



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.

Laboratorio de Inmunobiología.

“Efecto de la inhibición de adenosina deaminasa (ADA) en la proliferación y viabilidad de células tumorales de cáncer cérvico-uterino”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO PRESENTA:

ALBERTO MONROY MORA

Director de Tesis: Dr. Jorge Hernández Montes



Asesor Interno: Dra. Christian Azucena Don López

CD. MX.

Abril 2019



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
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **MONROY MORA ALBERTO**, con número de cuenta **310126104**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **09 de abril de 2019** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

VOCAL Dr. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

SECRETARIO Dra. CHRISTIAN AZUCENA DON LÓPEZ

SUPLENTE M. en C. ANA ROCÍO RIVERA MARTÍNEZ

SUPLENTE Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la inhibición de adenosina deaminasa (ADA) en la proliferación y viabilidad de células tumorales de cáncer cérvico-uterino.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 14 de marzo de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR

DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, clave IN225519: Estudio funcional de la vía CD73-Adenosina en la tumorigenicidad de células iniciadoras del cáncer en un modelo de células tumorales de cáncer cérvico-uterino similares a células troncales, y al Fondo de Investigación en Salud- IMSS (Proyectos 1314,1383 y 1613).

Monroy-Mora, A.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en donde me formé académicamente y viví gratas experiencias estos últimos años.

Al Dr. Alberto Monroy García y la Dra. María de Lourdes Mora García encargados de los laboratorios de Inmunología y Cáncer y de Inmunobiología respectivamente, quienes me permitieron realizar este trabajo en dichos lugares.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por sus enseñanzas, tiempo, paciencia y atención al elaborar este trabajo.

A la Dra. Christian Azucena Don López, por sus observaciones, tiempo, paciencia y atención en la elaboración de este trabajo.

A mi comité de sinodales conformado por la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez, la M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez y el Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por sus observaciones en el presente trabajo y las atenciones recibidas de su parte.

A mis compañeros de laboratorio Luis Ávila, Gabriela Molina, Ricardo Godínez, Ángeles Ponce, Katia Alhelí, Alberto Vázquez, David Toledo, Adriana Medina, Rosario García, Monserrat Carrera, Berenice Torres, Antonio Marín. También a Vianey Gutiérrez, Erick Hoyos, Alejandro Gamboa, Janeth Castro, Román Trejo, Alan Izalde e Isael García por compartir gratas experiencias durante mi estancia en los laboratorios.

Al Sr. José Guadalupe Lima y a la laboratorista María del Carmen Fuentes Castañeda por su apoyo técnico en los Laboratorios de Inmunobiología e Inmunología y Cáncer, respectivamente.

Monroy-Mora, A.

DEDICATORIAS

A mis padres María de Lourdes y Alberto por todo su cariño, apoyo, confianza y dedicación, son un ejemplo a seguir y estoy totalmente agradecido con ustedes. Sin ustedes no hubiera logrado lo que soy ahora.

A mi hermana Katia, por compartir momentos agradables y aguantar mis cambios de humor.

A mi abuelita Julia García por cuidarme desde la niñez y por todo su cariño.

A mis perros: Yopi y Lizzy que, en estos años me han hecho pasar infinidad de alegrías.

A mis compañeros y amigos de la carrera de biología: Arizaí Herrera, Román Trejo, David Ortega, Diego Morelos por su amistad y compañerismo.

A mis amigos: Brian Ocampo, Óscar Pérez, Ladislao Cruz, Octavio Martínez, Carolina Flores, Mario Hernández y Juan Carlos García, por todas las experiencias y alegrías vividas en varios momentos de mi vida. Gracias a ustedes se han transformado en momentos inolvidables.

*“Confiar en ti mismo no garantiza el éxito,
pero no hacerlo garantiza el fracaso”*

Albert Bandura

ÍNDICE

1. RESUMEN	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Cáncer	12
2.2. Incidencia y mortalidad por cáncer.....	13
2.3. El cáncer cérvico-uterino (CaCu)	14
2.4. Microambiente tumoral y sus componentes.....	15
2.5. Vía adenosinérgica en la supresión de la respuesta inmune antitumoral ...	16
2.6. ADA regula la supresión de la respuesta inmune	21
2.7. Actividad de ADA en células tumorales	22
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general.....	26
5.2. Objetivos particulares.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1. Cultivo celular.....	27
6.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PMBC)	27
6.3. Expresión de ADA en células tumorales de CaCu	28
6.4. Actividad enzimática de ADA	29
6.5. Efecto de EHNA en la proliferación de células de CaCu: determinación de la IC ₅₀ de EHNA	30
6.6. Efecto de ADO sobre la proliferación de células de CaCu inhibidas en ADA	31
6.7. Evaluación de apoptosis mediante Anexina-V/7-AAD.....	31
6.8. Determinación del estado del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con EHNA.....	32
6.9. Análisis estadístico	33
7. RESULTADOS	34
7.1. Presencia de ADA en las células tumorales de CaCu	34
7.2. Actividad enzimática de ADA-Mem en las líneas celulares de CaCu.....	36
7.3. EHNA disminuye la proliferación de células tumorales de CaCu.....	38
7.4. La inhibición de la actividad enzimática de ADA favorece la disminución de la proliferación de células tumorales de CaCu en presencia de ADO.....	41
7.5. EHNA induce apoptosis en las células tumorales de CaCu.....	42
7.6. EHNA induce cambios en el estado del potencial de membrana mitocondrial de las células tumorales de CaCu.....	46

8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS.....	54
11. REFERENCIAS.....	55
12. APÉNDICE	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características que adquieren las células tumorales durante el desarrollo tumoral.

Figura 2. Las células del microambiente tumoral.

Figura 3. Balance de ATP/ADO, durante la inflamación.

Figura 4. Vías extracelulares e intracelulares de la ADO.

Figura 5. Apoptosis inducida por ADO de células de cáncer gástrico.

Figura 6. Determinación de ADA en líneas celulares de CaCu y en PMBC.

Figura 7 . Actividad enzimática de ADA-Mem en líneas celulares de CaCu y PMBC.

Figura 8. Actividad enzimática de ADA en lisados de líneas celulares de CaCu y PMBC.

Figura 9 . Efecto de EHNA en la proliferación de células tumorales de CaCu y PMBC.

Figura 10. Valores de IC_{50} (μ M) de EHNA para inhibir la proliferación de células tumorales de CaCu.

Figura 11. EHNA disminuye la proliferación de células tumorales de CaCu en presencia de ADO.

Figura 12. EHNA induce apoptosis en las líneas celulares de CaCu.

Figura 13. EHNA afecta el estado del potencial de membrana mitocondrial en las células tumorales de CaCu.

GLOSARIO

AC: Adenil ciclasa	PMBC: Células mononucleares de sangre periférica
ADA: Adenosina deaminasa	DCs: Células dendríticas
ADA1: Adenosina deaminasa-1	ECM: Matriz extracelular
ADA2: Adenosina deaminasa-2	EHNA: Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil))
ADA-IC: ADA intracelular	FITC: Isotiocianato de fluoresceína
ADA-Mem: ADA en membrana	HPV: Virus de papiloma humano
ADGF: Factor de proliferación de ADA	INO: Inosina
ADO: Adenosina	ITS: Infecciones de transmisión sexual
ADP: Difosfato de adenosina	MDSC: Células supresoras de origen mielóide
AK: Adenosina quinasa	MSCs: Células troncales/estromales mesenquimales
AMP: Monofosfato de adenosina	NTs: Transportadores de nucleósidos equilibradores
AMPK: Proteína cinasa activada por AMP	PDE: Fosfodiesterasas
ARs: Receptores de adenosina	ROS: Especies reactivas de oxígeno
ATP: Trifosfato de adenosina	TME: Microambiente tumoral
CaCu: Cáncer cérvico-uterino	TMRM: Tetrametilrodamina
CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer	VB: Vaginosis bacteriana
cAMP: AMP cíclico; 3`5`-cAMP	7-AAD: 7-Aminoactinomycin D
CD26: Dipeptidil peptidasa-IV	
CD39: Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa- 1; E-NTPDasa1	
CD73: Ecto-5`-nucleotidasa; Ecto 5`NTasa	

1. RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa un gran problema de salud pública en México, siendo actualmente la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. En los últimos años se ha reportado que la vía adenosinérgica juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, ya sea favoreciendo la angiogénesis, la proliferación y metástasis de las células tumorales, o inhibiendo las funciones efectoras de la respuesta inmune a través de la generación de grandes cantidades de adenosina (ADO). Por otra parte, se sabe que los niveles de ADO son regulados de manera importante por la actividad de adenosina deaminasa (ADA), y se ha propuesto que la alta concentración de ADA en el microambiente tumoral (TME) puede ser un mecanismo compensatorio contra la acumulación tóxica de sus sustratos, debido al aumento del metabolismo de purina y pirimidina en tejidos cancerosos. Por tanto, ADA podría otorgar una ventaja selectiva a las células cancerosas para su sobrevivencia. En el presente estudio se determinó la expresión de la proteína ADA en las líneas celulares de CaCu: HeLa (HPV+), CaSki (HPV+) y C33A (HPV-), y se analizó la actividad funcional y la propiedad de esta enzima para proteger a estas células tumorales del potencial efecto citotóxico de ADO extracelular. Al detectar la expresión de ADA, se encontraron niveles mayores de ADA intracelular (ADA-IC) respecto a la encontrada en membrana (ADA-Mem) en las líneas celulares HeLa y C33A, así como en PMBC. Las tres líneas celulares de CaCu en cultivo fueron capaces de desaminar eficientemente ADO a INO. Asimismo, lisados de estas líneas celulares también mostraron alta capacidad para desaminar ADO, la cual correspondió con los contenidos de ADA-Total detectados en las células tumorales. La adición de (Hidrocloreuro de adenina(eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) (EHNA), un inhibidor específico con función irreversible de la actividad de ADA, inhibió completamente su actividad enzimática, y de la misma forma inhibió de manera dosis dependiente la proliferación de las células tumorales de CaCu. No obstante, las células tumorales C33A y las PMBC, quienes presentaron los más altos contenidos de ADA-Total, fueron más resistentes al tratamiento con EHNA. De manera interesante, el tratamiento de las células tumorales con la concentración respectiva de EHNA para inhibir la

Monroy-Mora, A.

proliferación celular en 50% (IC₅₀), indujo apoptosis y desestabilización de la membrana mitocondrial en un alto porcentaje de las células tratadas de manera comparable a Cisplatino, utilizado como control positivo, además de revertir de manera importante la resistencia de las células tumorales de CaCu al efecto citotóxico de altas concentraciones de ADO.

Estos resultados permiten sugerir que la presencia de ADA en las células tumorales de CaCu puede tener un efecto protector ante altas concentraciones de ADO contenidas en el TME, y que la inhibición de ADA puede ser una estrategia a seguir en el tratamiento de esta enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cáncer

El cáncer representa un amplio espectro de condiciones causadas por una falla de los controles que normalmente rigen la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (Delves *et al.*, 2015). Estas células anormales dan lugar a clonas, que al proliferar pueden generar un tumor o neoplasia de tamaño considerable (Kindt *et al.*, 2007).

Para que una célula dé origen a un tumor, primero debe acumular múltiples mutaciones, y éstas deben ocurrir en genes responsables del control de la multiplicación y la supervivencia celular (Parham, 2011). Las mutaciones que promueven el desarrollo del cáncer lo hacen por medio de la conversión de proto-oncogenes en oncogenes, o por medio de la inactivación de genes supresores de tumores (Alberts *et al.*, 2008).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg enumeraron las características fisiológicas que son propias de las células tumorales (Fig. 1). A estas características se les llamaron "*Hallmarks of cancer*" y son: la autosuficiencia en señales de proliferación, la insensibilidad a señales antiproliferativas, la evasión de la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la producción de nuevos vasos sanguíneos y la invasión a otros tejidos (metástasis) (Hanahan & Weinberg, 2000). En una revisión actualizada de su trabajo, propusieron dos nuevas características, que son la reprogramación del metabolismo y la evasión de la respuesta inmune antitumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

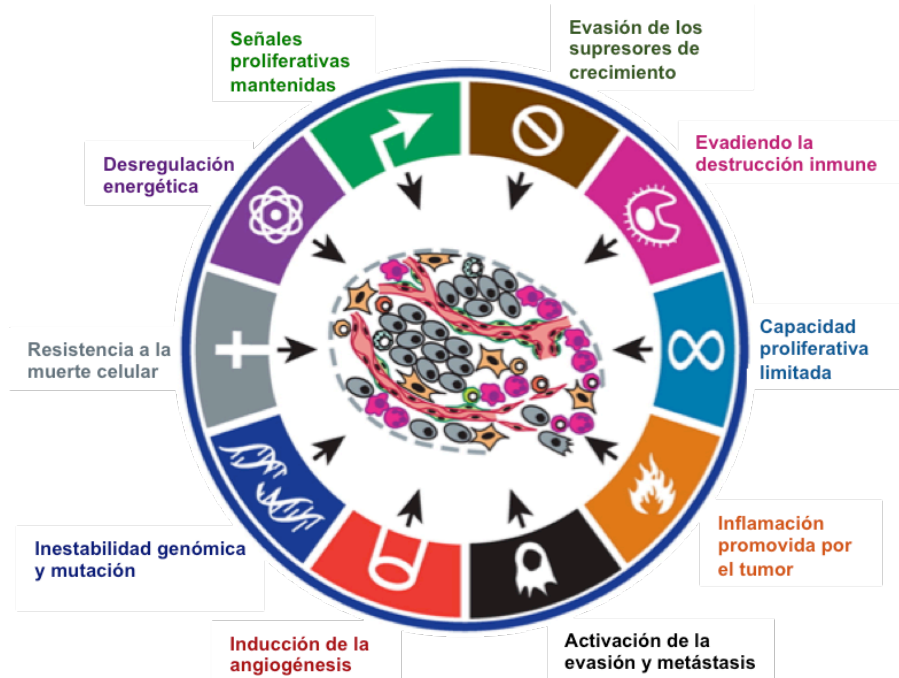


Figura 1. Características que adquieren las células tumorales durante el desarrollo tumoral. Tomado y modificado de Hanahan *et al.*, 2011.

2.2. Incidencia y mortalidad por cáncer

A nivel mundial en 2018, hubo 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y 9.6 millones de muertes debido al cáncer; de los cuales el 57% (8 millones) de los nuevos casos de cáncer y el 65% (5,3 millones) de las muertes por cáncer se presentaron en países en vías de desarrollo (Ferlay *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta la incidencia del cáncer en ambos sexos, el cáncer de pulmón es el de mayor frecuencia (11.6% del total de casos), seguido por el cáncer de mama femenino (11.6%), cáncer de próstata (7,1%) y cáncer colorrectal (6,1%). Mientras que entre los tipos de cáncer de mayor porcentaje de mortalidad destacan el cáncer de pulmón (18.4% del total de muertes por cáncer), cáncer colorrectal (9,2%), cáncer de estómago (8,2%) y cáncer de hígado (8,2%) (Bray *et al.*, 2018).

2.3. El cáncer cérvico-uterino (CaCu)

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es el cuarto cáncer de mayor incidencia y mortalidad en las mujeres, con un estimado de 569,847 nuevos casos y 311,365 muertes en 2018, de las cuales 85% (266,000) se registraron en países en vías de desarrollo, lo que representa el 7,5% de todas las muertes por cáncer en las mujeres (Bray *et al.*, 2018). En México, anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos, con una incidencia de 35.4 casos por cada 100,000 mujeres, y representa la segunda causa de muerte por tumores genitales, con una tasa de 11.3 muertes por cada 100,000 mujeres (Ervik *et al.*, 2016; INEGI, 2018).

El desarrollo de CaCu se asocia estrechamente (99.7%) con la infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo (HPV-AR, por sus siglas en inglés) (Walboomers *et al.*, 1999). Sin embargo, una infección por HPV-AR se considera una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del CaCu (Muñoz *et al.*, 2003). La progresión de la infección por HPV-AR en el CaCu está respaldada por otros cofactores que incluyen el uso a largo plazo de anticonceptivos orales, múltiples parejas sexuales, inicio de la actividad sexual a edad temprana, consumo de tabaco (Castellsagué & Muñoz, 2003), y factores biológicos, como la vaginosis bacteriana (VB) o las infecciones de transmisión sexual (ITS), los cuales alteran el microambiente vaginal y se han identificado como cofactores en la persistencia de una infección por HPV (Guo *et al.*, 2012; Vriend *et al.*, 2015; Clarke *et al.*, 2012). La gran mayoría de las mujeres infectadas por HPV-AR nunca desarrollan CaCu porque una respuesta inmune adecuada, es capaz de controlar la infección y prevenir su progresión a una lesión precancerosa (Insinga *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que la respuesta inmune contra antígenos de HPV eliminan a la mayoría de las infecciones y lesiones precursoras en las mujeres, el desarrollo del CaCu está inevitablemente ligado a la evasión y supresión de la respuesta inmune, así como a mecanismos intrínsecos de las células tumorales que favorecen su proliferación, invasión y metástasis (Doorbar *et al.*, 2012).

