



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE CD73 EN LA
VIABILIDAD Y LA CAPACIDAD DE FORMAR ESFERAS TUMORALES
IN VITRO DE LA LÍNEA CELULAR CASKI, DERIVADA DE CÁNCER
CERVICAL UTERINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

ADRIANA ALEJANDRA PÉREZ MEDINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

ASESORA: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

Ciudad de México, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología de la UIDCC en la UMIEZ de la FES Zaragoza, UNAM. **“Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <<IN225519>>”.**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María De Lourdes Mora García y al Dr. Alberto Monroy García por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, además de su apoyo, observaciones y sugerencias que permitieron el desarrollo del presente trabajo.

Mi profundo agradecimiento al Dr. Jorge Hernández Montes, mi director de tesis por sus enseñanzas, asesoría durante la realización de los ensayos experimentales y comentarios a mi trabajo de investigación, los cuales fueron de vital importancia para el desarrollo del mismo.

A la Dra. Christian Azucena Don López por compartir su conocimiento, su tiempo, sus comentarios y correcciones que ayudaron a la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosario Rocha García ya que siempre estuvo dispuesta para aclarar cualquier duda, por sus comentarios, apoyo y asesoría brindada durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio por su ayuda, los consejos brindados y por hacer el ambiente de trabajo más ameno.

ÍNDICE

ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
MARCO TEÓRICO	1
• Cáncer	1
• Cáncer cérvicouterino (CaCu)	1
• Virus del Papiloma Humano (HPV)	4
• Estructura y genoma.....	5
• CD73	7
• Vía adenosinérgica.....	8
• Modelo de cultivo de células tumorales en 3D	10
• CD73 en cáncer cervicouterino	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
MATERIAL Y MÉTODO	18
• Líneas celulares	18
• Condiciones de cultivo celular	18
• Evaluación de la proliferación	19
• Determinación de la expresión de CD73 y proteínas asociadas con la troncalidad celular, por citometría de flujo	19

- Generación de tumoresferas21
- Determinación de la apoptosis por citometría de flujo21
- Generación de tumoresferas en presencia de Ado y EGF22

RESULTADOS..... 23

- Células transfectadas con un siRNA específico a CD73, presentan disminución en la expresión de CD73 en membrana.....23
- Las células CaSki desreguladas en la expresión de CD73 en membrana muestran baja capacidad para formar tumoresferas.25
- Las células CaSki desreguladas en la expresión de CD73 presentan un aumento en la apoptosis cuando son cultivadas en condiciones de ultra baja adherencia.27
- Las células CaSki desreguladas en la expresión de CD73 presentan menor capacidad proliferativa que las células CaSki con mayor expresión de CD73.....30
- Ado no favorece la capacidad de formar tumoresferas.....32
- No hay una diferencia significativa en la expresión de proteínas asociadas con el mantenimiento de la viabilidad y la capacidad clonal entre células de cáncer cervicouterino con diferente expresión de CD73. ...34
- EGF mejora la formación de esferas en las células CaSki WT y células CaSki desreguladas en la expresión de CD73.....37

DISCUSIÓN DE RESULTADOS 39

CONCLUSIONES 45

PERSPECTIVAS..... 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo viral en el epitelio estratificado. Tomada de Manzo-Merino J <i>et al.</i> , 2014.	3
Figura 2. Evolución de las lesiones intraepiteliales cervicales hacia cáncer y su relación con productos del HPV. Tomada de Manzo-Merino J <i>et al.</i> , 2014.	4
Figura 3. Organización del genoma del Virus del Papiloma Humano. Tomada de Zaldívar G <i>et al.</i> , 2012.....	6
Figura 4. Metabolismo de la Ado extracelular. Tomada de Regateiro FS <i>et al.</i> , 2013.	9
Figura 5. Diagrama esquemático de la población de células troncales del cáncer (CSC) en un ensayo <i>in vitro</i> 3D o de formación de esferas. Tomado de Zhang L <i>et al.</i> , 2012.	12
Figura 6. Expresión de CD73 en células CaSki WT y CaSki transfectadas con un siRNA específico para CD73.....	24
Figura 7. Formación de tumoresferas de células CaSki cultivadas en ultra baja adherencia...	26
Figura 8. Detección de apoptosis en las células CaSki cultivadas en ultra baja adherencia. ...	29
Figura 9. Cinética de proliferación de las células CaSki.....	31
Figura 10. Formación de esferas en cultivo de ultra baja adherencia con tratamiento de Ado y APCP.	33
Figura 11. Expresión de marcadores de troncalidad en células CaSki.....	37
Figura 12. Formación de esferas en cultivo de ultra baja adherencia de células CaSki con tratamiento de EGF.	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de anticuerpos empleados en la determinación de la expresión de CD73 y proteínas asociadas con la troncalidad celular.	20
---	----

RESUMEN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, corresponde al 10% de todos los cánceres y es la tercera neoplasia más diagnosticada en mujeres entre los 25 y 64 años. La alta tasa de mortalidad de esta enfermedad se atribuye a la metástasis, que es un mecanismo esencial para promover la progresión del tumor.

Se ha reportado que CD73 se sobreexpresa en distintos tipos de cánceres humanos, entre ellos el CaCu, lo cual se ha asociado con un mal pronóstico y un deterioro de la inmunidad antitumoral pues la expresión de CD73 en las células tumorales perjudica significativamente las respuestas inmunitarias antitumorales adaptativas a través de su actividad ecto-enzimática, ya que la adenosina (Ado) generada por CD73 del tumor bloquea la inmunovigilancia al inhibir a las células del sistema inmunitario. Además, se ha propuesto que CD73 cumple funciones de señalización y adhesión, independientes de su función enzimática, lo cual puede favorecer a las propiedades invasivas y metastásicas del cáncer, por lo tanto, el papel que juega CD73 en el microambiente tumoral la ubica como una molécula reguladora clave en el desarrollo del cáncer.

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la proteína CD73 en la viabilidad de células de la línea celular CaSki y determinar si es que esta molécula presentaba un efecto en la formación de esferas tumorales *in vitro*. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de la proteína favorece la capacidad de formar esferas bajo condiciones de cultivo sin adherencia al sustrato (resistencia a anoikis). Además, observamos que la expresión disminuida de CD73 induce una intensa apoptosis (anoikis), y que en un cultivo en monocapa adherida, las células muestran una cinética de proliferación más lenta.

Por su parte, Ado, producto de la actividad enzimática de CD73, no tiene un efecto inductor de la formación de esferas; de mismo modo, un inhibidor específico de la actividad enzimática de CD73, APCP, no inhibe la formación de esferas. Por otro lado, se muestra que el Factor de

Crecimiento Epidérmico (EGF) tiene un efecto favorecedor sobre la forma de las células CaSki, e incrementa la capacidad de formar esferas tumorales.

Estos resultados nos permiten concluir que CD73 muestra efecto sobre la formación de esferas multicelulares y que ésta no depende de su actividad enzimática; de igual manera, la disminución en la expresión de CD73 en la membrana afectó la viabilidad de las células CaSki al inducir apoptosis por anoikis, y que EGF les confiere a las células resistencia a la anoikis.

MARCO TEÓRICO

- Cáncer

El cáncer es una enfermedad donde la célula ha perdido su capacidad de mantener la homeostasis, aumentando su proliferación de manera descontrolada, evadiendo los supresores de crecimiento y la muerte celular; puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo generando un tumor que suele invadir el tejido circundante y producir metástasis en puntos distantes del organismo (OMS, 2021).

Hay diversas causas que llegan a provocar tales cambios en la célula debido a la acumulación de una serie de mutaciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos o biológicos (Muñoz A, 1997). Como resultado, las células cancerosas poseen propiedades que las proveen de la capacidad de invasión, y que impiden una adecuada regulación del ciclo celular debido a que ignoran las señales internas y externas de muerte celular programada (Douglas H and Weinberg RA, 2011).

Esta enfermedad se manifiesta como uno de los principales problemas de salud pública y una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Torres-Poveda KJ *et al.*, 2014). En 2012, se reportaron en el mundo 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de fallecimientos. De acuerdo a las proyecciones, para 2030 el número de nuevos casos habrá aumentado hasta llegar a los 21.6 millones anuales (OMS, 2016).

- Cáncer cérvicouterino (CaCu)

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, corresponde al 10% de todos los cánceres y es la tercera neoplasia más diagnosticada en mujeres entre los 25 y 64 años. Cada año, se diagnostican alrededor de 500,000 casos nuevos en todo el mundo, y se estima que producen alrededor de 231,000 muertes de las cuales más del 85% ocurre en países en vías de desarrollo, donde representan 13% de los cánceres femeninos (Torres-Poveda KJ *et al.*, 2014).

Se ha establecido mediante evidencias moleculares y epidemiológicas, que existe una fuerte asociación entre la transmisión sexual del Virus del Papiloma Humano (HPV, por sus siglas en inglés: *Human papillomavirus*), la infección crónica del epitelio cervical y el riesgo de desarrollo de carcinoma invasor de células escamosa en el progreso de CaCu. Adicionalmente, se ha reconocido que hay otros factores de riesgo asociados que participan en el desarrollo de la carcinogénesis del epitelio cervical como lo son el número de parejas sexuales, el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, número de embarazos, tabaquismo, obesidad, uso de anticonceptivos orales o inmunosupresión (Barba-Evia JR, 2009; Zaldívar G *et al.*, 2012).

En México, el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años; aunque la experiencia de países más desarrollados ha demostrado que la mejor opción para disminuir la mortalidad por CaCu es la detección aunada a un tratamiento oportuno de lesiones precursoras y lesiones malignas, anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos nuevos y una mortalidad de 4,031 defunciones con una tasa de 11.2 por 100,000 mujeres (Doorbar J, 2006).

El CaCu se origina en el epitelio del cuello uterino, la mucosa que lo recubre se denomina ectocérvix y se encuentra formado por epitelio escamoso estratificado; el epitelio que recubre el canal cervical se denomina endocérvix y está formado por células glandulares, y el punto en el que estos dos tipos de células se concentran en el cuello uterino se llama zona de transformación. Cuando las células de este epitelio crecen de forma anormal, pueden generarse lesiones precancerosas o displasias (Vicuña CN *et al.*, 2009).

El proceso neoplásico inicia con la infección de las células basales por el HPV, cuando éste accede al estrato epitelial basal indiferenciado a través de una herida, el genoma del virus se establece y se replica en forma episomal nuclear. Una vez infectadas las células basales, comienzan a replicarse dando resultado a las células hijas HPV+, que migran de la capa basal e inician su proceso de diferenciación. En la capa suprabasal, estas células son inducidas para entrar a la fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma

viral, resultando en la expresión de la transcripción tardía, la producción de proteínas de la cápside y, finalmente, el ensamblaje de toda la progenie de viriones. La amplificación del DNA viral y la producción de su progenie solamente se observa en el estrato más superficial diferenciado del epitelio escamoso (**Figura 1**) (Barba-Evia JR, 2009).

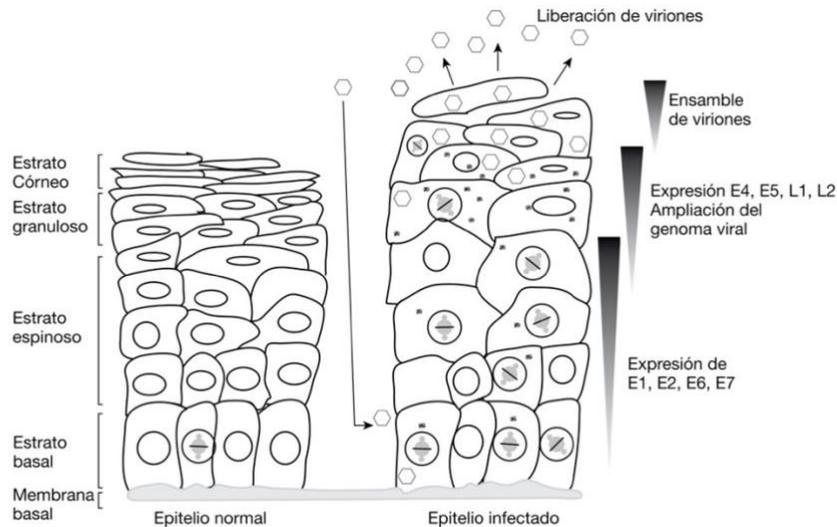


Figura 1. Ciclo viral en el epitelio estratificado. Tomada de Manzo-Merino J *et al.*, 2014.

El CaCu evoluciona a partir de lesiones premalignas no invasivas, referidas como NIC (neoplasias intracervicales) o LIE (lesiones intraepiteliales escamosas). Histológicamente, las alteraciones precancerosas se gradúan de la siguiente forma (**Figura 2**):

- NIC I: displasia leve
- NIC II: displasia moderada
- NIC III: displasia grave y carcinoma in situ

En las clasificaciones citológicas, las lesiones precancerosas se agrupan sólo en dos grupos:

- Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG): corresponden a NIC I o condilomas planos
- Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG): corresponden a NIC II ó III (Manzo-Merino J *et al.*, 2014).

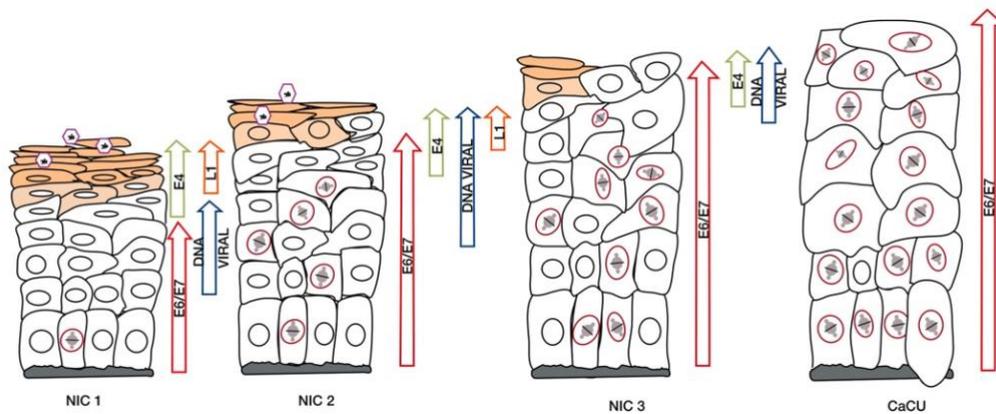


Figura 2. Evolución de las lesiones intraepiteliales cervicales hacia cáncer y su relación con productos del HPV. Tomada de Manzo-Merino J *et al.*, 2014.

Por lo tanto, antes de manifestarse, el CaCu pasa por varias etapas que empiezan con la displasia que, en caso de no tratarse, evoluciona a carcinoma *in situ* y cáncer invasor (López Saavedra A and Lizano Soberón M, 2006).

En la gran mayoría de las mujeres, el período entre la infección por HPV, la displasia y el carcinoma invasor suele ser de años a décadas, lo que ofrece un gran potencial para la detección oportuna y su tratamiento temprano para modificar el curso natural de la enfermedad y la morbilidad asociada a ésta (Vicuña CN *et al.*, 2009).

