



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA PENTOSTATINA SOBRE LA VIABILIDAD DE
CÉLULAS DE CÁNCER DE CERVICOUTERINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ERANDI GABRIELA ESPINOSA ALONZO

JURADO DEL EXAMEN:

DIRECTORA: DRA. ROSARIO GARCÍA ROCHA

ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

ASESORA: DRA. CHRISTIAN AZUCENA DON LOPEZ

SINODAL: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

SINODAL: DR. JORGE HERNÁNDEZ MONTES



CIUDAD DE MÉXICO

MARZO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	2
3.1 Cáncer	2
3.2 Cáncer Cérvico-uterino	4
3.3 Vía Adenosinergica	5
3.4 Mecanismos de liberación de los nucleótidos extracelulares	7
3.5 Vía Adenosinergica en el CaCu	8
3.6 Pentostatina y su relación con el cáncer	11
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
5. HIPÓTESIS	13
6. OBJETIVOS	14
6.1 Objetivo general	14
6.2 Objetivos particulares	14
7. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Cultivo Celular	14
6.2 Expresión de ADA en células tumorales de CaCu	14
6.3 Actividad enzimática de ADA	15
6.4 Efecto de la Pentostatina en la proliferación de células de CaCu	16
6.5 Análisis estadístico	16
8. RESULTADOS	16
9. DISCUSIÓN	23
10. CONCLUSIÓN	26
11. REFERENCIAS	27
12. ÍNDICE DE FIGURAS	41
13. GLOSARIO	42

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

RESUMEN

La enzima adenosina desaminasa (ADA) desempeña un papel fundamental en el metabolismo de las purinas y tiene una mayor actividad en los tejidos cancerosos, lo que otorga ventajas a las células tumorales para sobrevivir al protegerlas de las altas concentraciones de adenosina (Ado) en el microambiente tumoral. La Ado, generada a partir de la hidrólisis de AMP por la ectoenzima CD73, se asocia con la progresión tumoral al promover un microambiente inmunotolerante regulando la proliferación y apoptosis de las células inmunes y la metástasis en las células tumorales. En el presente estudio se analizó la expresión de adenosina deaminasa (ADA) en tres líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCu) C33A, CaSki y HeLa y se evaluó el efecto de la pentostatina como inhibidor de la actividad enzimática de ADA y su efecto sobre la viabilidad celular. En los resultados se observó una inhibición de la actividad enzimática de ADA en las células tratadas con pentostatina, de manera dosis dependiente, y la viabilidad celular disminuyó en las líneas celulares C33A y CaSki. Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que la pentostatina es un inhibidor de la actividad enzimática de ADA y tiene efectos significativos en la disminución de la viabilidad celular. Por último, cabe resaltar que la pentostatina en el contexto del cáncer cervical, puede tener un potencial uso terapéutico, sin embargo, aun existe la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor sus efectos y mecanismos de acción.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo, representando más de 300,000 muertes por año, de las cuales más del 80% ocurren en países en vías de desarrollo (Bray F, *et. al.*, 2018) y de acuerdo con los últimos informes del International Agency for Research on Cancer (IARC) es la segunda causa de muerte en México (IARC, 2022). En la actualidad se sabe que la infección persistente por el virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo (-AR) es el principal factor etiológico para desarrollar CaCu (Doorbar J, 2019). En este sentido, se sabe que el sistema inmune es capaz de eliminar al HPV-AR en aproximadamente 1 o 2 años después de la infección (Woodman C, *et. al.*, 2007), de lo contrario el HPV-AR puede generar cambios displásicos, los cuales pueden retroceder espontáneamente o persistir y progresar a cáncer invasivo (Moscicki A, *et. al.*, 2004). En la actualidad se sabe que hay muchas vías de señalización que participan para la expansión del cáncer (Soleimani, *et. al.*, 2019), así como la presencia de mecanismos intrínsecos de las células tumorales que pueden jugar un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad (Kobayashi A, *et. al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que la vía adenosinérgica juega un papel importante en la patogénesis del cáncer ginecológico (Bahreyni A, *et. al.*, 2018), en esta vía, los nucleótidos ATP/ADP/AMP que se encuentran en el microambiente tumoral (por sus siglas en inglés - TME), son hidrolizados conjuntamente para generar adenosina (Ado) (Vaupel P, *et. al.*, 2016). Por otra parte, se sabe que los niveles de Ado son regulados de manera importante por la actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA), la cual puede otorgar una ventaja selectiva a las células cancerosas para su sobrevivencia. Por tanto, la búsqueda de fármacos que regulen la expresión y/o actividad de ADA puede ser de utilidad terapéutica en esta enfermedad.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Cáncer.

El cuerpo humano está conformado por una gran cantidad de células que, a su vez, forman tejidos y órganos, cada una de estas células dependen de mecanismos de control o regulación que son originados en su mayoría en el núcleo celular, siendo resultado de la actividad de los genes (Rojas-Espinosa, 2017). Normalmente, las células siguen un camino donde se dividen para formar células nuevas cuando el cuerpo las necesita y, cuando las células sufren algún daño o bien envejecen, éstas mueren y son reemplazadas por células nuevas (National Cancer Institute, 2021), sin embargo, cuando estos mecanismos fallan, se

producen alteraciones en la expresión génica, que pueden contribuir al desarrollo del cáncer, y que conducen a las células a dividirse y multiplicarse sin control, diseminándose a otras partes del cuerpo invadiendo tejidos en un proceso llamado metástasis (Rojas-Espinosa, 2017; De Vita, *et. al.*, 2020; National Cancer Institute, 2021).

Con respecto a estas células con alteraciones genéticas que desencadenan y conforman el cáncer, se sabe que existen características propias de éstas células tumorales conocidas como los “hallmarks” del cáncer (Figura 1), estas características se han estado estudiado durante años describiendo lo siguiente: evasión de los supresores de crecimiento, evasión de la destrucción inmune, capacidad proliferativa ilimitada, inflamacion promovida por el tumor, activación de la evasión y metástasis, inducción de la angiogénesis, inestabilidad genómica y mutación, resistencia a la muerte celular, desregulación energética, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos, células senescentes y, el bloqueo de la plasticidad fenotípica (Hannahan, 2022).



Figura 1. “Hallmarks” del cáncer. Características que adquieren las células tumorales durante el desarrollo tumoral: evasión de los supresores de crecimiento, evasión de la destrucción inmune, capacidad proliferativa ilimitada, inflamación

promovida por el tumor, activación de la evasión y metástasis, inducción de la angiogénesis, inestabilidad genómica y mutación, resistencia a la muerte celular, desregulación energética, y las cuatro características recientemente agregadas: reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos, células sensecentes y, el bloqueo de la plasticidad fenotípica (Hanahan, 2022).

3.2. Incidencia y mortalidad.

Actualmente, el cáncer es considerado una de las principales causas de muerte en todo el mundo, siendo la primera o segunda causa principal de muerte antes de los 70 años de edad en 112 países y la tercera o cuarta causa de muerte en 23 países (Sung, *et. al.*, 2021).

En cuanto a la incidencia del cáncer en ambos sexos, el cáncer de mama ocupa el primer lugar con el 11.7% del total de los casos, seguido por el cáncer de pulmón (11.4%), cáncer colorrectal (10%), cáncer de próstata (7.3%), cáncer de estómago (5.6%), cáncer de hígado (4.7%), y cáncer cérvico-uterino (3.1%) (Sung, *et. al.*, 2021; Cancer Today, 2023).

3.3. El cáncer cérvico-uterino (CaCu).

El CaCu es un tipo de cáncer que se produce en las células que se encuentran en el cuello uterino (Mayo Clinic, 2023) y se reporta que la mayoría de los casos nuevos (85%) y muertes (90%) ocurren en países con ingresos bajos y medios (Bhatla *et.al.*, 2021) como lo es México. En la actualidad el CaCu es uno de los problemas de salud pública más preocupantes en las mujeres mexicanas, representando el segundo lugar en neoplasia femenina más frecuente, con una incidencia del 9.3% y 9.9% de mortalidad (Figura 2) (Jemal *et. al.*, 2021; Cancer Today, 2022).

Dentro de los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del CaCu se encuentran las infecciones de transmisión sexual (ITS), principalmente el HPV (Lakkis *et.al.*, 2022; Mayo Clinic, 2023) que, en la actualidad se considera que existe una relación etiológica entre la infección prolongada y persistente de este virus con el desarrollo de este cáncer (Bhatla *et.al.*, 2021) y en México, más del 99% de pacientes con CaCu presentan infección por alguno de los tipos de HPV-AR (Bhatla *et.al.*, 2021; Lakkis *et.al.*, 2022).

Los datos epidemiológicos actuales sobre los tipos de HPV así como la evaluación del impacto que ha tenido la vacunación en contra del HPV en nuestra población, nos pueden brindar las herramientas

necesarias para la futura prevención del cáncer (Salcedo-Vargas, *et. al.*, 2014). Sin embargo, para aquellas pacientes que desarrollan CaCu, el tratamiento tradicional que incluye quimioterapia sistémica (altamente tóxica con eventos adversos serios), cirugía y radioterapia, ofrece opciones limitadas para lograr una sobrevida libre de la enfermedad (Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020; Sánchez-Mercader, *et. al.*, 2021). Por lo tanto, se están investigando nuevos blancos terapéuticos (Soleimani, *et. al.*, 2019) para combatir este padecimiento (Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020), entre las cuales se encuentran las moléculas participantes en la vía adenosinérgica.

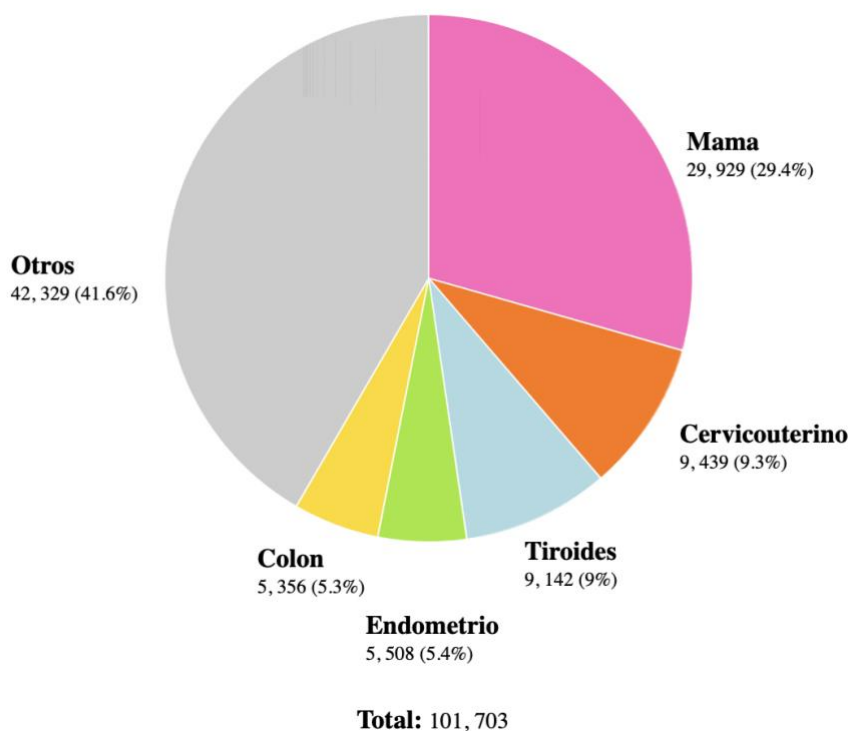


Figura 2. Incidencia de cáncer en México. Número de casos estimados de cáncer en mujeres de todas las edades en México durante el 2022 (Cancer Today, 2022).

