (Wang, *et al.*, 1996). Por otro lado, las células HCT 116, también hidrolizaron de manera eficiente al AMP suministrado a los cultivos, el 90% de este nucleótido fue hidrolizado a Ado (50%), INO (10%) e Hipo (30%). Es importante mencionar que la actividad hidrolítica de las enzimas CD39 y CD73 en las células HCT 116 fue corroborada por la adición de los inhibidores específicos, POM-1 y APCP, respectivamente, quienes inhibieron en más del 80% y 90% la hidrólisis de ATP y AMP, respectivamente. Por otra parte, también observamos una expresión menor de ADA en la membrana celular respecto a la detectada de manera intracelular cuando las células HCT 116 fueron permeadas. De hecho, la obtención de INO, como resultado de la hidrólisis de AMP, sugirió la presencia de ADA en las células HCT 116. La actividad de ADA en las células HCT 116 cultivadas con Ado fue corroborada al detectar a INO como producto de la desaminación de Ado. Además, también se detectó Hipo, el cual es un producto de la catálisis de INO a través de la actividad de la PNP, cuya expresión será importante de analizar en estudios posteriores, puesto que la presencia de esta enzima es fundamental en la recuperación de las purinas, reciclaje de nucleósidos y biosíntesis de nucleótidos, que son esenciales en la proliferación de las células tumorales (Camici, M., *et al.*, 2019). La alta expresión y actividad de ADA en las células tumorales se ha relacionado con su capacidad para sobrevivir ante altas concentraciones de Ado en su entorno, debido a la capacidad de esta enzima para desaminar a este nucleósido y convertirlo en INO, cuya señalización a través de los receptores de Ado es muy baja (Nakajima, *et al.*, 2015; Monroy-Mora, *et al.*, 2022). En nuestro estudio observamos que la adición de EHNA a los cultivos de HCT 116 inhibió en más del 90% la conversión de Ado en INO e Hipo, lo cual sería interesante para evaluar en estudios posteriores la propiedad que le puede conferir esta enzima a las células HCT 116 para sobrevivir en condiciones de altas concentraciones de Ado, tal como ocurre en sitios hipóxicos en los tumores, en los cuales las ectoenzimas CD39 y CD73 se encuentran sobre-expresadas (Decking *et al.*, 1996; Amirhossein, *et al.*, 2017).

La INO es un metabolito de la Ado que es producida por la participación de la enzima ADA, la cual está presente tanto en la superficie celular como intracelular y se asocia con CD26, que es una glicoproteína de superficie con actividad IV dipeptidil peptidasa, CD26 sirve como una proteína de enlace para la ADA extracelular, la presencia del complejo CD26/ADA

en la superficie extracelular disminuye los niveles de Ado al convertirlos en INO, de igual forma, la Ado funge un papel como factor tumorigénico en el CCR, ya que controla la respuesta inmune antitumoral inhibiendo la activación y proliferación de células importantes en la respuesta inmune innata y adaptativa (Leona., 2018; Yang, *et al.*, 2020).

Por otro lado, la actividad de Ado depende exclusivamente de la interacción con cuatro subtipos de receptores heterodiméricos (A1, A2A, A2B y A3) acoplados a proteína G, y dispuestos en la superficie celular. La línea celular HCT 116 expresó los 4 receptores de Ado, no obstante, se encontró diferencia en la expresión entre ellos, particularmente los receptores A1 y A2B mostraron menor expresión que la detectada para los receptores A2A y A3. La señalización de los AR suele ser citoprotectora en varios tejidos bajo una amplia variedad de condiciones fisiológicas (Bertil, *et al.*, 2011; Mohammad, *et al.*, 2017). La señalización de Ado a través de A1R y A3R están reguladas por miembros Gi y Go de la familia de proteínas G y disminuyen los niveles de AMPc. Por otro lado, los receptores A2A y A2B estimulan la adenilil ciclase a través de la proteína Gs y aumentan el AMPc (Bertil, *et al.*, 2011). La evidencia de la investigación respalda que la activación de los receptores de Ado mediante agonistas o antagonistas específicos puede modular la proliferación de células tumorales (Liu *et al.*, 2013; Valverde, *et al.*, 2015; Nishikawa *et al.*, 2014; Adeegbe, *et al.*, 2013). Se ha reportado que A1, desempeña una actividad antitumoral a través de células microgliales asociadas a tumores para prevenir el desarrollo de glioblastomas; mientras que agonistas del receptor A3 pueden favorecer el crecimiento y metástasis tumoral (Koszalka, *et al.*, 2016). Los A2A y A2B están asociados con la inhibición de la respuesta inmune, mediante la inhibición de la citotoxicidad de las células asesinas naturales, la actividad de las células T y la actividad CD4+/CD8+ anti-tumor, a través de la producción de factores inmunosupresores y promotores de la angiogénesis tumoral (Kasama, *et al.*, 2015; Koszalka, *et al.*, 2016). En el caso particular de la línea celular HCT 116 se ha demostrado que la señalización a través del receptor A2A incrementa la supervivencia y disminuye la apoptosis (Sakowicz-Burkiewicz, *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha observado que la señalización a través del receptor A3, las células HCT 116 disminuyen la proliferación, aumentan la apoptosis y disminuyen el crecimiento tumoral (Ohana, *et al.*, 2003; Polycarpou, *et al.*, 2013), las células HCT 116 son capaces de hidrolizar de manera eficiente a los nucleótidos ATP y AMP para generar Ado. No obstante, la baja expresión de los receptores A2A y A3 respecto a la