- Virus del Papiloma Humano (HPV)

La infección por el HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes, con una prevalencia en mujeres jóvenes entre 30 al 46% en diversos países (Vicuña CN *et al.*, 2009). Se ha observado que es un factor de riesgo etiológico que favorece al desarrollo de CaCu, pues, aunque el 90% de las infecciones suelen curarse por sí mismas, el resto de las infecciones pueden culminar en un crecimiento de células descontrolado progresando a un cáncer invasor (Zaldívar G *et al.*, 2012). Las infecciones genitales por el HPV son transmitidas principalmente por contacto sexual, pues como se mencionó anteriormente, se considera que ocurre a través de

microabrasiones del epitelio que exponen a la infección viral a las células de la capa basal (Vicuña CN *et al.*, 2009).

El HPV es un virus con DNA de doble cadena de la familia de los *Papillomaviridae* (López Saavedra A and Lizano Soberón M, 2006). Se han identificado más de 100 genotipos de los cuales cerca de 18 se clasifican en “alto riesgo” dada su asociación con cáncer, y de “bajo riesgo” por su asociación con displasias de alto y bajo grado. Los tipos de HPV 16 y 18 son causantes de más de 75% de todos los cánceres de cérvix. Las infecciones por HPV son bastante comunes, y típicamente están asociadas con lesiones displásicas de bajo grado, pero la infección persistente asociada a lesiones displásicas de alto grado acontece en 1-2% de las mujeres afectadas (Manzo-Merino J *et al.*, 2014).

Estudios epidemiológicos basados en tecnologías moleculares han provisto de evidencia que asocia el papel causal de algunas infecciones por HPV con el desarrollo del 5.2% de los cánceres, lo que lo coloca como un agente oncogénico de diversos cánceres, además del de cérvix, el de útero, vulva, pene, ano, piel, cavidad oronasal, así como del tracto superior aerodigestivo (Barba-Evia JR, 2009).

- Estructura y genoma

El HPV tiene una cápside icosaédrica, constituida por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), conformada por las proteínas estructurales L1 y L2, que albergan el genoma viral. Su genoma viral consiste en DNA circular de doble cadena de 7200-8000 pares de bases (pb), con más de 10 marcos de lectura abierta (ORFs) y generalmente una hebra es transcripcionalmente activa (Gutiérrez-Xicoténcatl L *et al.*, 2009). El genoma del HPV se divide en tres regiones, dependiendo del momento en que se expresan los genes durante el ciclo viral: región temprana (E: *Early*) que codifica para los genes implicados en replicación y mantenimiento del genoma viral (E1-E8); región tardía (L: *Late*), la cual codifica a las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2, y que interviene en la entrada del virus a las células, en la

localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al DNA, y en la formación de la cápside (Zaldívar G *et al.*, 2012); y, por último, la región larga de control (LCR: *Long Control Region*), la cual contiene los sitios de regulación de la transcripción y replicación viral (**Figura 3**) (Manzo-Merino J *et al.*, 2014).

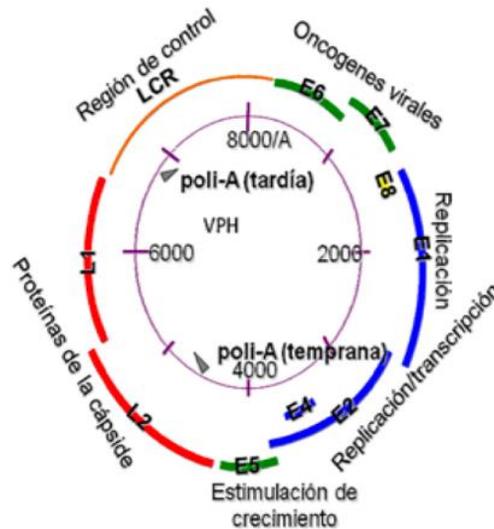


Figura 3. Organización del genoma del Virus del Papiloma Humano. Tomada de Zaldívar G *et al.*, 2012.

Una vez que el virus logra penetrar a la célula huésped inicia la expresión de los genes tempranos E1-E7 promoviendo la replicación del genoma viral. Las moléculas críticas en la replicación son E6 y E7, las cuales inactivan funcionalmente los productos de dos genes supresores de tumores muy importantes, p53 y Rb, ocasionando la proliferación, inmortalización y transformación maligna de las células infectadas (Motoyama S *et al.*, 2004).

Durante la fase inicial de la infección, las proteínas E1 y E2 son expresadas para mantener el DNA viral como episoma nuclear, facilitando la correcta segregación del genoma viral durante la división celular. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio mientras que la otra célula inicia el proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio (Manzo-Merino J *et al.*, 2014; Vicuña CN *et al.*, 2009).

En etapas más avanzadas de la infección, el HPV integra su genoma viral al DNA de la célula huésped, paso importante en la progresión neoplásica del cérvix, debido a que la integración causa delección o alteración del gen regulador viral E2, lo cual origina el incremento de la expresión de los oncogenes virales, y provoca la expansión clonal de células infectadas dando lugar al proceso infeccioso. Finalmente, la integración del genoma viral al genoma celular conlleva la sobreexpresión de E6 y E7, y pérdida de las proteínas E1 y E2 (Doorbar J, 2006).

- CD73

La proteína CD73, también conocida como ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'-NT, EC 3.1.3.5), es una glicoproteína de superficie celular anclada al glicosilfosfatidilinositol (GPI), de 70 kD, que está codificada por el gen NT5E. Esta proteína tiene funciones enzimáticas y no enzimáticas: en las células, juega un papel crucial en la activación del metabolismo adenosinérgico al hidrolizar nucleósidos monofosfatos extracelulares en nucleósidos intermedios bioactivos, además de que puede funcionar como una molécula de señalización (Antonioli L *et al.*, 2016).

Como nucleotidasa unida a la superficie, metaboliza el monofosfato de adenosina (AMP, por sus siglas en inglés) a adenosina (Ado), la cual puede activar hasta cuatro tipos de receptores acoplados a proteína G. Los receptores de Ado se expresan en una amplia variedad de células y se ha demostrado que distintos tipos de células expresan más de una isoforma de receptores (Colgan SP *et al.*, 2006; Gao Z *et al.*, 2014).

Se ha reportado que CD73 se sobreexpresa en distintos tipos de líneas celulares de cáncer y biopsias de pacientes, incluidos cáncer de mama, colorrectal, de ovario, gástrico, de vesícula biliar, próstata, melanoma, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. Así mismo, su sobreexpresión se ha asociado con un pronóstico adverso y un deterioro de la inmunidad antitumoral en varios cánceres humanos, pues la expresión de CD73 por las células tumorales perjudica significativamente las respuestas inmunitarias antitumorales adaptativas

a través de su actividad ecto-enzimática, ya que la Ado generada por CD73 del tumor bloquea la inmunovigilancia al inhibir a las células del sistema inmunitario (Gao Z *et al.*, 2017).

Se ha propuesto que CD73 cumple, además, funciones de señalización y adhesión, independientes de su función enzimática, y que puede regular la interacción celular con componentes de la matriz extracelular (MEC), como la laminina y la fibronectina, lo cual puede favorecer a las propiedades invasivas y metastásicas del cáncer (Sadej R *et al.*, 2006). Por lo tanto, varios estudios han asociado a CD73 en el control de la función de barrera tisular (Colgan SP *et al.*, 2006).

Por lo cual, cada vez se acumulan más evidencias que indican que las funciones de CD73 la colocan como una molécula reguladora clave en el desarrollo del cáncer (Allard D *et al.*, 2016; Gao Z *et al.*, 2014). De hecho, tanto las funciones enzimáticas como las no enzimáticas de CD73 están involucradas en procesos asociados al cáncer y no son completamente independientes entre sí (Regateiro FS *et al.*, 2013).

- Vía adenosinérgica

La vía adenosinérgica es una cascada enzimática coordinada, de varios pasos, que inicia con la liberación espontánea de trifosfato y difosfato de adenosina (ATP / ADP, por sus siglas en inglés), y culmina con la formación de Ado extracelular por la acción de las ectonucleotidasas unidas a la membrana; dicha liberación se da de manera espontánea, como resultado del daño celular u ocasionado por estrés metabólico (Leone RD and Emens LA, 2018).

Las moléculas de ATP liberadas al espacio extracelular son hidrolizadas a ADP y éste es hidrolizado secuencialmente a AMP, por la ectoenzima CD39 (ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, E- NTPDase1). El AMP obtenido es hidrolizado hasta Ado por la ectoenzima CD73 y se une a sus propios receptores celulares, denominados genéricamente como P1 (A1R, A2AR, A2BR y A3R), que influyen en la supervivencia, la proliferación y la motilidad celular (Boison D and Yegutkin GG, 2019).

La Ado extracelular acumulada obstaculiza la infiltración y la activación de las células inmunes, de modo que la Ado actúa como una de las moléculas reguladoras inmunosupresoras más importantes en el microambiente tumoral (**Figura 4**) (Gao Z *et al.*, 2014).

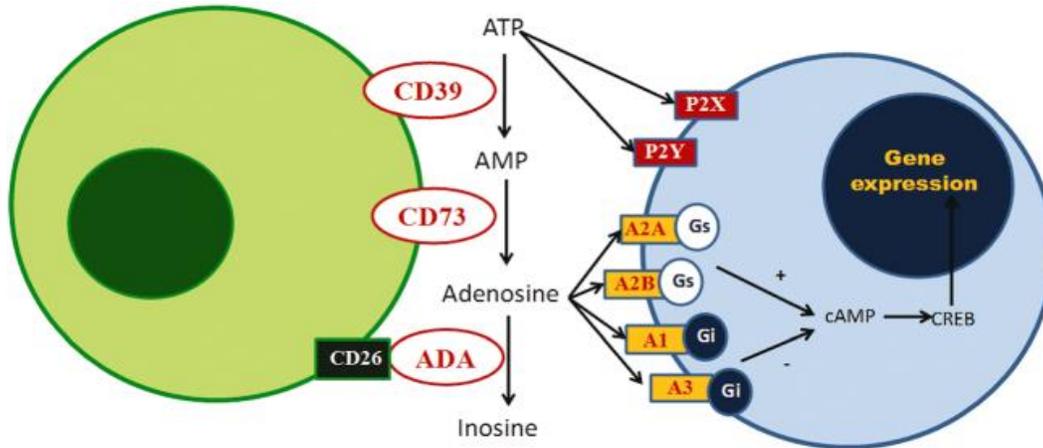


Figura 4. Metabolismo de la Ado extracelular. Tomada de Regateiro FS *et al.*, 2013.

Los receptores de Ado de la superficie celular, expresados en varios tipos de células y tejidos, están acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés: *G protein coupled receptors*), y funcionan mediante la inhibición o estimulación de la adenilil-ciclase para disminuir o aumentar los niveles intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP): Los receptores A1 y A3 se acoplan preferentemente a proteínas G inhibitoras (Gi), inhibiendo la adenilato ciclase y la producción de cAMP; en contraste, los receptores A2A y A2B están acoplados a las proteínas reguladoras estimulantes (Gs), lo que desencadena la acumulación de cAMP intracelular (Allard D *et al.*, 2016).

En situaciones de estrés metabólico, la acumulación de Ado extracelular y la estimulación de los receptores de Ado protegen los órganos contra lesiones e inflamación excesiva, y promueven la reparación del tejido (Antonioli L *et al.*, 2014). Sin embargo, tales mecanismos de defensa mediados por la Ado también pueden contribuir al desarrollo y la progresión de la tumorigénesis (Hammami A *et al.*, 2019).

Las moléculas adenosinérgicas causan una fuerte inmunosupresión en el microambiente tumoral. Se sabe que la Ado es capaz de inhibir la activación y las funciones efectoras citotóxicas tanto de las células asesinas naturales (NK) como de las células T CD8+ (GAO ZW et al., 2016; Huang S et al., 1997). Los efectos inhibidores de Ado sobre las células efectoras del sistema inmunitario están mediados principalmente por los receptores A2A y A2B, que disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias y aumentan la síntesis de citocinas inmunosupresoras, como la interleucina 10 (IL-10) y el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés: *transforming growth factor*) (Allard D et al., 2016).

Además de actuar directamente sobre las células NK y las células T CD8+, A2AR también actúa a través de la modulación de las células mieloides y de las células T reguladoras (T reg) CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺, para obstaculizar las funciones de los linfocitos citotóxicos, mientras que el receptor A2B provoca inmunosupresión principalmente a través de células mieloides, lo que se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Vijayan D et al., 2017).

- Modelo de cultivo de células tumorales en 3D

Debido a la heterogeneidad y complejidad del cáncer se ha hecho necesario abordar nuevos modelos que permitan recrear las condiciones *in vivo* que consideren los múltiples parámetros del microambiente tumoral. Los modelos bidimensionales (2D) tienen una capacidad limitada para imitar las condiciones complejas presentes *in vivo*; en cambio, los sistemas *in vitro* 3D abordan este problema, ya que pueden imitar con mayor precisión tanto la estructura del tejido maligno como el microambiente al que están expuestas las células dentro del tumor (Sung KE and Beebe DJ, 2014).

El cultivo 3D fue empleado por primera vez por Reynolds et al. para cultivar células de cerebro adulto, obteniendo agregados similares a esferas, llamadas neuroesferas (Herrerros Pomares A, 2019). Desde entonces, se han desarrollado diversos modelos de cultivo para la obtención de esferoides; por ejemplo, Sutherland et al. utilizaron un modelo de sistema *in vitro* 3D para

recrear las complejidades de un tumor multicelular y estudiar la respuesta de las células tumorales humanas al efecto de agentes terapéuticos (Alcántara-Quintana LE, 2019).

La base metodológica para la formación de esferas es colocar células en una superficie de adherencia ultrabaja, con el medio de cultivo libre de suplementos y con requisitos mínimos de factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), y el Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (bFGF). La formación de esferas parte de cultivo primario de células tumorales o de líneas celulares comerciales (Lee C-H *et al.*, 2016).

En las esferas, las células crecen en estrecho contacto, reproduciendo así las condiciones físicas observadas en los tumores sólidos tales como: (i) heterogeneidad celular; (ii) señalización célula-célula; (iii) estructura interna del tumor; (iv) deposición de matriz extracelular (MEC), interacciones físicas entre células-MEC y célula-célula; (v) cinética de crecimiento; (vi) expresión génica y (vii) resistencia a fármacos, por tanto, los cultivos 3D pueden ser usados para evaluar aspectos relacionados con la migración celular, hipoxia, entre otros aportando resultados útiles para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer (Costa EC *et al.*, 2016).

Se ha propuesto que una minoría de células dentro del modelo de cultivo 3D están dotadas de potencial tumorigénico, aumentando su proliferación para generar células hijas con características específicas, entre ellas la autorrenovación y diferenciación de forma indefinida, lo que les confiere la capacidad de causar crecimiento tumoral (Alcalá Pérez D *et al.*, 2015). Estas son las llamadas células troncales del cáncer (CSC por sus siglas en inglés: *cancer stem cells*), y teniendo en cuenta que muestran una capacidad de sobrevivencia independiente del anclaje, los ensayos *in vitro* 3D se han convertido en un método estándar para seleccionar CSC, analizar su capacidad de autorrenovación y enriquecer estas células (Lee C-H *et al.*, 2016; Liu H *et al.*, 2016). De manera que los tumores que crecen a partir de las CSC contienen poblaciones mixtas de células cancerosas tumorigénicas y no tumorigénicas, recreando así la heterogeneidad fenotípica completa del tumor original (**Figura 5**) (Dalerba P *et al.*, 2007).