3.4. Vía adenosinérgica.

La vía adenosinérgica es una vía de señalización que desempeña un papel de sistema de comunicación entre célula-célula (comunicación extracelular), en donde los nucleótidos extracelulares participan como mensajeros (Giuliani, *et. al.*, 2019). Es considerada como una de las vías con mayor relevancia dentro del

cuerpo humano ya que es selectiva y flexible debido a que los efectos biológicos que tiene dependen del tipo y cantidad de nucleótidos liberados, su modificación por las ectonucleotidasas y su recaptación celular (Giuliani, *et. al.*, 2019). Las respuestas fisiológicas en las que participa incluyen: la neurotransmisión, neuromodulación, interacciones glial-neurón, secreción hormonal, transmisión sensorial, funciones especializadas de diferentes órganos como el hígado, riñón, plaquetas, aparato cardiovascular, sistema inmunológico y sistema musculoesquelético, además de participar en respuestas patológicas que incluyen: trastornos del sistema nervioso central como el dolor neuropático, trauma, isquemia cerebral, esclerosis múltiple, Parkinson y Alzheimer, alteraciones patológicas en el hígado, enfermedades cardiovasculares, infecciones, inflamación, dolor y cáncer (Giuliani, *et. al.*, 2019).

Los elementos de esta vía, pueden actuar como mensajeros extracelulares ya que tienen una rápida difusión a través de los espacios intercelulares ricos en líquidos, y un apagado rápido de la señal para evitar la sobreestimulación o la desensibilización del receptor. Estos se encuentran en concentraciones muy bajas en el espacio extracelular en condiciones fisiológicas normales (nmol/l) y son hidrolizados rápidamente por nucleotidasas extracelulares que se encuentran en todo el cuerpo (Giuliani, *et. al.*, 2019).

En la vía adenosinérgica, participan las ectonucleotidasas CD39 (ENTPD1, difosfohidrolasa trifosfato ectonucleósido-1, EC 3.6.1.5) y CD73 (5'- ectonucleotidasa, CE 3.1.3.5), CD39 hidroliza a los nucleótidos ATP (molécula considerada como fuente de energía para las células y molécula de señalización extracelular) (Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020; Alvarez, *et. al.*, 2022) y ADP, que son liberados por una variedad de tipos de células en respuesta a señales de estrés o daño, producidas en infecciones o lesiones, así como de hipoxia e inflamación que se producen comúnmente durante el desarrollo de un tumor maligno, para generar el AMP; y CD73 genera Ado, a partir de la hidrólisis de AMP (Resta, *et. al.*, 1998; Robson, *et. al.*, 2005, 2006; Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020). Posteriormente, esta Ado puede desaminarse mediante la enzima ADA, convirtiéndola en inosina (Ino) (Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020), o bien, puede entrar en una reserva de nucleótidos de purina a través de la actividad de la adenosina cinasa (AK, por sus siglas en inglés: adenosine kinase) catalizando la formación de AMP (Antonioli, *et. al.*, 2014) controlando de esta manera los niveles intracelulares de la Ado. (Allard B, *et. al.*, 2016). Mientras que la enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP, por sus siglas en inglés: purine nucleoside phosphorylase) metaboliza la Ino a hipoxantina (HYP por sus siglas en inglés hypoxanthine) de manera extracelular (Giuliani *et. al.*, 2017; Boison *et. al.*, 2019) (Figura 3).

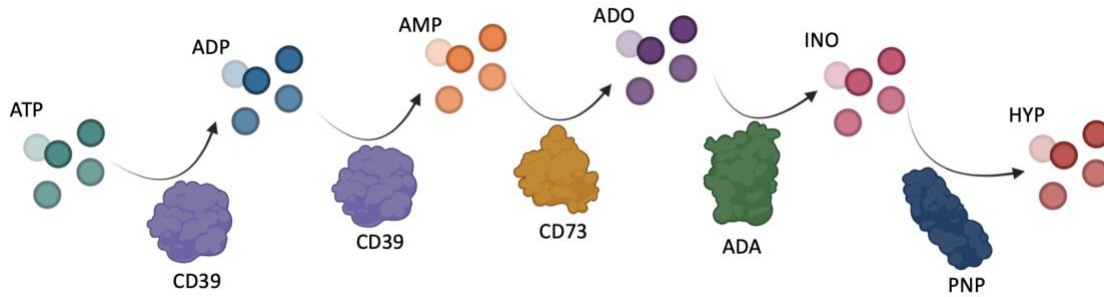


Figura 3. Vía adenosinérgica. La molécula de ATP es hidrolizada por la ectonucleotidasa CD39 a ADP y a AMP, después, AMP es hidrolizado por la ectonucleotidasa CD73 a ADO; la ADO es desaminada por ADA a Ino y ésta es metabolizada a HYP por PNP (Resta, *et. al.*, 1998; Robson, *et. al.*, 2005; Robson, *et. al.*, 2006; Antonioli, *et. al.*, 2014; Allard B, *et. al.*, 2016; Giuliani *et. al.*, 2017; Boison, *et.al.*, 2019; Giuliani, *et. al.*, 2019; Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020; Alvarez, *et. al.*, 2022).

3.5. Mecanismos de liberación de los nucleótidos extracelulares.

Los nucleótidos utilizados en la vía adenosinérgica pueden ser liberados por las células a través de diferentes mecanismos: mecanismos específicos y mecanismos no específicos.

- Mecanismos específicos:

Estos mecanismos desempeñan un papel importante en la modulación de la inflamación y la inmunidad. Los nucleótidos son liberados mediante la exocitosis vesicular (exocitosis regulada), microvesículas y diferentes tipos de canales y transportadores [transportador de nucleótidos vesicular, (VNUT)] (Figura 4) (Giuliani, *et. al.*, 2019).

- Mecanismos no específicos:

En este caso, la liberación de los nucleotidos es resultado de condiciones de estrés celular e inducción a la muerte celular (después de una deformación mecánica, exposición a agentes citotóxicos, hipoxia, daño en la membrana plasmática). Los nucleótidos se liberan de forma no regulada como en la inflamación donde existe una interrupción de la membrana celular que conduce a la liberación no específica de grandes cantidades de nucleótidos debido al gradiente de nucleótidos intracelular/extracelular (Giuliani, *et. al.*, 2019).

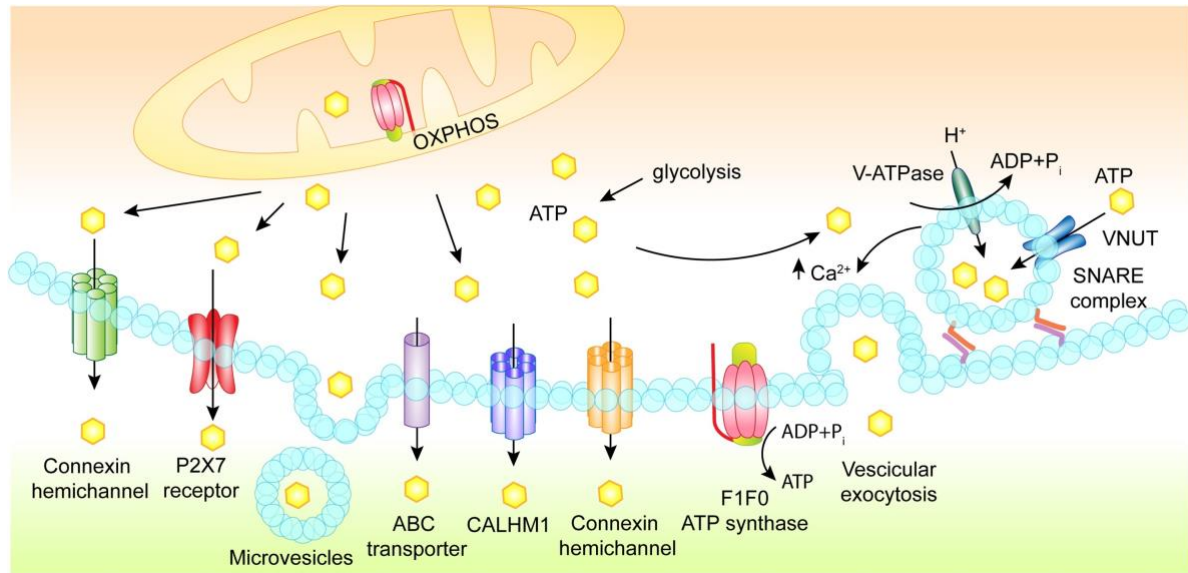


Figura 4. Vías para la liberación regulada de nucleótidos. El ATP generado dentro de la célula por glucólisis y fosforilación oxidativa se puede liberar a través de exocitosis vesicular, microvesículas derivadas de la membrana plasmática, canales de connexina o pannexina, transportadores específicos de casete de unión a ATP (ABC), canales moduladores de homeóstasis de calcio (CALHM) o el P2X7R. El ATP se acumula en vesículas secretoras gracias a la acción de la V-ATPasa que genera un gradiente de protones a través de la membrana de la vesícula, y el transportador de nucleótidos vesiculares (VNUT) que explota el gradiente electroquímico para transportar ATP a las vesículas. Después, la exocitosis se produce a través del complejo canónico del receptor de fijación del factor sensible a la N-etilmaleimida (SNARE) activado por Ca^{2+} . También se ha sugerido que una membrana plasmática F1F0 ATP sintasa contribuya al aumento del ATP en el espacio pericelular (Giuliani, *et. al.*, 2019).

3.6. Vía adenosinérgica en el cáncer y en el cáncer cérvico-uterino (CaCu).

El microambiente tumoral (TME) es dinámico, consiste en diversos tipos de células (cancerosas, estromales, inmunitarias infiltrantes, etc.), citocinas, vasos sanguíneos, metabolitos derivados del tumor, entre otros elementos. El sistema inmune desempeña un papel importante y clave en todas las etapas, desde el inicio del tumor, su progresión, su invasión y la metástasis (Soleimani, *et. al.*, 2019). En cuanto a la vía adenosinérgica se sabe que el CD73 se encuentra sobreexpresado y en varios estudios se ha observado que tiene funciones no enzimáticas que facilitan la angiogénesis y la metástasis y además se ha relacionado con un aumento en la quimioresistencia (Soleimani, *et. al.*, 2019) ; así como enzimáticas, aumentando la concentración de la Ado desde $1 \mu\text{M}$ hasta $10 \mu\text{M}$ en el ambiente extracelular (Soleimani, *et. al.*, 2019; Alvarez, *et. al.*, 2022).