expresión encontrada en los receptores A1 y A2B, parece estar relacionada con un mecanismo protector de estas células en respuesta a la señalización de Ado. En este sentido será importante analizar a mayor profundidad la participación de la actividad de la enzima ADA para modular los niveles de Ado que interaccionan con los receptores de Ado.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que las células HCT 116 de CCR expresan las ectoenzimas CD39 y CD73, así como ADA tanto en membrana como de manera intracelular, para generar Ado a partir de la hidrólisis de ATP y AMP y desaminar Ado a INO, respectivamente. La detección de Hipo en los sobrenadantes de las células HCT 116, sugiere la presencia de la enzima PNP en estas células. Finalmente, la expresión diferencial de los receptores A2A y A3, encontrados en menor proporción que los receptores A1 y A2B, sugiere un mecanismo protector de estas células tumorales ante la señalización de Ado. En consecuencia, la línea celular HCT 116 representa un modelo interesante para estudiar la participación de la vía adenosinérgica en las actividades protumorales de las células de CCR, y para evaluar diferentes fármacos dirigidos a las moléculas de participantes en esta vía, con miras a establecer protocolos de terapia contra el CCR.

Referencias

- Adeegbe, D., Nishikawa, H. (2013). Natural and induced T regu-atory cells in cancer. *Front Immunol*; 4:1-14
- Aerts, I., Martin, J-J., De Deyn, P., Van Ginniken, C., Van Ostade, X., Kockx, M., Dua, G., Slegers, H. (2011). The expression of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (E-NPP1) is correlated with astrocytic tumor grade. *Clin Neurol Neurosurg* 113:224–9. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2010.11.018>
- Aldrich, M., Blackburn, M., Kellems, R. (2000). The importance of Adenosine Desaminase for Lymphocyte Development and Function. *Biochemical and Biophysycal Research Communications*. Vol. 272. N°2. Pp. 311-315.
- Allard, B., Turcotte, M., Stagg, J. (2012). CD73-Generated Adenosine: Orchestrating the Tumor-Stroma Interplay to Promote Cancer Growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23125525/>
- Amirohossein, S., Samani, E., Farzad, R., Reza, K., Younes, T., Behnam-Rassouli, R., Khazaei, M., Ryzhikov, M., Parizadeh, M., Hasanzadeh, M., Avan, A., Seyed, M. (2017). Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cáncer. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 233. N°4. Pp. 2715-2722.
- Antonioli, L., Colucci, R., La Motta, C., Tuccori, M., Awwad, O., Da Settimo, F., Fornai, M. (2012). Adenosina Desaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. *Current Drug Targets*. Vol. 13. N°6. Pp. 842-862.
- Antonioli, L., Csóka, B., Fornai, M., Colucci, R., Kókai, E., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2014). Adenosine and inflammation: What's new on the horizon? *DrugDiscovery Today*,19(8), 1051–1068.<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.010>.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E., Haskó, G. (2013). CD39 y CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 19:355-367.
- Ayuso, M., Gravalos, C. (2007). Diagnóstico y Tratamiento Carcinoma Colorrectal. Fundación Medica Mutua Madrileña. Disponible en:

https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_carcinoma_colorrectal.pdf