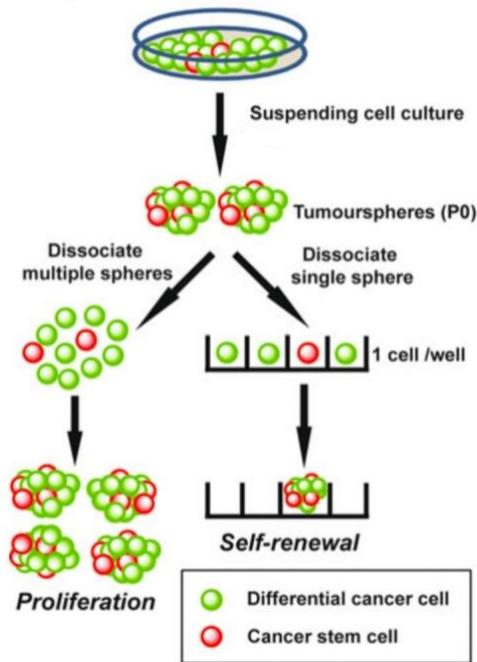


Figura 5. Diagrama esquemático de la población de células troncales del cáncer (CSC) en un ensayo *in vitro* 3D o de formación de esferas. Tomado de Zhang L *et al.*, 2012.

Las CSC pueden originarse tanto de células troncales normales como de células diferenciadas que han adquirido características semejantes a las de las células troncales normales (Alcalá Pérez D *et al.*, 2015). Entre las características que comparten las CSC con las células troncales normales están la autorrenovación, la diferenciación, la alta expresión de telomerasa, la evasión de la apoptosis y la capacidad de migrar (Herreros Pomares A, 2019). Además, pueden transportar sustancias, como medicamentos a través de la membrana, por medio del transportador de unión a trifosfato de adenosina proteína de transporte de membrana subfamilia G miembro 2 (ABCG2), lo que conduce a la recurrencia de la enfermedad en pacientes después de la cirugía y la quimioterapia (Mendoza-Almanza G *et al.*, 2019).

Estudios previos han demostrado que la presencia de CSC en tumores está asociada a altas tasas de metástasis, proceso que se encuentra regulado por la transición epitelio mesenquima (TEM) (Lee C-H *et al.*, 2016). Durante la TEM se producen cambios fenotípicos en las células de tipo epitelial a mesenquimal aumentando la expresión de N-cadherina y vimentina, lo cual origina

una pérdida de adhesión epitelial y polaridad apical-basal, permitiendo la liberación de células transformadas con características de CSC al sistema circulatorio; por lo tanto, la adquisición de un fenotipo mesenquimal se asocia con la progresión maligna del cáncer (Mendoza-Almanza G *et al.*, 2019).

La primera evidencia reportada sobre la existencia de células con características de CSC fue en leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) por el grupo de John Dick, en donde se observó que un pequeño grupo de células de AML podían inducir esta enfermedad en ratones diabéticos (Lee C-H *et al.*, 2016). Desde entonces, se han identificado células con un comportamiento semejante al de las CSC en varios tumores sólidos, incluidos cerebro, pulmón, colon, páncreas, mama, ovario, próstata, entre otros (Dalerba P *et al.*, 2007).

- CD73 en cáncer cervicouterino

Se ha encontrado que CD73 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, además, existe evidencia que sugiere la participación de esta molécula en el desarrollo del cáncer (Gao Z *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Bahreyni A *et al.* describieron que la activación de moléculas adenosinérgicas, incluyendo las enzimas CD39, CD73 y los receptores A2A y A2B, presentaron una acción reductora en la respuesta inmune durante el desarrollo de CaCu. En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que la interacción entre Ado y estos receptores induce la producción del TGF- β , suprimiendo la respuesta inmunitaria antitumoral (García-Rocha R *et al.*, 2019).

En otros antecedentes de nuestro grupo de investigación, se demostró que hay una mayor expresión de CD73 en células de cáncer cervicouterino en comparación con células de epitelio de cérvix normal. Además, se observó que CD73 es enzimáticamente funcional, y que, debido a la sobreexpresión de esta proteína, la hidrólisis de AMP se ve favorecida incrementando las

concentraciones de Ado, responsable de la inhibición de la función efectora de los linfocitos T citotóxicos (Ávila-Ibarra LR *et al.*, 2019; Mora-García ML *et al.*, 2017).

Del mismo modo, Cortes-Escamilla (2016) encontró que la sobreexpresión de CD73 en líneas celulares derivadas de cáncer cervical se correlaciona positivamente con un fenotipo similar al inducido por la TEM, lo cual está asociado con una mayor capacidad de migración y con un mayor potencial invasivo. Así mismo, la acumulación de Ado en el microambiente tumoral puede inducir angiogénesis tumoral, inmunosupresión y metástasis lo que es, un mecanismo esencial para promover la progresión del tumor (de Andrade Mello P *et al.*, 2017).

La importancia de la sobreexpresión de CD73 en el CaCu radica en las múltiples funciones que puede efectuar en los procesos relacionados con el cáncer. La conexión entre la sobreexpresión de CD73, el subtipo de cáncer y el pronóstico representa un valor potencial de esta molécula como un biomarcador considerable en la terapia individual del cáncer. Además, el efecto promotor de CD73 sobre el crecimiento tumoral y la migración lo ubica como un blanco terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer (Gao Z *et al.*, 2014).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema importante de salud pública, ocupando el segundo lugar en causas de muerte a nivel mundial. Diversos estudios reportan que las células de CaCu presentan una hiperactividad adenosinérgica, en comparación con células de cérvix normal, produciendo grandes concentraciones de Ado a partir del ATP extracelular, lo que limita la inmunidad antitumoral. Sin embargo, no ha sido tan claramente determinado el efecto que la Ado ejerce directamente sobre las propias células de CaCu. Adicionalmente, se ha propuesto que la molécula CD73 puede ejercer actividades diferentes a la enzimática en las células tumorales, por ejemplo, actuando como correceptor o como molécula de adhesión, afectando su capacidad de proliferación e invasión, pero los mecanismos moleculares asociados tampoco han sido satisfactoriamente dilucidados.

Por otra parte, la principal complicación y causa de mortalidad asociada al cáncer es la formación de metástasis y la formación de tumores secundarios en lugares distantes del tumor inicial. Por lo tanto, resulta de sumo interés caracterizar los factores moleculares que les confieren a las células tumorales la capacidad de sobrevivencia, proliferación e invasión, con la finalidad de sentar las bases de nuevas propuestas terapéuticas dirigidas hacia blancos moleculares específicos.

Con base en lo anterior, se propone evaluar si la expresión de la molécula CD73 se correlaciona con la viabilidad, la proliferación y la capacidad de formar tumoresferas en la línea celular CaSki, tomando en cuenta que las células tumorales capaces de proliferar en condiciones de no adherencia y formar tumoresferas, representan una mayor capacidad de sobrevivencia e invasión, además de estar enriquecidas en células con características de tipo troncales.

HIPÓTESIS

Se ha propuesto que CD73 es una molécula reguladora de la proliferación, migración e invasión de células cancerosas, pues se ha encontrado sobreexpresada en diversos tipos tumorales, incluyendo cáncer cervicouterino (CaCu). Por tanto, se espera que al inducir una disminución en la expresión de CD73 en células de CaCu se presente una disminución en su viabilidad, proliferación y capacidad de formar esferas no adherentes.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la expresión de CD73 en células de CaCu sobre la viabilidad, la proliferación y la capacidad de formar esferas tumorales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de CD73 en células CaSki silvestres y clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73.
- Evaluar la cinética de proliferación en células CaSki silvestres y clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73.
- Evaluar la eficiencia para generar tumoresferas a partir de células CaSki silvestres y clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73.
- Evaluar el nivel de apoptosis en células CaSki silvestres y clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73.
- Evaluar la eficiencia para generar tumoresferas a partir de células CaSki silvestres y clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73 en presencia y/o ausencia de Ado y EGF.
- Evaluar la expresión de marcadores de troncalidad en células CaSki silvestres y clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73.

MATERIAL Y MÉTODO

- Líneas celulares

Como material biológico se utilizó una línea celular proveniente de cáncer cervicouterino: CaSki, positiva para infección por HVP 16, obtenida del material criopreservado del Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

También fueron utilizadas en este estudio líneas celulares consistentes en clones de células CaSki VPH16⁺/CD73⁻, obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo, mediante la transfección con el vector genético pSIREN que induce la expresión de un siRNA que inhibe la expresión de CD73. Como control se incluyó un clon de células transfectadas con el plásmido “vacío”, que no induce la expresión del siRNA (García-Rocha R *et al*, 2019).

- Condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares CaSki (silvestres) y CaSki con CD73 disminuido (desreguladas) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI (Sigma-Aldrich, USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Biowest, Francia) y una mezcla de penicilina/estreptomicina, en un incubador biológico a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturante. Para resiembra o sembrado de un ensayo, las células se cosecharon retirando el medio de cultivo y adicionando solución de verseno (0.48mM de EDTA) y tripsina al 0.25%, incubando 10 minutos a 37°C, y posteriormente centrifugando en un tubo cónico, para resuspenderlas finalmente en medio de cultivo.

- Evaluación de la proliferación

Para este ensayo se utilizó la tinción con cristal violeta, y se evaluó el número celular por medio de espectrofotometría. Se sembraron 15 000 células CaSki silvestres o desreguladas por pozo, en cuatro placas de cultivo de 24 pozos (Costar, USA), con 1 mL medio RPMI y SFB al 0.5%.

Transcurridas 24 horas, se retiró el medio de cultivo de todos los pozos de una de las placas, se lavaron con 0.5 mL de PBS, para después agregar 250 μ L de una solución de Cristal-Violeta al 0.1% en etanol al 70% a cada pozo, durante 20 min. Pasados los 20 minutos se realizaron 3 lavados con 2 mL de agua destilada. Se dejó secar la placa y se guardó para su posterior uso. Se teñió de manera semejante una placa por cada día subsecuente.

Una vez teñidas todas las placas se agregaron 200 μ L de ácido acético al 10 % por pozo, se tomaron 150 μ L de cada pozo y se pasaron a una placa de 96 pozos de fondo plano, de la cual se realizó una lectura a 570 nm en el espectrofotómetro, donde la concentración de colorante es proporcional al número celular.

- Determinación de la expresión de CD73 y proteínas asociadas con la troncalidad celular, por citometría de flujo

Un día previo a la citometría se sembraron 5×10^4 células CaSki silvestres o desreguladas, en un volumen final de 2 mL de RPMI + SFB al 10%. Al día siguiente se les retiró el medio, se despegaron con tripsina al 0.25% en verseno, y se centrifugaron en frío 5 minutos a 2000 RPM. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 μ L de PBS con SFB al 2 %, para transferirlas a una placa de 96 pozos de fondo redondo. Después de centrifugar, el sobrenadante se desechó mediante succión por vacío. Para la detección de proteínas expuestas en la membrana (CD73 y CD49f) se adicionaron los anticuerpos correspondientes, más PBS con SFB al 2% para un volumen final de 50 μ L. La placa se incubó por 30 minutos en obscuridad, a 4° C. Pasado el tiempo se realizaron dos lavados más con 100 μ L de PBS con SFB 2% por vial para quitar el exceso de anticuerpos, y finalmente, las células se pasaron a tubos para citometría de flujo con 300 μ L de

PBS con SFB 2 %, manteniéndolos en frío hasta evaluar la intensidad de fluorescencia con un citómetro de flujo FACS- Calibur (BD Biosciences, USA). La tinción de las proteínas intracelulares se llevó a cabo de manera semejante, con la diferencia de que antes de incubar con los anticuerpos correspondientes, las células fueron fijadas durante 10 minutos con 100 μ L de paraformaldehído al 4%, y los lavados posteriores se realizaron con la solución permeabilizante PermWash (BD Biosciences, USA). En todos los casos la fluorescencia específica debida al marcaje con los anticuerpos se determinó en comparación con la autofluorescencia de las células no marcadas con anticuerpos.

- Los anticuerpos empleados fueron los siguientes (**Tabla 1**):

Anti-CD73/PE	(BD Biosciences 550257)	1:5
Anti-CD49f/APC	(R&D Systems FAB13501A)	1:10
Anti-citoqueratina 17/AlexaF488	(Bioss bs-3239R-A488)	1:100
Anti-p63/AlexaF647	(Bioss bs-0723R-A647)	1:100
Anti-Oct-4 +Ab2 ^o /FITC	(Abcam ab18976)	1:100
Anti-Sox-2 +Ab2 ^o /FITC	(Abcam ab 171380)	1:100
Anti-Nanog/AlexaF488	(Biolegend 674206)	1:100

Tabla 1. Lista de anticuerpos empleados en la determinación de la expresión de CD73 y proteínas asociadas con la troncalidad celular.

- Generación de tumoresferas

Se realizaron cultivos de 10 000 células CaSki o clones desregulados en la expresión de CD73 por pozo, en 2 mL de medio Opti-MEM (Gibco, Life Technologies, USA) + SFB al 0.5% en placas de seis pozos de ultra baja adherencia (Costar, USA), durante 7 días. Al término del cultivo, se evaluó al microscopio la intensidad de formación de esferas celulares en cada pozo. Para evaluar la viabilidad a largo plazo de las esferas, se cosecharon cada 7 días, se disgregaron con tripsina/verseno y se sembraron bajo las mismas condiciones de cultivo para evaluar el número de esferas formadas en cada pasaje.

- Determinación de la apoptosis por citometría de flujo

Para evaluar el porcentaje de apoptosis en las células cultivadas bajo condiciones de no adherencia, se realizaron cultivos de 20 000 células por pozo, en placas de ultra baja adherencia con 2 mL de medio Opti-MEM + SFB al 0.5%. Una vez transcurridas 48 horas se colectaron en tubos y se centrifugaron. Posteriormente se desechó el medio Opti-MEM y se agregó 1 mL de verseno + 100 μ L de tripsina al 1%, se dejaron incubando por 10 minutos a 37°C y se volvieron a centrifugar. Se desechó el verseno y el botón se lavó con 1 mL de PBS estéril. Se preparó una solución buffer con 900 μ L de agua destilada + 100 μ L de buffer del kit de detección de apoptosis (Número de catálogo APOAF Sigma-Aldrich, USA). Se tomaron 100 μ L de la solución buffer y se agregaron a cada una de las muestras. Se tomaron 450 μ L de la solución buffer y se le agregaron 25 μ L de Anexina V y 25 μ L de 7AAD del mismo kit, y se agregaron 100 μ L de esta solución a cada una de las muestras. Después de 10 minutos, las muestras se evaluaron en el citómetro de flujo, para evaluar la exposición extracelular de fosfatidilserina y la integridad de la membrana celular, como indicadores de la apoptosis.

