



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.**  
**Laboratorio de Inmunobiología.**

*“Efecto de simvastatina sobre la expresión de adenosina desaminasa en células tumorales de cáncer cérvico-uterino”.*

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**KATIA ALHELÍ MONROY MORA**

**Director de Tesis: Dr. Jorge Hernández Montes**

**Asesor Interno: Dra. Christian Azucena Don López**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA

DIRECCIÓN

Oficio de Fecha de Examen



**QFB. GRACIELA ROJAS VAZQUEZ**  
**JEFE DE LA UNIDAD DE**  
**ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**

**P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno MONROY MORA KATIA ALHELÍ con número de cuenta 312299398 de la carrera de BIOLOGÍA se le ha fijado el día 23 del mes de SEPTIEMBRE de 2020 a las 11:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales de Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. BENNY WEISS STEIDER	
VOCAL	Dr. JORGE HERNÁNDEZ MONTES	<u>Jorge Hernández H.</u>
SECRETARIO	Dra. CHRISTIAN AZUCENA DON LÓPEZ	
SUPLENTE	M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA	
SUPLENTE	Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA	<u>Alvarez Barrera Lucila</u>

Presenta la Tesis: "Efecto de simvastatina sobre la expresión de adenosina desaminasa en células tumorales de cáncer cérvico-uterino"

Opción de Titulación: Tesis

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad de México a 09 de septiembre de 2020.

**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**  
**DIRECTOR**

Vo.Bo.

RECIBÍ:

M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES  
Jefa de la Carrera

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES  
Y DE GRADO

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y en el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS. Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, PAPIIT IN225519 y FIS/IMSS/PROT/PRIO/19/114.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

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

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

A mi comité de sinodales conformado por la Dra. Rosalva Rangel Corona, la Dra. Lucila Álvarez Barrera y al Dr. Benny Weiss Steider, por sus atinadas observaciones en el presente trabajo y las atenciones recibidas de su parte.

A mis compañeros de laboratorio: Ángeles Ponce, Gabriela Molina, Adriana Medina, Monserrat Carrera, Rosario García, David Toledo, Alejandro Gamboa por compartir conmigo su conocimiento, consejos, brindarme su amistad y gran ayuda, así como muchos buenos momentos durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Ricardo Muñoz por la gran ayuda y retroalimentación a mi proyecto, por enseñarme cosas nuevas y sobre todo por las risas inevitables en la realización del WB. Cotorrea.

Al Sr. José Guadalupe Lima y al Sr. Enrique por su valioso apoyo día con día en el laboratorio.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Lourdes y Alberto, gracias por la infinidad de lecciones que me han dado, por ser un ejemplo de superación, esfuerzo, perseverancia y solidaridad. Por su enorme amor, comprensión y apoyo incondicional. Por introducirme en el mundo de la biología.

A mi hermano Beto, por hacer mi vida más divertida e interesante y sobre todo porque siempre has estado ahí ayudándome y apoyándome cuando lo he necesitado.

A mi abuelita Julia, por todo el cariño y apoyo que me has dado. Por ser el pilar de la familia y siempre procurar por todos nosotros.

A Melissa por tu incondicional apoyo, por ser la mejor amiga y hermana que siempre quise tener, por todos los buenos momentos que hemos pasado desde pequeñas.

A mi tía Eloísa por todo el cariño que me demuestras con tus sabios consejos, el gran ejemplo de fortaleza e infinita ayuda que siempre me has brindado.

A toda mi familia, incluyendo a mis mascotas: Yopi, Lizzy, Tuti, Bicho y Waltercito, que me han hecho pasar infinidad de alegrías.

A mis amigos y compañeros de la facultad: Diana Ortiz, Oswaldo Corona y Alejandro Ninguno, por todas las risas, pláticas padres y bonitas postales, por construir conmigo momentos inolvidables que tendré en la memoria de la universidad, pueden contar conmigo siempre.