- Bahreyni, A., Samani, S., Ghorbani, E. (2018). Adenosina: un mediador endógeno en la patogenicia del cáncer ginecológico. *J Cell Physiol.* 233 (4): 2715 - 2722. doi:10.1002/jcp.26056
- Ballinger, A., Anggiansah, C. (2007). Revisión clínica. Actualización en cáncer colorrectal. *BMJ.* Vol. 335 Pp. 715-8.
- Bertil, B., Fredholm, A., Ijzerman, K., Linden, J., Muller, C. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors- An Update. *Pharmacological Reviews.* Vol. 63. N°1. Pp.1-34.
- Blay, J., White, T., Hoskin, D. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Research*, 57(13), 2602–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205063>
- Borros, A. (2020). Tumor microenvironment. *Medicina*; 56(1):15.
- Bours, M., Swennen E., Di Virgilio F., Cronstein B., Dagnelie P. (2006). Adenosina 5'-trifosfato y adenosina como moléculas de señalización endógenas en inmunidad e inflamación. *Pharmacol Ther.* 112 (2): 358 - 404 doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
- Bowen, W., Srivastava, A., Batra, L., Barsoumian, H., Shirwan H. (2018). Current challenges for cancer vaccine adjuvant development. *Expert Rev Vaccines*; 17(3):207-215. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6093214/pdf/nihms-1500864.pdf>
- Caja, L., Dituri, F., Mancarella, S., Caballero-Diaz, D., Moustakas, A., Giannelli, G. (2018). TGF- β and the tissue microenvironment: relevance in fibrosis and cancer. *Int J Mol Sci.*; 19(5): 1294. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983604/>
- Calva, M., Acevedo, M. (2009). Revisión y actualización general en cáncer colorrectal. *Anales de Radiología de México.* Vol. 1., Pp. 99 -115.

- Camici, M., Garcia-Gil, M., Pesì, R., Allegrini, S., Grazia, M. (2019). Purine-Metabolising Enzymes and Apoptosis in Cancer. *Journals, Cancers*. Vol. 11. N°9.
- Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. Tabi, Z. (2011). Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *The Journal of Immunology*. 187:676-683.
- Decking, U., Schlieper, G., Kroll, K., Schrader, J. (1997). Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release, *Circ. Res.* 81: 154–164.
- Eales K., Hollinshead, K., Tennant, D. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Review. Oncogenesis*. 5: 1-8
- Eroglu, A., Canbolat, O., Demirci, S., Kocaoglu, H., Eryavuz, Y., Akgül, H. (2000). Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol*. Vol. 17. Pp. 319–24.
- Fredholm, B., AP, I, Jacobson, K., Klotz K., Linden, J. (2001). Unión Internacional de Farmacología. XXV. Nomenclatura y clasificación de los receptores de adenosina. *Pharmacol Rev*, 53 (4), 527-552. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734617>
- Gakis, C. (1996). Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *The European respiratory journal*, 9(4), 632–633. <https://doi.org/10.1183/09031936.96.09040632>
- García-Rocha, R., Monroy-García, A., Carrera-Martínez, M., Hernández-Montes, J., Don-López, C. A., Weiss-Steider, B., Monroy-Mora, K. A., Ponce-Chavero, M. L. Á., Montesinos-Montesinos, J. J., Escobar-Sánchez, M. L., Castillo, G. M., Chacón-Salinas, R., Vallejo-Castillo, L., Pérez-Tapia, S. M., & Mora-García, M. L. (2022). Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production. *Cell biochemistry and function*, 40(7), 760–772. <https://doi.org/10.1002/cbf.3742>
- García-Rocha, R., Monroy-García, A., Hernández-Montes, J., Weiss-Steider, B., Gutiérrez-Serrano, V. Fuentes-Castañeda, M., Ávila-Ibarra, L., Don-López, C., Torres-Pineda, B., Mora-García, M. (2019). Las células de cáncer de cuello uterino producen TGF- β 1 a