- Generación de tumoresferas en presencia de Ado y EGF

Se realizaron cultivos de 10 000 células CaSki o clones desregulados por pozo, con 2 mL de medio Opti-MEM + SFB al 0.5% en placas de seis pozos de ultra baja adherencia. Después del sembrado de células se agregó Ado a una concentración de 100 μ M, inhibidor específico de CD73: α , β -metilen-adenosina-5'-disfosfato (APCP) a 10 μ M, ó 10ng/mL de Factor epidérmico de proliferación recombinante humano (rhEGF, por sus siglas en inglés: *Epidermal growth factor*), en los pozos que correspondían, y se dejaron en observación durante 7 días, para comparar la formación de esferas contra un control sin tratamiento.

RESULTADOS

- **Células transfectadas con un siRNA específico a CD73, presentan disminución en la expresión de CD73 en membrana.**

Nuestro grupo de investigación previamente generó 2 clones de la línea celular CaSki desregulados en la expresión de CD73 mediante la transfección de un RNA de interferencia específico para esta molécula (García-Rocha R *et al*, 2019). Como primer paso en este trabajo, mediante citometría de flujo, se determinó la expresión de CD73 en la membrana de dichos clones (denominados como clon A y clon B) y se comparó con la de células CaSki parentales (denominadas como WT) así como con células CaSki transfectadas con el plásmido control. En la **Figura 6** (histogramas en color rojo) se observa la fluorescencia de las células marcadas con un anticuerpo específico anti-CD73, en tanto que los histogramas en color negro muestran la fluorescencia de las células incubadas con un anticuerpo isotipo control. Al determinar la expresión de CD73 en membrana, las células WT presentaron una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 99.18 y las células transfectadas con el plásmido control mostraron una IMF de 78.85, en tanto que los clones A y B de la línea celular CaSki presentaron fuerte disminución en la expresión de CD73, detectándose una IMF de 8.94 y 9.07, respectivamente.

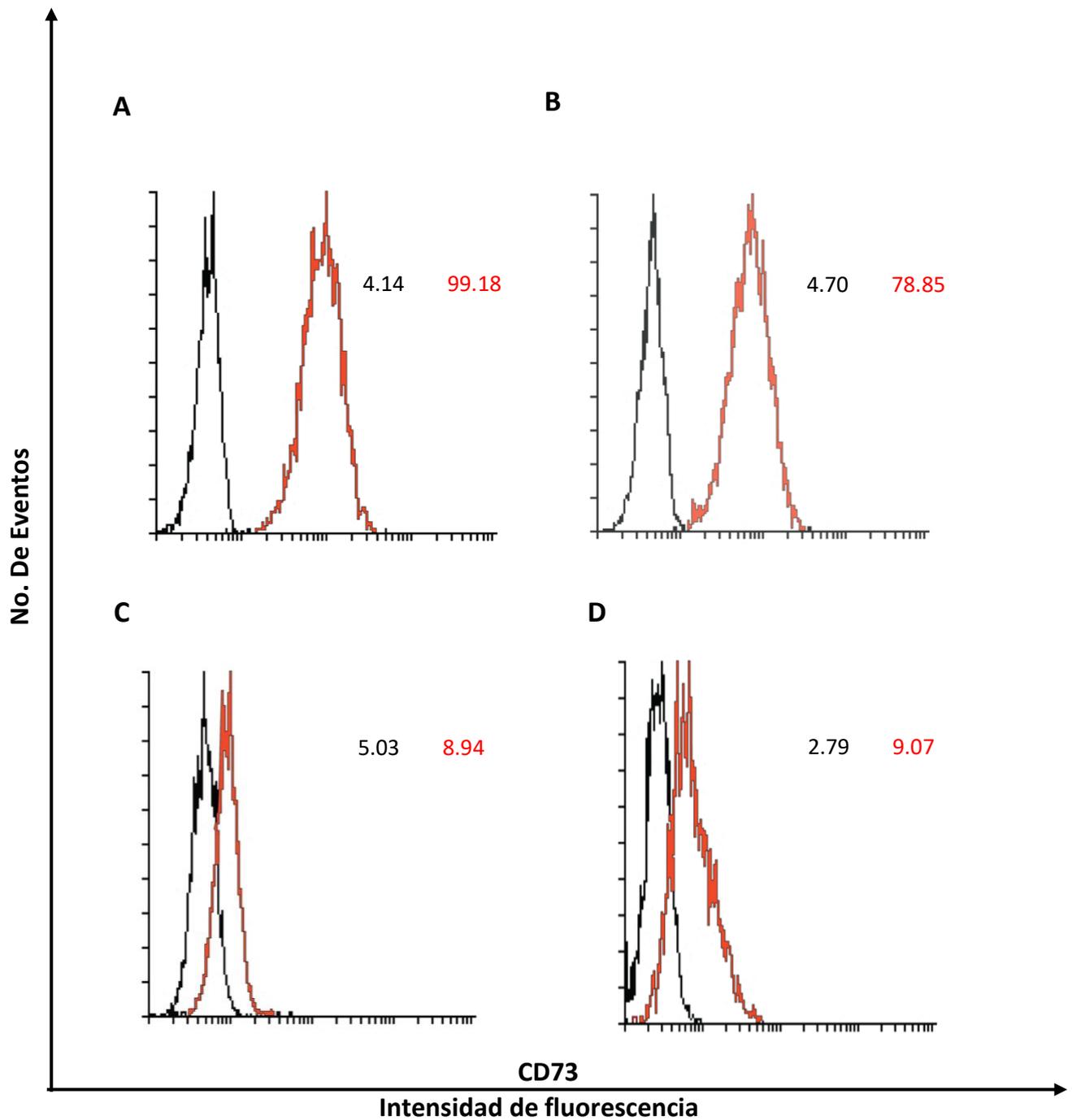


Figura 6. Expresión de CD73 en células CaSki WT y CaSki transfectadas con un siRNA específico para CD73. Se muestran los histogramas de las células incubadas con un isotipo control (color negro) o con anti-CD73 (color rojo) y sus respectivos valores de intensidad de fluorescencia. A) células CaSki WT, B) CaSki transfectadas con el plásmido control, C) clon A, D) clon B.

- **Las células CaSki desreguladas en la expresión de CD73 en membrana muestran baja capacidad para formar tumoresferas.**

Se ha propuesto que la propiedad de las células tumorales para formar esferas en cultivo en suspensión, son un indicativo de su capacidad de autorrenovación, por la presencia de células troncales, y de efectuar metástasis. Por tanto, se procedió a determinar la capacidad de las células CaSki WT, los clones A y B y CaSki transfectadas con el plásmido control para formar esferas en condiciones de cultivo de ultra baja adherencia. Como se observa en la **Figura 7** los cultivos realizados con las células CaSki WT y transfectadas con el plásmido control (**Figura 7A y 7B respectivamente**) presentan una mayor capacidad de formar esferas en condiciones de ultra baja adherencia, dando origen a un mayor número de esferas y de mayor tamaño en comparación con las esferas formadas a partir de las células de los clones A y B de CaSki (**Figura 7C Y 7D respectivamente**), los cuales presentan esferas de menor tamaño, en especial el clon B, que además de presentar esferas de menor tamaño muestra en la periferia un mayor número de células aisladas, con un tamaño reducido, lo que nos podría indicar que estas células aisladas son células apoptóticas que no pueden formar esferas en cultivo de ultra baja adherencia.

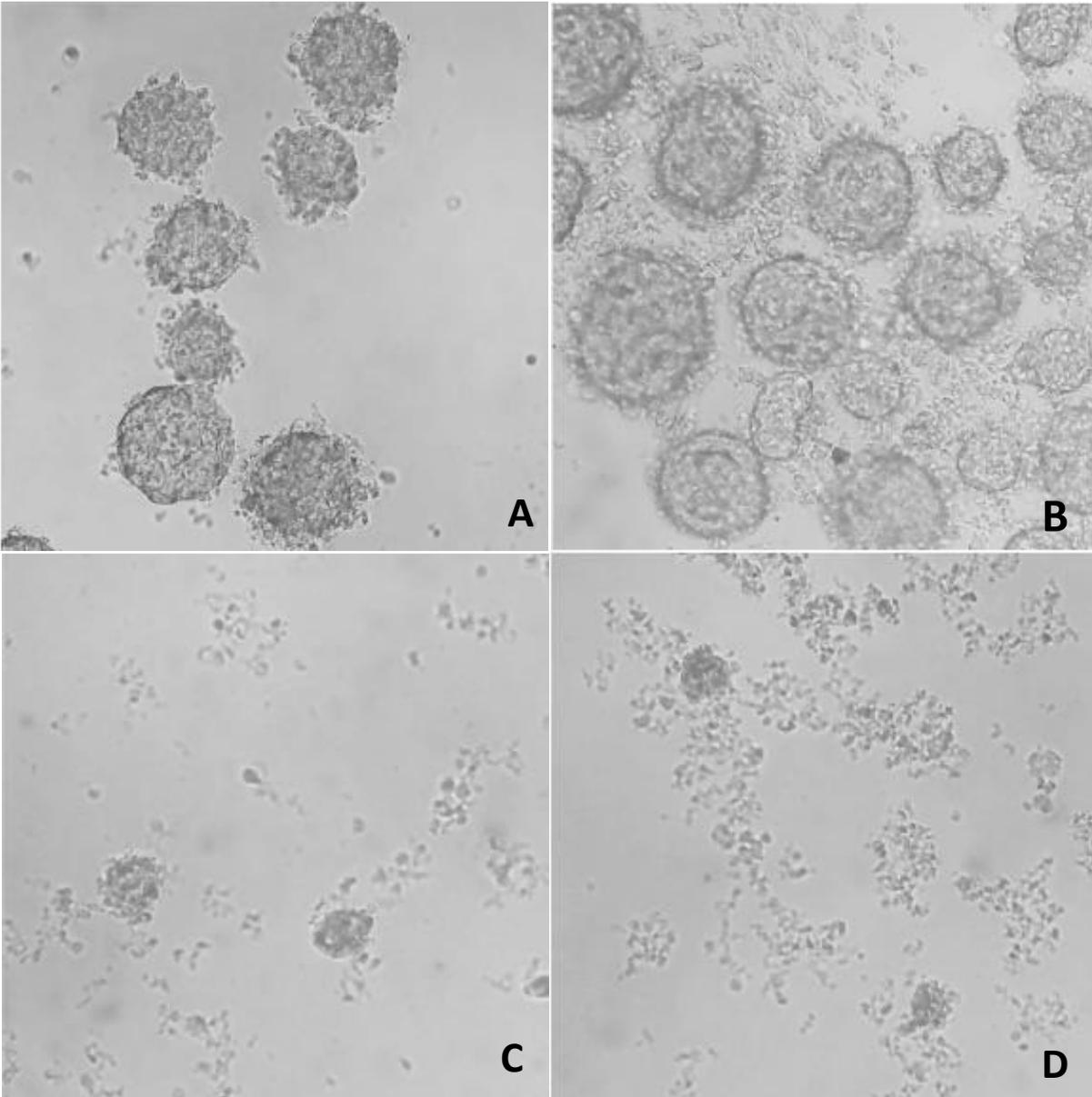
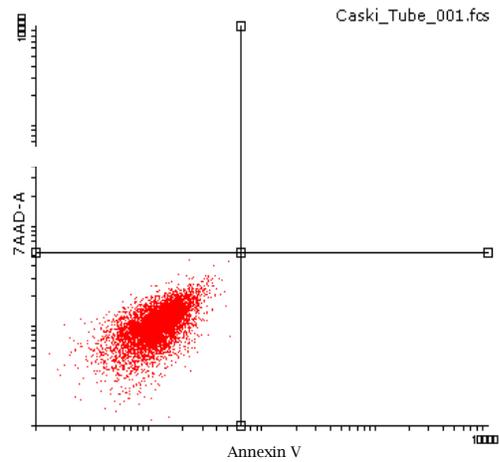
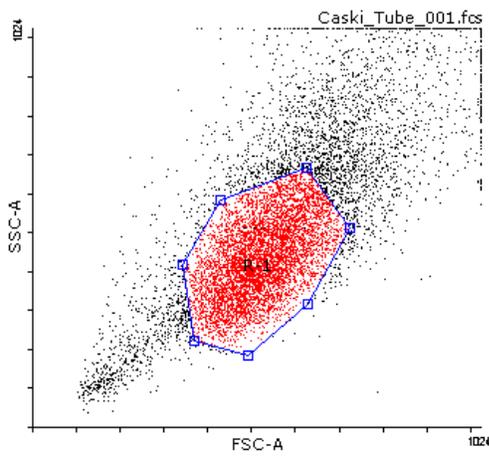


Figura 7. Formación de tumoresferas de células CaSki cultivadas en ultra baja adherencia. Fotografías de las células cultivadas en placas de ultra baja adherencia para la formación de tumoresferas. Las fotografías fueron tomadas el día 14 a un aumento de 10x. A) CaSki WT, B) CaSki transfectada con plásmido control, C) clon A, D) clon B de células CaSki desreguladas en la expresión de CD73.

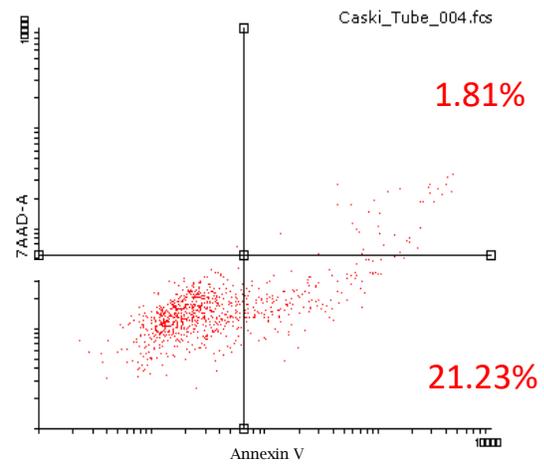
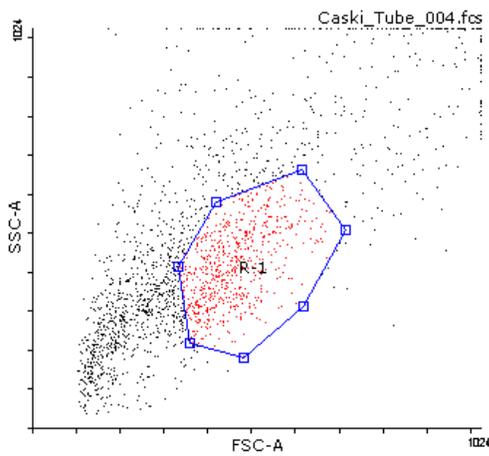
- **Las células CaSki desreguladas en la expresión de CD73 presentan un aumento en la apoptosis cuando son cultivadas en condiciones de ultra baja adherencia.**

Tomando en consideración los resultados obtenidos en los ensayos de formación de esferas en condiciones de ultra baja adherencia, y que se ha reportado que la inhibición de CD73 puede llevar a las células a apoptosis, se realizó una citometría de flujo con cultivos de células en placas de ultra baja adherencia para determinar el nivel de apoptosis de las células de cada tratamiento. Como se observa en la **Figura 9A**, las células cultivadas en suspensión a las 48 horas muestran un alto grado de apoptosis, en comparación con las células cultivadas en condiciones de adherencia. Al analizar los porcentajes de células tumorales en apoptosis tardía (FITC⁺/7AAD⁺), se observó que las células CaSki WT y las células CaSki transfectadas con el plásmido control mostraron porcentajes menores de apoptosis tardía de 1.81% y 0.90%, respectivamente (**Figuras 8B y 8C**). Sin embargo, el clon A y el clon B de CaSki mostraron valores apoptosis tardía de 23.47% y 22.45% respectivamente (**Figuras 8D y 8E**). En todos los grupos de estudio se puede observar que el porcentaje de células en apoptosis temprana no muestra valores muy diferentes de un intervalo entre el 19% al 30% de células apoptóticas. De lo anterior se concluye que la expresión de CD73 en la membrana de las células CaSki es importante para la formación de tumoresferas y parece protegerlas de la muerte por apoptosis.