*"La curiosidad y el afán de resolver dilemas  
constituyen el sello distintivo de nuestra especie."*

Carl Sagan

## Índice

1.	GLOSARIO.....	8
2.	RESUMEN .....	10
3.	MARCO TEÓRICO.....	12
3.1	Cáncer .....	12
3.2	Incidencia y mortalidad del cáncer cérvico-uterino (CaCU).....	13
3.3	Cáncer cérvico-uterino: desarrollo de la neoplasia cervical .....	13
3.4	La vía adenosinérgica en la supresión de la respuesta inmune antitumoral .....	16
3.5	Adenosina desaminasa: Una enzima crítica en el metabolismo de las purinas .....	18
3.6	La inhibición de la adenosina desaminasa como una estrategia de tratamiento eficaz para diversas enfermedades .....	22
3.7	Las estatinas y su potencial como agentes terapéuticos en el cáncer .....	24
4.	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
5.	HIPÓTESIS.....	27
6.	OBJETIVOS.....	28
6.1	Objetivo general .....	28
6.2	Objetivos particulares .....	28
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
7.1	Cultivo celular.....	29
7.2	Preparación de Simvastatina .....	29
7.3	Efecto de simvastatina en la proliferación de células de CaCU: determinación de la IC <sub>50</sub> de simvastatina .....	29
7.4	Efecto de simvastatina sobre la actividad funcional de ADA en células tumorales de CaCU 30	
7.5	Efecto de simvastatina sobre la expresión de ADA en líneas celulares de CaCU .....	31
7.6	Efecto de simvastatina sobre la actividad de ADA en sobrenadantes de células tumorales de CaCU.....	33
7.7	Detección de ADA en plasmas de pacientes con diferentes etapas de CaCU .....	33
7.8	Efecto de simvastatina sobre la actividad de ADA en plasmas de pacientes con diferentes estadíos de CaCU.....	35
7.9	Análisis estadístico .....	36
8.	RESULTADOS .....	37
8.1	Simvastatina disminuyó la viabilidad de células tumorales de CaCU.....	37



8.2	Simvastatina disminuyó parcialmente la actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCU.....	39
8.3	Simvastatina disminuyó parcialmente la expresión de ARNm de ADA en células tumorales de CaCU positivas para HPV 16 y 18.....	41
8.4	Simvastatina no disminuyó la actividad enzimática de ADA presente en sobrenadantes de células tumorales de CaCU .....	42
8.5	Detección de alto contenido de la isoforma de ADA2 en plasmas de pacientes con CaCU 43	
8.6	Simvastatina no tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de sADA presente en plasmas de los diferentes estadios de CaCU .....	45
9.	DISCUSIÓN.....	46
10.	CONCLUSIONES .....	51
11.	PERSPECTIVAS DE ESTUDIO .....	52
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	53
13.	APÉNDICE.....	61

## 1. GLOSARIO

**AC:** Adenil ciclasa.

**ADA:** Adenosina desaminasa.

**ADA1:** Adenosina desaminasa-1.

**ADA1cp:** Complejo entre dos subunidades ADA1 y CD26.

**ADA2:** Adenosina desaminasa-2.

**ADA3:** Adenosina desaminasa-3.

**ADAL:** Familia de proteínas similares a ADA.

**ADGF:** Factor de crecimiento de ADA

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ADO:** Adenosina.

**ADP:** Difosfato de adenosina.

**AK:** Adenosina quinasa.

**AMP:** Monofosfato de adenosina.

**AMPK:** Proteína cinasa activada por AMP.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.

**ARs:** Receptores de adenosina.

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**CaCU:** Cáncer cérvico-uterino.

**cAMP:** AMP cíclico; 3`5`-cAMP.

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

**CD26:** Dipeptidil peptidasa-IV

**CD39:** Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1; E-NTPDasa1

**CD73:** Ecto-5`-nucleotidasa; Ecto 5`NTasa

**CF:** Coformicina natural.

**DEPC:** Dietil-pirocarbonato.

**DFC:** 2`desoxicoformicina (pentostatina).

**EHNA:** Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil)

**ENTs:** Transportadores de nucleósidos equilibradores.

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

**FPP:** Farnesil pirofosfato.

**GGPP:** Gerangeranil pirofosfato.

**HCL:** Leucemia de células pilosas.

**HPV:** Virus de papiloma humano

**HR-HPV:** Virus de papiloma humano de alto riesgo.

**HYP:** Hipoxantina.

**iCD73:** 5`nucleotidasa intracelular.

**INO:** Inosina.

**iTreg:** Linfocitos T reguladores inducibles.

**Ki:** Constante de disociación.

**LIAG:** Lesiones intraepiteliales de alto grado.

**LIEBG:** Lesiones intraepiteliales de bajo grado.

Monroy-Mora, K.A.