- través de la vía CD73-adenosina y mantienen la expresión de CD73 a través de la actividad autocrina de TGF- β 1. *Citocina*, Volumen 118; Páginas 71-79, ISSN 1043-4666, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.018>.
- Giraldo, N., Becht, E., Vano, Y., Sautès-Fridman, C., Fridman, W. (2015). The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy. *Virchows Archiv*; 467(2): 127-135. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077464/>
- Góngora, J., Moo-Puc, J., Arankowsky, G., Alvarez, F., Pineda, J., Heredia, F., Bata-García, J. (2005). La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev. Biomed.* Vol. 16. N°1. Pp. 99-111.
- González, B. (2020). Efecto de TGF β , IFN α , TNF α YEGF en la expresión de CD73 en la línea celular de cáncer de mama de HCC 1806. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Mex. D.F.
- Hajiahmadi, S., Panjehpour, M., Aghaei, M, Shabani M. (2015). Activation of A2B adenosine receptor regulates ovarian cancer cell growth: involvement of Bax/Bcl-2 and Caspase-3. *Biochem. Cell Biol.* Volumen. 93. Teran. Iran.
- Han, Y., Zhang, Y., Jia, T., & Sun, Y. (2015). Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumor Biology*, 36(3), 1385–1394. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3230-8>
- Haskó, G., Cronstein, B. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, 25(1), 33–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698282>
- Haslam, A., Robb, SO., Hebert, JR., Huang, H., Withth, MD., Shivappa, N., Ebell, MH. (2017). La asociación entre las puntuaciones del Índice Inflamatorio Dietético y la prevalencia del adenoma colorrectal. *Salud Pública Nutra*.
- Holmes, K., Li, O., Anharad, T., Cross M. (2007). Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular. Estructura, función, señalización intracelular e inhibición terapéutica. Volumen

19. Numero 10. Paginas: 2003-2013. Gales. UK. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.013>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (05 de febrero de 2023). *En México cada Año se Diagnostican Cerca de 15 Mil Nuevos Casos de Personas con Cáncer de Colon*, IMSS, México; Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201903/070>
- Instituto Nacional del Cáncer. (05 de febrero de 2023). *¿Qué es el cáncer?*, NIH, Estados Unidos; Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Instituto Nacional del Cáncer. (16 de febrero de 2023). Muertes a causa del cáncer colorrectal, NIH, Estados Unidos; Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/acerca/estadisticas>
- Jacobo, P., Huerta, J., Cravioto, P. (2017). Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*; 26(2): 56-63. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2017/al172e.pdf.n>
- Kaesler, M., Pebernard, S., Iggo, R. (2004). Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells. *Genes: Structure and Regulation*. Vol. 279. N°9. Pp. 7598-7605.
- Kanterman, J., Sade-Feldman, M., & Baniyash, M. (2012). New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Seminars in Cancer Biology*, 22(4), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.02.008>.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557–63. <https://doi.org/10.1038/nature06188>
- Kasama, H., Sakamoto, Y., Kasamatsu, A., Okamoto, A., Koyama, T., Minikawa, Y., Ogawara, K., Yokoe, H., Shiiba, M., Tanzawa, H., Uzawa, K. (2015). Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. *BMC Cancer*. Vol.15. N°563.
- Kasama, H., Sakamoto, Y., Kasamatsu, A., Okamoto, A., Koyama, T., Minakawa, Y., Uzawa, K. (2015). Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. *BMC CANCER*. Vol. 15. No. 1. Pp. 1 – 12. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1577-2>

- Khoo, H. (1996). Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa, *Cancer Lett.* 106 (1), 17–21.
- Koszalka, P., Golunska, M., Urban, A., Stasiłojc, G., Stanisławowski, M., Majewski, M., Andrzej, C., Składanowski, J. (2016). Specific Activation of A3, A2A and A1 Adenosine Receptors in CD73-Knockout Mice Affects B16F10 Melanoma Growth, Neovascularization, Angiogenesis and Macrophage Infiltration. *Plos One*. Vol. 11. N°1.
- Leone, R. (2018). Emens L.A. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*; 6:57.
- Linden, J. (2001). Enfoque molecular de los receptores de adenosina: mecanismos de protección tisular mediados por receptores. *Anu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 775- 787.doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.775
- Liu, G., Richards, S., Olsson, R., Mullane, K., Walsh, R., Downey, J. (2014). Evidencia de que el receptor de adenosina A3 puede mediar la protección brindada por el preconditionamiento en el corazón de conejo aislado. *Cardiovascular. Res.* Volumen. 28. Numero. 7. Paginas: 1057–1061. doi: 10.1093/cvr/28.7.1057.
- Liu, W., Liu, J., Wu, J., Zhang, L., Liu, F., Yin, L., Zhang, M., Yu, B. (2013). Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells vía Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway. *PLoS One.* 8, e55487.
- López, K. (2013). Actualizaciones en el diagnóstico y tratamiento quirúrgico de los pacientes con cáncer de colon. *Revista Médica Clínica Las Condes.* Vol. 24. N° 4. Pp. 645-653. DOI: 10.1016/S0716-8640(13)70203-7
- Lutty, G., Scott, D. (2003). Desarrollo vascular de la retina y retinopatía inducida por oxígeno: el papel de la adenosina. *Progresos en la investigación de la retina y los ojos.* Volumen. 22. Numero. 1. Pagina: 95-111 Baltimore. EE.UU. doi: [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(02\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(02)00058-7)
- Madi, L. (2004). The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition, *Clin. Cancer Res.* 10 (13). 4472–4479.