A



B



C

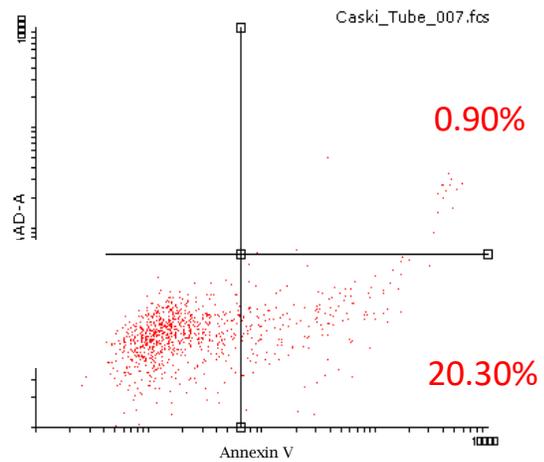
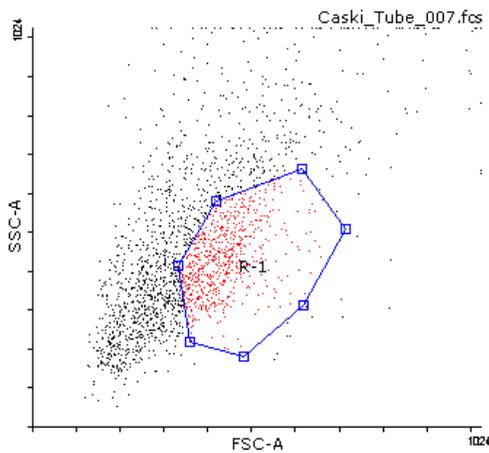


Figura 8. Detección de apoptosis en las células CaSki cultivadas en ultra baja adherencia.

Se muestran los *Dot plots* de apoptosis temprana (7AAD-/ Annexina V+) y apoptosis tardía (7AAD+/ Annexina V+) de las células CaSki en cultivo adherente (A), y en cultivo en placas de ultra baja adherencia de las células CaSki WT (B), CaSki transfectadas con un plásmido control (C), clon A (D) y clon B (E).

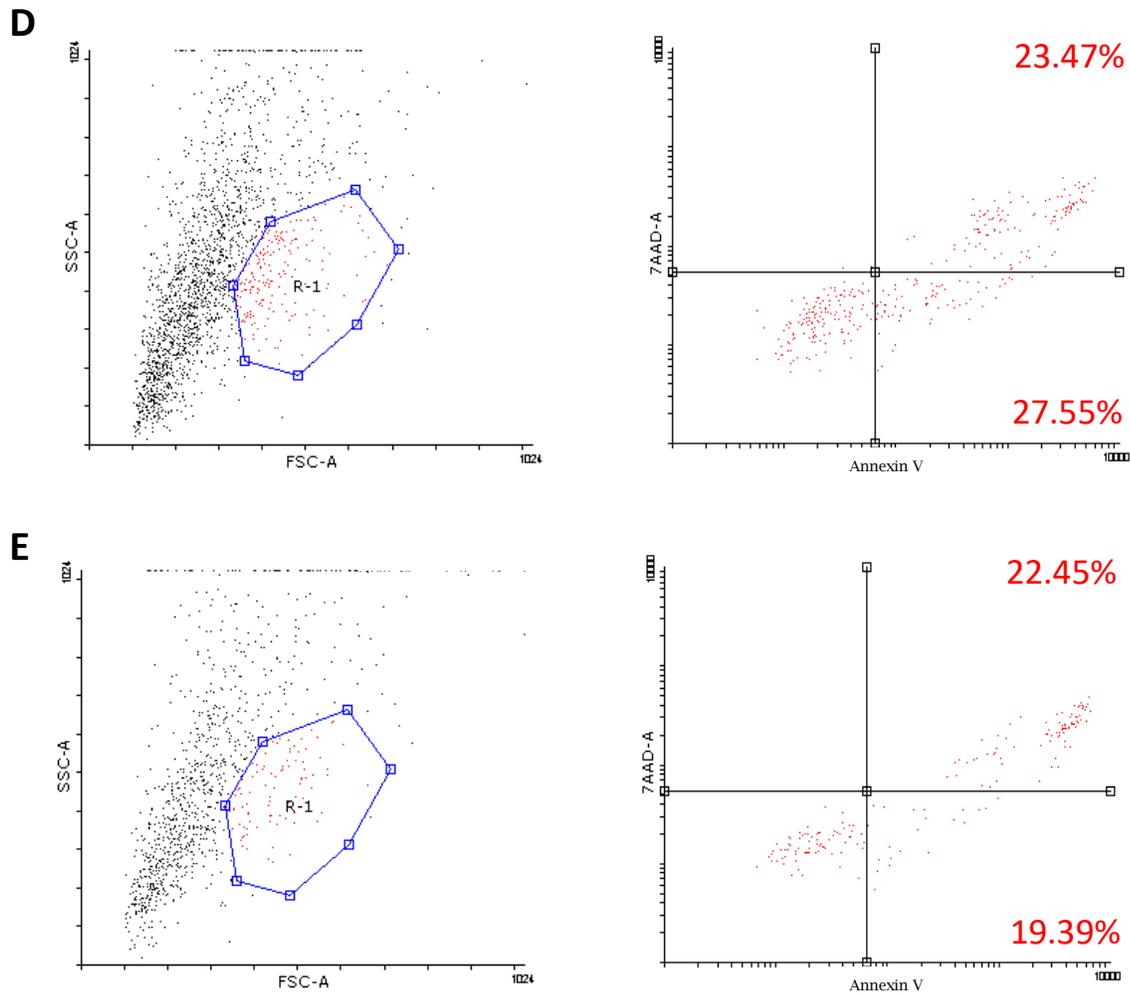


Figura 9. Detección de apoptosis en las células CaSki cultivadas en ultra baja adherencia.

Se muestran los *Dot plots* de apoptosis temprana (7AAD-/ Anexina V+) y apoptosis tardía (7AAD+/ Anexina V+) de las células CaSki en cultivo adherente (A), y en cultivo en placas de ultra baja adherencia de las células CaSki WT (B), CaSki transfectadas con un plásmido control (C), clon A (D) y clon B (E).

- **Las células CaSki desreguladas en la expresión de CD73 presentan menor capacidad proliferativa que las células CaSki con mayor expresión de CD73.**

Las células cancerosas se distinguen por presentar una alta tasa de proliferación en comparación con células no cancerosas, por este motivo se realizaron ensayos de proliferación a 3 y 7 días de las células CaSki silvestres (WT), los clones A y B de CaSki disminuidas en la expresión de CD73 y CaSki transfectada con el plásmido control (PC) (Figura 9).

En el ensayo de proliferación a los tres días se observó que los clones A y B mostraron una

tendencia a disminuir la proliferación en relación a las células CaSki WT y CaSki PC (**A** **A**).

Por otro lado, cuando los cultivos celulares se mantuvieron durante 7 días, las células CaSki WT mostraron un mayor nivel de proliferación con respecto a los clones A y B de CaSki. En tanto que las células CaSki con el plásmido control mostraron un nivel de proliferación similar a las células

CaSki WT después de 7 días de cultivo (**A** **B**).

Por lo tanto, estos resultados indican que las células desreguladas en la expresión de CD73 reducen su capacidad proliferativa en relación a las células tumorales CaSki con mayores niveles de CD73.

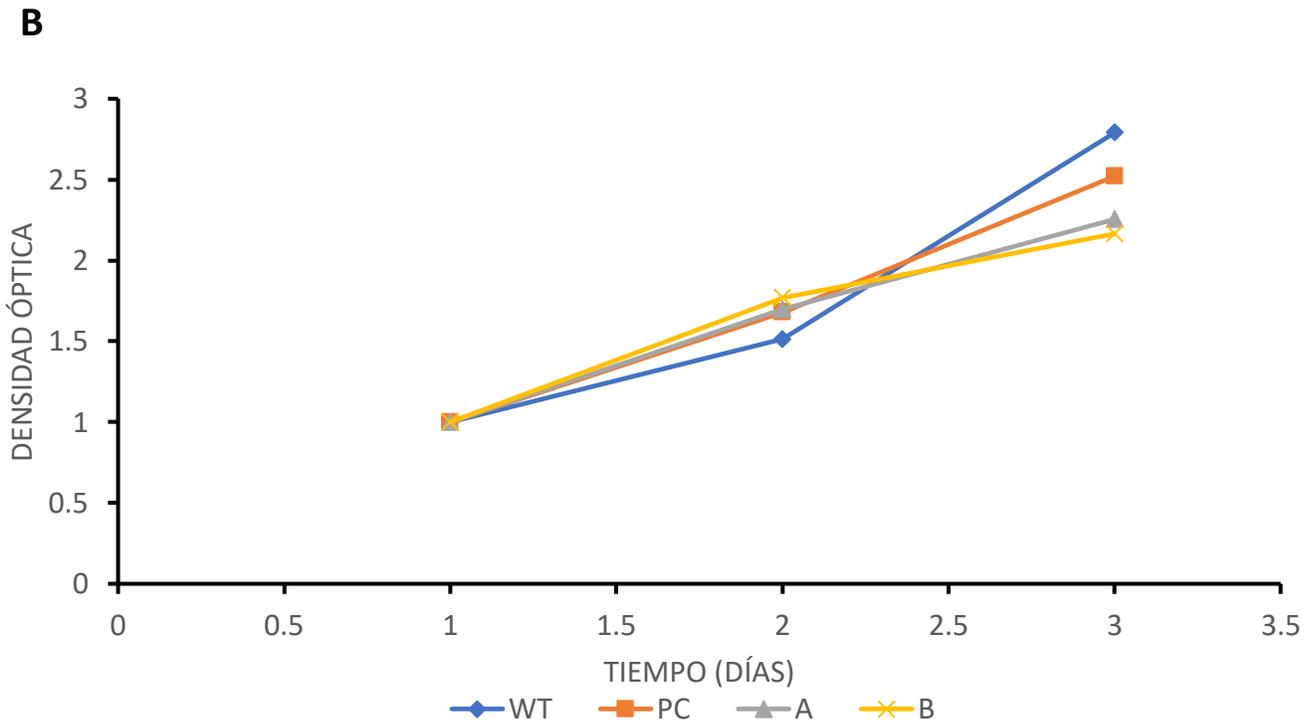
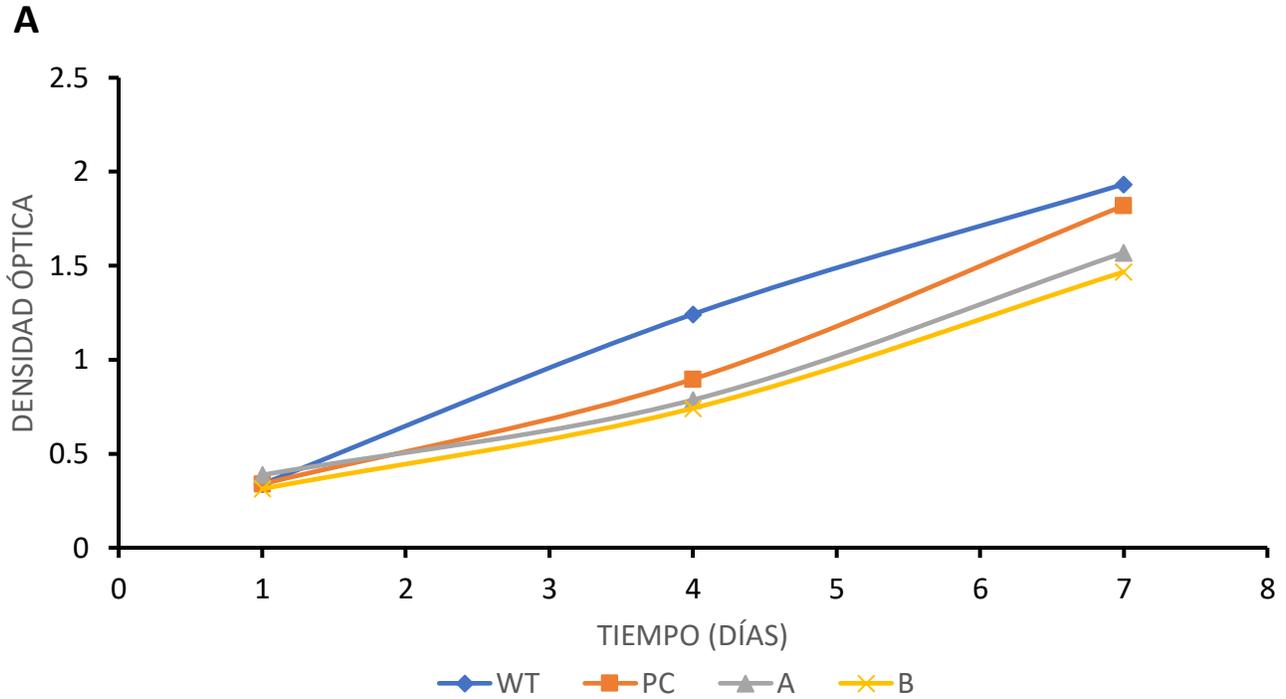


Figura 10. Cinética de proliferación de las células CaSki.

Se muestran las cinéticas de proliferación a 3 días (A) y 7 días (B) de las células CaSki silvestres (WT), las células transfectadas con un plásmido control (PC) y los clones A y B de células CaSki disminuidas en la expresión de CD73

- **Ado no favorece la capacidad de formar tumoresferas.**

La Ado surge como producto de la hidrólisis de AMP mediante CD73, y se le ha atribuido un efecto potenciador para el desarrollo de los tumores. Tomando en cuenta que los clones A y B de CaSki tienen baja expresión de CD73 en la membrana, la generación de Ado extracelular se puede ver disminuida. Por tanto, para determinar el efecto de Ado sobre la capacidad de formar esferas en condiciones de ultra baja adherencia se realizaron cultivos de células CaSki WT y células CaSki del clon A en pozos de ultra baja adherencia, añadiendo Ado y un inhibidor específico de CD73 (APCP) ambos a una concentración de 100 μ L, se dejaron en observación por 7 días, y se tomaron fotografías. Las células CaSki WT cultivadas en presencia de Ado disminuyeron aparentemente la cantidad de esferas en el cultivo. De manera interesante, la adición de APCP indujo mayor cantidad de esferas, incluso de mayor tamaño (**Figura 10A**). Por otro lado, como era de esperarse, las células del clon A de CaSki mostraron menor cantidad de esferas, de tamaño pequeño y con células dispersas en la periferia. La adición de Ado disminuyó aun más la formación de esferas, observándose muchas células dispersas en la periferia. Finalmente, la adición de APCP mantuvo un contenido de esferas similar a las células del clon A que no recibieron tratamiento (**Figura 10B**).