**MDSC:** Células supresoras de origen mieloide.

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa.

**PDE:** Fosfodiesterasas.

**PNP:** Enzima purina nucleósido fosforilasa.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**RT-PCR:** Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa.

**sADA:** Adenosina desaminasa forma soluble/citosólica.

**SCJ:** Unión escamosa cervical.

**TME:** Microambiente tumoral.

**Treg:** Linfocitos T reguladores.

## 2. RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es un problema importante de salud pública en México, siendo actualmente la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. La infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) se considera el principal agente etiológico del CaCU. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de factores inmunoreguladores pueden jugar un papel importante en la patofisiología de esta enfermedad. En este contexto, se ha reportado que el desarrollo de tumores ginecológicos está asociado con la producción de adenosina (ADO) en el microambiente tumoral (TME), la cual inhibe la respuesta inmune antitumoral y puede favorecer la proliferación, migración e invasión de las células tumorales. Por otra parte, se sabe que los niveles de ADO son regulados de manera importante por la actividad enzimática de la adenosina desaminasa (ADA) expresada en las células tumorales, la cual les puede otorgar una ventaja para sobrevivir ante altas concentraciones de ADO. Por lo cual, la búsqueda de fármacos que regulen la expresión y/o actividad de ADA puede ser de importancia terapéutica en esta enfermedad. En el presente estudio se analizó el efecto de simvastatina, sobre la expresión y actividad funcional de ADA y en la viabilidad de células tumorales de CaCU (C33A, CaSki y HeLa). Simvastatina inhibió la proliferación de las células tumorales de manera dependiente de la dosis. La concentración de simvastatina para inhibir en 50% la viabilidad ( $IC_{50}$ ) de las células C33A, CaSki y HeLa, fue de 375 $\mu$ M, 332 $\mu$ M y 46.5 $\mu$ M, respectivamente. Asimismo, se encontró que simvastatina disminuyó en 50% y 30% la expresión de ARNm de ADA en CaSki y HeLa, respectivamente, además de disminuir la actividad enzimática de ADA de manera parcial en las tres líneas celulares, empleando las respectivas  $IC_{50}$ . Sin embargo, simvastatina no inhibió la actividad de ADA soluble (sADA) contenida en sobrenadantes de las líneas celulares. Por otra parte, al analizar la presencia de ADA en plasmas de pacientes con diferentes etapas de la enfermedad (lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y cáncer cérvico-uterino (CaCU), así como de donadoras normales (Normal), se detectó la presencia de proteínas de aproximadamente 41kDa y 70kDa (correspondiente al peso molecular de ADA1) y de 114kDa (correspondiente

Monroy-Mora, K.A.