2.4. Microambiente tumoral y sus componentes

Las células cancerosas proporcionan el estímulo inicial crítico para el establecimiento del microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) y la formación de tumores, pero representan solo una parte menor de la masa tumoral general y dependen críticamente de los elementos restantes del TME para la supervivencia, proliferación y metástasis (Rashidian *et al.*, 2015). 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 tratamientos anteriores (Kalinski, 2017).

Los tipos de células no tumorigénicas más abundantes son los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs, por sus siglas en inglés) que residen en el estroma tumoral y participan activamente en la regulación del desarrollo tumoral (Han *et al.*, 2015). Además de los CAFs, otras células del estroma que residen en o son reclutadas para el TME, tales como las células troncales/estromales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) y adipocitos, pueden regular varias funciones en las células malignas durante el desarrollo del tumor (Karnoub *et al.*, 2007; Nieman *et al.*, 2013). Otro componente celular importante del TME son las células endoteliales, que participan en la vascularización del tumor, lo cual es esencial para proporcionar los nutrientes y el oxígeno necesario, y también para servir como una ruta para que las células cancerosas generen metástasis (Piëtila *et al.*, 2016).

Los tumores también atraen a menudo muchos componentes celulares del sistema inmune innato, como macrófagos, células supresoras de origen mieloide (MDSC, por sus siglas en inglés), monocitos, células NK y mastocitos, así como células componentes del sistema inmune adaptativo, como las células T citotóxicas, células T de memoria y diferentes tipos de células B. La actividad proinflamatoria es esencial para el desarrollo de tumores, y la inflamación crónica se ha relacionado con la formación de tumores. Por otro lado, la capacidad de las

células tumorales para evadir y suprimir el sistema inmune es esencial para su supervivencia y actividad metastásica (Fig. 2) (Dvorak, 1986; Kanterman *et al.*, 2012).

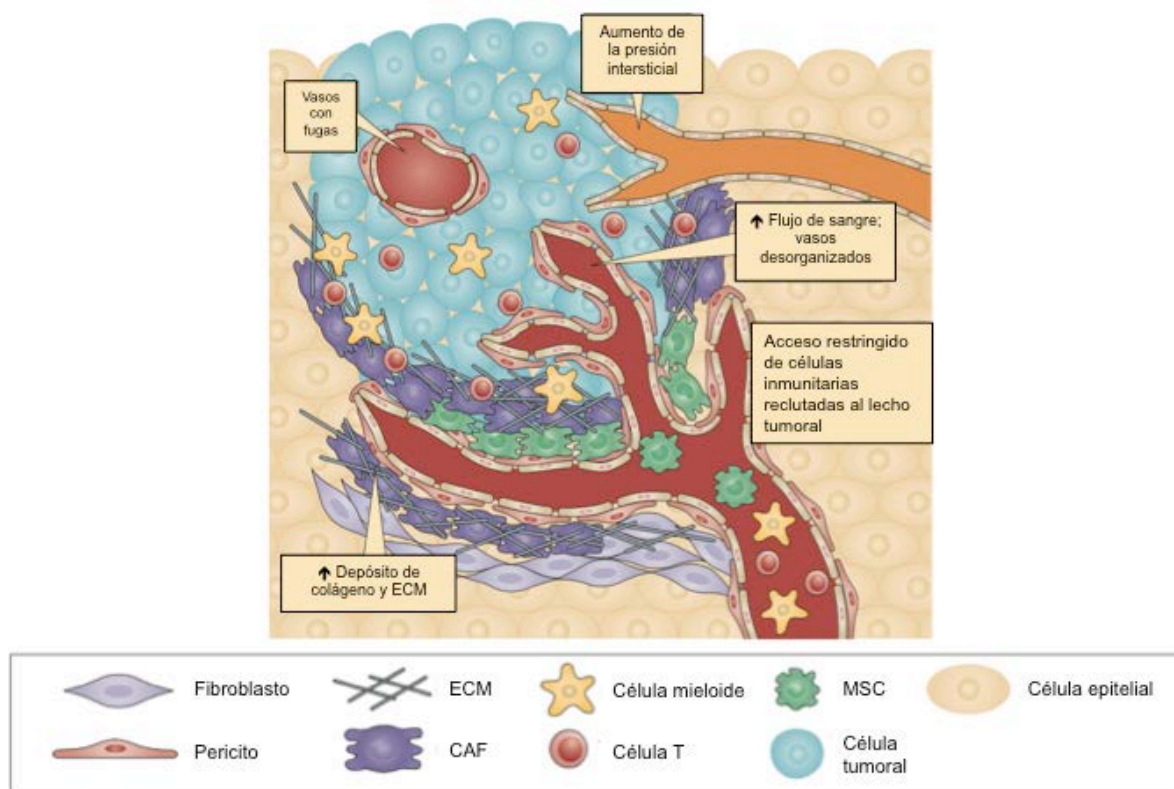


Figura 2. Las células del microambiente tumoral. La transformación neoplásica suele ir acompañada de la formación de un lecho tumoral y de profundas alteraciones en el tejido conectivo y el estroma circundantes, un proceso que culmina en el establecimiento de un microambiente tumoral (TME). ECM, matriz extracelular. CAF, fibroblastos asociados a cáncer. MSC, células estromales mesenquimales. **Tomado y modificado de Turley, 2015.**

2.5. Vía adenosinérgica en la supresión de la respuesta inmune antitumoral

Entre los mecanismos inmunosupresores que impiden la inmunidad antitumoral, se encuentra la activación del sistema purinérgico que conduce a la acumulación extracelular de adenosina (ADO), la cual es considerada como una estrategia potente y generalizada que los tumores explotan para escapar de la vigilancia inmunológica (Allard *et al.*, 2016).

El sistema purinérgico es un sistema seleccionado evolutivamente que depende de las funciones de las células inmunitarias, así como de las interacciones célula a célula, la secreción de citocinas y quimiocinas, la eliminación de antígenos de superficie, la eliminación de patógenos intracelulares y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Haskó *et al.*, 2008; Trautmann, 2009; Junger, 2011). Los mediadores purinérgicos, como el trifosfato de adenosina (ATP) y la ADO, se liberan en el espacio extracelular en respuesta a las perturbaciones metabólicas, y funcionan como señales externas que permiten regular las respuestas inmunitarias (Fredholm *et al.*, 2011).

En el TME, el ATP se libera abundantemente en el espacio extracelular debido a la muerte celular, el estrés celular, o mediante la exocitosis de vesículas intracelulares y la activación de los canales de panexina/conexina en las células inmunes y las células endoteliales (Pellegatti *et al.*, 2008; Kroemer *et al.*, 2013; Lazarowski, 2012). Una vez en el medio extracelular, las acciones proinflamatorias del ATP a través de la activación de los receptores purinérgicos P2X y P2Y expresados por las células inmunitarias tienen un papel crítico en el inicio de las respuestas inmunitarias anticancerígenas (Kroemer *et al.*, 2013; Aymeric *et al.*, 2010; Ghiringhelli *et al.*, 2009). Sin embargo, las señales potentes presentes en el TME pueden favorecer la degradación del ATP en ADO inmunosupresora y, por lo tanto, interrumpir la inmunidad antitumoral (Allard *et al.*, 2016; Sitkovsky *et al.*, 2014).

El ATP y la ADO extracelulares, tienen efectos opuestos en las respuestas de las células inmunitarias, actuando como un Yin-Yang. ATP y ADO mantienen el equilibrio entre los mediadores pro y anti-inflamatorios, respectivamente, en los tejidos para mantener la homeostasis. En situaciones patológicas como el cáncer, este equilibrio se altera a favor de la ADO con consecuencias que afectan la progresión y el resultado de la enfermedad (Fig. 3) (Whiteside, 2017).

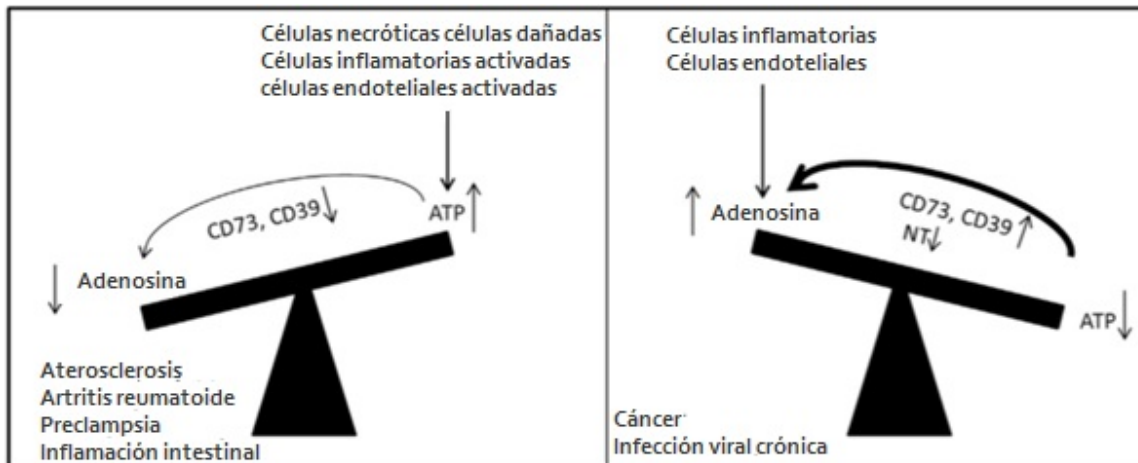


Figura 3. Balance de ATP/ADO, durante la inflamación. Durante la inflamación, altos niveles de ATP son producidos por la muerte o daño celular en el sitio de inflamación. Este ATP atrae células inflamatorias al sitio de inflamación, activándolas y potenciando su activación. Estas células comienzan a producir factores pro-inflamatorios, como ROS y citocinas, las cuales inhiben a las enzimas que desfosforilan al ATP, como CD39 y CD73. Eventualmente, en el sitio de inflamación, los niveles de ATP disminuyen mientras las células mueren, pero también facilitan la desfosforilación de ATP a ADO. Como consecuencia los niveles de ADO incrementan. Esta desfosforilación de ATP es facilitado por el ambiente hipóxico, el cual incrementa la actividad de CD39 y CD73. La hipoxia también disminuye los transportadores de nucleósidos (NT), por lo que la ADO extracelular se mantiene en concentraciones altas. La ADO con sus propiedades anti-inflamatorias facilitará la resolución o inhibición de la inflamación. **Tomado y modificado de Faas et al., 2017.**

La ADO es un nucleósido de purina endógeno compuesto de adenina unida a la ribosa, que desempeña un papel importante en diversos procesos fisiológicos (Muller-Heegele *et al.*, 2014). Este metabolito se produce tanto en sitios extracelulares, como intracelulares y sus niveles en los tejidos están calibrados por la actividad de varias enzimas clave (Whiteside, 2017).

La producción de ADO extracelular se realiza mediante la hidrólisis de ATP mediada por la actividad coordinada de CD39 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa- 1; E-NTPDasa1), que hidroliza el grupo fosfato del ATP y difosfato de adenosina (ADP), en una forma dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , para producir monofosfato de adenosina (AMP); y de CD73 (ecto-5'-nucleotidasa; Ecto 5'NTasa), que hidroliza el AMP para generar ADO (Fig. 3) (Antonioli *et al.*, 2013). La ADO puede ser producida por células tisulares, incluidas las células tumorales, o por células del sistema inmune, incluidas las Treg adaptativas o inducibles (iTreg) y las células MDSC, que expresan CD39 y CD73 (Mandapathil *et al.*, 2010; Deaglio *et al.*, 2007; Rhyzov *et al.*, 2011; Borsellino *et al.*, 2007). Por otra parte, la

ADO intracelular se produce por hidrólisis de cAMP (AMP cíclico; 3'5'-cAMP) mediante fosfodiesterasas (PDE), o de AMP a través de 5' nucleotidasa intracelular (CD73). Otra fuente de ADO intracelular resulta de la conversión de S-adenosil homocisteína en ADO por la actividad de la enzima citoplasmática S-adenosil homocisteína hidrolasa, la cual una vez producida es liberada al ambiente extracelular por medio de transportadores de nucleósidos equilibradores (NTs, por sus siglas en inglés) que residen en la membrana celular (Antonioli *et al.*, 2012; Montesinos *et al.*, 2002). Alternativamente, la ADO intracelular puede experimentar una desaminación rápida a través de la enzima adenosina deaminasa (ADA), que la convierte en inosina (INO) o puede entrar en una reserva de nucleótidos de purina a través de la actividad de la adenosina quinasa (AK) convirtiéndola en AMP (Antonioli *et al.*, 2014), siendo además esta última enzima la que controla los niveles intracelulares de ADO (Fig. 4) (Allard, B *et al.*, 2016).

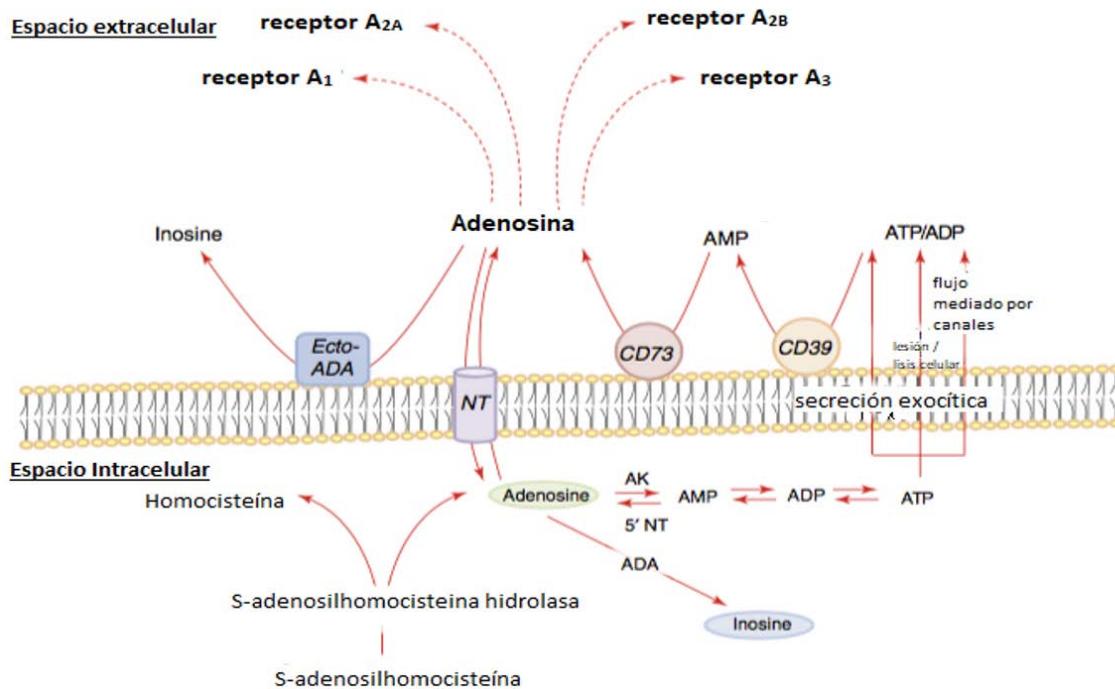


Figura 4. Vías extracelulares e intracelulares de la ADO. Diagrama esquemático que muestra los mecanismos que afinan la magnitud y/o la duración de la transmisión adenosinérgica. **Tomada y modificada de Antonioli *et al.*, 2014.**

En el entorno extracelular, la ADO puede activar localmente a 4 subtipos de receptores específicos acoplados a proteínas G (ARs: A1R, A2aR, A2bR y A3R), que se expresan en varios tipos de células, incluidas las células de la respuesta inmune. Al involucrar a estos receptores, ADO puede modular las respuestas mediadas por las células inmunitarias (Muller-Heegele *et al*, 2014). A1R y A2aR son receptores de alta afinidad (A1R más que A2aR), mientras que A2bR y A3R son receptores de baja afinidad. Al activar estos receptores, la ADO activa o desactiva la adenil ciclasa (AC) y modula los niveles y la actividad de cAMP. A2aR y A2bR estimulan la AC y aumentan los niveles de cAMP, mediando así la inhibición de la respuesta inmune. Mientras que A1R y A3R inhiben la AC y regulan a la baja el cAMP, lo que resulta en la activación de las respuestas inmunitarias (Ralevic y Burnstock, 1998).