Por tanto, podemos concluir que la Ado, adicionada de manera exógena o la producida por la actividad enzimática de CD73 en las células tumorales, inhibe la formación de esferas.

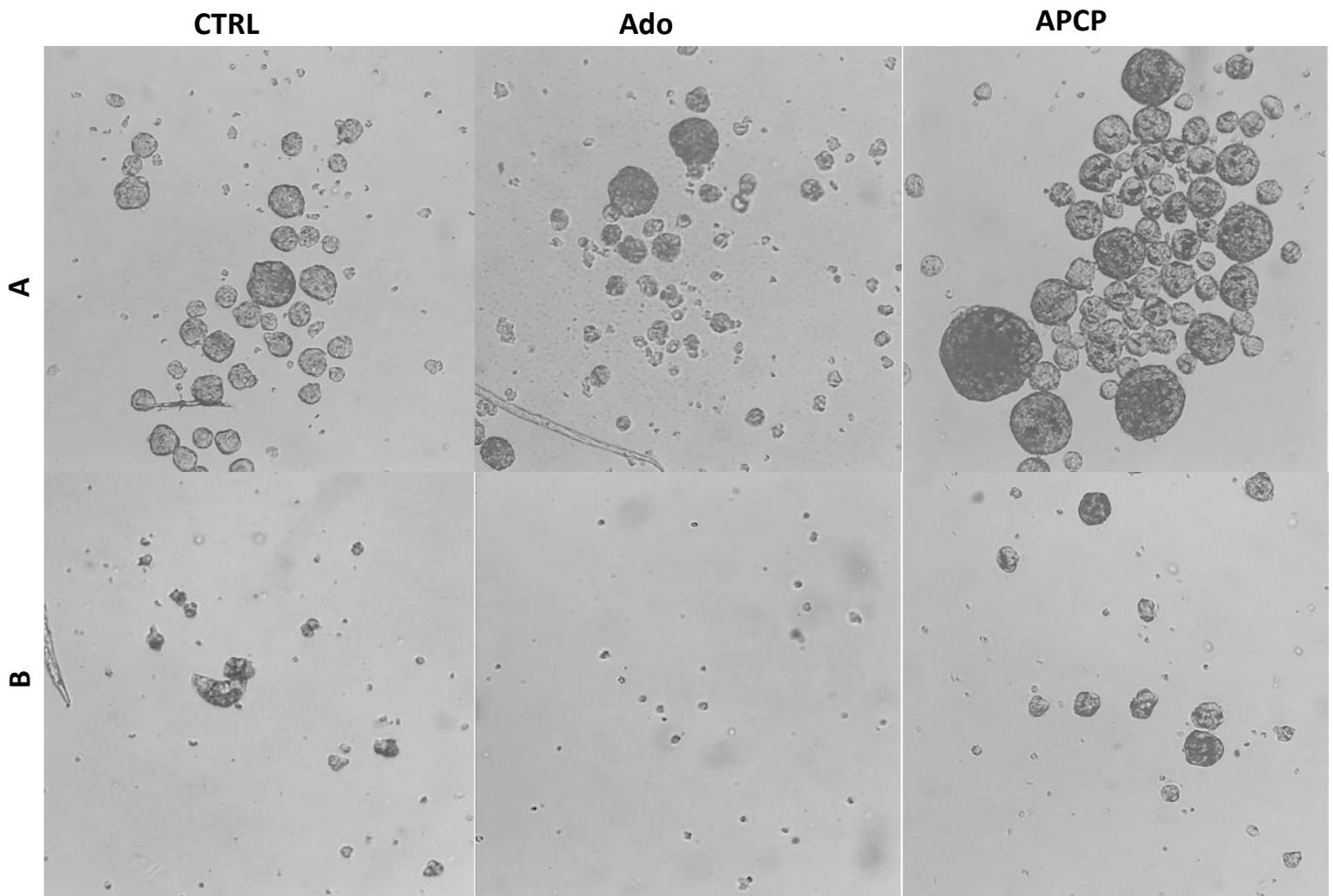


Figura 11. Formación de esferas en cultivo de ultra baja adherencia con tratamiento de Ado y APCP. Fotografías a un aumento de 10x de las células CaSki WT (A) o el clon A de células CaSki disminuidas en la expresión de CD73 (B) cultivadas en placas de ultra baja adherencia en presencia o ausencia de Ado o un inhibidor de CD73 (APCP).

- **No hay una diferencia significativa en la expresión de proteínas asociadas con el mantenimiento de la viabilidad y la capacidad clonal entre células de cáncer cervicouterino con diferente expresión de CD73.**

Aunque se ha propuesto que la expresión de ciertas proteínas puede funcionar como un marcador para identificar células troncales del cáncer (CSC, por sus siglas en inglés: *cancer stem cells*) no existe un conjunto de biomarcadores universales para identificar y aislar a estas células. Sin embargo, se ha observado que un grupo de moléculas relacionadas con la autorrenovación, fenotipo invasivo y resistencia a los medicamentos convencionales de quimioterapia o radiación, confieren a las células tumorales con un fenotipo semejante a CSC.

También se ha propuesto que las células que forman esferas se asocian con altos niveles de marcadores de troncalidad y presentan características de CSC; por tanto, se decidió evaluar mediante citometría de flujo la expresión de las proteínas CD49f, CK17, p63, Nanog, Sox2, y Oct4, para determinar si había alguna diferencia molecular entre las células CaSki WT y los clones desregulados para CD73. Como se observa en la **Error! Reference source not found.**, no hay alguna diferencia en la expresión de los marcadores de troncalidad analizados entre las CaSki WT y las células del clon A de CaSki desreguladas en CD73, a excepción de una disminución de la expresión de CD49f en las células del clon A de CaSki en comparación con las células CaSki WT, encontrándose valores de IMF de 115.8 vs 175.14, respectivamente.

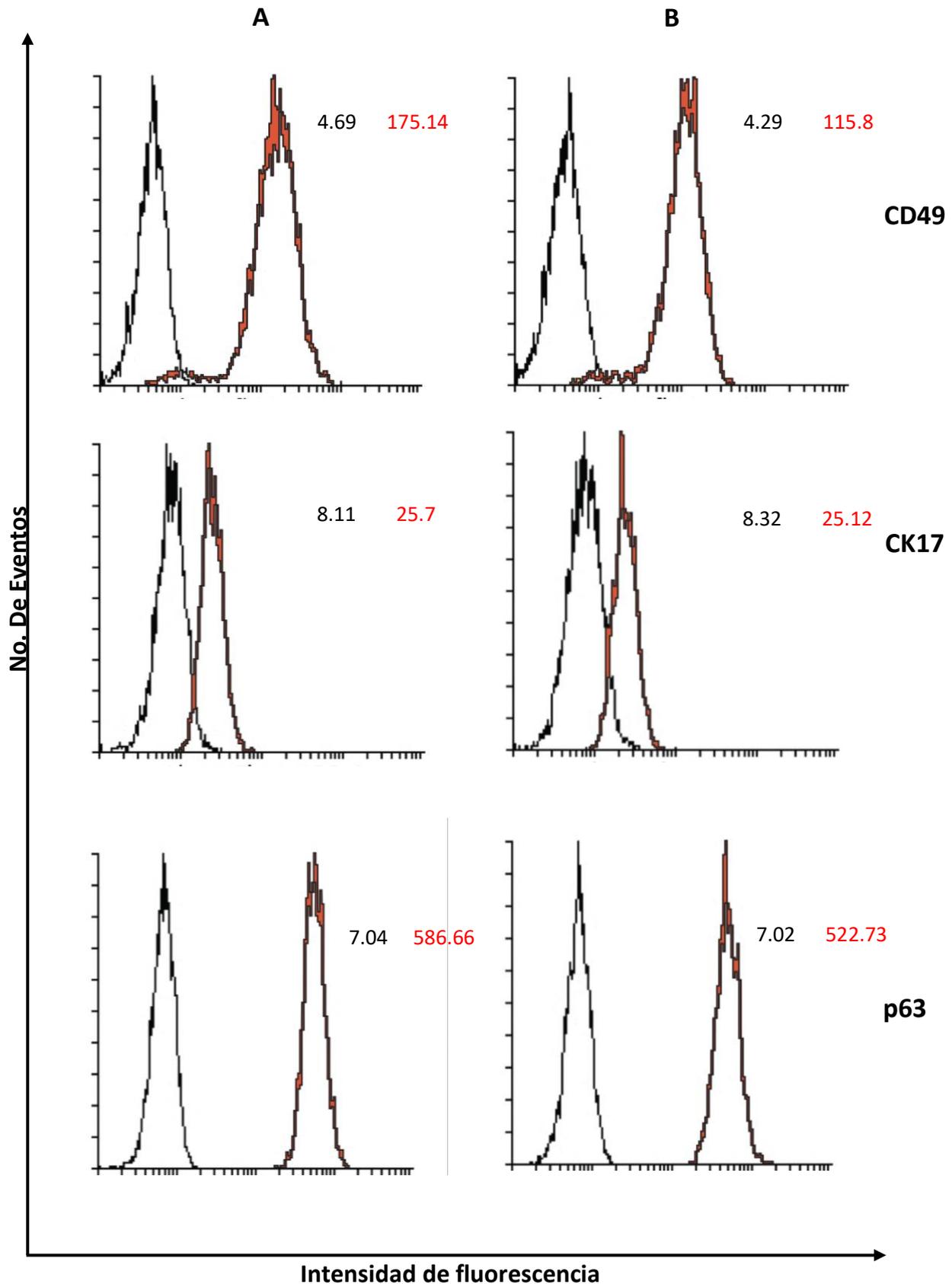


Figura 12. Expresión de marcadores de troncalidad en células CaSki.

Se muestran los histogramas de autofluorescencia (línea negra) y la expresión de los marcadores de troncalidad (CD49, CK17, p63, Nanog, Oct-4 y Sox2) (línea roja) en las células CaSki WT (A) y el clon A de células CaSki disminuidas en la expresión de CD73 (B).

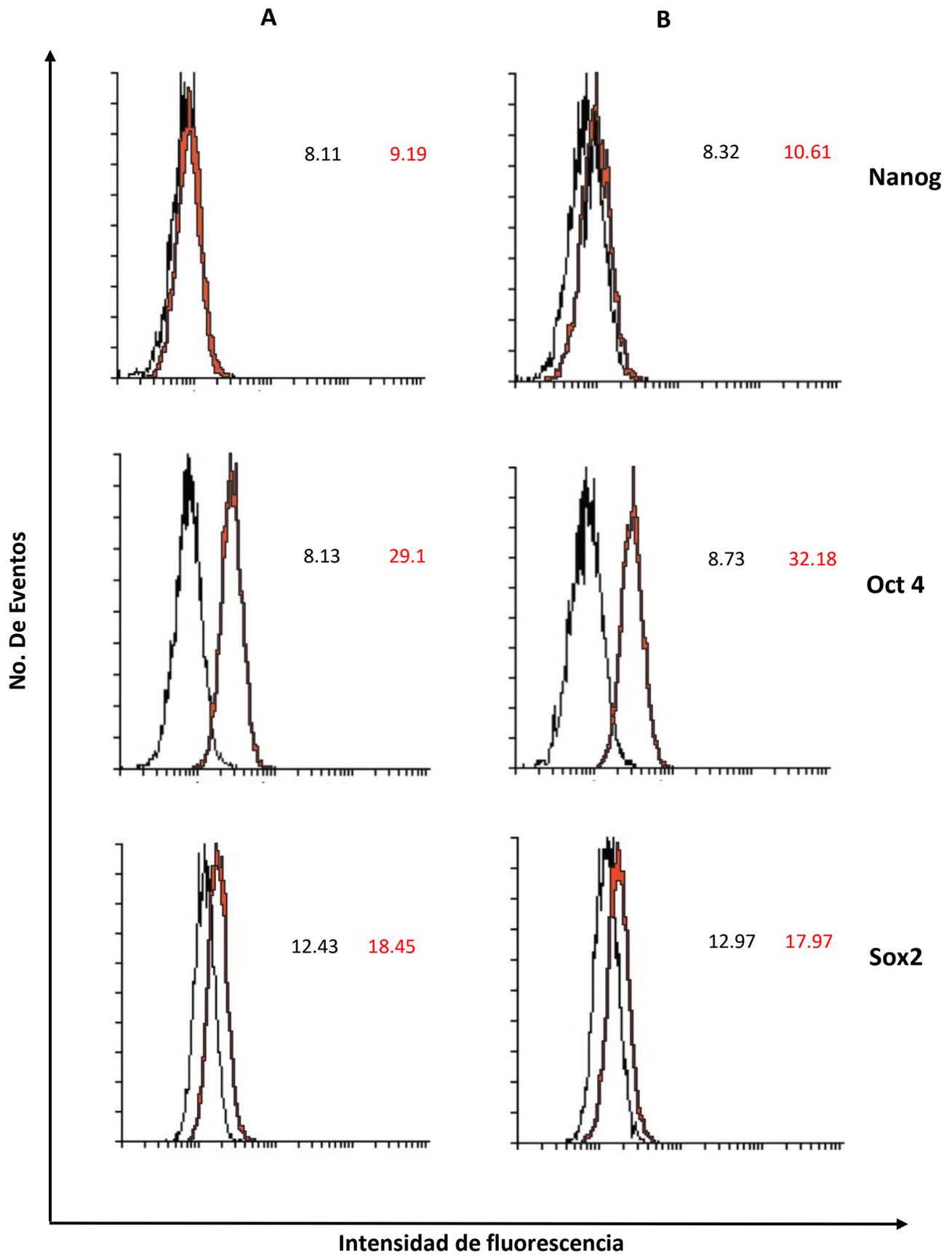


Figura 13. Expresión de marcadores de troncalidad en células CaSki.

Se muestran los histogramas de autofluorescencia (línea negra) y la expresión de los marcadores de troncalidad (CD49, CK17, p63, Nanog, Oct-4 y Sox2) (línea roja) en las células CaSki WT (A) y el clon A de células CaSki disminuidas en la expresión de CD73 (B).