- Memorial Sloan Kettering Cancer Center. (06 de febrero del 2023). Estadios del Cancer de Colon. MSKCC. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_carcinoma_colorrectal.pdf
- Meriño, M., Briones, L., Palma, V., Escudero, C. (2017). Rol de los receptores de adenosina en la interacción adipocito-macrófago durante la obesidad. Laboratorio de Fisiología Vascular, Grupo de Investigación en Angiogénesis Tumoral (GIANT), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad del Bio Bio, Chillán, Chile. DOI: 10.1016/j.endinu.2017.03.010
- Mohammad, H., Sahar, R., Hojjat-Farsangi, M., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F. (2017). Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cáncer. Journal of Cellular Physiology. Vol. 233. N° 3. Pp. 2032-2057.
- Mølck, C., Ryall, J., Failla, L., Coates, J., Pascussi, J., Heath, J., Stewart, G., Hollande, F. (2019). The A2b adenosine receptor antagonist PSB-603 promotes oxidative phosphorylation and ROS production in colorectal cancer cells via adenosine receptor-independent mechanism, Cancer Lett. 383 (1). 135–143.
- Molina, G. (2019). Efecto de TGF- β , IFN- β , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de Cáncer cérvico-uterino. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX.
- Monroy-Mora, A. (2019). Efecto de la inhibición de adenosina desaminasa (ADA) en la proliferación y viabilidad de células tumorales de cáncer cervico-uterino. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, CDMX.
- Monroy-Mora, A., Mora-García, M., Monroy-Mora, K., Hernández-Montes, J., García-Rocha, R., Don-López, A., Weiss-Steider, B., Montesinos-Montesinos, J., Monroy-García, A. (2022). Inhibition of adenosine deaminase activity reverses resistance to the cytotoxic effect of high adenosine levels in cervical cancer cells. Cytokine. Vol. 158. N°1.

- Muro, M., Campillo, J., Alvarez-lopez, R. (2007). Factores Inmunologicos y cáncer. Servicio de Inmunologia, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia España; SN: 978-84-691-1265-3.
- Nakajima, Y., Kanno, T., Nagaya, T., Kuribayashi, K., Nakano, T., Gotoh, A., Nishizaki, T. (2015). Adenosine deaminase inhibitor EHNA exhibits a potent anticancer effect against malignant pleural mesothelioma. *Cell Physiol Biochem*. Vol. 35. N°1. Pp. 51-60.
- Nieman, K. M., Romero, I. L., Van Houten, B., & Lengyel, E. (2013). Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(10), 1533–1541. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.010>.
- Niitsu, N., Yamaguchi, Y., Umeda, M., Honma, Y. (1998). Human monocytoid leukemia cells are highly sensitive to apoptosis induced by 2'-deoxycoformycin and 2'-deoxyadenosine: association with d ATP-dependent activation of caspase-3. *Bood*. Vol. 92. N°9. Pp. 3368-3375.
- Nikbakht, D., Valiani, A., Mardani, M., Zamani, R. (2016). Adenosine A1 receptor modification P53 expression and apoptosis in breast cancer cell line MCf-7. *Bratisl med j*. Vol. 117. No. 4 Pp. 241 – 246. Disponible en: <https://doi.org/10.4149/BLL>
- Nishikawa, H., Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*;27:1-7.
- Noh, J., Lee, I., Han, N., Kim, M., Min, Y., Lee, S., Yun, S., Kim, S., Park, T., Chung, H., Park, D., Lee, C. (2022). Additive Effect of CD73 Inhibitor in Colorectal Cancer Treatment With CDK4/6 Inhibitor Through Regulation of PD-L1. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. Vol. 14. No. 4. Pp. 769–788. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.07.005>
- Ohana, G., Bar-Yehuda, S., Arich, A., Madi, L., Dreznick, Z., Rath-Wolfson, L., Silberman, D., Slosman, G., Fishman, P. (2003). *BJC; Nature; British Journal of Cancer*. Vol. 89. N° 1. Pp. 1552-1558.