El resultado general del alza de los niveles de ADO en el microambiente del tejido conduce a una regulación negativa de las respuestas inmunitarias. Esta inmunosupresión mediada por ADO normalmente representa un bucle autorregulador, que sirve para proteger al huésped de una activación inmunitaria excesiva y respuestas inflamatorias que podrían resultar en daños en los tejidos. Sin embargo, en un tumor, un exceso de ADO generado en el microentorno inflamatorio crónico suprime de manera indiscriminada todas las respuestas inmunitarias, incluidas las que atacan al tumor, por lo que permite el crecimiento del tumor y su escape del control inmunitario (Haskó *et al.*, 2004; Blay *et al.*, 1997).

Se ha reportado (Vaupel y Mayer, 2016), que las altas concentraciones de ADO (10-100 μ M) generadas en el TME hipóxico pueden ejercer efectos negativos importantes en el huésped a través de la señalización mediante los ARs. Por un lado, suprimiendo las células que participan en la respuesta inmune antitumoral como linfocitos T citotóxicos CD8+ (LTC), células NK, células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés), etc (Vaupel y Multhoff, 2016); y, por otro lado, favoreciendo la proliferación, invasión y metástasis de las células tumorales (Otha, 2016 & Antonioli *et al.*, 2016).

2.6. ADA regula la supresión de la respuesta inmune

ADA es una enzima clave involucrada en la ruta degradativa de la ADO a INO, y se describe generalmente, como una enzima monomérica pequeña (40 kDa) de 363 residuos aminoacídicos. En humanos, se han identificado diferentes isoformas de ADA designadas como adenosina deaminasa-1 (ADA1) y adenosina deaminasa-2 (ADA2) (Antonioli *et al.*, 2012).

La isoenzima ADA1 es la más conocida. Se expresa de forma ubicua en todos los tejidos y eritrocitos. Los niveles más altos de ADA1 se encuentran en el duodeno y en el sistema linfoide como los ganglios linfáticos, el bazo y el timo. La función de ADA1 es principalmente reducir los niveles intracelulares de ADO, que es tóxica para las células, especialmente para los linfocitos, y para proteger a las células de la apoptosis (Niitsu *et al.*, 1998; Aldrich *et al.*, 2000). ADA1, juega un papel crítico en la maduración de las células linfoides en los seres humanos, pues esta enzima es crucial en el desarrollo del sistema inmunológico, y en la función y regulación de las células inmunitarias (Blackburn y Kellems, 2005; Franco *et al.*, 2007; Ghaemi *et al.*, 2011). Además de participar en el catabolismo de la ADO, la ADA1 puede interactuar con la proteína transmembranal dipeptidil peptidasa-IV (CD26), para mantenerse en la superficie celular y actuar como una ecto-enzima. El complejo resultante está profundamente involucrado en la regulación de los niveles de ADO extracelular. Por otra parte, la interacción ADA/CD26 desempeña un papel importante en la población de linfocitos T CD4+ auxiliares/memoria, donde CD26 se expresa marcadamente (Ungerer *et al.*, 1992). Una vez formado, este complejo participa en la modulación de las señales coestimuladoras, lo que aumenta la proliferación y diferenciación de estas células inmunitarias (Cortés *et al.*, 2014).

La ADA2 se ha detectado solo en los eucariotas y organismos multicelulares, principalmente en el espacio extracelular, y se ha clasificado como un factor de crecimiento de ADA (ADGF), debido a su papel en el desarrollo del tejido (Iwaki-Egawa *et al.*, 2006). Además, la concentración de ADA2 en suero se correlaciona

con la progresión del crecimiento tumoral, lo que identifica a ADA2 como un biomarcador conveniente para monitorear el tratamiento de pacientes con cáncer (Roberts *et al.*, 2012). Se cree que los monocitos, macrófagos y DCs activadas en los sitios de inflamación y en el TME son la principal fuente de ADA2 en plasma y fluidos pleurales (Zavialov *et al.*, 2010).

2.7. Actividad de ADA en células tumorales

Se ha sugerido que ADO es capaz de inducir apoptosis en células tumorales, ya sea por vía intracelular o extracelular. En la vía intracelular la ADO es introducida al citoplasma a través de los NTs, en donde se convierte en AMP por la acción de la AK. El AMP producido es capaz de activar la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), quien es responsable de inducir apoptosis, tal como se ha reportado en células humanas de cáncer gástrico GT3-TKB y HGC-27 (Fig. 5A) y de hepatocarcinoma (HuH-7) y en células de mesotelioma pleural maligno (MPM) (Tsuchiya *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011; Nakajima *et al.*, 2015). Por la vía extracelular, se ha reportado que ADO induce apoptosis mediante su interacción con ARs. A través de la interacción con A1R en células de cáncer de colon humano (CW2) y células de astrocitoma de rata (RCR-1) (Saito *et al.*, 2010; Sai *et al.*, 2006); con A2aR en cáncer de colon humano (Caco-2) y células HepG2 (Yasuda *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2012); con A2bR en cáncer de mama (Panjehpur *et al.*, 2007); y con A3R, en células de cáncer gástrico MKN28 y MKN45 (Tsuchiya *et al.*, 2015) (Fig. 5B) y carcinoma hepatocelular (Bar-Yehuda *et al.*, 2008). La participación de ADO a través de la vía extrínseca para inducir muerte por apoptosis en células tumorales de varios tipos de cáncer ha sido dilucidada mediante el bloqueo farmacológico de los ARs, o de los NTs (Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que se sabe que ADO es tóxica, inclusive para las células tumorales, estudios recientes han reportado que la enzima ADA puede tener un efecto protector en las células tumorales ante la presencia de altas concentraciones de ADO intra o extracelular. Por ejemplo, la inhibición de ADA,

con el inhibidor específico EHNA, indujo apoptosis en varias líneas celulares de MPM y suprimió el crecimiento tumoral en ratones inoculados con células de MPM, sugiriendo que la inhibición de ADA fue esencial para la inducción de apoptosis en las células de MPM (Nakajima *et al.*, 2015).

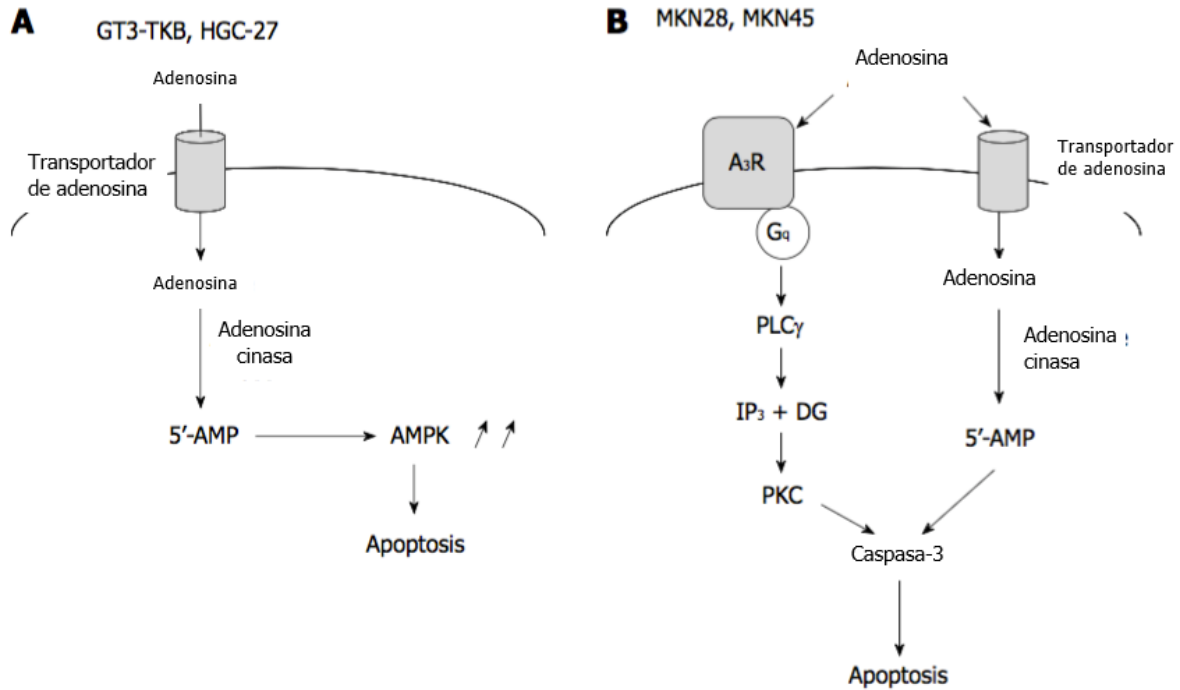


Figura 5. Apoptosis inducida por ADO de células de cáncer gástrico. A) Vía apoptótica inducida por adenosina para células GT3-TKB y HGC-27; **B)** Vía apoptótica inducida por adenosina para las células MKN28 y MKN45. Tomado de Tsuchiya *et al.*, 2015

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer representa un gran problema de salud pública a nivel mundial, siendo actualmente una de las principales causas de muerte, debido a que su desarrollo está inevitablemente ligado a la evasión y supresión de la respuesta inmune, así como a la proliferación, invasión y metástasis de las células tumorales. Por tanto, resulta importante enfocar estudios para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que favorecen estas señales distintivas del cáncer.

Recientemente se ha descrito que la generación de grandes cantidades de ADO a través de la vía adenosinérgica, es un evento que ocurre comúnmente en el TME para favorecer la supresión de la respuesta inmune y el desarrollo tumoral. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que células tumorales de CaCu positivas a HPV-AR expresan altos niveles de la ectoenzima CD73 en la membrana celular y producen grandes cantidades de ADO cuando son cultivadas en presencia de AMP y que esta propiedad está asociada con la capacidad de suprimir fuertemente las funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (Mora-García *et al.*, 2017). Por otro lado, se sabe que este nucleósido es tóxico, inclusive para las propias células tumorales. Sin embargo, estudios recientes muestran que la desaminación de ADO a INO mediante la actividad enzimática de ADA puede inhibir el efecto citotóxico de ADO, y que la inhibición de ADA es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales de MPM por acumulación de ADO intracelular, lo que ha sugerido que la actividad de ADA en estas células tumorales puede tener un efecto protector ante la presencia de ADO (Nakajima *et al.*, 2015). Tomando en consideración que células tumorales de CaCu tienen la capacidad de desaminar rápidamente la ADO a INO (Ávila-Ibarra, 2011; Ávila-Ibarra, 2014), el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar si la inhibición de ADA en las células tumorales de CaCu disminuya su proliferación y viabilidad en presencia de ADO. Lo anterior puede ser de gran relevancia para diseñar estrategias terapéuticas para el tratamiento del CaCu mediante la inhibición de ADA.

4. HIPÓTESIS

Se sabe que ADO induce apoptosis en diferentes tipos de células tumorales ya sea por su interacción con ARs (vía extrínseca) o por la conversión intracelular de ADO en AMP y activación de AMPK (vía intrínseca). No obstante, estudios recientes muestran que la desaminación de ADO a INO mediante la actividad enzimática de ADA puede inhibir el efecto citotóxico de ADO en las células tumorales. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que células tumorales de CaCu presentan alta capacidad para convertir ADO en INO y su proliferación es parcialmente inhibida ante la presencia de altas concentraciones de ADO, sugiriendo un efecto protector de ADA en estas células tumorales. Por tanto, si se inhibe la actividad enzimática de ADA en las células tumorales de CaCu, entonces se espera que éstas disminuyan su proliferación y viabilidad en presencia de ADO.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Analizar el efecto de la inhibición de adenosina deaminasa (ADA) en la proliferación y viabilidad de células tumorales de CaCu.

5.2. Objetivos particulares.

- Determinar la presencia de ADA en células tumorales de CaCu.
- Determinar la actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCu.
- Analizar el efecto de la inhibición de ADA sobre la proliferación de células tumorales de CaCu en presencia de ADO.
- Analizar el efecto de la inhibición de ADA en la inducción de apoptosis en las células tumorales de CaCu.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivo celular

Se utilizaron tres líneas celulares de CaCu, HeLa (VPH-18), CaSki (VPH-16) y C33A (VPH-), las cuales se cultivaron con medio RPMI 1640 de (GibcoBRL Life Technologies) suplementado al 10% con Suero Fetal de Bovino (SFB) (GibcoBRL Life Technologies), antibióticos penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 ug/mL, y fueron mantenidas bajo condiciones de esterilidad a temperatura constante de 37°C en una incubadora (Forma Scientific), con 5% de CO₂ y un ambiente de humedad saturante.

6.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PMBC)

Como control normal en todos los experimentos, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PMBC, por sus siglas en inglés) extraídas de donadores sanos. Para ello se obtuvieron de 10-20mL de sangre periférica con ayuda de un vacutainer con anticoagulante ACD (BD, USA). La muestra fue procesada y centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos con la finalidad de separar el plasma del paquete celular. Con una pipeta serológica el plasma fue retirado y almacenado en congelación en tubos estériles. El paquete celular se colocó en un tubo Falcon de 50ml, posteriormente las células fueron diluidas en un volumen igual de amortiguador de fosfatos (PBS). En tubos Falcon de 15ml se agregó Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, USA) con una densidad de 1.077 g/mL e inmediatamente se añadió lentamente sobre el Ficoll la sangre diluida (proporción 1:2 de Ficoll-Histopaque: sangre diluida) utilizando una pipeta serológica.

Después el tubo se centrifugó a 1000 rpm durante 30 minutos. Terminado este tiempo, se aisló cuidadosamente la banda de color blanco conteniendo las PMBC y se colocaron en un tubo de 50ml (Corning, USA) completando a un volumen de 20 ml con PBS estéril y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con 4ml de PBS estéril.

Después de realizar los lavados, las células mononucleares fueron resuspendidas con medio ISCOVE`S-modificado (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 4mM de L-glutamina, 1mM de Piruvato de Sodio, 20µM de 2-Mercaptoetanol y una mezcla de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, USA), además de antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL).

Dado que la expresión de ADA incrementa en linfocitos T activados (Codero *et al.*, 2001), las PMBC fueron cultivadas en presencia de perlas recubiertas de los anticuerpos CD2/CD3/CD28 (Miltenyi Biotec, USA), en una proporción 2:1 de PMBC:perlas, e incubados a 37 °C, 5% de CO² por 72 horas, para obtener linfocitos T activados y utilizarlos como control positivo de la expresión de ADA en los ensayos funcionales.

6.3. Expresión de ADA en células tumorales de CaCu

Para detectar la presencia de ADA en membrana (ADA-Mem) o de manera total (ADA-Total) en las células tumorales de CaCu, se empleó un ensayo de citometría de flujo. En una placa de 96 pozos se colocaron 5x10⁵ células por pozo de cada línea celular. Para la determinación de ADA-Mem, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo primario policlonal (hecho en conejo) anti-ADA humano (Creative Diagnostic, USA) a una dilución 1:10 con solución amortiguadora (PBS + 2% SFB). Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con solución amortiguadora e incubadas durante 15 minutos a 4°C con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en ratón y marcado con PE (R&D Systems, USA). Las células fueron lavadas dos veces con solución amortiguadora y posteriormente se resuspendieron en 200µL de solución fijadora (PBS + 2% de paraformaldehído) y se transfirieron a tubos para su lectura en citómetro de flujo. Para determinar ADA-Total, las células fueron previamente fijadas durante 10 minutos con solución fijadora posteriormente fueron permeadas con 100µL de solución Perm/Wash (saponina 1%) (BD, USA). Inmediatamente después las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-ADA durante 30 minutos, y

después fueron lavadas dos veces con la solución Perm/Wash y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG-PE durante 15 minutos a 4°C. Después de lavar las células con Perm/Wash, éstas se colocaron en tubos para su lectura en citómetro de flujo (FACS Aria, BD, USA). Como controles de fondo y auto fluorescencia se utilizaron células teñidas únicamente con anticuerpo secundario y sin teñir, respectivamente. Para calcular ADA-Intracelular, se sustrajo el valor de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de ADA-Mem al valor de IMF obtenido de la determinación de ADA-Total en todos los casos.