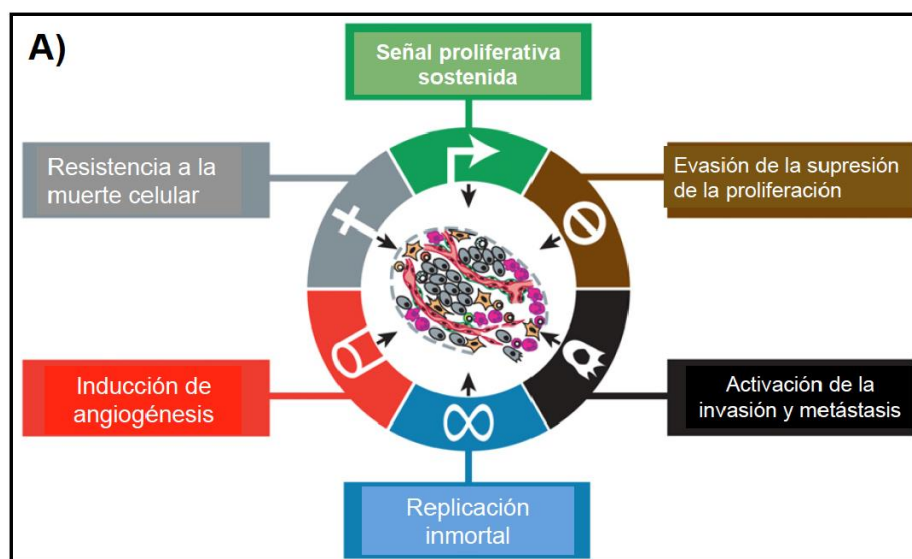
al peso molecular de ADA2). Curiosamente, los plasmas de pacientes con CaCU mostraron el mayor contenido de estas proteínas y mayor actividad enzimática para convertir ADO en inosina (INO) en relación a los plasmas de pacientes con etapas menos avanzadas de la enfermedad (Normal, LIEBG y LIEAG). Este es el primer estudio en el que se da evidencia de la actividad inhibitoria potencial de simvastatina sobre la expresión y actividad enzimática de ADA. No obstante, estudios posteriores serán requeridos para evaluar el papel de simvastatina en la inhibición de la producción de ADA durante el crecimiento tumoral y valorar su potencial terapéutico en esta enfermedad.

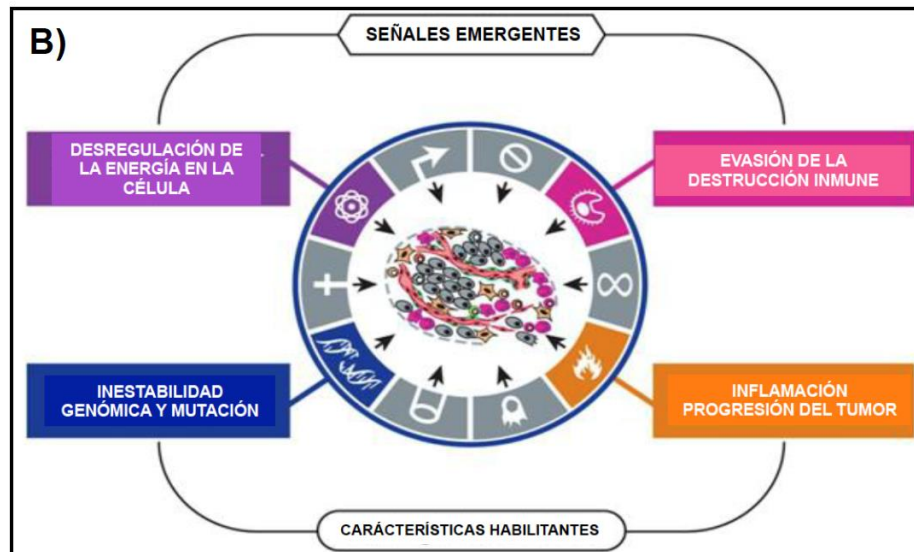
### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que involucran el crecimiento celular no regulado con el potencial de invadir y diseminarse a otros sitios del cuerpo. Estas células anormales dan lugar a clonas, que al proliferar pueden generar un tumor o neoplasia de tamaño considerable (Kindt *et al.*, 2007). Para que una célula de origen a un tumor maligno, primero debe acumular múltiples mutaciones, y éstas deben ocurrir en genes responsables del control de la multiplicación y la supervivencia celular (Parham, 2011).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg definieron seis características distintivas del cáncer, las cuales son: la capacidad de señales de crecimiento autónomas, evasión de señales inhibitorias del crecimiento, evasión de muerte celular apoptótica, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) e invasión y metástasis, (Figura 1A). En una revisión actualizada de su trabajo, propusieron dos nuevas características distintivas, las cuales consisten en la reprogramación del metabolismo y la evasión de la respuesta inmune antitumoral (Figura 1B) (Hanahan & Weinberg, 2011).