De manera reciente se han descrito diversos mecanismos por los cuales se puede favorecer el enriquecimiento de Ado en el TME; Vultaggio *et. al.*, sugieren que las ATPasas solubles o asociadas a microvesículas se acumulan en el TME, donde cooperan con las ectonucleotidasas de la membrana plasmática en la degradación del ATP hacia Ado (Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020). Por otro lado, nuestro grupo de investigación demostró que las células de CaCu expresan CD73 y como consecuencia tienen una alta capacidad para generar Ado, y a su vez, la Ado promueve la producción de TGF- β 1 que mantiene la expresión de CD73 (García-Rocha, *et. al.*, 2019; García-Rocha, *et. al.*, 2022)

Por otra parte, se ha descrito que la Ado puede interactuar con diferentes receptores, en total se han identificado cuatro receptores de tipo P1 (PIR): A1R, A2AR, A2BR y A3R (Kazemi, *et al.*, 2018; Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020) que están acoplados a la proteína G (Antonioli, *et. al.*, 2013; Alvarez, *et. al.*, 2022) y quince de tipo P2 (Giuliani, *et. al.*, 2019). En este sentido varios estudios apoyan el papel de los receptores adenosinérgicos en la modulación del crecimiento tumoral (Di Virgilio, *et. al.*, 2018; Sharma, *et. al.*, 2021). En los humanos, los A1R, A2AR y A3R muestran alta afinidad por la Ado mientras que A2BR tiene una baja afinidad (Bagheri, *et.al.*, 2019), sin embargo, se ha relacionado a este último como el principal receptor de la Ado en el cáncer ya que éste se encuentra expresado por las células del sistema inmune (células dendríticas, macrófagos, células T y B) y su estimulación incita la diferenciación de los macrófagos M2, contrarresta la señalización de los linfocitos T al aumentar la concentración de AMP intracelular y promover la actividad de la proteína quinasa A (PKA) que disminuye la proliferación de las células T e inhibe la producción de citocinas inflamatorias (Antonioli, *et. al.*, 2014; Vultaggio-Poma, *et. al.*, 2020). Además cuando la Ado se encuentra en altas concentraciones (>50 μ M) potencia el desarrollo tumoral mediante la proliferación celular y la angiogénesis, además de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias, favorece a la metástasis y el aumento en la expresión metaloproteinasas presentes en la matriz extracelular así como favorecer la transición epitelio mesénquima (Soleimani, *et. al.*, 2019).

De manera contrastante, también se ha descrito que la Ado puede tener una señalización no canónica independiente de AR. Aunque los mecanismos no están bien definidos, se propone que la Ado interactúa con la AK (Boison, 2013), la AK activada por AMP (AMPK) (da Silva, *et. al.*, 2006) y la s-adenosilhomocisteína hidrolasa en la cara interna de las células (Mato, *et. al.*, 2008), en donde la Ado convertida en AMP por la AK regula a la alza la expresión de p53, para inducir la apoptosis independiente

de caspasas (Yang D, *et. al.*, 2010). Por otro lado se ha sugerido que la Ado induce la apoptosis incrementando la síntesis de la proteína pro apoptótica Bax, además de activar caspasa-3 (Shirali, *et. al.*, 2013), además se ha descrito que el AMP puede fosforilar a Bcl-X_L causando la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, resultando en la liberación de DIABLO (Yang, *et. al.*, 2011) y el citocromo c que puede combinarse con Apaf-1, procaspasa 9 y ATP para formar el apoptosoma e iniciar la cascada apoptótica (Yang, *et. al.*, 1998). Además, la Ado induce el arresto del ciclo celular e induce la apoptosis mediante la estimulación de la ciclina D1/Cdk4 (Shirali S, *et. al.*, 2013).

Por otra parte, la ADA es una enzima crucial en el metabolismo de las purinas con múltiples funciones dentro de las cuales se encuentra la modulación alostérica, molécula coestimuladora y la comunicación célula-célula (Bagheri, *et. al.*, 2019). La actividad de ADA aumenta en los tejidos cancerosos como un mecanismo compensatorio contra la acumulación tóxica de la Ado (Donorio J, *et. al.*, 1978) otorgando una ventaja selectiva a las células cancerosas para su sobrevivencia (Monroy-Mora, *et. al.*, 2022). Existen tres isoformas de esta enzima: ADA1, la cual es una proteína monomérica con 40 kDa y que se encuentra presente en todas las células, se sabe que hasta la fecha su principal función se detecta en el desarrollo de los linfocitos (Pérez-Aguilar, *et. al.*, 2010), ADA2, es una proteína de 110 kDa y es considerada de gran importancia para el mantenimiento de la integridad vascular y de la degradación extracelular de adenosina, es liberada por los monocitos y macrófagos cuando existe la presencia de microorganismos en su interior, además participa en la regulación de la proliferación de células T activadas (Zervou, *et. al.*, 2020) y ADA3, una proteína crucial que funge como coactivador del receptor de estrógeno (ER) y participa en la progresión del ciclo celular y se encuentra correlacionado con el cáncer de mama y su mal pronóstico con baja supervivencia (Griffin, *et. al.*, 2016).

En nuestro grupo de trabajo se describió que las células de CaCu expresan ADA en la membrana celular y de manera intracelular y que rápidamente convierte Ado en Ino, sugiriendo que este mecanismo le permite a la célula tumoral mantenerse viable en presencia de altas concentraciones de Ado y que al ser cultivadas en presencia de EHNA, un inhibidor específico con función irreversible de la actividad de ADA (Zavialov AV. & Engström A. 2005) redujo de forma dosis dependiente la proliferación de las células tumorales, además de inducir apoptosis en las mismas (Monroy-Mora, *et. al.*, 2022). En el 2020 en otro trabajo realizado en nuestro grupo, se observó que simvastatina, un fármaco perteneciente al grupo de las estatinas lipofílicas que actúan como inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA)

reductasa (Pedersen, *et. al.*, 2004), inhibió la proliferación de células de CaCu de manera dependiente de la dosis del fármaco; así mismo, observó que simvastatina redujo la capacidad de las células tumorales para desaminar la Ado a Ino, sin embargo, el fármaco no fue capaz de inhibir la actividad enzimática de ADA contenida en los sobrenadantes de los cultivos celulares ni en el plasma sanguíneo de pacientes con CaCu, sugiriendo que la simvastatina tiene su efecto principalmente en la inhibición de la síntesis de ADA, pero no directamente en la actividad funcional de esta enzima (Monroy-Mora, 2020).

Esto nos lleva a pensar que la sobreexpresión de ADA en el TME puede ser importante para proteger a las células tumorales de las altas concentraciones de Ado. Las evidencias experimentales sugieren que al inhibir la actividad enzimática de ADA incrementa la concentración de Ado extra e intracelular, lo cual puede resultar en la inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis de la célula tumoral. En consecuencia, la búsqueda de inhibidores de ADA estables, con unión reversible (tiempo de residencia bajo) de acción rápida y de baja toxicidad podrán ser de utilidad en el tratamiento de tumores con altos contenidos de ADA (Monroy-Mora, *et. al.*, 2022)

3.7. Pentostatina y su relación con el cáncer.

La pentostatina ó dCF [3-(2-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)] un análogo de purina aislado de *Streptomyces antibioticus*, es un inhibidor de ADA y se ha descrito que la inhibición de ADA relacionada con pentostatina da como resultado la acumulación de desoxiadenosina (dAdo), que a su vez se manifiesta en un efecto de inhibición sobre la ribonucleótido reductasa (RNR), la cual es una enzima esencial para la biosíntesis de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), así como la replicación y reparación del ADN (Pubchem, 2023).

La pentostatina es un fármaco que tiene diferentes usos terapéuticos entre los cuales se encuentra su función como antibiótico, inhibidor de enzima, agente inmunosupresor y antineoplásico (Wu, *et. al.*, 2017). En la actualidad la pentostatina se utiliza para el tratamiento paliativo de la leucemia de células pilosas (reticuloendoteliosis leucémica) que responde de manera inadecuada o progresa durante la terapia con IFN- α , produciendo regresión tumoral clínicamente importante o estabilización de la enfermedad (respuestas completas o parciales) en aproximadamente el 80-100% de los pacientes, incluso en pacientes no tratados previamente (p. Ej., Aquellos que no se han sometido a esplenectomía u otra terapia), así como en aquellos pacientes en quienes la esplenectomía y/o terapia con otros agentes (IFNs o agentes

antineoplásicos) no funcionó (Kurzrock, 2000; Lathia, *et. al.*, 2002). En un estudio *in vitro* realizado en el año 2000 por Aldinucci *et. al.*, demostraron que la pentostatina puede ser un medicamento prometedor para el tratamiento de linfomas agresivos de células T $\gamma\delta^+$, esta es una neoplasia agresiva y con mala respuesta a la quimioterapia convencional; sin embargo, la combinación de pentostatina (10-100 μM) junto con dAdo fue capaz de inducir una inhibición del crecimiento clonogénico, de manera dosis dependiente (Aldinucci *et. al.*, 2000).

El grado en que la pentostatina inhibe la ADA varía entre los tipos de células, posiblemente debido a las diferencias en las constantes de disociación del inhibidor de la enzima en diferentes células, así como a las diferencias en la acumulación celular del fármaco. En general, no ha habido una relación clara entre la inhibición de la ADA y la citotoxicidad inducida por pentostatina en los estudios clínicos (Major *et. al.*, 1981).

Hasta el momento se ha descrito que la pentostatina puede aumentar el dATP intracelular, éste al ser un inhibidor alostérico de la ribonucleótido reductasa que al ser inhibida, inhibe a su vez la síntesis de ADN y ARN. También, la pentostatina disminuye los niveles de nicotinamida lo que conlleva al agotamiento del dinucleótido nicotinamida-adenina, una molécula importante para los linfocitos para su crecimiento, diferenciación y proliferación; en este sentido debido a que los linfocitos T tienen un nivel más alto de ADA a comparación de los linfocitos B, los efectos citotóxicos de la pentostatina son logrados con menor dosis en los linfocitos T (Tonin *et. al.*, 2012; Major *et. al.*, 1981).