6.4. Actividad enzimática de ADA

Para analizar la actividad enzimática de ADA en membrana, muestras de 1×10^6 de células de cada línea celular de CaCu y PMBC fueron colocadas en tubos Eppendorf en presencia 50µL de ADO 10mM y en presencia o ausencia de EHNA (Hidrocloreuro de adenina(eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil), Sigma-Aldrich, USA), inhibidor específico de ADA, a una concentración final de 1mM, 2mM y 4mM, en un volumen total de 100µL. Al inicio de cada cultivo y después de 6 horas se tomaron alícuotas de 1µL de cada sobrenadante y se colocaron sobre laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel para cromatografía en capa fina (CCF) (5.5cm x 5.5cm) (Sigma-Aldrich, USA). Como testigos se emplearon muestras de 1µL de ADO e INO sintéticas (Sigma, Life Science) a una concentración de 10mM. Las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 5mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol, alcohol isoamílico, etoxietanol, amoniaco y agua, en proporciones 9:6:18:9:15, respectivamente. La elución se dejó correr durante 60 minutos en la cámara de elución, y posteriormente fueron retiradas 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).

Para el análisis de la actividad total de ADA, muestras de 5×10^6 de células tumorales de CaCu o 1×10^7 de PMBC fueron colocadas en tubos Eppendorf y

Monroy-Mora, A.

lisadas con 250µL de amortiguador de lisis compuesto por: 1% Tritón X-100, 5mM EDTA, 140mM NaCl, 50mM Tris (pH 7.4), 1mM PMSF, 1mM NaF, 1% aprotinina, 1µM leupeptina, 1µM pepstatina y 100µM Na₃VO₄. Después de haber agitado por vórtex, los tubos se dejaron incubando durante 30 minutos a 4°C y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se determinó la concentración total de proteína en los lisados celulares, mediante una curva de calibración con albúmina sérica bovina utilizando la técnica de Bradford. Para determinar la actividad enzimática de ADA, se tomaron 100µg de proteína total de cada lisado y se incubaron en presencia de ADO a una concentración final de 5mM y en presencia y ausencia de EHNA a una concentración final de 1mM, en un volumen total de 100µL. Se procedió a incubar a 37°C y se tomaron alícuotas de 1µL a los tiempos 0, 2, 4 y 6 horas para aplicarlas sobre laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel y analizar la presencia de los productos de hidrólisis mediante CCF.

6.5. Efecto de EHNA en la proliferación de células de CaCu: determinación de la IC₅₀ de EHNA

Se analizó el efecto de EHNA en la proliferación de las diferentes líneas celulares de CaCu. Para ello, se cultivaron durante 24 y 48 horas y por triplicado, 1x10⁴ células de cada línea celular (CaSki, HeLa y C33), así como 5x10⁴ PMBC en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Costar, USA), en presencia de diferentes concentraciones de EHNA (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.031 y 0.015mM) en un volumen final de 100µL. Como controles negativos se utilizaron células cultivadas solo en medio de cultivo. Al finalizar los tiempos de cultivo, en cada pozo se adicionaron 20µL del reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega, USA), concentración final de 317µg/ml, y las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C en total oscuridad.

El reactivo CellTiter 96® AQueous One contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio;

MTS], el cuál es biorreducido por las células vivas, generando un producto colorido (formazán) que es soluble en el medio de cultivo. La cantidad de formazán generada es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo, la cual fue leída a una longitud de onda de 490nm en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices, USA).

El porcentaje de proliferación celular se calculó considerando como el 100% la absorbancia de las células que solo contenían medio de cultivo. Los valores de IC₅₀ de EHNA sobre la proliferación de las células tumorales se calcularon a través del software Graphpad Prisma versión 7 utilizando los valores normalizados de las absorbancias y el logaritmo de las concentraciones [μ M] de EHNA.

6.6. Efecto de ADO s sobre la proliferación de células de CaCu i nhibidas en ADA

Con la finalidad de determinar el efecto de ADO sobre la proliferación de las células tumorales de CaCu inhibidas en su actividad de ADA, las diferentes líneas celulares fueron cultivadas durante 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de ADO (1mM, 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M) en presencia o ausencia de la correspondiente IC₅₀ de EHNA en un volumen total de 100 μ L. Los porcentajes de proliferación se determinaron con el reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega, USA) como se describió anteriormente.

6.7. Evaluación de apoptosis mediante Anexina-V/7-AAD

Para evaluar la apoptosis en las células tumorales tratadas con EHNA, se utilizó el protocolo de Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, USA), en el cual se detecta el fosfolípido fosfatidilserina mediante Anexina-V acoplada al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Cabe mencionar que la Anexina-V es una proteína que se une específicamente a fosfatidilserina, la cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesta en la cara

externa de dicha membrana en etapas tempranas de la apoptosis. Brevemente, 1×10^5 células tumorales de CaCu se cultivaron durante 48 horas en placas de 24 pozos de fondo plano (Corning Costar, USA) en presencia de la IC_{50} de EHNA calculada para cada línea celular. Células cultivadas en presencia de $40 \mu\text{M}$ de Cisplatino (Chemocare, USA) fueron utilizadas como control positivo de muerte, mientras que aquellas cultivadas solo con medio de cultivo fueron utilizadas como control negativo.

Una vez concluido el tiempo de cultivo, se colectaron tanto las células en suspensión como las que estaban adheridas y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. Se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS frío y el botón celular se resuspendió en $100 \mu\text{L}$ de Binding Buffer 1x (HEPES/NaOH 100mM, pH 7.5, que contiene NaCl 1.4M y CaCl_2 25mM). Posteriormente se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de Anexina-FITC (1:8) diluida en Binding Buffer 1X y $5 \mu\text{L}$ de 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (BD Biosciences), se agitó vigorosamente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a leer en el citómetro de flujo (FACS Aria, BD, USA). Los datos fueron analizados mediante el software Flowing Software 2.5.1. Las células que se consideraron viables fueron Anexina V-FITC y 7-AAD negativas; las que se encontraron en apoptosis temprana fueron Anexina V-FITC positivas y 7-AAD negativas; mientras que las células muertas o en apoptosis tardía fueron aquellas que presentaron marcaje para Anexina V-FITC y 7-AAD.

6.8. Determinación del estado del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con EHNA

En una célula sana con mitocondrias activas, el reactivo de Tetrametilrodamina (TMRM) (ThermoFisher Scientific, USA) se secuestra fácilmente en la membrana mitocondrial, emitiendo así una señal fluorescente rojo-naranja. Cuando se induce la apoptosis, la membrana mitocondrial se despolariza y la señal de TMRM disminuye. Con base en esta propiedad, se utilizó el reactivo TMRM para analizar

Monroy-Mora, A.

el estado del potencial de membrana mitocondrial de las células de CaCu tratadas con EHNA. Para ello, las células se cultivaron durante 48 horas, ya sea en presencia de su correspondiente IC_{50} de EHNA, en presencia de $40\mu\text{M}$ de Cisplatino (Control positivo) o sólo de medio de cultivo (control negativo) como se mencionó anteriormente.

Una vez concluido el tiempo de cultivo, se colectaron tanto las células en suspensión como las que estaban adheridas y se centrifugaron a 3000rpm durante 3 minutos. Se realizaron dos lavados con 1mL de PBS frío y las células se incubaron con $200\mu\text{L}$ de solución 100nM de TMRM durante 30 minutos a 37°C . Finalmente las células se lavaron dos veces con PBS y se colocaron en tubos conteniendo $200\mu\text{L}$ de PBS para la adquisición de 50,000 eventos en el citómetro de flujo (FACS-aria, Beckton-Dickinson, USA). Los datos fueron analizados mediante el software Flowing Software 2.5.1.

El porcentaje de células positivas a TMRM se calculó considerando como (100%) la absorbancia de las células sin tratamiento (cultivadas con medio de cultivo).

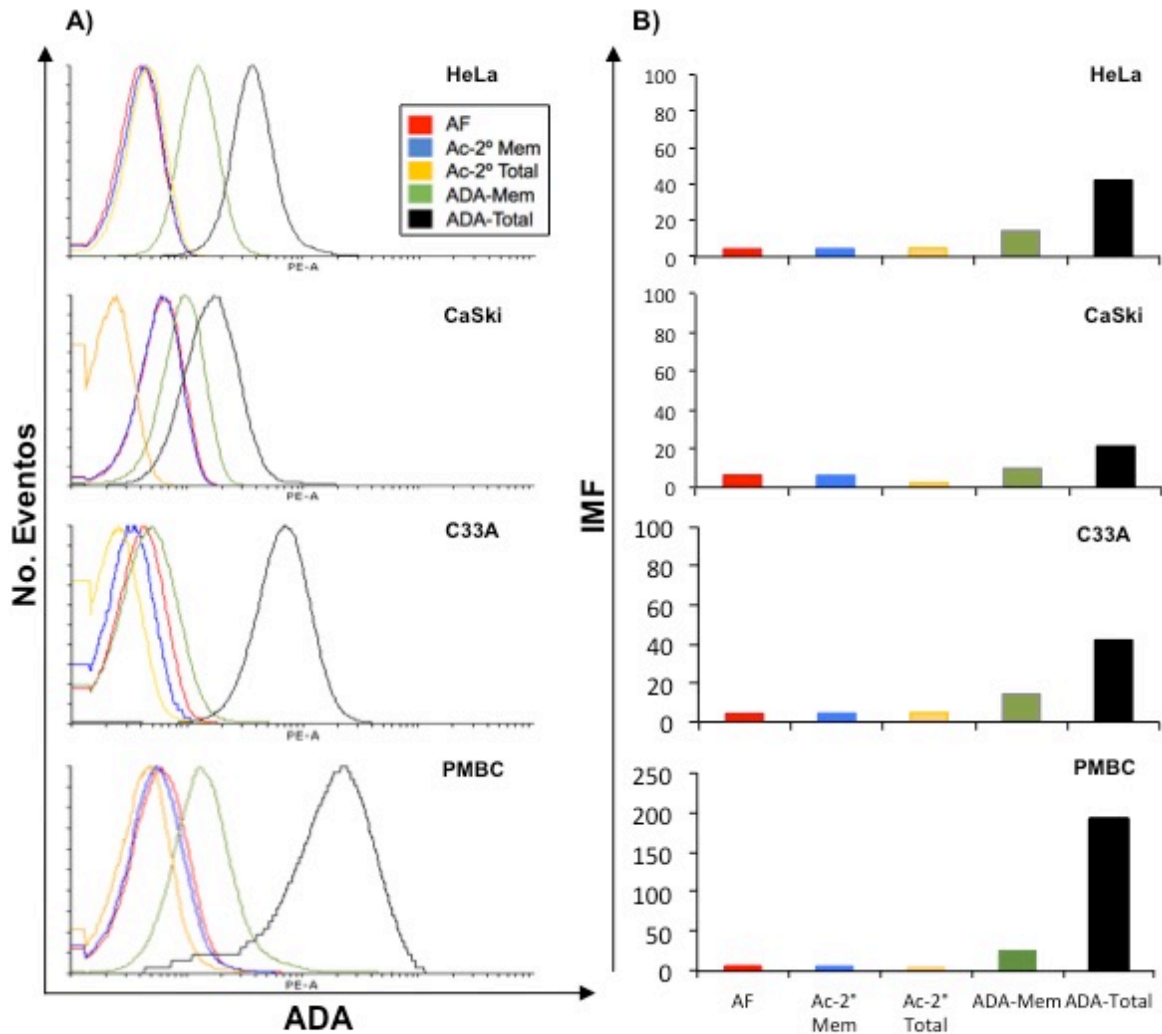
6.9. Análisis estadístico

Se utilizó análisis de varianza no paramétrico empleando la prueba de Dunnett a través del software Graphpad Prisma versión 7. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado con tres repeticiones de manera independiente. Todos los datos fueron expresados como promedio \pm SE.

7. RESULTADOS

7.1. Presencia de ADA en las células tumorales de CaCu

En sitios de inflamación y crecimiento tumoral, la concentración local de ADO extracelular aumenta rápidamente y juega un papel importante en la supresión de la respuesta inmune. No obstante, la expresión de ADA en células T efectoras y T reguladoras, disminuye el nivel de ADO al convertirla en INO, sugiriendo un mecanismo protector de ADA ante el efecto inhibitorio de la ADO extracelular en estas células efectoras (Kaljas *et al.*, 2017). Por otra parte, la generación de ADO juega un papel importante en la fisiología del cáncer y se ha reportado que la expresión y actividad de ADA se encuentran incrementadas en tejidos cancerosos respecto a su contraparte normal, sugiriendo un papel protector de ADA en las células tumorales ante la presencia de altas concentraciones de ADO en el TME (Battisti *et al.*, 2012). Para analizar si ADA participa en la protección de células tumorales de CaCu ante el efecto citotóxico de ADO, en primera instancia se procedió a analizar la presencia de ADA en las células tumorales empleando las líneas celulares HeLa (HPV+), CaSki (HPV+) y C33A (HPV-), así como en PMBC activadas, que fueron utilizadas como control positivo. Mediante citometría de flujo se procedió a detectar la presencia de esta enzima tanto en membrana (ADA-Mem) como intracelular (ADA-IC), como se indicó previamente en la metodología. Los resultados muestran que el contenido de ADA-IC en las líneas celulares HeLa y C33, así como en las PMBC se encontró en niveles mayores ($P < 0.05$) que los encontrados en ADA-Mem (Fig. 6A-C). El análisis de citometría de flujo mostró que la IMF para ADA-Mem fue de 14.17 para HeLa, 9.70 para CaSki, 5.42 para C33A y 25.66 para PMBC. El valor de ADA-IC fue estimado al sustraer el valor de la IMF de ADA-Mem al valor de IMF de ADA-Total, encontrándose que el contenido de ADA-IC fue de 27.68 para HeLa, 11.46 para CaSki, 69.55 para C33A y 165.33 para PMBC, de tal manera que el contenido de ADA-IC fue de aproximadamente 2, 10 y 6 veces mayor al de ADA-Mem detectado en las células HeLa, C33A y PMBC, respectivamente (Fig. 6C).



C)

Líneas celulares	Expresión de ADA (IMF)		
	Membrana	Intracelular	Total
HeLa (HPV+)	14.17	27.68	41.85
CaSki (HPV+)	9.70	11.46	21.16
C33A (HPV-)	5.42	69.55	74.97
PMBC (Ctl-)	25.66	165.33	190.99

Figura 6. Determinación de ADA en líneas celulares de CaCu y en PMBC. La presencia de ADA fue determinada mediante citometría de flujo en las líneas celulares HeLa, CaSki y C33A de CaCu, así como en PMBC las cuales fueron utilizadas como control de células normales. Se muestran los histogramas (A) y en gráfico de barras (B) de las células teñidas con el anticuerpo Anti-ADA en membrana (ADA-Mem) en color verde, y en células permeadas (ADA-Total) en color negro. La tinción con el anticuerpo secundario en membrana (Ac-2° Mem) histograma azul, o en células permeadas (Ac-2° Total) histograma amarillo, fueron incluidos como controles negativos para cada línea celular. En rojo se muestra la autofluorescencia (AF). Los valores numéricos de ADA-Mem y ADA-Total y ADA-IC para cada línea celular son mostrados en (C). El valor de ADA intracelular (ADA-IC) se obtuvo sustrayendo el valor de intensidad media de fluorescencia (IMF) de ADA-Mem al valor de IMF de ADA-Total. Los datos muestran un experimento representativo de tres experimentos independientes con resultados similares.

7.2. Actividad enzimática de ADA-Mem en las líneas celulares de CaCu

Con la finalidad de analizar la actividad enzimática de ADA-Mem en las líneas celulares de CaCu, 1×10^6 de células de cada una de las líneas celulares fueron cultivo en presencia de 5mM de ADO, y en presencia o ausencia de 1mM, 2mM y 4mM de EHNA, inhibidor específico de la actividad enzimática de ADA. La actividad enzimática de ADA-Mem fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando alícuotas de los sobrenadantes celulares tomadas al inicio (0 horas) y después de 6 horas de cultivo. Los resultados muestran que las líneas celulares de CaCu tuvieron la capacidad de desaminar completamente la ADO y generar INO, presente en los productos de la reacción, como se indica con las flechas negras (Fig. 7A-C). No obstante, las PMBC desaminaron parcialmente a la ADO (Fig. 7D). De manera interesante, la adición de EHNA a la concentración de 1mM fue suficiente para inhibir completamente la actividad de ADA en todos los casos (Fig. 7A-D). Por lo que esta concentración fue utilizada en los experimentos posteriores. Estos resultados indican que las líneas celulares de CaCu presentan fuerte actividad de ADA-Mem.