**Figura 1. Señales fisiológicas distintivas del cáncer.** Imágenes tomadas y modificadas de Hanahan & Weingberg (2011).

### 3.2 Incidencia y mortalidad del cáncer cérvico-uterino (CaCU)

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es el cuarto tipo de cáncer de mayor incidencia y mortalidad en las mujeres a nivel mundial. En el año 2018 se estimaron 569,847 nuevos casos y 311,365 muertes, de las cuales 85% (266,000) se registraron en países en vías de desarrollo, lo que representó el 7,5% de muertes por cáncer en las mujeres durante ese año (Bray *et al.*, 2018). En México, anualmente se estima una ocurrencia de aproximadamente 20,000 casos, con una incidencia de 35.4 casos por cada 100,000 mujeres y representa la segunda causa de muerte por tumores malignos, con una tasa de 11.3 muertes por cada 100,000 mujeres (Ervik *et al.*, 2016; INEGI, 2015).

### 3.3 Cáncer cérvico-uterino: desarrollo de la neoplasia cervical

Los virus son los agentes etiológicos de aproximadamente el 15% de los cánceres a nivel mundial. El virus de papiloma humano (HPV) se encuentra presente en más del 99% de los casos de CaCU, donde el HPV-16 y HPV-18, considerados como HPV de alto riesgo (HR-HPV) son expresados en aproximadamente el 70% de los

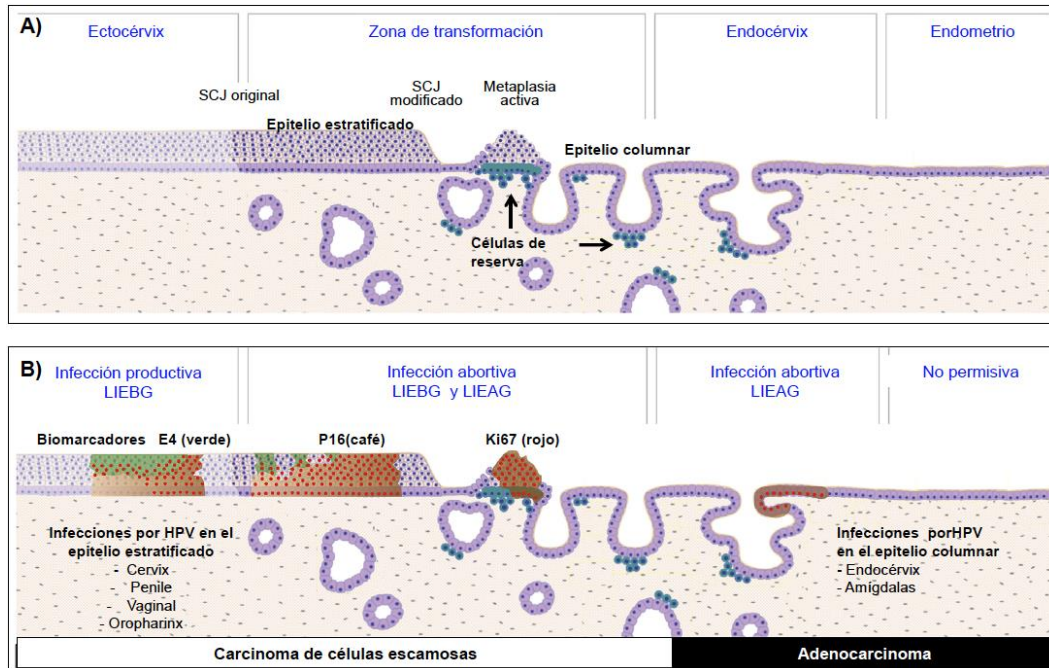
tumores de CaCU a nivel mundial (Walboomers *et al*, 1999; Wu *et al*, 2014). El CaCU se clasifica según los criterios morfológicos, ya sea como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma o como uno de varios cánceres cervicales menos comunes, como el carcinoma adenoescamoso (Benedet, 2000).