- **EGF mejora la formación de esferas en las células CaSki WT y células CaSki desreguladas en la expresión de CD73.**

Dado que no encontramos diferencias intrínsecas en la expresión de proteínas inductoras de la viabilidad y asociadas al fenotipo troncal entre las células CaSki WT y un clon A con la expresión de CD73 disminuida, evaluamos la capacidad de respuesta hacia estímulos externos, en ambas líneas celulares. El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF por sus siglas en inglés: *epidermal growth factor*) es un péptido que promueve el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular a través del ligando con su receptor presente en la superficie celular; este receptor se ha encontrado desregulado en diversos tipos de cánceres y se menciona que tanto la proteína como el receptor podrían estar asociados con el desarrollo de una gran variedad de tumores (Tomas A *et al.*, 2014). Por tanto, se realizaron cultivos en placas de ultra baja adherencia y al cultivo se le agregó EGF recombinante humano en los pozos que correspondían y se dejaron en observación durante 7 días. Como se observa en la

Figura 14, la formación de esferas para el grupo control, con únicamente SFB, concuerda con resultados anteriormente presentados: las células CaSki WT muestran una mayor formación de esferas en comparación con el clon A, donde casi no se forman esferas. En los cultivos tratados con EGF o EGF + SFB, se observa un aumento en el número de esferas formadas, incluso para el clon A, aunque el mayor efecto se da en las células CaSki WT. Las esferas obtenidas bajo estas condiciones son de mayor tamaño y menos compactas que las obtenidas en el control, además de que se aprecian algunos pequeños conglomerados de células, e incluso algunas células individuales.

Los resultados obtenidos nos indican que EGF muestra un efecto favorecedor en la formación de esferas en las células que presentan disminución de CD73 en la membrana, aunque en menor grado que el observado en las células CaSki WT.

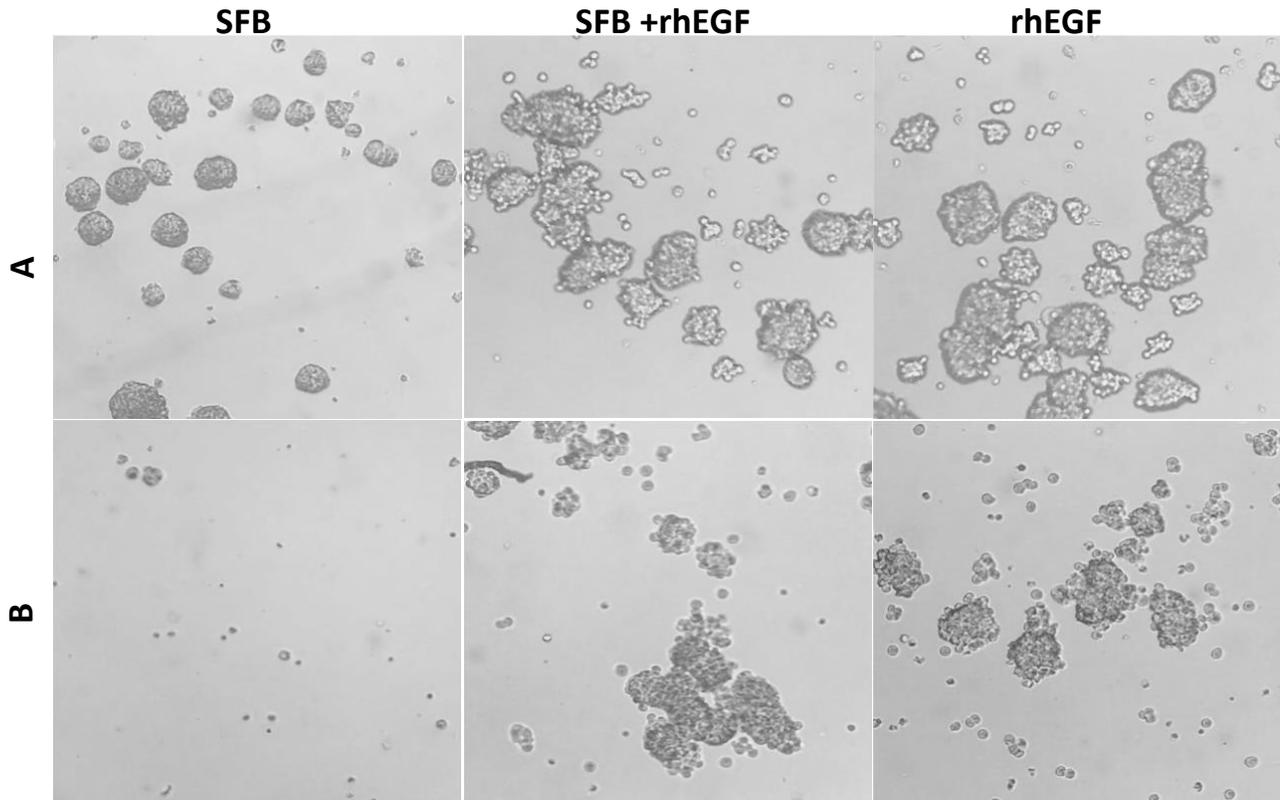


Figura 14. Formación de esferas en cultivo de ultra baja adherencia de células CaSki con tratamiento de EGF. Fotografías a un aumento de 10x de las células cultivadas en placas de ultra baja adherencia con un tratamiento de EGF. A) CaSki WT, B) clon A de células CaSki desreguladas en la expresión de CD73.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La transformación progresiva de las células normales a malignas les confiere la capacidad de evadir las señales de muerte celular programada, y de generar una descendencia que conserve esta mutación; asimismo, el microambiente puede favorecer el establecimiento y la progresión maligna de las células neoplásicas al aumentar su capacidad de invasión, implantación, supervivencia y proliferación. Normalmente, las células del sistema inmune son capaces de eliminar a las células tumorales; pero, proporcionalmente a su transformación maligna, las células tumorales desarrollan la capacidad de evadir los mecanismos de control.

Una manera en la que las células escapan de la vigilancia inmunológica tumoral es inactivando a las células del sistema inmune; por ejemplo, Linden J y Cekic C (2012) refieren que altas concentraciones de Ado producidas en el microambiente tumoral ejercen efectos inmunosupresores sobre los linfocitos T citotóxicos CD8+, a través de una interacción de alta afinidad con el receptor A2A. A su vez, la Ado es generada por medio de la fosfohidrólisis de nucleótidos de adenina por la actividad de las ectoenzimas CD39 y CD73.

Un gran número de estudios indican que la proteína CD73 está desregulada al alza en muchos tipos de cánceres, y que puede promover también comportamientos malignos de los carcinomas, incluyendo la proliferación, la migración, la invasión y la metástasis (Ma X-L *et al.*, 2019; Wang L *et al.*, 2013; Yu J *et al.*, 2018; Zhou L *et al.*, 2019). Esta actividad de CD73, promotora del tumor, se ha asociado con la estimulación de la angiogénesis (Wang L *et al.*, 2013) así como con la inducción del cambio de fenotipo epitelial al mesenquimal (Petruk N *et al.*, 2021), entre otros mecanismos. Por su parte Gao Z *et al.*, (2017), reportaron que la expresión de CD73 promueve la proliferación de células cancerosas *in vitro* y la progresión del ciclo celular, debido a una actividad diferente a la enzimática.

Asimismo, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo reportan que la línea celular CaSki, de CaCu, mantiene hiperactivada la vía CD73-adenosina, lo que conlleva una alta producción de Ado extracelular, que al unirse a sus receptores (A1, A2A, A2B, A3) mantendría un ambiente favorecedor de la progresión del cáncer (Mora-García ML *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta lo anterior, en este proyecto nos propusimos evaluar el efecto de la expresión de CD73 en la línea celular CaSki sobre su capacidad de formar esferas multicelulares *in vitro*, puesto que: el modelo de tumoresferas se considera más representativo de la arquitectura tumoral, en comparación con los cultivos en monocapa (Friedrich J *et al.*, 2009); la capacidad de las células de sobrevivir despegadas del substrato sugiere un fenotipo invasivo (Kramer N *et al.*, 2013); actualmente, algunos autores sostienen que la capacidad de formación de tumoresferas representa un “marcador” de células con naturaleza troncal tumoral (Lee C-H *et al.*, 2016) .

En primer lugar, corroboramos que las células CaSki son capaces de formar esferas cuando son cultivadas en condiciones de baja adherencia (Knuechel R *et al.*, 1990; Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2016, entre otros), con una morfología más compacta en comparación con otras líneas celulares.

A continuación, observamos que cuando se induce una disminución en la expresión de la proteína CD73 también disminuye la capacidad de formar esferas, tanto en número, como en tamaño, lo cual nos indica que esta molécula favorece esta capacidad en las células CaSki. Este resultado nos sugirió dos posibilidades: que CD73 tenga un efecto adhesivo, como se ha propuesto en el sistema linfocitos T/endotelio (Airas L *et al.*, 1995), o que tenga un efecto sobre la viabilidad o la capacidad de proliferación de las células CaSki, particularmente bajo condiciones de cultivo sin adherencia al substrato (resistencia a anoikis).

Para evaluar si CD73 tiene un efecto en la viabilidad de las células CaSki, determinamos el porcentaje de apoptosis a las 48 horas de cultivo de células impedidas de adherirse al fondo del pozo. Esta condición indujo una intensa apoptosis (anoikis), la cual es aún mayor en las células con la expresión de CD73 disminuida, al grado de que en ellas casi no observamos formación de esferas. De igual manera, en el cultivo en monocapa adherida, las células con una disminución en la expresión de CD73 muestran una cinética de proliferación más lenta que las células control, aunque con una diferencia menos pronunciada que la observada para la anoikis. Estos resultados nos indican que CD73 afecta la viabilidad de las células CaSki, sobre todo bajo condiciones drásticas, como lo es el cultivo impedido de adherencia. El efecto de la CD73 sobre la viabilidad de las células tumorales ha sido reportado previamente en cáncer de mama, donde la disminución de la expresión de CD73 se asoció con la disminución de la expresión de proteínas anti-apoptóticas y un aumento de las pro-apoptóticas (Zhi X *et al.*, 2010).

Por otra parte, la actividad enzimática de CD73 consiste en la producción de Ado a partir de la hidrólisis de AMP, y diversos autores han sugerido que la Ado favorece el desarrollo tumoral; Por ejemplo, Zhi X *et al.*, (2010), observaron que el tratamiento de células cancerosas con APCP, que es un inhibidor específico de la actividad enzimática de CD73, podía inhibir la proliferación de una manera dependiente de la dosis. Del mismo modo, Bavaresco L *et al.*, (2008) encontraron que el tratamiento con APCP provocó una reducción significativa del 30% en la proliferación de células de glioma, mientras que el tratamiento con adenosina aumentó la proliferación celular en un 35%. Por tanto, evaluamos si la adición de Ado purificada al cultivo inducía la capacidad de formar esferas, lo cual, no ocurrió. Del mismo modo, la adición de un inhibidor de la actividad enzimática de CD73 no inhibió la formación de esferas por parte de las células control. Lo anterior nos indica que, con mucha probabilidad, el efecto de la expresión de CD73 en la formación de esferas en la línea CaSki, no se debe a su actividad enzimática. En otros reportes se ha propuesto que la CD73 tiene también una actividad de tipo no-enzimática, debido a que, en ellos, los inhibidores de la actividad enzimática reducen sólo parcialmente el efecto atribuible a CD73 (Gao Z *et al.*, 2017; Sadej R *et al.*, 2008; Yu J *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta la fecha no

se han caracterizado completamente el o los mecanismos asociados a esta actividad no-enzimática.

Actualmente, se considera por muchos autores que la formación de esferas multicelulares en suspensión es una propiedad de las células tumorales de naturaleza troncal, aun cuando la caracterización molecular de dichas células todavía no es definitiva. Diversas moléculas han sido propuestas como “marcadoras” de las presuntas células troncales de diversos tipos tumorales, incluyendo el CaCu. Generalmente, se trata de moléculas que favorecen la viabilidad, la proliferación e incluso la transición del fenotipo epitelial al mesenquimal en las células tumorales. Para evaluar el impacto que la expresión que CD73 tiene sobre el fenotipo semejante a troncal de las células CaSki, determinamos mediante citometría de flujo la expresión de varias moléculas que han sido propuestas como marcadoras de troncalidad en CaCu (Lopez J *et al.*, 2012; Ortiz-Sánchez E *et al.*, 2016), pero no encontramos diferencias significativas entre las células desreguladas para CD73 y las células control. Únicamente encontramos una disminución de 34% en la expresión de la molécula integrina $\alpha 6$ (CD49f), la cual es una molécula de membrana con afinidad por la proteína laminina, de la matriz extracelular (MEC), y cuya unión produce una señalización al interior de la célula. Sería interesante determinar con otros ensayos si la disminución de la integrina $\alpha 6$ observada se asocia consistentemente con la disminución de CD73, puesto que se ha reportado que, bajo condiciones de transformación celular y como parte del complejo integrina $\alpha 6\beta 4$, modifica su función normal, y favorece la progresión tumoral, particularmente facultando la invasión (Lipscomb EA y Mercurio AM, 2005; Mercurio AM y Rabinovitz I, 2001), y asimismo, favorece la resistencia a anoikis en células de cáncer de mama (Bachelder RE *et al.*, 1999).

Puesto que no encontramos un efecto directo de la actividad enzimática de CD73 en la formación de esferas, ni una marcada diferencia en la expresión intrínseca de genes asociados con la troncalidad entre las células CaSki control y las desreguladas para CD73, evaluamos si existía una diferencia a la capacidad de respuesta a estímulos externos, particularmente al EGF, el cual es

péptido asociado a un mal pronóstico clínico ya que favorece el desarrollo de las neoplasias malignas; su actividad promueve la supervivencia, la proliferación, la invasión, la metástasis y la progresión tumoral, a través de fungir como ligando de su receptor (EGFR), presente en la superficie celular (Logue JS and Morrison DK, 2012). En concordancia con (Knuechel R et al., 1990), observamos que la adición de EGF recombinante al cultivo modificó la forma de las células CaSki, e incrementó el número, y el tamaño de las esferas formadas, las cuales fueron además menos compactas que en ausencia del factor; asimismo, resultó en la aparición en el cultivo de células individuales en suspensión y no asociadas a esferas, lo que indica que esta citocina confiere resistencia a la anoikis. El EGF indujo la formación de esferas en las células CaSki con baja expresión de CD73, pero el efecto fue menor que en las células control, lo que nos sugiere una diferencia en la capacidad de respuesta al EGF. Esta observación implica que, probablemente, la regulación negativa de la expresión de CD73 en las células CaSki, resultó en una menor expresión de EGFR; Zhi *et al.*, (2012) encontraron que la expresión de CD73 se correlacionó positivamente con la expresión de EGFR en las células de cáncer de mama MB-MDA-231, lo que los llevó a sugerir que CD73 promovió la migración e invasión de células tumorales mediante la regulación de la expresión de EGFR, semejante a lo observado por (Zhu J et al., 2017) en cáncer de pulmón. Por otra parte, las células CaSki presentan una alta densidad de receptores para EGF en comparación con otras líneas celulares de CaCu (Eiblmaier M *et al.*, 2008), lo cual sugiere una alta dependencia de este factor en el sostenimiento de su viabilidad; por tanto, la disminución en la viabilidad de las células CaSki con expresión reducida de CD73 concordaría con una expresión reducida del EGFR.