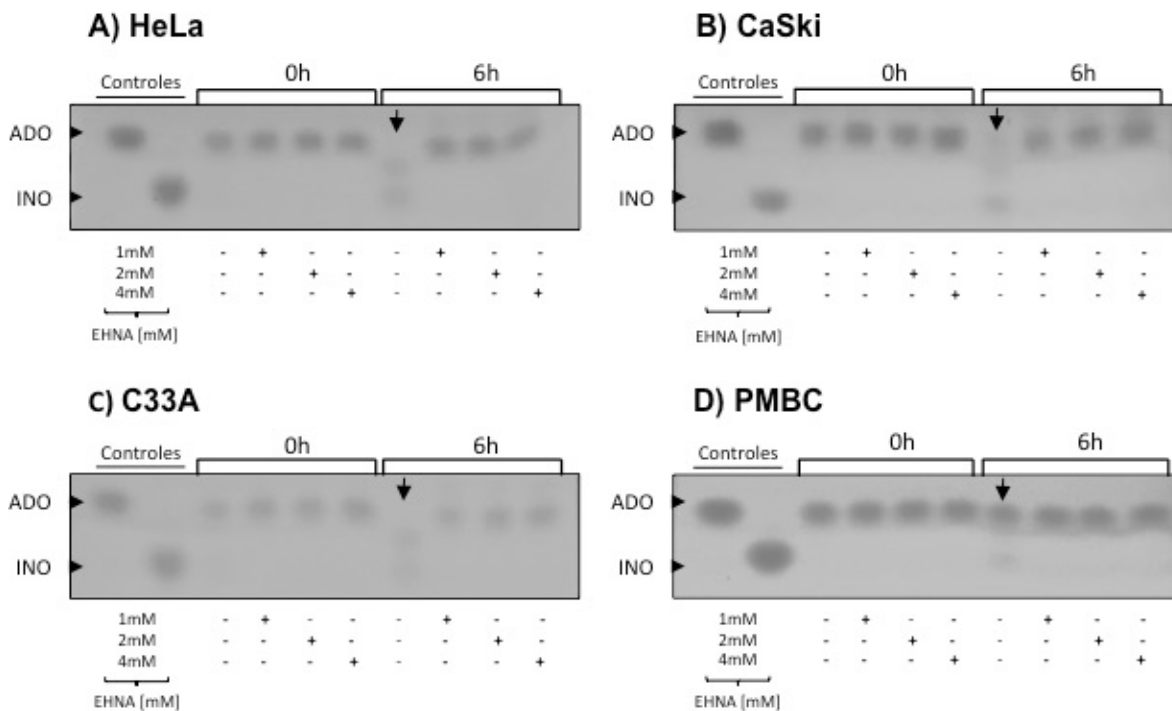


Figura 7. Actividad enzimática de ADA-Mem en líneas celulares de CaCu y PMBC. 1×10^6 de células tumorales de HeLa (A), CaSki (B) y C33A (C), así como de PMBC (D) fueron incubadas durante 6 horas en presencia de 5mM de ADO y en presencia o ausencia de EHNA, inhibidor específico de ADA, a concentraciones finales de 1mM, 2mM y 4mM. Mediante cromatografía en capa fina (CCF) se muestra la desaminación de ADO a INO por ADA (flechas en negro) en presencia.

Por otro lado, se ha reportado que ADA intracelular juega un papel importante en proteger a las células tumorales del efecto citotóxico de ADO, puesto que la inhibición de esta enzima indujo apoptosis en células tumorales de MPM (Nakajima *et al.*, 2015). Para analizar la actividad enzimática total de ADA en las células tumorales, 1×10^5 células de CaCu y 1×10^7 PMBC fueron lisadas con 1mL de amortiguador de lisis, y después de la cuantificación de proteína por la técnica de Bradford, se tomaron 100µg de proteína total de cada lisado y se incubaron en presencia de una concentración 5mM de ADO en presencia o ausencia de 1mM EHNA, en un volumen total de 100µL. Alícuotas de los sobrenadantes celulares fueron tomadas en intervalos de 2 horas durante 6 horas. Como se esperaba, la actividad enzimática de ADA fue observada tanto en los lisados de las células de CaCu como de las PMBC (Fig. 8A-D). Cabe mencionar que la desaminación de ADO en INO (señalada por flechas negras) fue más intensa en el lisado de la línea

celular C33A y de las PMBC durante todo el tiempo de incubación. De hecho, en estos lisados celulares se observó desaminación completa de ADO a partir de las 4 horas de incubación. Asimismo, la inhibición de la actividad enzimática de ADA se observó en todos los lisados celulares al agregar 1mM de EHNA (Fig. 8A-D). Estos resultados nos permiten evidenciar la actividad enzimática total de ADA tanto en las líneas celulares de CaCu como en las PMBC, y acorde con los contenidos de ADA-Total detectados por citometría de flujo (Fig. 6), la mayor actividad de ADA-Total fue observada en las células C33A y PMBC.

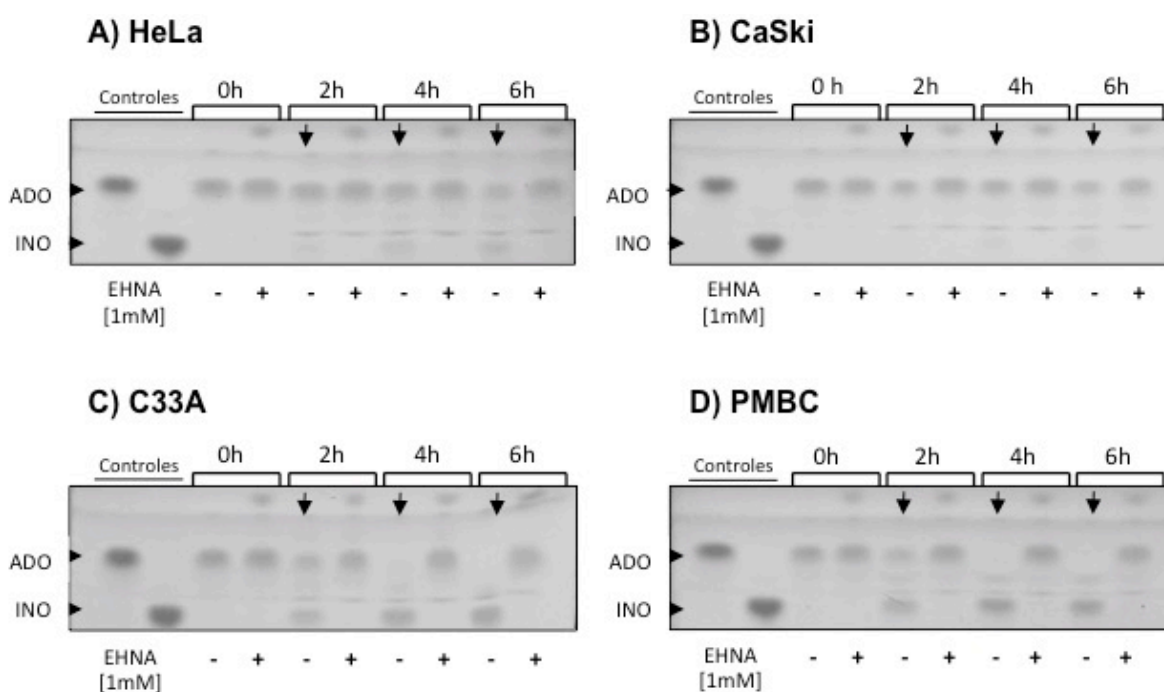
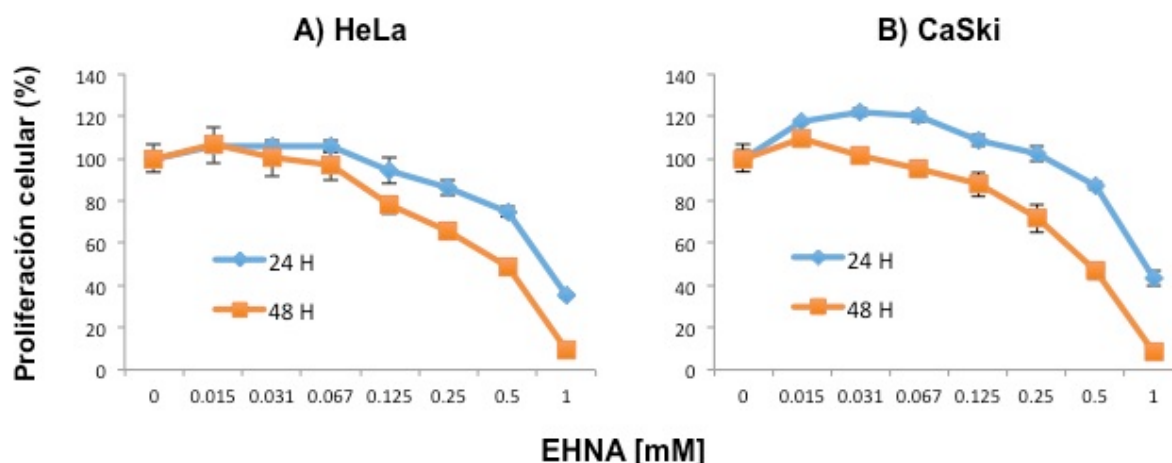


Figura 8. Actividad enzimática de ADA en lisados de líneas celulares de CaCu y PMBC. 100ug de proteína total de cada uno de los lisados de las células: HeLa (A), CaSki (B) y C33A (C), así como de PMBC (D) fueron incubados durante 2, 4 y 6 horas en presencia de 5mM ADO y en presencia o ausencia de 1mM de EHNA, inhibidor específico de ADA. Se muestra la actividad enzimática total de ADA en geles de cromatografía en capa fina.

7.3. EHNA disminuye la proliferación de células tumorales de CaCu

En estudios recientes, se ha propuesto que EHNA tiene efecto antitumoral al inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células tumorales de MPM (Nakajima *et al.*, 2015). Con la finalidad de analizar el efecto de EHNA sobre la proliferación de células tumorales de CaCu, líneas celulares de CaCu fueron tratadas con

diferentes concentraciones de EHNA (1mM a 0.015 μ M) durante 24 y 48 horas. Como control negativo se utilizaron células cultivadas solo con medio de cultivo. La proliferación se determinó por el método colorimétrico MTS utilizando el reactivo CellTiter 96®. Los resultados obtenidos muestran que, en relación al control negativo, EHNA redujo la proliferación de las células tumorales de CaCu (HeLa, CaSki y C33A) entre 20-50% cuando éstas fueron tratadas a concentraciones mayores de 0.5mM a las 24 horas; mientras que a las 48 horas de tratamiento la proliferación se redujo entre 30-92%. Cabe mencionar que la línea celular C33A fue la más resistente al tratamiento con EHNA, ya que empleando la concentración más alta (1mM), se obtuvo una disminución de la proliferación de 25 y 55% a las 24 y 48 horas, respectivamente. En el caso de las PMBC, el tratamiento con EHNA a concentraciones mayores a 0.5mM redujo la proliferación entre 20-42% a las 24 y 48 horas de cultivo respectivamente (Fig. 9A-D). Con base en las curvas dosis-respuesta de EHNA sobre la proliferación de las líneas celulares a las 48 horas, los valores calculados de IC₅₀ fueron los siguientes: 322.4 μ M para HeLa, 309.6 μ M para CaSki, 472.8 μ M para C33A y 350.2 μ M para PMBC (Fig. 10A-D). Estos resultados sugieren que la inhibición de la actividad enzimática de ADA promueve la inhibición de la proliferación de células tumorales de CaCu.



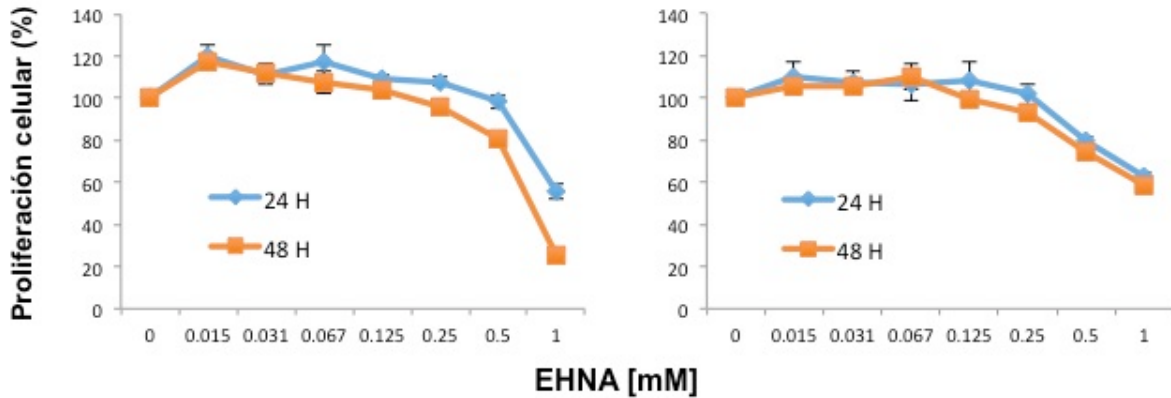


Figura 9. Efecto de EHNA en la proliferación de células tumorales de CaCu y PMBC. 1×10^4 células: HeLa (A), CaSki (B) y C33A (C), así como 5×10^4 PMBC (D) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y posteriormente tratadas a diferentes concentraciones de EHNA (0.015–1mM) durante 24 y 48 horas. Se muestra el porcentaje de la proliferación respecto al control (células sin tratamiento). Datos obtenidos de tres experimentos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Se indica la media \pm SEM.

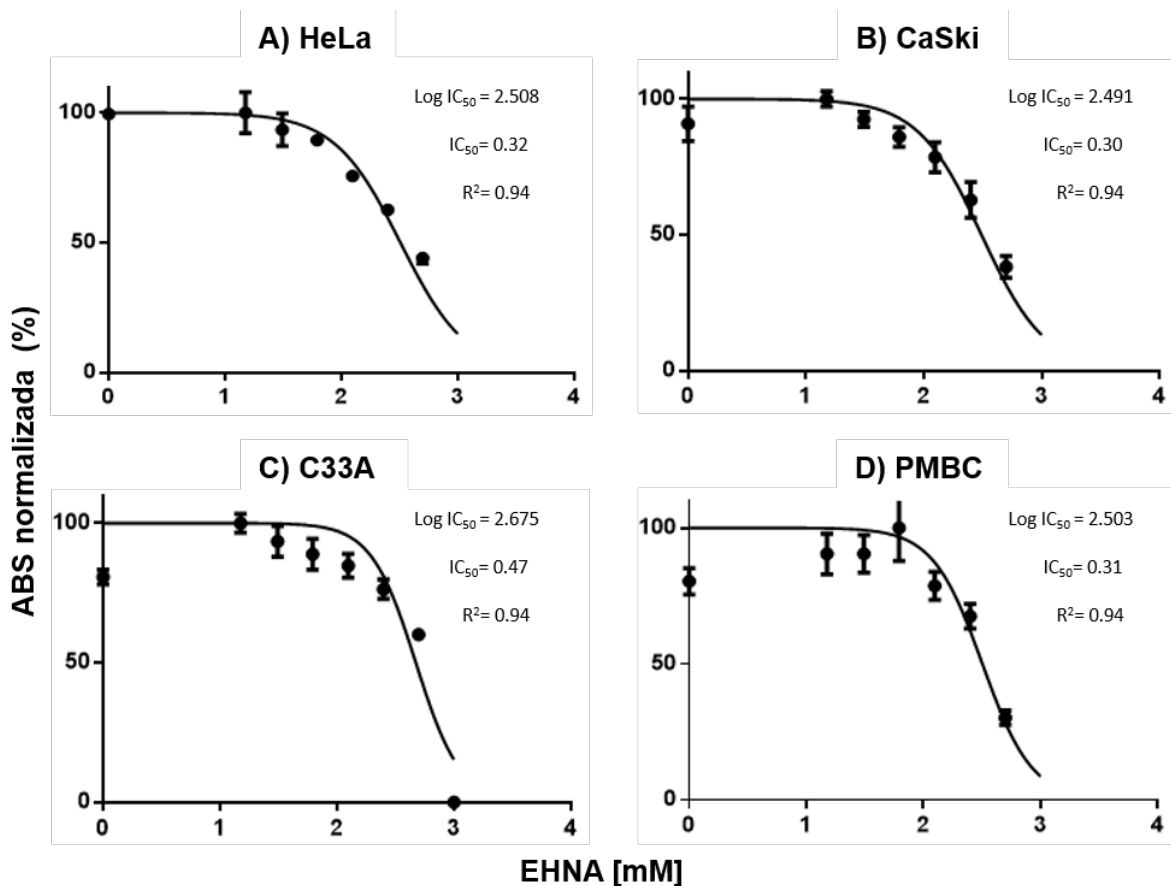


Figura 10. Valores de IC_{50} (μM) de EHNA para inhibir la proliferación de células tumorales de CaCu. Los valores de IC_{50} en las líneas celulares de CaCu: HeLa (A), CaSki (B), C33A (C) y PMBC (D), se obtuvieron trazando escalas semilogarítmicas utilizando los valores normalizados de las absorbancias y el valor logarítmico de las concentraciones de EHNA, mediante el software Graphpad Prisma versión 7. Datos obtenidos de tres experimentos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Se indica la media \pm SEM.