- Organización Panamericana de Salud. (05 de febrero de 2023). *Cáncer colorrectal*, OPS; Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11761:colorectal-cancer&Itemid=41765&lang=es#gsc.tab=0
- Panjehpour, M., & Karami-Tehrani, F. (2007). Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. *Oncology Research*, 16(12), 575–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351132>.
- Pengxi, Z., Dormir, Z., Dandan, S., Jing, H., Chong, H., Xue, Y., Bing, Z., Shanshan, Z., Zhipeng, H., Lixin, W, Li, Z. (2016). Inhibition of Growth and Metastasis of Colon Cancer by Delivering 5-Fluorouracil-loaded Pluronic P85 Copolymer Micelles. *Nature*. Vol. 6. N°. 208906.
- Pérez, K. (2012). Análisis funcional de la vía cd73 como mecanismo inmunosupresor de células estromales mesenquimales derivadas de neoplasias cervicales (Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular). Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México.
- Persma S J. 2011. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cáncer Microenvironment*, 4 (3), 361-375
- Pickup, M., Owens, P., Moses, H. (2017). TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin signaling and the tumor microenvironment. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 9(5):1-22. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28062564/>
- Pietilä, M., Ivaska, J., & Mani, S. A. (2016). Whom to blame for metastasis, the epithelial mesenchymal transition or the tumor microenvironment? *Cancer Letters*, 380(1), 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.12.033>.
- Polycarpou, E., Meira, L., Carrington, S., Tyrrell, E., Modjtahedi, H., Carew, M. (2013). Resveratrol 3-O-D-glucuronide and resveratrol 4'-O-D-glucuronide inhibit colon cancer cell growth: evidence for a role of A3 adenosine receptors, cyclin D1 depletion, and G1 cell cycle arrest. *Molecular, Nutrition y Food*. Vol. 57. N° 10. Pp. 1708-1717.

- Rajput, A., Dominguez, I., Rosa, R., Hoffman, R., Brattain, M., Wang, J. (2008). Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *Oncology/Endocrine*. Vol. 147. N°2. Pp. 276-281.
- Regateiro, F., Howie, D., Nolan, K., Agorogiannis, E., Greaves, D., Cobbold, S., Waldmann, H. (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *European journal of immunology*. Vol. 41. No. 10. Pp. 2955-2965.
- Robson, S., Seigny, J., Zimmermann, H. (2006). La familia E-NTPDasa de ectonucleotidasas: relaciones estructura-función e importancia fisiopatológica. *Señal Purinérgica*. 2 (2): 409 - 430. doi:10.1007/s11302-006-9003-5
- Rodríguez, Z., Jean-Louis, B., Lozada, G., Joubert, G., Pineda, J. (2015). Currently used knowledge about the recurrent colon cáncer. *Revista Medisan*, vol. 19. No. 4. Santiago de Cuba. Cuba.
- Saito, M., Yaguchi, T., Yasuda, Y., Nakano, T., Nishizaki, T. (2010). Adenosine suppresses CW2 human colonic Cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. *Cancer Letters*, 290(2). 211-5. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.09.011>.
- Sakowicz-Burkiewicz, M., Kitowska, A., Grden, M., Maciejewska, I., Szutowicz, A., Pawelczyk, T. (2013). Differential effect to adenosine receptor on growth of human colon cáncer HCT 116 and HT-29 cell lines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 533. N° 1-2. Pp. 47-54.
- Sanz, J., Gómez, A., Silva, A. (2021) El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función, *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, Volume 13, Issue 33, Pp. 932-1941, ISSN 0304-5412, <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.05.006>.
- Schroy, P. *et al.* (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 76: 201-209, PubMed: 8625092
- Schwab, M. (2016). Adenosine. In: *Encyclopedia of Cancer*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sitkovsky, M., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., Thiel, M. (2004). Physiological Control of Immune Response and Inflammatory Tissue Damage