Sin embargo la inhibición de ADA difiere dependiendo de la actividad intrínseca de la enzima en la célula, así como de la farmacodinámica específica de la célula (p. ej., síntesis de proteínas, tasa de proliferación celular). En algunas células, la inhibición por una sola dosis de pentostatina puede persistir durante 1 semana o más (Xia B, *et. al.*, 2019). La respuesta a la pentostatina varía según el tipo y la sensibilidad de la neoplasia que se esté tratando; las afecciones asociadas con una actividad de ADA relativamente baja (p. Ej. leucemias de células pilosas y linfocíticas crónicas) manifiestan una inhibición prolongada y completa de ADA en respuesta a dosis relativamente bajas, mientras que las afecciones asociadas con una alta actividad de ADA (p. Ej. leucemias agudas) menormente sensibles a la droga, requiriendo dosis más altas que producen una inhibición relativamente incompleta de actividad de la ADA (Higman M, *et.al.*, 2004). Además de que en la literatura, no ha habido una relación clara entre la inhibición de la ADA y la

citotoxicidad inducida por pentostatina en los estudios clínicos (Kane B, *et. al.*, 1992; Xia B, *et. al.*, 2019; Kurzrock R, 2000; Lathia C, *et.al.*, 2002; Higman M, *et.al.*, 2004).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Se ha propuesto que la sobreexpresión de ADA en las células malignas es una ventaja selectiva que les permite sobrevivir ante la presencia de altas concentraciones de Ado en el TME. Asimismo, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de ADA puede conducir a las células tumorales a la apoptosis. Por lo que, resulta importante diseñar nuevas terapias con fármacos que regulen la actividad de ADA y ayuden al tratamiento del cáncer. En este sentido la pentostatina, un análogo de purina, se ha propuesto como un potente inhibidor de ADA (Wu, *et. al.*, 2017), que tiene efecto citotóxico en diferentes tipos de linfomas (Kurzrock, *et. al.*, 2000); de hecho, es considerado el antineoplásico antimetabolito más viejo (de los análogos de nucleósidos) utilizado en la práctica clínica, y está aprobada para el tratamiento contra de leucemia de células pilosas en pacientes adultos (Lathia, *et. al.*, 2002). En cuanto a nuestro grupo de investigación, se ha reportado que células de CaCu expresan ADA en la membrana celular y de manera intracelular y que estas células pueden mantenerse viables aún en altas concentraciones de Ado (Monroy-Mora, *et. al.*, 2022). Con base a todo lo descrito con anterioridad, resulta interesante analizar si pentostatina inhibe la actividad enzimática de ADA de células de CaCu, y si esta inhibición impacta en la disminución de la viabilidad de las células.

5. HIPÓTESIS

Se sabe que la presencia de ADA en células tumorales puede tener efecto protector ante altas concentraciones de Ado extracelular, y que la inhibición de su actividad enzimática es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales, por la acumulación de Ado intracelular. Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha reportado que células de CaCu expresan ADA en membrana celular y de manera intracelular. Entonces, si se cultivan células de CaCu en presencia de pentostatina, un potente inhibidor de ADA, se espera que se inhiba la actividad enzimática de ADA en las células tumorales y disminuya su viabilidad.

6. OBJETIVOS

6.1. General.

Analizar el efecto de la pentostatina sobre la viabilidad de células de cáncer cervicouterino.

6.2. Específicos.

1. Analizar la expresión de ADA en las líneas celulares de CaCu: C33A, CaSki y HeLa.
2. Analizar el efecto de la pentostatina sobre la actividad enzimática de ADA en líneas celulares: C33A, CaSki y HeLa.
3. Determinar el efecto de pentostatina sobre la viabilidad en las líneas celulares: C33A, CaSki y HeLa.

7. MÉTODO

7.1. Cultivo celular.

Las líneas celulares de CaCu: C33A, CaSki y HeLa se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA), suplementado con suero fetal de bovino (SFB, Biowest, South America) al 10%, antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomycin 100 µg/mL) (Gibco), y 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.

7.2. Expresión de ADA en células tumorales de CaCu.

Para determinar la expresión de ADA en las células C33A, CaSki y HeLa se realizó una tinción intracelular para citometría de flujo. Con este propósito se colocaron 1x10⁶ células en un tubo para citometría de flujo de 5 ml (Falcon, USA). Posteriormente se adicionó un 1 ml de PBS al SFB 2%, luego se centrifugó a 250 g y se decantó el sobrenadante. Después se adicionaron 250 µl de solución fijadora [paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) 2%/SFB 2%] y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (TA), una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 250 g por 5 min y se descartó el sobrenadante; luego se adicionaron 250 µl de solución permeadora [Saponina (Sigma-Aldrich) 0.3% + SFB 2%] y se incubó durante 5 min a TA, enseguida se centrifugaron las células y se decantó. A continuación, las células se bloquearon con 100 µl de SFB durante 30 min a 4°C en oscuridad., una vez transcurrido el tiempo se

realizó un lavado que consiste en adicionar 1 ml de saponina al 0.1 % con SFB al 2 % (buffer de lavado), centrifugar a 250 g por 5 min a 4°C y decantar el sobrenadante. A continuación, se adicionó 1 µl anticuerpo conejo anti-humano ADA (Creative Diagnostics, USA) y se incubó durante 20 min a 4°C en oscuridad, posteriormente se realizaron dos lavados, después se adicionaron 4 µl de anticuerpo secundario (Ab sec) anti-conejo IgG PE (R&D Systems, USA) y se incubó 20 min a 4°C en oscuridad, seguidamente se realizaron dos lavados. Por último, se fijaron las células con 200 µl de paraformaldehído al 2%. Se adquirieron 10,000 eventos de la región de interés en un citómetro de flujo (FACS Canto II, BD, USA). Como controles se utilizaron la autofluorescencia y las células teñidas únicamente con Ab sec.

7.3. Actividad enzimática de ADA y densitometría.

Para analizar la actividad enzimática de ADA en membrana y encontrar la dosis mínima necesaria de pentostatina para inhibir dicha enzima, muestras de 1×10^6 células tumorales se colocaron en un microtubo para centrífuga 100 µl de diferentes concentraciones de pentostatina (Sigma-Aldrich) 1, 10, 100, 1000 µM (un tubo para cada concentración) durante 30 min, como control se incubaron las células únicamente con medio de cultivo y como control de la inhibición de ADA se adicionó 1 mM de EHNA (Sigma-Aldrich), inhibidor específico e irreversible de la actividad de ADA (Alberto M, *et. al.*, 2022). Posteriormente se incubaron durante 6 h en presencia de 5 mM de Ado. Al inicio de la incubación y cada hora, durante 5 h se tomaron alícuotas de 10 µl de sobrenadante para su posterior análisis. Para analizar la desaminación de la Ado por medio de ADA se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) empleando laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel (Sigma-Aldrich). Como testigos se emplearon muestras de 2 µl de pentostatina a 1 mM y Ado, Ino e Hipo (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mM. Las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 2.5 ml de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol (38%), etilacetato (22.2%), metanol (16.6%) y amoniaco (22.2%). La elución se dejó correr durante 40 min en la cámara de elución y posteriormente se retiraron para su secado a TA. Finalmente, los productos generados se visualizaron y fotografiaron a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV). Se utilizó el programa Image J para realizar un análisis densitométrico con las fotografías a las laminillas fluorescentes, tomando de referencia la inhibición enzimática las células cultivadas con EHNA, otorgándole un 100% de inhibición de la actividad enzimática de ADA.

7.4. Efecto de la Pentostatina en la viabilidad de células de CaCu.

Para analizar el efecto de la pentostatina sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares de CaCu se cultivaron 1×10^4 células de cada línea celular en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Costar, USA) en presencia de diferentes concentraciones de pentostatina (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μM) por triplicado en un volumen final de 100 μl durante 48 h, como control se utilizaron células solo con medio de cultivo. Al finalizar los tiempos de cultivo, en cada pozo se adicionó 20 μl del reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA), y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C en total oscuridad. La reducción del compuesto de tetrazolio MTS a formazán por células vivas se midió a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas para ELISA (GloMax, Promega). El porcentaje de viabilidad celular se calculó considerando como el 100% la absorbancia de las células que sólo contienen medio de cultivo.

7.5. Análisis estadístico.

Todos los datos numéricos se presentaron como el valor promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Las comparaciones se evaluaron utilizando análisis estadístico multivariado en GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Prism software, USA). Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Expresión de ADA en las líneas celulares de CaCu.

En el TME la concentración de la Ado se encuentra aumentado en comparación de un tejido sano, llegando a tener concentraciones de 100 μM o más (Haskó G, *et. al.*, 2004; Semeniario V, *et. al.*, 2009; Bagheri, *et.al.*, 2019) teniendo diversos efectos en el TME, como favorecer la estimulación del crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (Soleimani, *et. al.*, 2019). Sin embargo, la ADA es la enzima encargada de desaminar la Ado a Ino, y por consiguiente controlar el flujo de la Ado, sin embargo, se ha reportado que ADA se encuentra sobre expresada en tejidos neoplásicos en comparación de un tejido normal, en este sentido nuestro grupo de investigación describió que las líneas celulares C33A, CaSki y HeLa, expresan ADA (Monroy-Mora, *et. al.*, 2022). En este trabajo se analizó la expresión de ADA en cada una de las líneas celulares mediante citometría de flujo; este análisis mostró que todas las líneas celulares de CaCu (C33A, CaSki y HeLa) expresan ADA. C33A cuenta con una intensidad media de

fluorescencia (IFM) de 11,386; CaSki con una IFM de 754 y HeLa con una IFM de 1,101. Siendo la línea celular C33A que presenta más expresión de ADA, aproximadamente 15 y 10 veces mayor comparado con CaSki y HeLa, respectivamente (Figura 5).

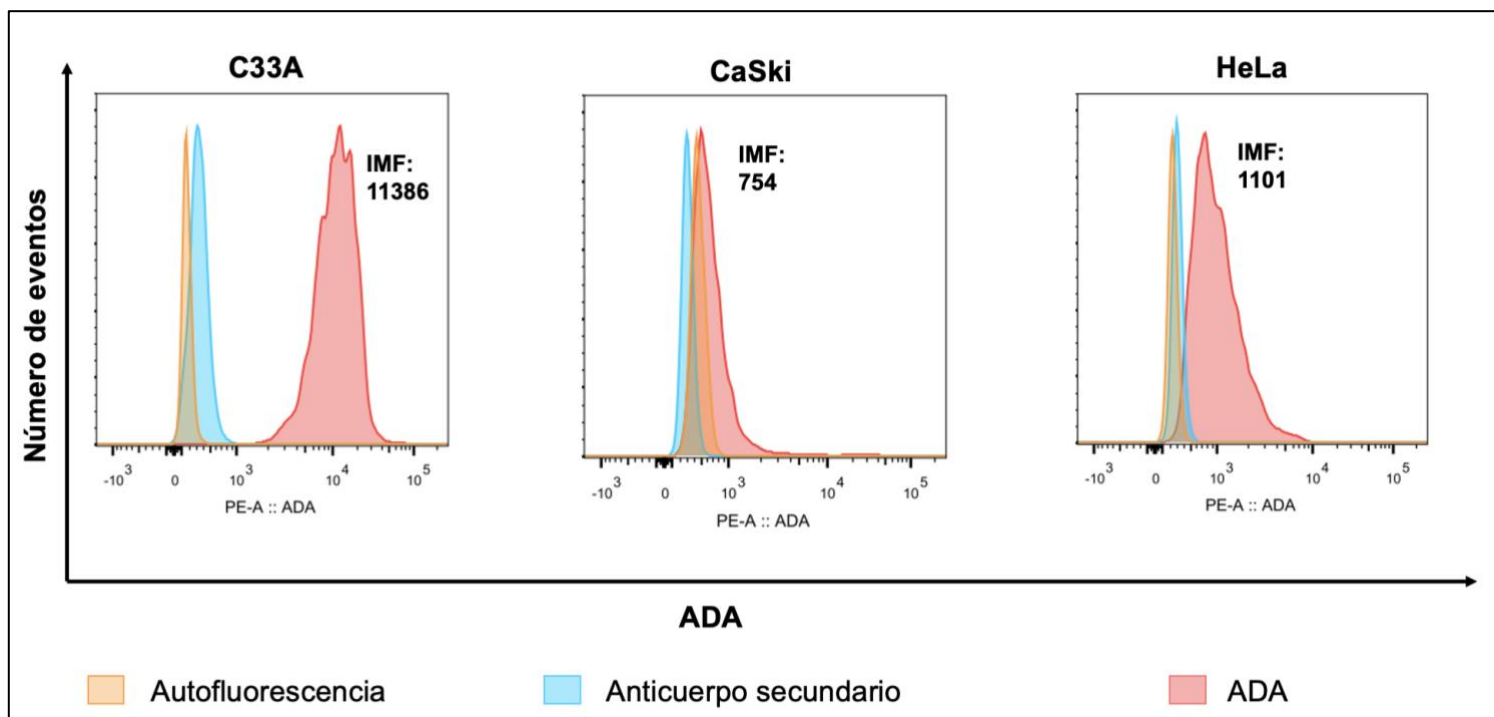


Figura 5. Expresión de ADA en las líneas celulares de CaCu. Se determinó la expresión de ADA mediante una tinción de citometría de flujo, en las diferentes líneas celulares de CaCu. En el eje de la Y se observa el número de eventos y en el eje de la X se observa la expresión de ADA. Se muestra la autofluorescencia de color anaranjado, el anticuerpo secundario en azul y ADA en rojo.