7.4. La inhibición de la actividad enzimática de ADA favorece la disminución de la proliferación de células tumorales de CaCu en presencia de ADO

Se sabe que ADA participa en la desaminación de ADO a INO y tiene un efecto regulador de las funciones de las células de la respuesta inmune al disminuir las concentraciones de ADO extracelular y protegerlas ante el efecto inhibitorio de ADO (Kaljas *et al.*, 2017). Para analizar si la actividad de ADA protege a las células tumorales de CaCu ante el efecto inhibitorio de ADO, las células tumorales de CaCu fueron cultivadas durante 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de ADO (1mM, 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M) y en presencia o ausencia de EHNA (IC_{50} de cada línea celular). Cultivos de las células tumorales en ausencia de ADO fueron utilizados como control negativo. Los resultados muestran que solo a altas concentraciones de ADO (1mM) se pudo observar una ligera disminución en la proliferación de las células tumorales de 24% en HeLa y 10% en CaSki. No obstante, la proliferación de C33A y de PMBC no fue afectada a esa concentración de ADO (Fig. 11A-D). De manera interesante, cuando las células tumorales fueron cultivadas en presencia de ADO y de la IC_{50} de EHNA, calculada para cada línea celular, se encontró una disminución importante en la proliferación de las células tumorales a concentraciones mayores a 100 μ M de ADO, de hecho, a 1mM de ADO se encontró inhibición de la proliferación de 75% en HeLa, 63% en CaSki, 49% en C33A y 22% en PMBC (Fig. 11A-D). Estos resultados sugieren que la presencia de ADA en las células tumorales de CaCu puede tener un efecto protector ante el efecto inhibitorio de ADO.

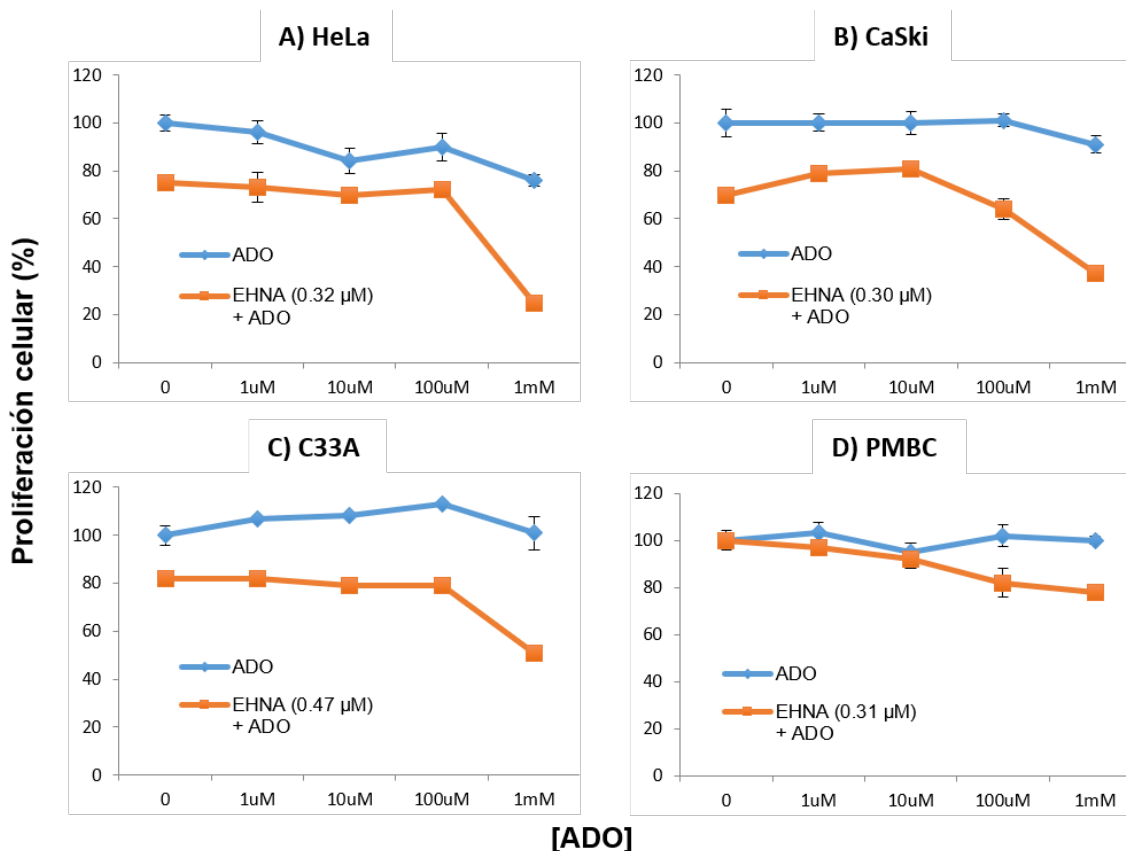
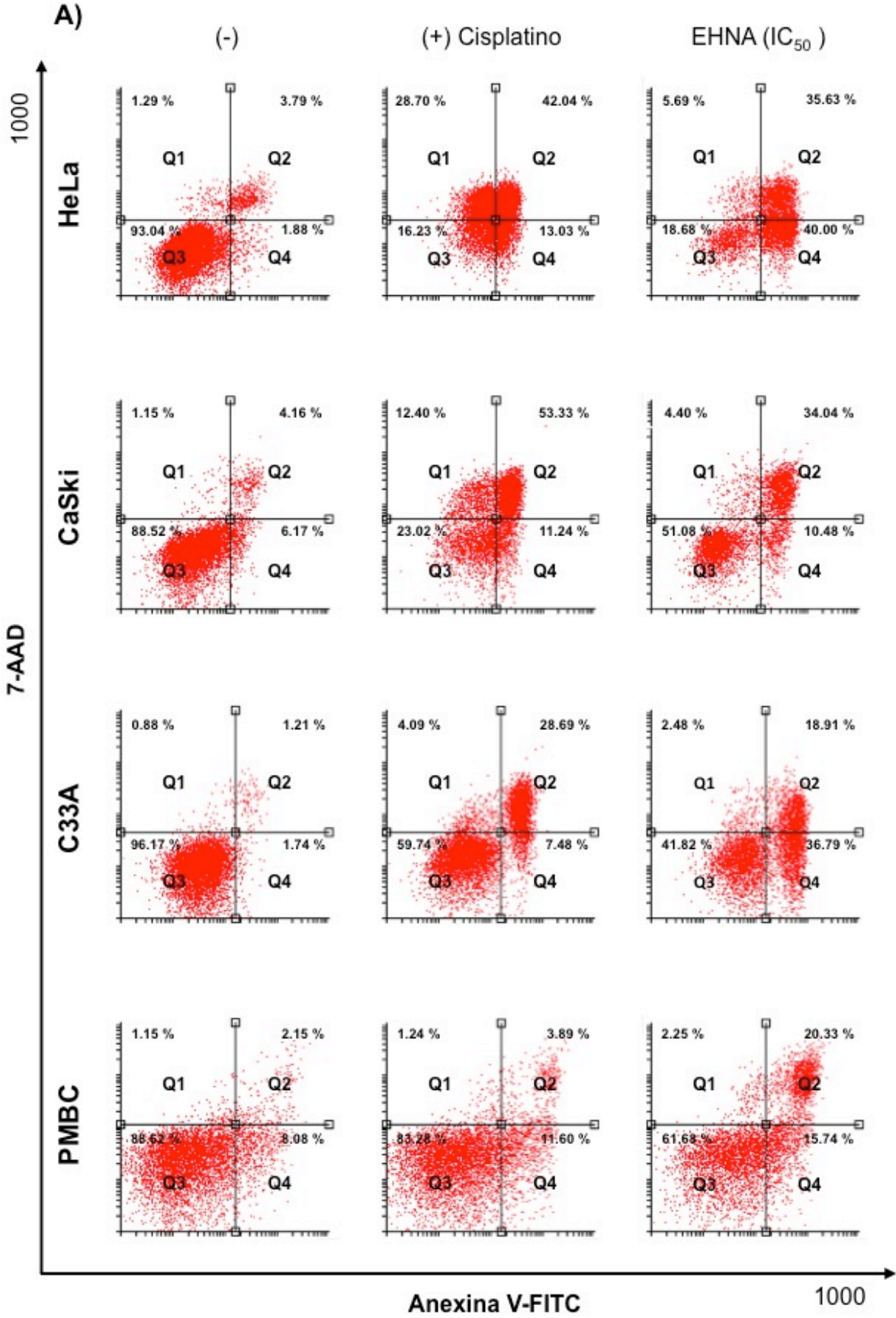


Figura 11. EHNA disminuye la proliferación de células tumorales de CaCu en presencia de ADO. 1×10^4 células HeLa (A), CaSki (B) y C33A (C), así como 5×10^4 PMBC (D) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y posteriormente tratadas a diferentes concentraciones de ADO (1mM, 100uM, 10uM y 1uM) en presencia o ausencia de la correspondiente IC₅₀ de EHNA de cada línea celular (Fig. 10) durante 48 horas. Se muestra el porcentaje de proliferación de las células tratadas con ADO respecto a las tratadas con ADO y EHNA (IC₅₀). Datos obtenidos de tres experimentos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Se indica la media \pm SEM.

7.5. EHNA induce apoptosis en las células tumorales de CaCu

Una vez que se evidenció que EHNA inhibe la proliferación de las células tumorales de CaCu, se procedió a evaluar el efecto de EHNA en la inducción de muerte por apoptosis. Para ello, se realizaron cultivos de 48 horas de las líneas celulares de CaCu en presencia de EHNA (IC₅₀ de cada línea celular). Como control positivo se cultivaron las células tumorales en presencia de 40μM de Cisplatino, y como control negativo se cultivaron las células solo con medio de cultivo. Para determinar la inducción de apoptosis en las células tumorales tratadas con EHNA, se empleó Anexina-V acoplada a FITC para detectar fosfatidilserina. Cabe mencionar que la Anexina-V es una proteína que se une

específicamente a fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana en etapas tempranas de la apoptosis. Asimismo, se utilizó 7-AAD para identificar células en etapas tardías de la apoptosis. De acuerdo a los resultados obtenidos (Fig. 12A), en la línea celular HeLa, la proporción de células apoptóticas en presencia de EHNA (IC_{50}) fue de 75.63% en relación a las células sin tratamiento (-) que fue de 5.67%. En la línea celular CaSki cultivadas con EHNA (IC_{50}) se obtuvo un 44.52% de apoptosis y un 10.33% en las células sin tratamiento (-). En la línea celular C33A, la adición de EHNA (IC_{50}) de igual manera incrementó la proporción de células apoptóticas hasta un 55.7% en relación a las células sin tratamiento (-) con un 2.95%. En comparación con las líneas celulares de CaCu, las PMBC cultivadas con EHNA (IC_{50}) presentaron un 36.07% de apoptosis y las células sin tratamiento (-) un 10.23%. Cabe mencionar que a excepción de la línea celular CaSki, el tratamiento con EHNA indujo mayor porcentaje de apoptosis que el tratamiento con Cisplatino. Asimismo, el porcentaje de necrosis (células positivas a 7-AAD y negativas a Anexina-V, fue marginal en todas las células tratadas con EHNA (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que además de inhibir ADA, EHNA induce un alto porcentaje de muerte por apoptosis en las células tumorales de CaCu.



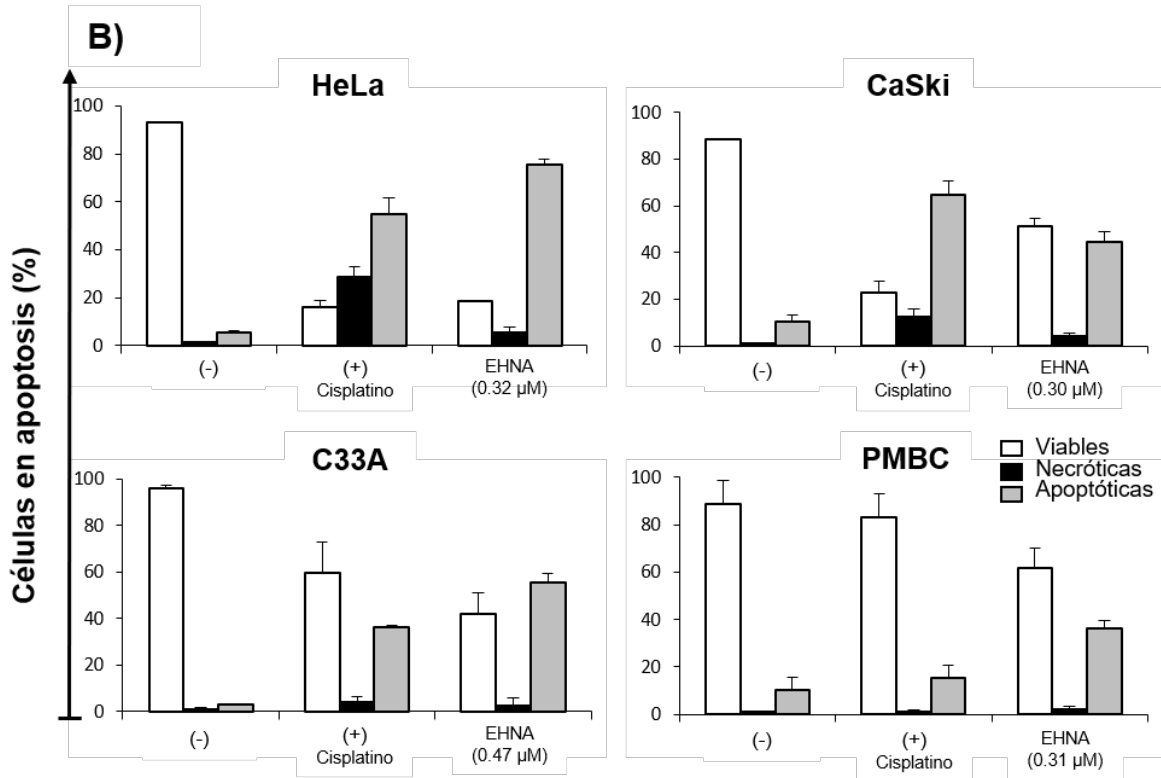


Figura 12. EHNA induce apoptosis en las líneas celulares de CaCu. 1×10^5 células tumorales HeLa, CaSki y C33A, así como de PMBC se cultivaron durante 48 horas en presencia de su respectiva IC_{50} de EHNA en placas de 24 pozos, después de 48 horas de cultivo se analizó el porcentaje de células apoptóticas mediante la técnica de Anexina V-FITC/7-AAD. **(A)** Se muestra en gráficas de puntos los porcentajes de células necróticas que son fluorescentes a 7-AAD (Q1), células en apoptosis tardía marcadas por 7-AAD y Anexina-V (Q2), células viables (Q3), y células en apoptosis temprana marcadas con Anexina-V (Q4). Como control positivo se cultivaron las células tumorales en presencia de 40 μ M de Cisplatino, y como control negativo se cultivaron las células solo con medio de cultivo. **(B)** Gráficas de barras mostrando los porcentajes de las poblaciones celulares encontradas en cada uno de los cuadrantes (Q1-Q4). Los datos muestran un experimento representativo de tres realizados de manera independiente con resultados similares.

7.6. EHNA induce cambios en el estado del potencial de membrana mitocondrial de las células tumorales de CaCu

Se sabe que las membranas mitocondriales sanas mantienen una diferencia en el potencial eléctrico entre el interior y el exterior del organelo, por lo que la pérdida de este potencial de membrana está asociada con la muerte celular (Elmore, 2007). Con el objetivo de analizar el efecto de EHNA en la integridad de la membrana mitocondrial, las células tumorales de CaCu fueron tratadas con 100nM de TMRM -un colorante permeable que se acumula en la mitocondria activa con potencial de membrana intacto-. Como control positivo se cultivaron las células tumorales en presencia de 40 μ M de Cisplatino, y como control negativo se cultivaron las células solo con medio de cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento de las células tumorales con EHNA disminuyó de manera importante la intensidad de fluorescencia de la TMRM acumulada en las células tumorales, respecto al control negativo, dicho efecto fue comparable al producido por Cisplatino. Cabe mencionar que las PMBC tratadas con EHNA y Cisplatino presentaron una ligera disminución en la tinción con TMRM (Fig. 13A). Después del tratamiento con su respectivo IC₅₀ de EHNA, se encontró que los porcentajes de las células HeLa, CaSki, C33A y PMBC teñidas con TMRM, relativo a las células sin tratamiento cuya tinción con TMRM fue considerada como 100%, fueron 42, 51, 41 y 63%, respectivamente. Mientras que la tinción con TMRM en las células HeLa, CaSki, C33A y PMBC tratadas con Cisplatino fue de 35, 53, 31 y 90%, respectivamente (Fig. 13B). Estos resultados nos sugieren que el tratamiento con EHNA, acorde con la inducción de apoptosis, afecta de manera importante la integridad del potencial de membrana mitocondrial en las células tumorales de CaCu.