El cuello uterino consta de al menos tres tipos epiteliales distintos, de los cuales la zona de transformación cervical es la más importante con respecto al riesgo de desarrollar cáncer (Reich & Regauer, 2017). La mayoría de los cánceres de cuello uterino surgen en esta región, la cual se cree que es sostenida por un tipo especializado de células madre conocidas como la célula de reserva cervical, estas células están presentes de manera variable debajo del epitelio columnar que se encuentra cerca de la unión columnar escamosa cervical (SCJ) y participan en el proceso de metaplasia cervical cuando esto se requiere (Martens *et al.*, 2009). La metaplasia es un proceso normal por el cual el epitelio columnar en esta región puede convertirse en un epitelio estratificado diferenciado y puede ocurrir en la pubertad cuando el endocérvix se expone al ambiente ácido de la vagina, pero también ocurre a lo largo de la vida de una mujer en respuesta a la irritación local. Esta teoría llevó a los patólogos a deducir que es la infección por HPV de la célula de reserva cervical, y la desregulación inherente de la expresión génica viral que ocurre en estas células, lo que subyace al desarrollo de la neoplasia cervical (Doorbar & Griffin, 2019).

La infección persistente por HPV y la desregulación de la expresión génica viral normal son factores de riesgo unificadores que afectan los tres sitios de infección, lo cual sugiere que la infección por HR-HPV del ectocérvix tiene un riesgo de progresión similar al de las infecciones vaginales y/o del pene, con una progresión lenta durante la transición de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) a lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG), y finalmente al CaCU, la cual puede durar entre 2 y 20 años. La infección del epitelio columnar cerca de la SCJ, donde puede ocurrir metaplasia, se asocia con un mayor riesgo de progresión del cáncer, sin embargo, a pesar de su importancia, no todas las infecciones se limitan al ectocérvix y a la zona de transformación, puesto que los HR-HPV también



pueden infectar las células columnares del endocérnix propiamente dicho, un sitio que no tiene capacidad para soportar la producción de lesiones intraepiteliales (Reich & Regauer, 2017), (Figura 2).



**Figura 2. Diversidad de sitios de infección por HPV en el cuello uterino, y la consecuencia de la infección.** A) El cuello uterino está compuesto por el epitelio estratificado convencional del ectocérnix, la zona de transformación y el epitelio columnar del endocérnix, que se encuentra adyacente al endometrio. Las células de reserva, que se muestran en turquesa, se encuentran debajo del epitelio columnar de la zona de transformación y juegan un papel en la metaplasia normal, un proceso que conduce a la formación de una nueva estratificación epitelio cuando sea necesario. Esto se muestra entre la unión columnar escamosa cervical (SCJ). B) La consecuencia de la infección por HPV difiere dependiendo del sitio de la infección. El pensamiento actual sugiere que el ectocérnix es un sitio donde se admite la infección productiva por HPV y LIEBG, y que los otros sitios son asociados con diferentes niveles de expresión desregulada del gen de HPV. Los fenotipos moleculares típicos observados en estos sitios pueden revelarse utilizando biomarcadores E4 (verde), p16 (marrón) y MCM / Ki67 (rojo). Los fenotipos de mayor grado observados en la zona de transformación y el endocérnix son precursores potenciales del cuello uterino. Tomado y modificado de Doorbar & Griffin (2019).

La gran mayoría de las mujeres infectadas por HR-HPV nunca desarrollan CaCU porque una respuesta inmune adecuada es capaz de controlar la infección y prevenir su progresión a una lesión precancerosa (Insinga *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que la respuesta inmune contra antígenos de HPV eliminan a

la mayoría de las infecciones y lesiones precursoras en las mujeres, el desarrollo del CaCU está inevitablemente ligado a la evasión y supresión de la respuesta inmune, así como a mecanismos intrínsecos de las células tumorales que favorecen su proliferación, invasión y metástasis (Doorbar *et al.*, 2012).

### **3.4 La vía adenosinérgica en la supresión de la respuesta inmune antitumoral**

Entre los mecanismos inmunosupresores que impiden la inmunidad antitumoral, se encuentra la acumulación extracelular de ADO, la cual es considerada como una estrategia potente y generalizada que los tumores explotan para escapar de la vigilancia inmunológica mediante la activación del sistema purinérgico también conocido como vía adenosinérgica (Allard *et al.*, 2016). La ADO es un nucleósido de purina endógeno compuesto de adenina unida a la ribosa, que desempeña un papel importante en diversos procesos fisiológicos (Muller-Haegeler *et al.*, 2014). Este metabolito se produce tanto en sitios extracelulares como intracelulares y sus niveles en los tejidos están calibrados por la actividad de varias enzimas clave (Whiteside, 2017).