8.2. Inhibición de actividad enzimática de ADA en líneas celulares de CaCu mediante pentostatina.

Se ha reportado que la pentostatina es utilizada en el tratamiento contra leucemias de células pilosas con un efecto favorable debido al efecto sobre la inhibición de ADA (Kurzrock R, 2000; Lathia C, *et.al.*, 2002; Tonin *et. al.*, 2012; VANEDECUM, 2013) y teniendo en cuenta que las líneas celulares de CaCu expresan ésta enzima se procedió a examinar el efecto de la pentostatina sobre la actividad enzimática de ADA en estas líneas celulares. Para ello se analizaron los sobrenadantes recolectados a diferentes horas (0, 2, 4 y 6 horas) de las células que se incubaron en presencia de 5 mM de Ado y en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de pentostatina (1, 10, 100, 1000 μ M). Los resultados mostraron que las líneas celulares de CaCu desaminaron la Ado y generaron Ino, esto se puede hacer evidente en las CCF realizadas

(Figura 6, A-C). En la línea celular C33A, a las 6 h (Figura 6D, Tabla 1), la concentración más alta de pentostatina (1000 μM) inhibió totalmente la actividad enzimática de ADA, con un 27.05% de inhibición mayor en comparación al control de EHNA y la concentración de 100 μM inhibió 97.29%, mientras que las concentraciones de 10 μM y 1 μM inhibieron parcialmente la actividad enzimática de ADA con valores de 57.13% y 21.73% respectivamente. En la línea celular CaSki, a las 6 h (Figura 6E, Tabla 2), todas las concentraciones de pentostatina inhibieron parcialmente en comparación al control, la concentración de 1000 μM en un 81.01%, 100 μM en un 53.25%, 10 μM en un 33.24%, y 1 μM en un 16.70%, resaltando que la inhibición de ADA es dosis dependiente de la concentración de pentostatina. En la línea celular HeLa, a las 6 h (Figura 6F, Tabla 3), la pentostatina inhibió parcialmente la actividad de ADA, obteniendo valores de inhibición de 76.36% con la concentración más alta de pentostatina hasta un 37.84% de inhibición de ADA con la concentración más baja de pentostatina utilizada en estos experimentos.

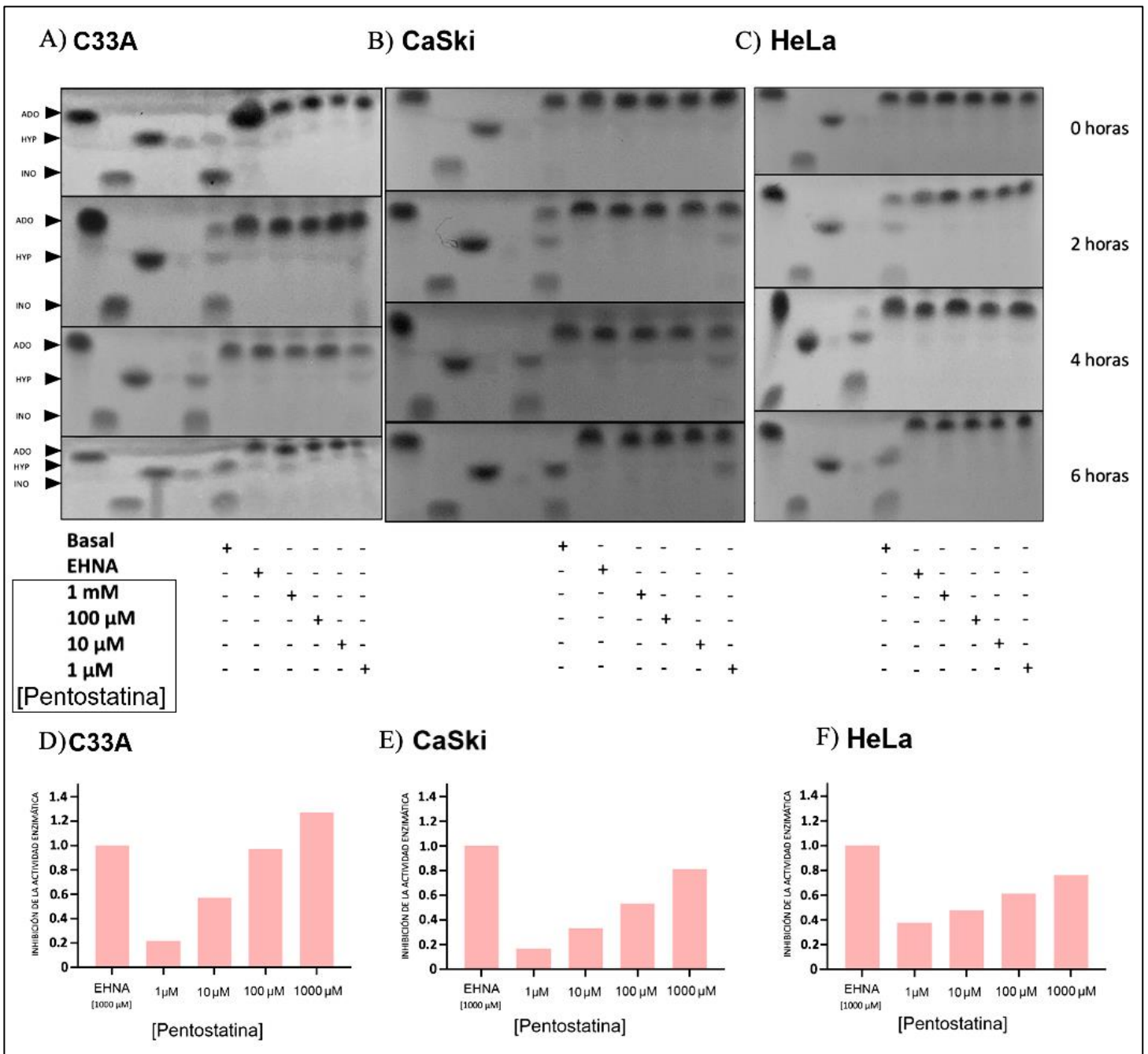


Figura 6. Inhibición de la actividad enzimática de ADA por pentostatina. Se cultivaron 1×10^6 células tumorales con Ado 5 mM y diferentes concentraciones de pentostatina (1, 10, 100, 1000 μ M) y EHNA 1000 μ M como control positivo de la inhibición enzimática de ADA. Mediante CCF se muestra la actividad enzimática de ADA al desaminar Ado a Ino a lo largo del tiempo (0 h, 2 h, 4 h y 6 h), las flechas negras indican los controles de los nucleótidos (Ado, Ino e Hipo) (A-C). En las gráficas de barras se muestra el análisis densitométrico de las diferentes CCF, tomando como referencia a ENHA con inhibición enzimática relativa de 1 (D-E), en el eje de las Y indica la inhibición de la actividad enzimática y en el eje de las X las diferentes concentraciones de pentostatina y EHNA.

Tabla 1. Datos densitométricos. Se muestran los resultados numéricos de la prueba de densitometría de la línea C33A a las 6 h. Para el porcentaje, todas las muestras de pentostatina comparadas EHNA.

C33A 6 h		
Reactivo	Cantidad	Expresión relativa de Ado
EHNA	1000 μ M	100
Pentostatina	1000 μ M	127.05
	100 μ M	97.29
	10 μ M	57.13
	1 μ M	21.73

Tabla 2. Datos densitométricos. Se muestran los resultados numéricos de la prueba de densitometría de la línea CaSki a las 6 h. Para el porcentaje, todas las muestras de pentostatina comparadas con EHNA.

CaSki 6 h		
Reactivo	Cantidad	Expresión relativa de Ado
EHNA	1000 μ M	100
Pentostatina	1000 μ M	81.01
	100 μ M	53.25
	10 μ M	33.24
	1 μ M	16.70

Tabla 3. Datos densitométricos. Se muestran los resultados numéricos de la prueba de densitometría de la línea HeLa a las 6 h. Para el porcentaje, todas las muestras de pentostatina son comparadas con EHNA.

HeLa 6 h		
Reactivo	Cantidad	Expresión relativa de Ado
EHNA	1000 μ M	100
Pentostatina	1000 μ M	76.36
	100 μ M	61.18
	10 μ M	47.52
	1 μ M	37.84

8.3. Análisis del efecto de la pentostatina en la viabilidad de las líneas celulares de CaCu.

Se ha reportado que la pentostatina es capaz de influir en la viabilidad de diferentes tipos de células como los linfocitos y monocitos en experimentos preclínicos (*in vitro* e *in vivo*) y clínicos (en combinación con otros fármacos) (Brox, *et. al.*, 1984; Carrera *et. al.*, 1989) e inducir a las células a apoptosis (Ogawa *et. al.*, 2000). Para analizar el efecto de la pentostatina sobre la viabilidad de las líneas celulares de CaCu se analizaron diferentes concentraciones de esta molécula y se midió viabilidad celular con CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay después de 48 h de cultivo. Los resultados obtenidos muestran que, en dos de las tres líneas probadas, en relación con la basal, la pentostatina redujo significativamente la viabilidad celular (Figura 7A, B); en la línea celular C33A la pentostatina a concentraciones de 500 μ M y 1000 μ M redujeron la viabilidad celular en un 24.37% y 28.87% respectivamente (Figura 7A), mientras que en la línea celular CaSki (Figura 7B), se redujo la viabilidad celular significativamente a las concentraciones de 15 μ M, 31 μ M y 1000 μ M, en un 32.43%, 36.73% y 46.45% respectivamente. De manera interesante y contrastante, en el caso de la línea celular HeLa, no se muestra una disminución en la viabilidad celular (Figura 7C), al contrario, lo que se muestra es un aumento en el porcentaje de viabilidad celular a las concentraciones de 500 μ M y 1000 μ M en un 23.32% y 21.32% respectivamente, lo que se puede traducir en un aumento en la proliferación, de acuerdo con el fundamento teórico de la metodología que se utilizó en este experimento.