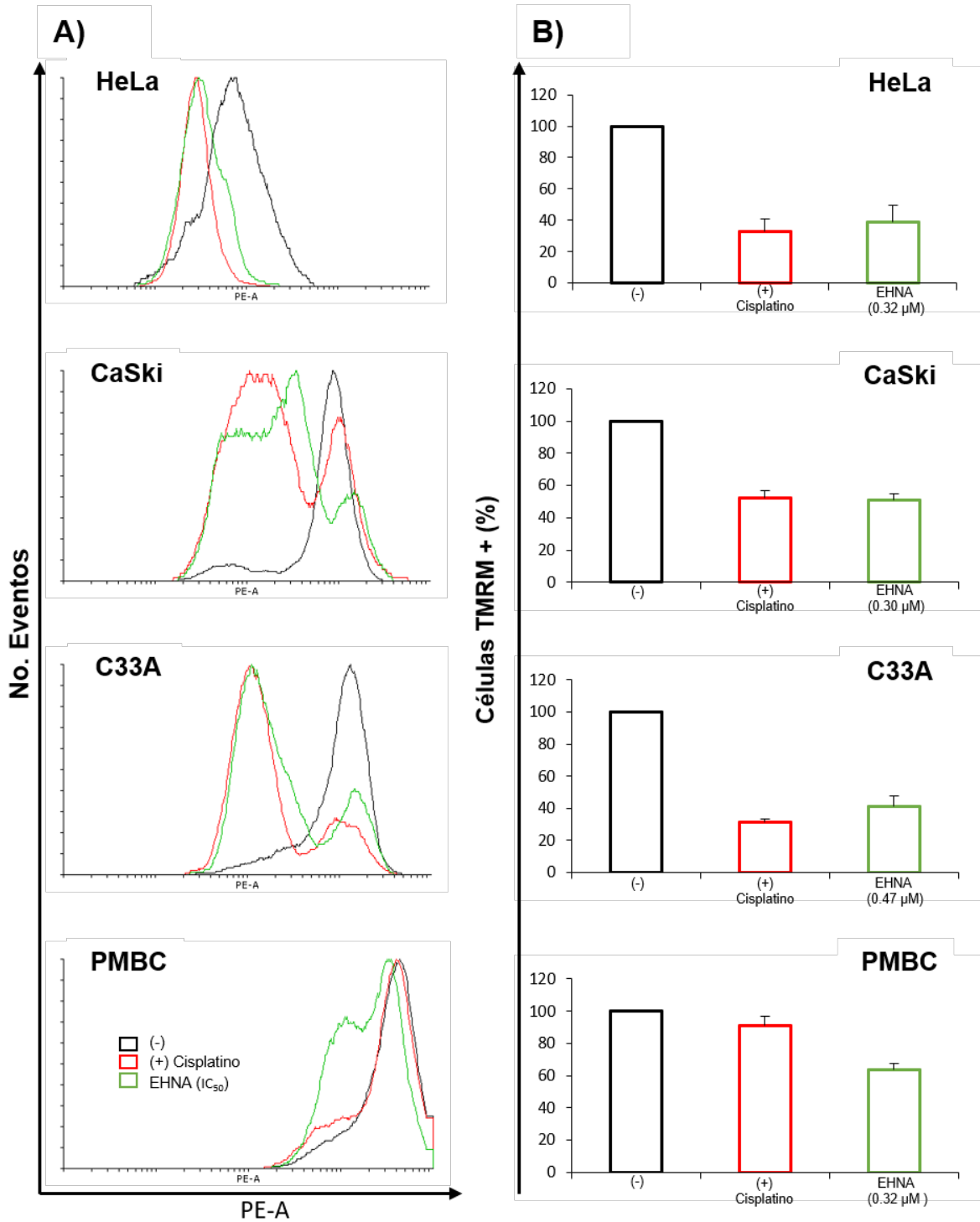


Figura 13. EHNA afecta el estado del potencial de membrana mitocondrial en las células tumorales de CaCu. 1×10^5 células tumorales HeLa, CaSki y C33A, así como de PMBC se cultivaron durante 48 horas en presencia de su respectiva IC₅₀ de EHNA en placas de 24 pozos, después de 48 horas las células fueron teñidas con 5μM TMRM, como se mencionó en la metodología. La acumulación de TMRM en la membrana mitocondrial se determinó mediante citometría de flujo. **(A)** Se muestra la intensidad de fluorescencia emitida por la TMRM acumulada en la membrana mitocondrial de las células sanas cultivadas bajo los siguientes tratamientos: medio solo (negro), 40μM Cisplatin (rojo) y EHNA (IC₅₀ de cada línea celular) (verde). **(B)** Se muestra el porcentaje de células positivas a TMRM en relación a las células sin tratamiento (cultivadas con medio solo) las cuales fueron normalizadas a 100%. Los datos muestran un experimento representativo de tres experimentos independientes con resultados similares.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha reportado que la vía adenosinérgica juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, ya sea favoreciendo la angiogénesis, la proliferación y metástasis de las células tumorales, o inhibiendo las funciones efectoras de la respuesta inmune a través de la generación de grandes cantidades de ADO, que es producida por la fosfohidrólisis de ATP a través de la actividad catalítica y secuencial de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, las cuales son altamente expresadas en tejidos tumorales o encontradas de manera soluble y en altas concentraciones en plasma de pacientes con cáncer avanzado (Haskó *et al.*, 2008; Antonioli *et al.*, 2013; Antonioli *et al.*, 2016). Por otra parte, se sabe que los niveles de ADO son regulados de manera importante por la actividad de ADA, y se ha propuesto que la alta actividad de ADA en el TME puede ser un mecanismo compensatorio contra la acumulación tóxica de sus sustratos debido al aumento del metabolismo de purina y pirimidina en tejidos cancerosos (Cortés *et al.*, 2014). Por tanto, ADA podría otorgar una ventaja selectiva a las células cancerosas para su sobrevivencia. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que células tumorales de CaCu positivas a HPV-AR expresan altos niveles de la ectoenzima CD73 en la membrana celular y producen grandes cantidades de ADO cuando son cultivadas en presencia de AMP (Mora-García *et al.*, 2017). Además, se ha observado que estas células tumorales también tienen la capacidad de desaminar rápidamente la ADO a INO (Ávila-Ibarra, 2011; Ávila-Ibarra, 2014), indicando una alta actividad de ADA en estas células tumorales. En el presente estudio se determinó la expresión de la proteína ADA en células tumorales de CaCu derivadas de las líneas celulares HeLa (HPV+), CaSki (HPV+) y C33A (HPV-), y se analizó la actividad funcional y la propiedad de esta enzima para proteger a estas células tumorales del potencial efecto citotóxico de ADO extracelular. La presencia de ADA en las células tumorales fue detectada tanto en membrana (ADA-Mem) como intracelular (ADA-IC), encontrándose niveles mayores de ADA-IC respecto a ADA-Mem en las líneas celulares HeLa y C33A, así como en PMBC. En el caso particular de las células CaSki, presentaron el menor contenido de ADA-Total, probablemente debido a que en estudios previos se ha detectado una alta actividad de ADA en

medios condicionados de estas células, sugiriendo la posible liberación de altos contenidos de esta enzima en exosomas (Molina, 2019). Las tres líneas celulares de CaCu en cultivo *in vitro* fueron capaces de desaminar eficientemente ADO a INO. Asimismo, lisados de estas líneas celulares también mostraron alta capacidad para desaminar ADO, capacidad que correspondió con los contenidos de ADA-Total detectados en las células tumorales. El cultivo de las células tumorales o de lisados de las mismas en presencia de EHNA, un inhibidor específico con función irreversible de la actividad de ADA, inhibió completamente la actividad enzimática de ADA. También se observó que EHNA inhibió de manera dosis dependiente la proliferación de las células tumorales de CaCu. Particularmente, las células tumorales C33A y las PMBC, quienes presentaron los mayores contenidos de ADA-Total, fueron más resistentes al tratamiento con EHNA, lo que corrobora la capacidad protectora de esta enzima. De manera interesante, el tratamiento de las células tumorales con la concentración respectiva de EHNA para inhibir la proliferación celular en 50% (IC₅₀), indujo apoptosis y desestabilización de la membrana mitocondrial en un alto porcentaje de las células tratadas y de manera comparable a Cisplatino, utilizado como control positivo, además de revertir de manera importante la resistencia de las células tumorales de CaCu al efecto citotóxico de altas concentraciones de ADO. Al respecto, resulta interesante investigar si ADA protege a las células tumorales de concentraciones basales de ADO, o si el EHNA ejerce su efecto citotóxico mediante otro mecanismo

Como se mencionó anteriormente, las altas concentraciones de ADO en el TME son reguladas principalmente a través de la actividad de ADA, que cataliza la conversión de ADO en su metabolito INO, desregulando los efectos biológicos de ADO *in situ*. En humanos dos diferentes enzimas con actividad funcional de ADA, designadas como ADA1 y ADA2, han sido caracterizadas. La isoenzima ADA1, que corresponde a un monómero soluble de 363 aminoácidos con un peso de 41 kDa, regula principalmente la concentración intracelular de ADO, y se ha reportado que protege a los linfocitos T de la apoptosis inducida por la interacción de ADO-A2AR (Linden *et al.*, 2012). Esta enzima también puede encontrarse asociada

tanto a CD26, una glicoproteína con actividad dipeptidil peptidasa IV que se encuentra anclada a la membrana celular (Cortés *et al.*, 2014), como a A1R, A2AR y A2BR, expresados en la superficie de las células efectoras de la respuesta inmune, y puede participar en la activación de células T a través de la formación de la sinapsis inmunológica, al unirse simultáneamente a los ARs y CD26 dispuestos en la membrana de células dendríticas y linfocitos T, respectivamente. Además, la presencia de ADA1 en linfocitos T efectores resulta esencial para revertir el efecto inmunosupresor de ADO mediado por células T reguladoras (Mandapathil *et al.*, 2010; Mandapathil *et al.*, 2012; Naval-Macabuhay *et al.*, 2016). Por otra parte, la isoenzima ADA2, que corresponde a una proteína de 110 kDa, se localiza en el espacio extracelular y tiene 100 veces menos afinidad para la ADO que ADA1, y alcanza su actividad máxima en sitios de alta concentración de ADO y de bajo pH, como ocurre en el TME y sitios altamente hipóxicos y de inflamación (Zavialov *et al.*, 2005). Además, la concentración de ADA2 en suero se correlaciona con la progresión del crecimiento del tumor, lo cual identifica a ADA2 como un biomarcador conveniente en el seguimiento de pacientes con cáncer (Roberts *et al.*, 2012). En el presente estudio, el anticuerpo policlonal utilizado para la detección de ADA en las células tumorales de CaCu está dirigido hacia la secuencia 287-314 que corresponde a un epítopo conservado entre ambas isoenzimas de ADA, por lo que es posible que ambas isoenzimas pudieran haber sido detectadas mediante este anticuerpo. No obstante, tomando en cuenta que ADA2 es insensible a EHNA (Ratech *et al.*, 1981), el inhibidor de ADA utilizado en este trabajo, y al hecho de que la actividad funcional de ADA1 se presenta primordialmente en membrana y citoplasma y la de ADA2 en el medio extracelular (Cortés *et al.*, 2014), los resultados obtenidos en relación a los contenidos de ADA-Mem y ADA-Total y su correspondiente actividad funcional, que fue inhibida completamente con EHNA, permite sugerir que la principal actividad de ADA detectada en las células tumorales de CaCu es debida principalmente a ADA1. Sin embargo, será necesario utilizar anticuerpos específicos para detectar la distribución de ADA1, ya sea, asociada a CD26 en membrana o localizada de manera intracelular en las células tumorales de CaCu.

Por otro lado, EHNA inhibió de manera dosis dependiente la proliferación de las células tumorales. Asimismo, la IC₅₀ de EHNA (calculada para cada línea celular) fue capaz de inducir apoptosis y la desestabilización del potencial de membrana en un porcentaje importante de las células tratadas, debido a la disminución significativa en la retención de TMRM. Estudios recientes han reportado que la ADO induce apoptosis en una variedad de células cancerosas a través de dos vías: la vía intracelular, en la cual el AMP generado a partir de la fosforilación de ADO por la enzima AK, activa a la AMPK; y la vía extracelular a través de la interacción de ADO con ARs para conducir a las células tumorales a la apoptosis (Tsuchiya *et al.*, 2015). En el presente trabajo se observó que al adicionar EHNA se redujo la generación de INO tanto por la ADA-Mem como por la ADA-IC (contenida en lisados celulares), lo cual sugiere que la ADO resultante pudiera participar por cualquiera de estas dos vías para inducir apoptosis en las células tumorales de CaCu, lo cual será importante de analizar en estudios posteriores, si la inhibición de la expresión de ADA en las células tumorales de CaCu las hace más sensibles al efecto citotóxico de ADO.

Por otro lado, es importante mencionar que las PMBC presentaron el mayor porcentaje de viabilidad (60-70%) bajo el tratamiento con EHNA, probablemente debido a los altos contenidos de ADA-Total detectados en estas células, de hecho, fueron las células que presentaron los mayores contenidos de ADA-Total, lo cual puede ser favorable en el establecimiento de terapias antitumorales que incluyan inhibidores de ADA.

En este contexto, la observación de que la deficiencia de ADA causa linfopenia (Ratech *et al.*, 1981), ha impulsado grandes esfuerzos para desarrollar inhibidores que puedan explotarse de manera rentable y segura para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer que afectan al sistema inmunitario, como son leucemia y linfoma (Robak *et al.*, 2003; Dearden *et al.*, 2006), y cuya aplicación podría extenderse al tratamiento de tumores sólidos. A nivel mundial, se clasifican en las siguientes categorías: (i) inhibidores con características estructurales similares a ADO, sustrato endógeno de ADA; (ii) inhibidores de transición, que se asemejan al

intermedio tetrahédrico que se forma durante el proceso de la reacción de desaminación (Cristalli *et al.*, 2001) y (iii) la reciente segunda generación de inhibidores de ADA no nucleósidos, como FR221647 y sus derivados, que se han sintetizado por medio del diseño de fármacos basado en estructuras cristalinas de rayos X del inhibidor binario (Terasaka *et al.*, 2004). Varios inhibidores fuertes de ADA demostraron ser insatisfactorios para su uso clínico, debido a que exhibieron un alto grado de toxicidad, baja estabilidad química, mala farmacocinética, y un metabolismo rápido (Law *et al.*, 2003; Trincavelli *et al.*, 2013). En consecuencia, hay un interés continuo en el desarrollo de inhibidores de ADA más estables, fácilmente reversibles, de acción corta y de baja toxicidad. Actualmente, solo los análogos de purina, tal como la pentostatina (2'beta-deoxicoformicina: DCF) y cladribina (2-chlorodeoxyadenosine: CdA) han recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de la leucemia de células pilosas, aunque su mecanismo de acción preciso en esta enfermedad permanece desconocido (Grever *et al.*, 2011; Johnston *et al.*, 2011).

Finalmente, en este estudio, el uso del inhibidor EHNA, específico de ADA y cuya función permite un efecto irreversible sobre la actividad de ADA, permitió determinar que la presencia de ADA en las células tumorales de CaCu puede tener un efecto protector ante altas concentraciones de ADO contenidas en el TME, sugiriendo que la inhibición de ADA puede ser una estrategia a seguir en el tratamiento de esta enfermedad.

9. CONCLUSIONES

- 1** ADA se expresó diferencialmente entre las líneas celulares de CaCu, tanto en membrana (ADA-Mem) como intracelularmente (ADA-IC). La expresión de ADA-IC fue mayor en las líneas celulares HeLa y C33A, así como en PMBC, respecto a la de ADA-Mem.
- 2** Las tres líneas celulares de CaCu presentaron actividad funcional de ADA tanto en membrana como de manera intracelular (lisados celulares), capacidad que correspondió con los contenidos de ADA-Total detectados en las células tumorales. En ambas condiciones, la adición de (EHNA), inhibidor específico para ADA, redujo la actividad enzimática de ADA en las células tumorales.
- 3** EHNA inhibió de manera dosis dependiente la proliferación de las células tumorales. Las células tumorales C33A y las, quienes presentaron los más altos contenidos de ADA-Total, fueron más resistentes al tratamiento con EHNA.
- 4** La inhibición de ADA con EHNA (IC_{50}) indujo muerte celular por apoptosis y desestabilización de la membrana mitocondrial en un alto porcentaje de las células tratadas con este fármaco, además de revertir de manera importante la resistencia de las células tumorales de CaCu al efecto citotóxico de altas concentraciones de ADO.
- 5** La presencia de ADA en las células tumorales de CaCu puede tener una función protectora ante el efecto citotóxico de ADO.