Asimismo, Chhabra R (2018) propuso que el mantenimiento de una población troncal en las células CaSki, incluyendo la capacidad de formar esferas, es coordinado por el EGF, que, a su vez, activa a las proteínas de señalización intracelular PI3K/Akt y Sox2. De acuerdo con esto, las esferas formadas en líneas celulares de CaCu presentan una mayor expresión de Sox2 en comparación con las células parentales, aun sin la adición exógena de EGF (Wang L *et al.*, 2019);

complementariamente, las células Sox2+ presentan una mayor capacidad de formar esferas (Ji J and Zheng P-S, 2010).

Además, existe una correlación entre la actividad del EGF con CD73 y la integrina $\alpha6\beta4$. El EGF induce un aumento en la expresión de CD73 en líneas de cáncer cervical (Gamboa Meraz UA, 2019) y la intensidad de expresión del EGFR se asocia directamente con la intensidad de expresión del complejo integrina $\alpha6\beta4$, en cáncer (Chhabra R, 2018). Resulta interesante que, a su vez, la activación del complejo integrina $\alpha6\beta4$, induce el agrupamiento de moléculas del EGFR en la membrana celular, lo que conduce a la activación de este receptor (Gilcrease MZ *et al.*, 2009). Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, donde encontramos que la línea celular deficiente para CD73 responde de manera limitada al EGF, en comparación con las células control, y expresa una menor densidad de la proteína integrina $\alpha6$.

Otro aspecto importante que merece ser evaluado es la capacidad que puedan tener estas moléculas en la estabilización de las esferas, una vez que las células resistieron la anoikis. Por ejemplo, la unión del EGF con su receptor impide la función de la molécula de adhesión cadherina-E, con lo que se forman esferas más laxas que en ausencia del factor, pero induce la formación de desmosomas verdaderos, los cuales no se observan en cultivos en monocapa (Knuechel R *et al.*, 1990). Por su parte, sería conveniente evaluar si CD73 y la integrina $\alpha6$ contribuyen a la estabilización de las esferas, debido a su capacidad para funcionar como ligandos de proteínas de MEC (Olmo N *et al.*, 1992; Sadej R *et al.*, 2008).

Finalmente, cabe resaltar que es importante analizar los factores moleculares que contribuyen a la formación, estabilización y sobrevivencia de las tumoresferas, puesto que estas estructuras representan un modelo conveniente para estudiar de la capacidad metastásica de las células transformadas. Por ejemplo, se ha descrito que las células que migran en grupo presentan una mayor eficiencia para formar metástasis, que las que migran individualmente (Saitoh M, 2018). Consistente con esto, se han reportado datos que indican que la expresión de CD73 está asociada con metástasis tumorales en modelos experimentales y pacientes clínicos (Gao Z *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que la sobreexpresión de CD73 en células CaSki favorece la capacidad de formar esferas tumorales en condiciones de baja adherencia y que esta capacidad no depende de la actividad enzimática de la proteína; de mismo modo, la disminución de CD73 afecta en la viabilidad de las células de CaCu.

Por otro lado, el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) indujo significativamente la formación de esferas en células de la línea CaSki. Finalmente, las células desreguladas para CD73 no muestran una diferencia significativa en la expresión de moléculas asociadas a la troncalidad.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión de EGFR células CaSki WT y en los clones desregulados genéticamente para la expresión de CD73.
- Evaluar el efecto de EGF en la expresión de CD49f en células CaSki desreguladas genéticamente para la expresión de CD73.
- Evaluar el efecto de EGF en la expresión de CD73 en células CaSki desreguladas genéticamente para la expresión de CD73 en condiciones de ultra baja adherencia.

LITERATURA CITADA

- Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, and Jalkanen S (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1603–1608.
- Alcalá Pérez D, Barrera Pérez M, Yépiz RC, Luisa A, and Pérez C (2015). Células madre cancerígenas: conceptos actuales. *Revista Cent Dermatol Pascua* 24, 47–51.
- Alcántara Quintana LE (2019). Cultivo celular 3D como modelo para estudiar el cáncer.
- Allard D, Allard B, Gaudreau P-O, Chrobak P, and Stagg J (2016). CD73–adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. *Immunotherapy* 8, 145–163.
- de Andrade Mello P, Coutinho-Silva R, and Savio LEB (2017). Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor–Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Immunology* 8, 1–17.
- Antonioli L, Csóka B, Fornai M, Colucci R, Kókai E, Blandizzi C, and Haskó G (2014). Adenosine and inflammation: what’s new on the horizon? *Drug Discovery Today* 19, 1051–1068.
- Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, and Haskó G (2016). Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities. *Trends in Cancer* 2, 95–109.
- Ávila-Ibarra LR, Mora-García MDL, García-Rocha R, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Montesinos JJ, Lizano Soberon M, García-López P, López CAD, Torres-Pineda DB, et al. (2019). Mesenchymal Stromal Cells Derived from Normal Cervix and Cervical Cancer Tumors Increase CD73 Expression in Cervical Cancer Cells Through TGF- β 1 Production. *Stem Cells and Development* 28, 477–488.
- Bachelder RE, Ribick MJ, Marchetti A, Falcioni R, Soddu S, Davis KR, and Mercurio AM (1999). P53 Inhibits α 6 β 4 Integrin Survival Signaling by Promoting the Caspase 3–Dependent Cleavage of Akt/PKB. *Journal of Cell Biology* 147, 1063–1072.
- Bahreyni A, Samani SS, Ghorbani E, Rahmani F, Khayami R, Toroghian Y, Behnam-Rassouli

- R, Khazaei M, Ryzhikov M, Parizadeh MR, et al. (2018). Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. *Journal of Cellular Physiology* 233, 2715–2722.
- Barba Evia JR (2009). Cáncer cervicouterino. ¿Que papel etiológico juega la infección del virus del papiloma humano? *Revista Mexicana de Patología Clínica* 56, 83–104.
 - Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, and Battastini AMO (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 319, 61–68.
 - Boison D, and Yegutkin GG (2019). Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell* 36, 582–596.
 - Chhabra R (2018). let-7i-5p, miR-181a-2-3p and EGF/PI3K/SOX2 axis coordinate to maintain cancer stem cell population in cervical cancer. *Scientific Reports* 8, 7840.
 - Colgan SP, Eltzhig HK, Eckle T, and Thompson LF (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* 2, 351–360.
 - Cortes Escamilla CE (2016). Efecto de TGF-Beta sobre la expresión de la ectoenzima 5'nucleotidasa (CD73) en la capacidad migratoria de células tumorales de cáncer cérvicouterino. Universidad nacional Autónoma de México.
 - Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, and Correia IJ (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances* 34, 1427–1441.
 - Dalerba P, Cho RW, and Clarke MF (2007). Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annual Review of Medicine* 58, 267–284.
 - Doorbar J (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110, 525–541.
 - Douglas H, and Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
 - Eiblmaier M, Meyer LA, Watson MA, Fracasso PM, Pike LJ, and Anderson CJ (2008).

Correlating EGFR Expression with Receptor-Binding Properties and Internalization of ⁶⁴Cu-DOTA-Cetuximab in 5 Cervical Cancer Cell Lines. *Journal of Nuclear Medicine* 49, 1472–1479.

- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, and Kunz-Schughart LA (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols* 4, 309–324.
- Gamboa Meraz UA (2019). Efecto del Factor de Crecimiento Epidérmico (EFG) sobre la expresión de CD73 y su participación en la proliferación y capacidad migratoria de células tumorales de Cáncer Cerviouterino. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gao Z, Dong K, and Zhang H (2014). The Roles of CD73 in Cancer. *BioMed Research International* 2014, 1–9.
- Gao Z, Wang H, Lin F, Wang X, Long M, Zhang H, and Dong K (2017). CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC Cancer* 17, 135.
- GAO ZW, WANG HP, DONG K, LIN F, WANG X, and ZHANG HZ (2016). Adenosine inhibits migration, invasion and induces apoptosis of human cervical cancer cells. *Neoplasma* 63, 201–207.
- García-Rocha R, Monroy-García A, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, Gutiérrez-Serrano V, del Carmen Fuentes-Castañeda M, Ávila-Ibarra LR, Don-López CA, Torres-Pineda DB, and de Lourdes Mora-García M (2019). Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine* 118, 71–79.
- Gilcrease MZ, Zhou X, Lu X, Woodward WA, Hall BE, and Morrissey PJ (2009). Alpha6beta4 integrin crosslinking induces EGFR clustering and promotes EGF-mediated Rho activation in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28, 67.
- Gutiérrez-Xicotécatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, and Madrid-Marina V (2009). Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Pública de México* 51, s479–s488.

- Hammami A, Allard D, Allard B, and Stagg J (2019). Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Seminars in Immunology* 42, 101304.
- Herreros Pomares A (2019). Tumorspheres as an in vitro model for cancer stem-like cells characterization in non-small cell lung cancer . Prognostic implications. Universitat de València.
- Huang S, Apasov S, Koshiba M, and Sitkovsky M (1997). Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90, 1600–1610.
- Ji J, and Zheng P-S (2010). Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Human Pathology* 41, 1438–1447.
- Knuechel R, Keng P, Hofstaedter F, Langmuir V, Sutherland RM, and Penney DP (1990). Differentiation patterns in two- and three-dimensional culture systems of human squamous carcinoma cell lines. *The American Journal of Pathology* 137, 725–736.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, and Dolznig H (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 752, 10–24.
- Lee C-H, Yu C-C, Wang B-Y, and Chang W-W (2016). Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget* 7, 1215–1226.
- Leone RD, and Emens LA (2018). Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6, 57.
- Linden J, and Cekic C (2012). Regulation of Lymphocyte Function by Adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, 2097–2103.
- Liu H, Wang H, Li C, Zhang T, Meng X, Zhang Y, and Qian H (2016). Spheres from cervical cancer cells display stemness and cancer drug resistance. *Oncology Letters* 12, 2184–2188.
- Logue JS, and Morrison DK (2012). Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy. *Genes & Development* 26, 641–650.

- Lopez J, Ruíz G, Organista-Nava J, Gariglio P, and García-Carrancá A (2012). Human Papillomavirus Infections and Cancer Stem Cells of Tumors from the Uterine Cervix. *The Open Virology Journal* 6, 232–240.
- López Saavedra A, and Lizano Soberón M (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Unidad de Investigación Biomédica En Cáncer. UNAM - INCan* 1, 31–55.
- Ma X-L, Shen M-N, Hu B, Wang B-L, Yang W-J, Lv L-H, Wang H, Zhou Y, Jin A-L, Sun Y-F, et al. (2019). CD73 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110 β and predicts poor prognosis. *Journal of Hematology & Oncology* 12, 37.
- Manzo-Merino J, Jiménez-Lima R, and Cruz-Gregorio A (2014). Biología molecular del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología* 13, 18–24.
- Mendoza-Almanza G, Ortiz-Sánchez E, Rocha-Zavaleta L, Rivas-Santiago C, Esparza-Ibarra E, and Olmos J (2019). Cervical cancer stem cells and other leading factors associated with cervical cancer development (Review). *Oncology Letters* 18, 3423–3432.
- Mora-García ML, Ávila-Ibarra LR, García-Rocha R, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Don-López CA, Gutiérrez-Serrano V, Titla-Vilchis IJ, Fuentes-Castañeda MC, Monroy-Mora A, et al. (2017). Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular Immunology* 320, 46–55.
- Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL, and Maruo T (2004). The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe Journal of Medical Sciences* 50, 9–19.
- Muñoz A (1997). *Cáncer. Genes y Nuevas Terapias* (España: Hélice).
- Olmo N, Turnay J, Risse G, Deutzmann R, von der Mark K, and Lizarbe MA (1992). Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin. *Biochemical Journal* 282, 181–188.
- Organización Mundial del la Salud (OMS) (2016). *Prevención y control del cáncer en el*

contexto de un enfoque integrado.

- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021). Cáncer. OMS 1–7.
- Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñiz-Hernández S, Garrido E, De León DC, and García-Carrancá A (2016). Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget* 7, 31943–31954.
- Petruk N, Tuominen S, Åkerfelt M, Mattsson J, Sandholm J, Nees M, Yegutkin GG, Jukkola A, Tuomela J, and Selander KS (2021). CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer. *Scientific Reports* 11, 6035.
- Regateiro FS, Cobbold SP, and Waldmann H (2013). CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clinical & Experimental Immunology* 171, 1–7.
- Reynolds B, and Weiss S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Sadej R, Sychala J, and Skladanowski AC (2006). Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Research* 16, 213–222.
- Sadej R, Inai K, Rajfur Z, Ostapkowicz A, Kohler J, Skladanowski AC, Mitchell BS, and Sychala J (2008). Tenascin C interacts with Ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1782, 35–40.
- Saitoh M (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry* 164, 257–264.
- Sung KE, and Beebe DJ (2014). Microfluidic 3D models of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 79–80, 68–78.
- Sutherland RM, McCredie JA, and Inch WR (1971). Growth of Multicell Spheroids in Tissue Culture as a Model of Nodular Carcinomas. *JNCI*:

Journal of the National Cancer Institute 46, 113–120.

- Tomas A, Futter CE, and Eden ER (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in Cell Biology* 24, 26–34.
- Torres-Poveda KJ, Cruz-Valdez A, and Madrid-Mariana V (2014). Epidemiología del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología* 13, 4–17.
- Vicuña Chavaro N, Arroyo Hernández G, Alcázar LF, and Pérez Zuñiga I (2009). Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología, Mexico* 8, 61–79.
- Vijayan D, Young A, Teng MWL, and Smyth MJ (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nature Reviews Cancer* 17, 709–724.
- Wang L, Tang S, Wang Y, Xu S, Yu J, Zhi X, Ou Z, Yang J, Zhou P, and Shao Z (2013). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clinical & Experimental Metastasis* 30, 671–680.
- Wang L, Liu Y, Zhou Y, Wang J, Tu L, Sun Z, Wang X, and Luo F (2019). Zoledronic acid inhibits the growth of cancer stem cell derived from cervical cancer cell by attenuating their stemness phenotype and inducing apoptosis and cell cycle arrest through the Erk1/2 and Akt pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38, 93.
- Yu J, Wang X, Lu Q, Wang J, Li L, Liao X, Zhu W, Lv L, Zhi X, Yu J, et al. (2018). Extracellular 5'-nucleotidase (CD73) promotes human breast cancer cells growth through AKT/GSK-3 β / β -catenin/cyclinD1 signaling pathway. *International Journal of Cancer* 142, 959–967.
- Zaldívar Lelo de Larrea G, Martín Molina F, Sosa Ferreyra CF, Ávila Morales J, Lloret Rivas M, Román Lara M, and Vega Malagón G (2012). Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 77, 315–321.
- Zhang L, Jiao M, Li L, Wu D, Wu K, Li X, Zhu G, Dang Q, Wang X, Hsieh J-T, et al. (2012). Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138, 675–686.
- Zhi X, Wang Y, Zhou X, Yu J, Jian R, Tang S, Yin L, and Zhou P (2010). RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer*

Science *101*, 2561–2569.

- Zhou L, Jia S, Chen Y, Wang W, Wu Z, Yu W, Zhang M, Ding G, and Cao L (2019). The distinct role of CD73 in the progression of pancreatic cancer. *Journal of Molecular Medicine* *97*, 803–815.
- Zhu J, Zeng Y, Li W, Qin H, Lei Z, Shen D, Gu D, Huang J, and Liu Z (2017). CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer* *16*, 34.