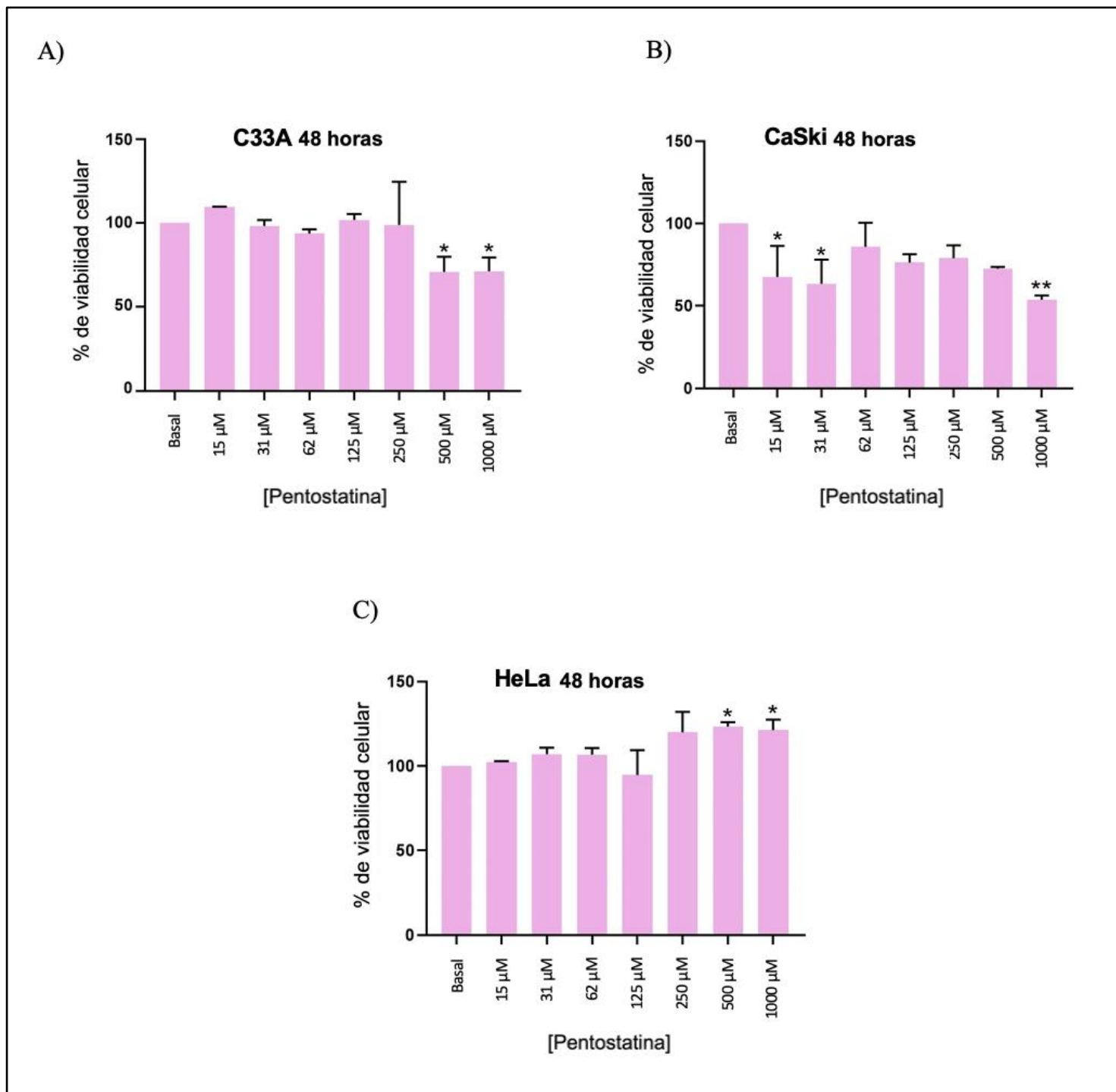


Figura 7: Efecto de la Pentostatina en la viabilidad de las líneas celulares de CaCu. Se muestran las gráficas de barras con \pm SEM correspondientes al porcentaje de viabilidad celular de cada una de las líneas de CaCu a diferentes concentraciones de pentostatina (15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 μ M) a las 48h. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

9. DISCUSIÓN

La enzima ADA es crucial en el metabolismo de las purinas con varias funciones en el organismo (Bagheri S, *et. al.*, 2019), aumentando su actividad en los tejidos cancerosos y de esta manera otorgando una ventaja selectiva a estas células para su sobrevivencia, protegiéndolas de las altas concentraciones de Ado que se pueden generar en el TME (Donorio J, *et. al.*, 1978; Monroy-Mora A, *et. al.*, 2022) mediante la desaminación de la Ado (Pedersen T, *et. al.*, 2004). Se sabe que la Ado es un producto de la hidrólisis de AMP por la ectoenzima CD73, la cual ha sido asociada con la progresión tumoral mediante la evasión del sistema inmune (Haskó G, *et. al.*, 2004; Semeniaro V, *et. al.*, 2009; Bagheri, *et.al.*, 2019). La Ado a través de la interacción con sus receptores promueve un TME inmunotolerante y regulando la proliferación, la apoptosis de las células del sistema inmune y promoviendo la metastasis en las células tumorales (Sun, *et. al.*, 2022). Además, se sabe que la Ado puede tener una señalización independiente de los AR interactuando con AK (Boison D, 2013), esta última es activada por AMPK y por s-adenosilhomocisteína hidrolasa (Mato J, *et. al.*, 2008), la Ado es convertida a AMP por AK regulando a la alza la expresión de P53 y así induciendo a la apoptosis independiente de caspasas (Yang D, *et. al.*, 2010). O bien, que la Ado induce a apoptosis incrementando la síntesis de la proteína pro apoptótica Bax y activar la caspasa-3 (Shirali S, *et. al.*, 2013), o que la Ado induce el arresto del ciclo celular e induce la apoptosis mediante la estimulación de la ciclina D1/Cdk4 (Shirali S, *et. al.*, 2013). En nuestro grupo de trabajo se ha reportado que las células tumorales desaminan rápidamente la Ado e Ino (Ávila-Ibarra, 2011; Ávila-Ibarra, 2014) lo que nos indica una alta actividad enzimática de la ADA, además también se demostró que el hidrocloreuro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil) (EHNA), un inhibidor específico de ADA1, es capaz de reducir la actividad enzimática de ADA y disminuir la viabilidad de las células de CaCu, lo cual sugiere que esta puede tener una acción protectora ante el efecto citotóxico de la Ado (Monroy-Mora, *et. al.*, 2022). En el presente estudio se determinó y corroboró la expresión de ADA en tres líneas celulares de CaCu (C33A, CaSki y HeLa), y se analizó el efecto de la pentostatina, como inhibidor de la actividad enzimática de ADA y sobre la viabilidad de las células tumorales.

La presencia de ADA fue detectada de forma diferencial entre las líneas celulares de CaCu coincidiendo con lo reportado por Alberto Monroy-Mora en 2022. Los niveles mayores fueron detectados en C33A seguido por HeLa, en el caso de CaSki ésta presentó el menor contenido de ADA. De forma interesante se sabe que las líneas celulares de CaCu con VPH expresan mayor CD73 (Mora-García, *et. al.*, 2017).

Con base en los resultados obtenidos sería interesante estudiar si existe una correlación inversa entre la expresión de ADA y CD73.

Por otro lado, al administrar diferentes concentraciones de pentostatina a las células de CaCu se observó una inhibición de la actividad enzimática de ADA en las diferentes líneas celulares de CaCu. No obstante, únicamente la pentostatina pudo inhibir de igual manera o incluso mejor que EHNA en la línea C33A a concentraciones de 500 μM y 1000 μM , mientras que en las líneas celulares CaSki y HeLa solo inhibieron parcialmente la actividad enzimática de ADA. Sin embargo, cabe resaltar que el efecto de la inhibición enzimática de las diferentes líneas celulares fue dosis dependiente de la concentración de la pentostatina. En este sentido podemos sugerir utilizar una mayor concentración de pentostatina para la inhibición enzimática de ADA teniendo en cuenta que la dosis típica de pentostatina para el tratamiento de la LLC en adultos es de aproximadamente 4-6 mg/m^2 de superficie corporal.

Por otro lado, se observó que al tratar a las células de CaCu con pentostatina disminuyó la viabilidad de éstas. En las líneas celulares C33A y CaSki se observó una disminución significativa de la viabilidad a las 48 h. En este sentido, con base en nuestros resultados podemos proponer que en la línea C33A está relacionada la inhibición de la actividad enzimática de ADA con la disminución de la viabilidad celular; y aunque la línea celular CaSki solo mostró una inhibición de la actividad en la actividad enzimática de ADA en un 81% en presencia de 1000 μM de pentostatina, esta dosis fue suficiente para disminuir significativamente su viabilidad. Sin embargo, de manera interesante y contrastante, en HeLa se observó que no se ve afectada la viabilidad celular a pesar de que se observó una inhibición parcial de la actividad enzimática; estos resultados pueden sugerir que, posiblemente de manera particular la línea celular HeLa pudiera tener activos diferentes mecanismos que le permitan sobrevivir independiente al mecanismo de protección propuesto mediante ADA.

En resumen, en este trabajo se observó que la pentostatina es un inhibidor de la actividad enzimática de ADA y que además esta molécula tiene efectos significativos sobre la viabilidad celular; sin embargo en este estudio no se demostró cuál es la vía que la llevaría a estas células a la disminución en su viabilidad, pero sabemos la Ado interactúa con la AK, y ésta es activada por AMP y la s-adenilhomocisteína hidrolasa en la cara interna de las células, en donde la Ado es convertida a AMP por la AK regula al alza la expresión

de p53 para inducir la apoptosis independiente de caspasas (da Silva, *et. al.*, 2006; Mato J, *et. al.*, 2008; Yang D, *et. al.*, 2010; Boison D, 2013).

Por último, es muy importante señalar que, se sabe que un efecto farmacológico está determinado en parte por la duración de tiempo que el complejo fármaco-receptor persiste, es decir, su tiempo de residencia. El tiempo de vida del complejo fármaco-receptor está afectado por varios procesos dinámicos (cambios en la conformación) que controlan la velocidad de asociación y de disociación de los fármacos del blanco terapéutico, un mayor tiempo de residencia corresponde a un efecto farmacológico prolongado y viceversa. También, se sabe que un tiempo de residencia larga puede ser una desventaja potencial cuando se prolonga la toxicidad de un fármaco. Para algunos receptores, la ocupación transitoria por los fármacos produce el efecto deseado, mientras que la ocupación prolongada puede provocar toxicidad (Major *et. al.*, 1981). En este enfoque, la EHNA al ser un inhibidor irreversible puede ocasionar problemas en el organismo y causar estados similares al SCID (inmunodeficiencia severa combinada), un trastorno hereditario que afecta al sistema inmune por deficiencia de la enzima ADA causando vulnerabilidad a las infecciones repetidas y persistentes causadas por microorganismos oportunistas como bacterias, virus y hongos pudiendo llegar a la muerte. Por otro lado, la pentostatina al ser un inhibidor reversible se puede controlar la administración del fármaco y así su duración produciendo el efecto deseado y disminuyendo los eventos adversos serios a los pacientes.