10. PERSPECTIVAS

- 1** Será interesante analizar en estudios posteriores la expresión de las isoenzimas de ADA (ADA1 y ADA2) su actividad funcional (desaminación de ADO y su modulación alostérica con los ARs) en las células tumorales de CaCu.
- 2** Por otro lado, será importante dilucidar las vías (Extrínseca o Intrínseca) por las cuales ADO induce apoptosis en las células tumorales de CaCu.
- 3** Corroborar el papel protector de ADA ante el efecto citotóxico de ADO empleando interferentes de la expresión del RNAm de ADA.

11. REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008). *Introducción a la biología celular* (6th ed.). Barcelona España: Panamericana. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>.
- Aldrich, M. B., Blackburn, M. R., & Kellems, R. E. (2000). The Importance of Adenosine Deaminase for Lymphocyte Development and Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(2), 311–315. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2773>.
- Allard, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., & Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.04.001>.
- Allard, D., Allard, B., Gaudreau, P.-O., Chrobak, P., & Stagg, J. (2016). CD73–adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. *Immunotherapy*, 8(2), 145–163. <https://doi.org/10.2217/imt.15.106>.
- Antonioli, L., Colucci, R., La Motta, C., Tuccori, M., Awwad, O., Da Settimo, F., ... Fornai, M. (2012). Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. *Current Drug Targets*, 13(6), 842–862. <https://doi.org/10.1161/01.STR.28.6.1165>.
- Antonioli, L., Csóka, B., Fornai, M., Colucci, R., Kókai, E., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2014). Adenosine and inflammation: What's new on the horizon? *Drug Discovery Today*, 19(8), 1051–1068. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.010>.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Hascó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 19(6), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.tmm.2013.03.005>.
- Antonioli, L., Yegutkin, G. G., Pacher, P., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2016). Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in*

Monroy-Mora, A.

Cancer, 2(2), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.01.003>.

Ávila-Ibarra, L.R. (2011). Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasas CD73 (EC3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura. UNAM. México, D.F.

Ávila-Ibarra, L.R. (2014). Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina) como mecanismo inmunosupresor en células tumorales de cáncer de cuello uterino. Tesis de Maestría. UNAM. México, D.F.

Aymeric, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Martins, I., Kroemer, G., ... Zitvogel, L. (2010). Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Research*, 70(3), 855–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3566>.

Bar-Yehuda, S., Stemmer, S. M., Madi, L., Castel, D., Ochaion, A., Cohen, S., ... Fishman, P. (2008). The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF-kappaB signal transduction pathways. *International Journal of Oncology*, 33(2), 287–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636149>.

Battisti, V., Maders, L. D. K., Bagatini, M. D., Battisti, I. E., Bellé, L. P., Santos, K. F., ... Morsch, V. M. (2012). Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: Influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 67(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2012.12.004>.

Blackburn, M. R., & Kellems, R. E. (2005). Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Advances in Immunology*, 86, 1–41. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86001-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86001-2).

Blay, J., White, T. D., & Hoskin, D. W. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine.

Monroy-Mora, A.

Cancer Research, 57(13), 2602–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205063>.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., ... Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Castellsagué, X., & Muñoz, N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. In *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* (pp. 20–8). J Natl Cancer Inst Monogr. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807941>.

Clarke, M. A., Rodriguez, A. C., Gage, J. C., Herrero, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., ... Schiffman, M. (2012). A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-33>.

Cordero, O. J., Salgado, F. J., Fernández-Alonso, C. M., Herrera, C., Lluís, C., Franco, R., & Nogueira, M. (2001). Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 920–930. <https://doi.org/10.1189/JLB.70.6.920>.

Cortés, A., Gracia, E., Moreno, E., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E. I., & Casadó, V. (2014). Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Medicinal Research Reviews*, 35(1), 85–125. <https://doi.org/10.1002/med.21324>.

Monroy-Mora, A.

Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., & Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, *21*(2), 105–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223861>.

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., ... Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(6), 1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>.

Dearden, C. E. (2006). Role of single-agent purine analogues in therapy of peripheral T-cell lymphomas. *Seminars in Hematology*, *43*(2 Suppl 2), S22-6. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2005.12.008>.

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R & Roitt, I. M. (2015). *Roitt's essential immunology* (12th ed.). UK: Wiley-Blackwell.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30* Suppl 5, F55-70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine*, *315*(26), 1650-1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Ervik, M., Lam, F., Ferlay, J., Mery, L., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2016). *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today*. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>, accessed [26/11/2018].

Faas, M. M., Sáez, T., & de Vos, P. (2017). Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Molecular Aspects of Medicine*, *55*, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.002>.

Monroy-Mora, A.

- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2018). *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. International Journal of Cancer.* <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
- Franco, R., Pacheco, R., Gatell, J. M., Gallart, T., & Lluís, C. (2007). Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Critical Reviews in Immunology*, 27(6), 495–509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197796>.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Muller, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 1–34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>.
- Ghaemi Oskouie, F., Shamelí, A., Yang, A., Desrosiers, M. D., Mucsi, A. D., Blackburn, M. R., ... Shi, Y. (2011). High Levels of Adenosine Deaminase on Dendritic Cells Promote Autoreactive T Cell Activation and Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology*, 186(12), 6798–6806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004222>.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., ... Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*, 15(10), 1170–8. <https://doi.org/10.1038/nm.2028>.
- Grever, M. R. (2011). Hairy cell leukemia: a successful model for experimental therapeutics—pentostatin and new ideas. *Leukemia & Lymphoma*, 52(sup2), 25–28. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.577851>.
- Guo, Y.-L., You, K., Qiao, J., Zhao, Y., & Geng, L. (2012). Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *International Journal of STD & AIDS*, 23(8), 581–4. <https://doi.org/10.1258/ijsa.2012.011342>.

Monroy-Mora, A.

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>.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Haskó, G., & Cronstein, B. N. (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>.

Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9), 759–70. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. **2015**. Accesado (23/03/2018), disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.

Insinga, R. P., Perez, G., Wheeler, C. M., Koutsky, L. A., Garland, S. M., Leodolter, S., ... Haupt, R. M. (2011). Incident Cervical HPV Infections in Young Women: Transition Probabilities for CIN and Infection Clearance. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20(2), 287–296. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0791>.

Iwaki-Egawa, S., Yamamoto, T., & Watanabe, Y. (2006). Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. *Biological Chemistry*, 387(3), 319–21. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.042>.

Johnston, J. B. (2011). Mechanism of action of pentostatin and cladribine in hairy cell leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 52 Suppl 2(sup2), 43–5. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.570394>.

Monroy-Mora, A.

Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 11(3), 201–12. <https://doi.org/10.1038/nri2938>.

Kalinski, P. (2017). *Tumor Immune Microenvironment in Cancer Progression and Cancer Therapy* (Pawel Kali, Vol. 1036). New York,: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0>.

Kaljas, Y., Liu, C., Skaldin, M., Wu, C., Zhou, Q., Lu, Y., ... Zavalov, A. V. (2017). Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(3), 555–570. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2357-0>.

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>.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. W.H. Freeman.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.

Law, W. R., Valli, V. E., & Conlon, B. A. (2003). Therapeutic potential for transient inhibition of adenosine deaminase in systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine*, 31(5), 1475–81. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000063259.09580.D8>.

Lazarowski, E. R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signalling*, 8(3), 359–73. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9304-9>.

Monroy-Mora, A.

Linden, J., & Cekic, C. (2012). Regulation of Lymphocyte Function by Adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2097–2103. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226837>.

Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., ... Whiteside, T. L. (2010). Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7176–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047423>.

Mandapathil, M., Szczepanski, M., Harasymczuk, M., Ren, J., Cheng, D., Jackson, E. K., ... Whiteside, T. L. (2012). CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4 + T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology*, 1(5), 659–669. <https://doi.org/10.4161/onci.20387>.

Molina-Castillo, G. (2019). Efecto de TGF- β , INF- β , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino. Tesis de Maestría. UNAM. México, D.F.

Montesinos, M. C., Desai, A., Chen, J.-F., Yee, H., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., & Cronstein, B. N. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *The American Journal of Pathology*, 160(6), 2009–18. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61151-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61151-0).

Mora-García, M. L., Ávila-Ibarra, L. R., García-Rocha, R., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., Don-López, C. A., ... Monroy-García, A. (2017). Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular Immunology*, 320, 46–55. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874917301363?via%3Dihub>.

Muller-Haegle, S., Muller, L., & Whiteside, T. L. (2014). Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert Review of*

Monroy-Mora, A.

Clinical Immunology, 10(7), 897–914.
<https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.915739>.

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., ... International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>.

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. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(1), 51–60. <https://doi.org/10.1159/000369674>.

Naval-Macabuhay, I., Casanova, V., Navarro, G., García, F., León, A., Miralles, L., ... Climent, N. (2016). Adenosine deaminase regulates T_{reg} expression in autologous T cell-dendritic cell cocultures from patients infected with HIV-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(2), 349–359. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A1214-580RR>.

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 dATP-dependent activation of caspase-3. *Blood*, 92(9), 3368–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787175>.

Ohta, A. (2016). A metabolic immune checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7(MAR), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00109>.

Monroy-Mora, A.

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>.

Parham, P. (2011). *El sistema inmune (3a ed)*. México: Manual Moderno

Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., & Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PloS One*, 3(7), e2599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>.

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>.

Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289>.

Rashidian, M., Keliher, E. J., Bilate, A. M., Duarte, J. N., Wojtkiewicz, G. R., Jacobsen, J. T., ... Ploegh, H. L. (2015). Noninvasive imaging of immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6146–6151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502609112>.

Ratech, H., & Hirschhorn, R. (1981). Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient-severe combined immunodeficiency. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 115(3), 341–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6975191>.

Ratech, H., Thorbecke, G. J., Meredith, G., & Hirschhorn, R. (1981). Comparison and possible homology of isozymes of adenosine deaminase in Aves and humans. *Enzyme*, 26(2), 74–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7238474>.

Monroy-Mora, A.

Robak, T. (2003). Purine nucleoside analogues in the treatment of myeloid leukemias. *Leukemia & Lymphoma*, 44(3), 391–409. <https://doi.org/10.1080/1042819021000035608>.

Roberts, E. L., & Roberts, O. T. (2012). Plasma adenosine deaminase isoform 2 in cancer patients undergoing chemotherapy. *British Journal of Biomedical Science*, 69(1), 11–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558798>.

Rhyzhov, S., Novitskiy, S. V., Goldstein, A. E., Biktasova, A., Blackburn, M. R., Biaggioni, I., ... Feoktistov, I. (2011). Adenosinergic Regulation of the Expansion and Immunosuppressive Activity of CD11b+Gr1+ Cells. *The Journal of Immunology*, 187(11), 6120–6129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101225>.

Sai, K., Yang, D., Yamamoto, H., Fujikawa, H., Yamamoto, S., Nagata, T., ... Nishizaki, T. (2006). A(1) adenosine receptor signal and AMPK involving caspase-9/-3 activation are responsible for adenosine-induced RCR-1 astrocytoma cell death. *Neurotoxicology*, 27(4), 458–67. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.12.008>.

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>.

Sitkovsky, M. V., Hatfield, S., Abbott, R., Belikoff, B., Lukashev, D., & Ohta, A. (2014). Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. *Cancer Immunology Research*, 2(7), 598–605. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0075>.

Tamura, K., Kanno, T., Fujita, Y., Gotoh, A., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2012). A(2a) adenosine receptor mediates HepG2 cell apoptosis by downregulating Bcl-X(L) expression and upregulating Bid expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(5), 1766–75. <https://doi.org/10.1002/jcb.24048>.

Monroy-Mora, A.

Terasaka, T., Okumura, H., Tsuji, K., Kato, T., Nakanishi, I., Kinoshita, T., ... Nakamura, K. (2004). Structure-Based Design and Synthesis of Non-Nucleoside, Potent, and Orally Bioavailable Adenosine Deaminase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(11), 2728–2731. <https://doi.org/10.1021/jm0499559>.

Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a "Danger Signal". *Science Signaling*, 2(56), pe6-pe6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6>.

Trincavelli, M. L. (2013). Unveiling the binding mode of adenosine deaminase inhibitors to the active site of the enzyme: implication for rational drug design : presented by Maria P. Abbracchio. *Purinergic Signalling*, 9(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9353-8>.

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>.

Turley, S. J., Cremasco, V., & Astarita, J. L. (2015). Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 15(11), 669–682. <https://doi.org/10.1038/nri3902>.

Ungerer, J. P., Oosthuizen, H. M., Bissbort, S. H., & Vermaak, W. J. (1992). Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clinical Chemistry*, 38(7), 1322–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1623598>.

Vaupel, P., & Mayer, A. (2016). Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 876, pp. 177–183). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22.

Vaupel, P., & Multhoff, G. (2016). Commentary: A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 7, 332.

Monroy-Mora, A.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00332>.

Vriend, H. J., Bogaards, J. A., van Bergen, J. E. A. M., Brink, A. A. T. P., van den Broek, I. V. F., Hoebe, C. J. P. A., ... Medical Microbiological Laboratories and the CSI group. (2015). Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without *Chlamydia trachomatis* co-infection. *Cancer Medicine*, 4(10), 1589–1598. <https://doi.org/10.1002/cam4.496>.

Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., ... Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).

Whiteside, T. L. (2017). Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(6), 527–535. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1316197>.

Yang, D., Yaguchi, T., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2011). Adenosine activates AMPK to phosphorylate Bcl-XL responsible for mitochondrial damage and DIABLO 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/10.1159/000325207>.

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>.

Zavialov, A. V, & Engström, A. (2005). Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *The Biochemical Journal*, 391(Pt 1), 51–7. <https://doi.org/10.1042/BJ20050683>.

Zavialov, A. V, Gracia, E., Glaichenhaus, N., Franco, R., Zavialov, A. V, & Lauvau,

Monroy-Mora, A.

G. (2010). Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(2), 279–90. <https://doi.org/10.1189/jlb.1109764>.

12. APÉNDICE

Preparación de RPMI

1800 mL de agua mili-Q en una probeta de 2 L, adicionar dos frascos de reactivo para medio de cultivo RPMI (Sigma, USA) manteniendo en agitación hasta que se disuelva y posteriormente añadir 4 g de bicarbonato de sodio hasta que se logre una mezcla homogénea. Aforar a dos litros con agua mili-Q. Ajustar el pH a 7.2-7.3 con ayuda de Ácido Clorhídrico HCl o NaOH.

Filtrar en condiciones de esterilidad y añadir al medio antibiótico (5 mL por cada 500 mL de medio).

Preparación de medio para linfocitos IMDM

Disolver un frasco de medio Iscoves modified Dubelcco's (Sigma, USA) en 800 mL de agua mili-Q y agregar 3 g de NaHCO₃ manteniendo en agitación. Ajustar a pH de 7.3. Aforar a 1 L. Luego de filtrar el medio, agregar antibióticos. Posteriormente, agregar suero inactivado humano al 10%. Finalmente suplementar con 500 µL de piruvato de sodio (100 X), 500 µL de aminoácidos no esenciales (100X) y 50 µL de 2- mercaptoetanol (100 X).

Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

8 g de Cloruro de sodio

0.2 g de cloruro de potasio

0.2 g de fosfato de potasio monobásico

Se afora en un litro de agua Milli-Q y se ajusta a un pH de 7.2 con fosfato de sodio dibásico.

Preparación de verseno (para 2L)

Tris base 6.88 g

16 g NaCl

0.8 g KCl

0.4 g EDTA

Ajustar pH a 7.7

Monroy-Mora, A.

Preparación de tripsina

Pesar 0.25 g de tripsina y disolver en 50 ml de PBS estéril. Filtrar la solución.

Luego, realizar una dilución de tripsina para obtener una proporción de tripsina-verseno 1:5

Preparación de Paraformaldehído al 2%

En un frasco se agregan 200 mL de agua mili-Q caliente a 60°C y se agregan 5 g de paraformaldehído y de ahí se va aplicando gotas de NaOH. Se agita vigorosamente hasta que esté disuelto, y después se agregan 25 ml de PBS 10X y se afora a 250 mL.