- by Hypoxia-Inducible Factors and Adenosine A2A Receptors. Annual Review of Immunology. Vol. 22. No. 1. Pp. 657 – 682. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731>
- Tamura, K., Kanno, T., Fujita, Y., Gotoh, A., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2012). A (2a) adenosine receptor mediates HepG2 cell apoptosis by down regulating Bcl-X(L) expression and upregulating Bid expression. Journal of Cellular Biochemistry, 113(5), 1766–75. <https://doi.org/10.1002/jcb.24048>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. Gastroenterology, 138(6), 2101–2114.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>.
- Tsuchiya, A., & Nishizaki, T. (2015). Anticancer effect of adenosine on gastric cancer via diverse signaling pathways. World J Gastroenterol, 21(39), <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.10931>.
- Ungerer, J., Oosthuizen, H., Bissbort, S., Vermaak, W. (1992). Serum adenosine desaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clinical Chemistry*. Vol. 38. N° 7. Pp. 1322-1326.
- Vijayan, D., Young, A., Teng, M, Smyth, M. (2017). Regulating immunosuppressive adenosine in cancer. Nature Reviews Cancer, 17 (12), 709–724. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>
- Villegas, A., Ramirez, D. (2015). Treg cells in the immunoediting and inflammation associated with cancer; Rev. Fac. Med. (Méx.) vol.58 no.6 Ciudad de México.
- Wang, T., Guidotti, G. CD39 is an ecto- (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 271. N° 17. Pp. 9898-9901.
- Woodhouse, E., Amanatullah, D., Schetz, J, Liotta, L., Stracke, M., Clair T. (1998). El receptor de adenosina A1 media la motilidad en células de melanoma humano. Comunicaciones de Investigación Bioquímica y Biofísica. Volumen: 246, Páginas: 888-889. Maryland. EEUU. doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8714>
- Yang, D., Yaguchi, T., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2011). Adenosine activates AMPK to phosphorylate Bcl-XL responsible for mitochondrial damage and release in HuH-7 cells. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular

- Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 27(1), 71–8. <https://doi.org/10.1159/0003252007>
- Yang, R., Elsaadi, S., Misund, K., Abdollahi, P., Vandsemb, N., Moen S., Kusnierczyk, A., Slupphaug, G., Standal, T., Waage, A., Slørdahl, T., Rø, T., Rustad, E., Sundan, A., Hay, C., Cooper, Z., Schuller, A., Woessner, R., Borodovsky, A., Menu, E., Børset, M., Sponaas, A. (2020). La conversión de ATP en adenosina mediante CD39 y CD73 en el mieloma múltiple puede abordarse con éxito en conjunto con bloqueo del receptor de adenosina A2A. *J Inmunotro Cáncer*.
- Yano, Y. (2004). Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (ENPP3/CD203c/PD-Iβ/B10/gp130RB13-6) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Lett* 207:139–147. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.002>
- Yano, Y., Hayashi, Y., Sano, K., Shinmaru, H., Kuroda, Y., Yokozaki, H., Yoon, S., Kasuga, M. (2003). Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma. *Int J Mol Med* 12:763–6
- Yasuda, Y., Saito, M., Yamamura, T., Yaguchi, T., & Nishizaki, T. (2009). Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors. *Journal of Gastroenterology*, 44(1), 56–65. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2273-7>.
- Yegutkin, G. (2014). Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49:473-497.
- Young, A., Mittal, D., Stannard, K., Young, M., Teng, M., Allard, B., Smyth, M. (2014). Co-blockade of immune checkpoints and adenosine A2A receptor suppresses metastasis Arabella. *OncoImmunology*. Vol. 3. No. 10. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.958952>
- Yun-Shan, L., Shu-Fen, C., Chia-Y, C., Wei-Ze, H., Tsung-Wei, C., Tzu-Liang, W., Tao-Wei, K., Pei-Chen, Y., Ji-An, L., An-Cheng, S., Chao, C., Chih-Yang, K. (2023). Targeting

CD73 increases therapeutic response to immunogenic chemotherapy by promoting dendritic cell maturation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Vol. 72. N°1. Pp. 2283-2297.

Zhang, B., Song, B., Wang, X., Chang, X., Pang, T., Zang, X., Yin, K., Fang, G. (2015). The expression and clinical significance of CD73 molecule in human rectal adenocarcinoma. *Tumor. Biol.* Vol. 36. Pp. 5459 – 5466.

Zimmermann, H., Zebisch, M., Strater, N. (2012). Función celular y estructura molecular de las ecto-nucleotidasas. *Señal Purinérgica*. 8 (3): 437 – 502.doi:10.1007/s11302-012-9309-4.