A través del reposicionamiento de fármacos el uso de la pentostatina para inhibir ADA representa un avance significativo en el tratamiento de la LLC y otras enfermedades relacionadas con la proliferación celular. A medida que avanzamos en nuestra comprensión de este enfoque terapéutico, se abren nuevas oportunidades para mejorar la eficacia y la seguridad de estos tratamientos, lo que beneficia directamente a los pacientes y a la medicina en general. Además de que el reposicionamiento de fármacos ofrece una gran ventaja a la industria farmacéutica y a las organizaciones públicas sobre la salud ya que ofrece mayor rendimiento en tiempo y costos en su investigación, producción y utilización del producto.

10. CONCLUSIÓN

En este estudio se analizó el efecto de la pentostatina sobre la actividad enzimática de ADA en líneas celulares de CaCu (C33A, CaSki, HeLa), encontrando que ésta puede ser inhibida de manera dosis dependiente por el fármaco, además de que la pentostatina tiene un efecto significativo sobre la disminución en la viabilidad celular. Este hallazgo sugiere el potencial de la pentostatina como una herramienta terapéutica en el contexto del CaCu y posiblemente en otras condiciones médicas donde la regulación de ADA sea relevante.

11. PERSPECTIVAS

- Analizar si el bloqueo de ADA con la pentostatina es capaz de inhibir la resistencia a la muerte celular mediado por la Ado en las líneas celulares de CaCu.
- Analizar la presencia y actividad de otras enzimas que puedan desaminar a la Ado en células de CaCu.
- Esclarecer la vía mediante la cual la pentostatina induce una disminución en la viabilidad de las células de CaCu.

12. REFERENCIAS

1. Aldinucci, D., Poletto, D., Zagonel, V., Rupolo, M., Degan, M., Nanni, P., Gattei, V., & Pinto, A. (2000). In vitro and in vivo effects of 2'-deoxycoformycin (Pentostatin) on tumour cells from human gammadelta+ T-cell malignancies. *British journal of haematology*, *110*(1), 188–196. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1046/j.1365-2141.2000.02129.x>
2. 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>
3. Alvarez, C. L., Troncoso, M. F., & Espelt, M. V. (2022). Extracellular ATP and adenosine in tumor microenvironment: Roles in epithelial-mesenchymal transition, cell migration, and invasion. *Journal of cellular physiology*, *237*(1), 389–400. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/jcp.30580>
4. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature reviews. Cancer*, *13*(12), 842–857. <https://doi.org/10.1038/nrc3613>
5. Antonioli, L., Haskó, G., Fornai, M., Colucci, R., & Blandizzi, C. (2014). Adenosine pathway and cancer: where do we go from here?. *Expert opinion on therapeutic targets*, *18*(9), 973–977. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1517/14728222.2014.925883>
6. Antonioli, L., Yegutkin, G. G., Pacher, P., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2016). Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in cancer*, *2*(2), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.01.003>.

7. Bagheri, S., Saboury, A. A., & Haertlé, T. (2019). Adenosine deaminase inhibition. *International journal of biological macromolecules*, *141*, 1246–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.078>.
8. Bahreyni, A., Samani, S. S., Ghorbani, E., Rahmani, F., Khayami, R., Toroghian, Y., Behnam-Rassouli, R., Khazaei, M., Ryzhikov, M., Parizadeh, M. R., Hasanzadeh, M., Avan, A., & Hassanian, S. M. (2018). Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. *Journal of cellular physiology*, *233*(4), 2715–2722. <https://doi.org/10.1002/jcp.26056>
9. Bahreyni, A., Samani, S. S., Ghorbani, E., Rahmani, F., Khayami, R., Toroghian, Y., Behnam-Rassouli, R., Khazaei, M., Ryzhikov, M., Parizadeh, M. R., Hasanzadeh, M., Avan, A., & Hassanian, S. M. (2018). Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. *Journal of cellular physiology*, *233*(4), 2715–2722. <https://doi.org/10.1002/jcp.26056>
10. Battisti, V., Maders, L. D., Bagatini, M. D., Battisti, I. E., Bellé, L. P., Santos, K. F., Maldonado, P. A., Thomé, G. R., Schetinger, M. R., & Morsch, V. M. (2013). Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *67*(3), 203–208. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.biopha.2012.12.004>
11. Boison D. (2013). Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacological reviews*, *65*(3), 906–943. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006361>
12. Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer cell*, *36*(6), 582–596. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.007>
13. Brox, L., Hunting, D., & Belch, A. (1984). Aphidicolin and deoxycofomycin cause DNA breaks and cell death in unstimulated human lymphocytes. *Biochemical and biophysical research*

communications, 120(3), 959–963. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/s0006-291x\(84\)80200-4](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/s0006-291x(84)80200-4)

14. Bouma, M. G., Stad, R. K., van den Wildenberg, F. A., & Buurman, W. A. (1994). Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 153(9), 4159–4168.
15. Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics*, 112(2), 358–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>
16. 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>.
17. Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acceso el 12 de febrero de 2024.
18. Carrera, C. J., Yamanaka, H., Piro, L. D., Lotz, M., & Carson, D. A. (1989). Profound toxicity of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toward human monocytes in vitro and in vivo. *Advances in experimental medicine and biology*, 253B, 219–225. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-4684-5676-9_33
19. Cortés, A., Gracia, E., Moreno, E., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E. I., & Casadó, V. (2015). Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Medicinal research reviews*, 35(1), 85–125. <https://doi.org/10.1002/med.21324>.
20. Cunha R. A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry international*, 38(2), 107–125. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00034-6](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00034-6)

21. da Silva, C. G., Jarzyna, R., Specht, A., & Kaczmarek, E. (2006). Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circulation research*, 98(5), e39–e47. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000215436.92414.1d>
22. De Mendonça, A., & Ribeiro, J. A. (2001). Adenosine and synaptic plasticity. *Drug development research*, 52(1-2), 283-290.
23. Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., & Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 18(10), 601–618. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>
24. Donofrio, J., Coleman, M. S., Hutton, J. J., Daoud, A., Lampkin, B., & Dyminski, J. (1978). Overproduction of adenine deoxynucleosides and deoxynucleotides in adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency disease. *The Journal of clinical investigation*, 62(4), 884–887. <https://doi.org/10.1172/JCI109201>
25. Doorbar, J., & Griffin, H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)*, 7, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.005>.
26. Ferreira, J. M., & Paes-de-Carvalho, R. (2001). Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain research*, 900(2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02279-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02279-x)
27. Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Ådén, U., & Svenningsson, P. (2001). Adenosine receptor signaling in vitro and in vivo. *Drug Development Research*, 52(1–2), 274–282. <https://doi.org/10.1002/DDR.1124>
28. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, 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>

29. García-Rocha, R., Monroy-García, A., Carrera-Martínez, M., Hernández-Montes, J., Don-López, C. A., Weiss-Steider, B., Monroy-Mora, K. A., Ponce-Chavero, M. L. Á., Montesinos-Montesinos, J. J., Escobar-Sánchez, M. L., Castillo, G. M., Chacón-Salinas, R., Vallejo-Castillo, L., Pérez-Tapia, S. M., & Mora-García, M. L. (2022). Evidence that cervical cancer cells cultured as tumorspheres maintain high CD73 expression and increase their protumor characteristics through TGF- β production. *Cell biochemistry and function*, 40(7), 760–772. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/cbf.3742>
30. García-Rocha, R., Monroy-García, A., Hernández-Montes, J., Weiss-Steider, B., Gutiérrez-Serrano, V., Del Carmen Fuentes-Castañeda, M., Ávila-Ibarra, L. R., Don-López, C. A., Torres-Pineda, D. B., & de Lourdes Mora-García, M. (2019). Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine*, 118, 71–79. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cyto.2018.09.018>
31. Giuliani, A. L., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2019). Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunology letters*, 205, 16–24. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.imlet.2018.11.006>
32. Griffin, N. I., Sharma, G., Zhao, X., Mirza, S., Srivastava, S., Dave, B. J., Aleskandarany, M., Rakha, E., Mohibi, S., Band, H., & Band, V. (2016). ADA3 regulates normal and tumor mammary epithelial cell proliferation through c-MYC. *Breast cancer research : BCR*, 18(1), 113. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s13058-016-0770-9>
33. Hajizadeh, F., Masjedi, A., Heydarzede Asl, S., Karoon Kiani, F., Peydaveisi, M., Ghalamfarsa, G., Jadidi-Niaragh, F., & Sevbitov, A. (2020). Adenosine and adenosine receptors in colorectal cancer. *International immunopharmacology*, 87, 106853. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.intimp.2020.106853>

34. Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
35. Haskó, G., & Cronstein, B. N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunology*, 25(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.11.003>
36. Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(9), 759–770. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>
37. Haskó, G., & Pacher, P. (2008). A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of leukocyte biology*, 83(3), 447–455. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607359>
38. Higman, M., Vogelsang, G. B., & Chen, A. (2004). Pentostatin - pharmacology, immunology, and clinical effects in graft-versus-host disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(12), 2605–2613. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.12.2605>
39. Jacobsohn, D. A., Gilman, A. L., Rademaker, A., Browning, B., Grimley, M., Lehmann, L., Nemecek, E. R., Thormann, K., Schultz, K. R., & Vogelsang, G. B. (2009). Evaluation of pentostatin in corticosteroid-refractory chronic graft-versus-host disease in children: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Blood*, 114(20), 4354–4360. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224840>
40. Jin, K., Mao, C., Chen, L., Wang, L., Liu, Y., & Yuan, J. (2021). Adenosinergic Pathway: A Hope in the Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers*, 13(2), 229. <https://doi.org/10.3390/cancers13020229>
41. Junger W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature reviews. Immunology*, 11(3), 201–212. <https://doi.org/10.1038/nri2938>

42. Kane, B. J., Kuhn, J. G., & Roush, M. K. (1992). Pentostatin: an adenosine deaminase inhibitor for the treatment of hairy cell leukemia. *The Annals of pharmacotherapy*, 26(7-8), 939–947. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1177/106002809202600718>
43. Kazemi, M. H., Raofi Mohseni, S., Hojjat-Farsangi, M., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Mohammadi, H., & Jadidi-Niaragh, F. (2018). Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2032–2057. <https://doi.org/10.1002/jcp.25873>
44. Khakh, B. S., & Burnstock, G. (2009). The double life of ATP. *Scientific American*, 301(6), 84–92. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1209-84>
45. Kobayashi, A., Weinberg, V., Darragh, T., & Smith-McCune, K. (2008). Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal immunology*, 1(5), 412–420. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.33>
46. Kurzrock R. (2000). Pentostatin (Nipent) in T-cell lymphomas. *Seminars in oncology*, 27(2 Suppl 5), 64–66.
47. Lathia, C., Fleming, G. F., Meyer, M., Ratain, M. J., & Whitfield, L. (2002). Pentostatin pharmacokinetics and dosing recommendations in patients with mild renal impairment. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 50(2), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0468-9>
48. Lee, J. S., & Yilmaz, Ö. (2018). Unfolding Role of a Danger Molecule Adenosine Signaling in Modulation of Microbial Infection and Host Cell Response. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 199. <https://doi.org/10.3390/ijms19010199>
49. Leone, R. D., & Emens, L. A. (2018). Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 6(1), 57. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s40425-018-0360-8>

50. Li, J.m, Fenton, R. A., Wheeler, H. B., Powell, C. C., Peyton, B. D., Cutler, B. S., & Dobson, J. G., Jr (1998). Adenosine A2a receptors increase arterial endothelial cell nitric oxide. *The Journal of surgical research*, 80(2), 357–364. <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5439>
51. Major PP, Agarwal RP, Kufe DW. Clinical pharmacology of deoxycytosine. *Blood*. 1981 Jul;58(1):91-6. PMID: 6263381.
52. Mandapathil, M., Boduc, M., Roessler, M., Güldner, C., Walliczek-Dworschak, U., & Mandic, R. (2018). Ectonucleotidase CD39 expression in regional metastases in head and neck cancer. *Acta oto-laryngologica*, 138(4), 428–432. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/00016489.2017.1405278>
53. Mato, J. M., Martínez-Chantar, M. L., & Lu, S. C. (2008). Methionine metabolism and liver disease. *Annual review of nutrition*, 28, 273–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155438>
54. Mayo Clinic (2023). Cáncer de cuello uterino - Diagnóstico y tratamiento. Mayo Clinic <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/cervical-cancer/diagnosis-treatment/drc-20352506>. Acceso el 27 de septiembre de 2023.
55. Mazziotta, C., Rotondo, J. C., Lanzillotti, C., Campione, G., Martini, F., & Tognon, M. (2022). Cancer biology and molecular genetics of A₃ adenosine receptor. *Oncogene*, 41(3), 301–308. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/s41388-021-02090-z>
56. Monroy-Mora, A., de Lourdes Mora-García, M., Alheli Monroy Mora, K., Hernández-Montes, J., García-Rocha, R., Don-López, C. A., Weiss-Steider, B., Montesinos-Montesinos, J. J., & Monroy-García, A. (2022). Inhibition of adenosine deaminase activity reverses resistance to the cytotoxic effect of high adenosine levels in cervical cancer cells. *Cytokine*, 158, 155977. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155977>.

57. Monroy Mora, K. A. (2020). Efecto de simvastatina sobre la expresión de adenosina desaminasa en células tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. TESIUNAM.
58. Mora-García, M. L., Ávila-Ibarra, L. R., García-Rocha, R., Weiss-Steider, B., Hernández-Montes, J., Don-López, C. A., Gutiérrez-Serrano, V., Titla-Vilchis, I. J., Fuentes-Castañeda, M. C., Monroy-Mora, A., Jave-Suárez, L. F., Chacón-Salinas, R., Vallejo-Castillo, L., Pérez-Tapia, S. M., & Monroy-García, A. (2017). Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular immunology*, *320*, 46–55. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cellimm.2017.09.002>
59. Moscicki, A. B., Shiboski, S., Hills, N. K., Powell, K. J., Jay, N., Hanson, E. N., Miller, S., Canjura-Clayton, K. L., Farhat, S., Broering, J. M., & Darragh, T. M. (2004). Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet (London, England)*, *364*(9446), 1678–1683. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17354-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17354-6)
60. Montserrat, E., Moreno, C., Esteve, J., Urbano-Ispizua, A., Giné, E., & Bosch, F. (2006). How I treat refractory CLL. *Blood*, *107*(4), 1276–1283. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0819>
61. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/>. Acceso el 27 de septiembre de 2023.
62. Ogawa, K., Shichishima, T., Nakamura, N., & Maruyama, Y. (2000). Induction of apoptosis in vivo and in vitro in hairy cell leukemia treated by deoxycoformycin. *The Tohoku journal of experimental medicine*, *192*(1), 87–98. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1620/tjem.192.87>
63. Pedersen, T. R., & Tobert, J. A. (2004). Simvastatin: a review. *Expert opinion on pharmacotherapy*, *5*(12), 2583–2596. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1517/14656566.5.12.2583>
64. Pérez-Aguilar, M. C., Goncalves, L., Ibarra, A., & Bonfante-Cabarcas, R. (2010). Adenosin deaminasa como molécula coestimuladora y marcador de inmunidad celular [Adenosine

- deaminase as costimulatory molecule and marker of cellular immunity]. *Investigacion clinica*, 51(4), 561–571.
65. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acceso el 27 de septiembre de 2023.
66. Resta, R., Yamashita, Y., & Thompson, L. F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunological Reviews*, 161, 95–109. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.1998.TB01574.X>
67. Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, 2(2), 409–430. <https://doi.org/10.1007/S11302-006-9003-5>
68. Robson, S. C., Wu, Y., Sun, X., Knosalla, C., Dwyer, K., & Enjyoji, K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(2), 217–233. <https://doi.org/10.1055/S-2005-869527>
69. Rojas-Espinosa, Ó. (2017). *Inmunología (de memoria)*. Ed. Médica Panamericana.
70. Sánchez-Mercader, A., Cámara-Salazar, A., Traconis-Díaz, V., & Sánchez-Buenfil, G. (2021). Análisis de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México y el estado de Yucatán | Revista de Ginecología y Obstetricia de México. *Gineol Obstet Mex*, 89(9), 671–677.
71. Sauter, C., Lamanna, N., & Weiss, M. A. (2008). Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(9), 1217–1222. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.9.1217>
72. Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2000). Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends in pharmacological sciences*, 21(9), 341–346. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01517-0](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01517-0)

73. Seminario-Vidal, L., Lazarowski, E. R., & Okada, S. F. (2009). Assessment of extracellular ATP concentrations. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *574*, 25–36. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-321-3_3
74. Sharma, S., Kalra, H., & Akundi, R. S. (2021). Extracellular ATP Mediates Cancer Cell Migration and Invasion Through Increased Expression of Cyclooxygenase 2. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 617211. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fphar.2020.617211>
75. Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International journal of molecular sciences*, *15*(2), 2024–2052. <https://doi.org/10.3390/ijms15022024>
76. Shirali, S., Aghaei, M., Shabani, M., Fathi, M., Sohrabi, M., & Moeinifard, M. (2013). Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tumor biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *34*(2), 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0650-1>
77. Soleimani, A., Bahreyni, A., Roshan, M. K., Soltani, A., Ryzhikov, M., Shafiee, M., Soukhtanloo, M., Jaafari, M. R., Mashkani, B., & Hassanian, S. M. (2019). Therapeutic potency of pharmacological adenosine receptors agonist/antagonist on cancer cell apoptosis in tumor microenvironment, current status, and perspectives. *Journal of cellular physiology*, *234*(3), 2329–2336. <https://doi.org/10.1002/jcp.27249>
78. Soleimani, A., Taghizadeh, E., Shahsavari, S., Amini, Y., Rashidpour, H., Azadian, E., Jafari, A., Parizadeh, M. R., Mashayekhi, K., Soukhtanloo, M., & Jaafari, M. R. (2019). CD73; a key ectonucleotidase in the development of breast cancer: Recent advances and perspectives. *Journal of cellular physiology*, *234*(9), 14622–14632. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/jcp.28187>
79. Spychala J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & therapeutics*, *87*(2-3), 161–173. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(00\)00053-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(00)00053-x)

80. Sun, C., Wang, B., & Hao, S. (2022). Vía del receptor de adenosina-A2A en la inmunoterapia contra el cáncer. *Fronteras en inmunología*, 13, 837230. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2022.837230>
81. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3322/caac.21660>
82. Trautmann A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Science signaling*, 2(56), pe6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6>
83. Tsuchiya, A., & Nishizaki, T. (2015). Anticancer effect of adenosine on gastric cancer via diverse signaling pathways. *World journal of gastroenterology*, 21(39), 10931–10935. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.10931>
84. Van der Graaf, P. H., Van Schaick, E. A., Visser, S. A., De Greef, H. J., Ijzerman, A. P., & Danhof, M. (1999). Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antilipolytic effects of adenosine A (1) receptor agonists in rats: prediction of tissue-dependent efficacy in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 290(2), 702–709.
85. Vaupel, P., & Mayer, A. (2016). Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression. *Advances in experimental medicine and biology*, 876, 177–183. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_22.
86. Vincent T De Vita Jr. (2020). *Cáncer, Principios y práctica de oncología 10 edición, Tomo 1 y 2.* (2017). <https://ebooks.amolca.com/reader/cancera-1614018573?location=44>
87. Vultaggio-Poma, V., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2020). Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells*, 9(11), 2496. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/cells9112496>

88. Wei, Q., Zhang, L., Zhao, N., Cheng, Z., Xin, H., & Ding, J. (2022). Immunosuppressive adenosine-targeted biomaterials for emerging cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, *13*, 1012927. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1012927>
89. Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, *7*(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>.
90. Wu, P., Wan, D., Xu, G., Wang, G., Ma, H., Wang, T., Gao, Y., Qi, J., Chen, X., Zhu, J., Li, Y. Q., Deng, Z., & Chen, W. (2017). An Unusual Protector-Protégé Strategy for the Biosynthesis of Purine Nucleoside Antibiotics. *Cell chemical biology*, *24*(2), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.012>.
91. Xia, B., & Wang, J. (2019). Effects Of Adenosine on Apoptosis of Ovarian Cancer A2780 Cells Via ROS and Caspase Pathways. *OncoTargets and therapy*, *12*, 9473–9480. <https://doi.org/10.2147/OTT.S216620>
92. Yang, J. C., & Cortopassi, G. A. (1998). dATP causes specific release of cytochrome C from mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, *250*(2), 454–457. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9333>
93. Yang, D., Yaguchi, T., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2010). Adenosine-induced caspase-3 activation by tuning Bcl-XL/DIABLO/IAP expression in HuH-7 human hepatoma cells. *Cell biology and toxicology*, *26*(4), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9145-7>
94. 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), 71–78. <https://doi.org/10.1159/000325207>

95. Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 246(16), 1791–1801. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1177/15353702211005390>
96. 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), 51–57. <https://doi.org/10.1042/BJ20050683>
97. Zervou, M. I., Goulielmos, G. N., Matalliotakis, M., Matalliotaki, C., Spandidos, D. A., & Eliopoulos, E. (2020). Role of adenosine deaminase 2 gene variants in pediatric deficiency of adenosine deaminase 2: A structural biological approach. *Molecular medicine reports*, 21(2), 876–882. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3892/mmr.2019.10862>

13. ÍNDICE DE FIGURAS

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

Figura 2. Incidencia de cáncer en México durante 2020, en mujeres de todas las edades.

Figura 3. Vía adenosinérgica.

Figura 4. Vías para la liberación regulada de nucleótidos.

Figura 5. Expresión de ADA en las líneas celulares de CaCu.

Figura 6. Indibición de la actividad enzimática de ADA por pentostatina.

Figura 7. Efecto de la Pentostatina en la viabilidad de las líneas celulares de CaCu.

14. GLOSARIO

ADA: Adenosina Desaminasa

Ado: Adenosina

ADP: Adenosín Difosfato

AMP: Adenosín Monofosfato

ATP: Adenosín Trifosfato

CaCu: Cáncer cervicouterino

dCF: deoxyconformicina // pentostatina

ER: receptor de Estrógeno

HPV: Virus del Papiloma Humano

HPV-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

TME: Microambiente Tumoral