Los nucleósidos y nucleótidos extracelulares participan en una variedad de respuestas celulares entre las cuales se encuentran la estimulación o inhibición de la muerte celular, proliferación, migración, diferenciación y secreción de factores y mediadores inflamatorios. Los mediadores purinérgicos, como el ATP y la ADO, se liberan en el espacio extracelular en respuesta a las perturbaciones metabólicas y funcionan como señales externas que permiten regular las respuestas inmunitarias (Antonioli *et al.*, 2013).

El proceso de producción de ADO extracelular se realiza mediante la hidrólisis de ATP mediada por la actividad coordinada de CD39 (ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa- 1; E-NTPDasa1), que hidroliza el grupo fosfato del ATP y ADP, en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , para producir AMP; y de CD73 (ecto-5'-nucleotidasa; Ecto 5`NTasa), que hidroliza el AMP para generar ADO, sin embargo

también existen fosfatasa alcalinas que pueden hidrolizar ATP extracelular vía ADP y AMP a ADO (Antonioli *et al.*, 2013). La ADO puede ser producida por células que expresan CD39 y CD73 dentro de las cuales encontramos, células tisulares, incluidas las células tumorales, o por células inmunes, como las células T reguladoras (Treg) adaptativas o inducibles (iTreg) y las células mieloides supresoras (MDSC), (Muller-Haegle *et al.*, 2014). Por otro lado, la ADO intracelular se produce por hidrólisis de 3'5'-cAMP mediante fosfodiesterasas (PDE), o de AMP a través de 5' nucleotidasa intracelular (iCD73). La ADO intracelular también se produce por la enzima citoplasmática S-adenosil homocisteína hidrolasa (síntesis de *ново*) que convierte la S-adenosil homocisteína en ADO, la cual una vez sintetizada es liberada al ambiente extracelular por medio de transportadores de nucleósidos equilibradores (ENTs, por sus siglas en inglés) que residen en la membrana celular (Muller-Haegle *et al.*, 2014; Whiteside, 2017). Alternativamente, la ADO intracelular puede experimentar una desaminación rápida a través de la enzima ADA que la convierte en INO o puede entrar en una reserva de nucleótidos de purina a través de la actividad de la adenosina cinasa (AK) convirtiéndola en AMP (Antonioli *et al.*, 2014). Por otra parte, la enzima Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) tiene un papel importante en el metabolismo de las purinas, puesto que su expresión en la superficie celular contribuye al metabolismo de nucleósidos extracelulares convirtiendo la INO a hipoxantina (HYP) (Giuliani *et al.*, 2017; Boison & Yegutkin, 2019).

En el entorno extracelular, la ADO puede activar localmente a 4 subtipos de receptores específicos acoplados a proteínas G (ARs: A1R, A2AR, A2BR y A3R), que se expresan en varios tipos de células, incluidas las células inmunes. Al involucrar a estos receptores, ADO puede modular las respuestas mediadas por las células inmunitarias (Muller-Haegle *et al.*, 2014). A1R y A2AR son receptores de alta afinidad (A2AR >A1R), mientras que A2BR y A3R son receptores de baja afinidad (Ralevic & Burnstock, 1998). Al activar estos receptores, la ADO activa o desactiva la adenil ciclasa (AC) y modula los niveles y la actividad de AMP cíclico (3'5'-cAMP). A2AR y A2BR estimulan la AC y aumentan los niveles de AMP cíclico, mediando la inhibición de la respuesta inmune. Mientras que A1R y A3R inhiben la

AC y regulan a la baja el AMP cíclico que resulta en la activación de las respuestas inmunitarias (Whiteside, 2017). Por otra parte, se sabe que, en condiciones normales, en los tejidos se detectan niveles de 10-100nM de ADO en el espacio extracelular. Sin embargo, en tejidos cancerosos se han reportado concentraciones de ADO mayores a 100µM. Estas concentraciones de ADO generadas en el microambiente tumoral hipóxico pueden generar efectos importantes en el huésped a través de la señalización de los ARs. Por un lado, suprimiendo las células que participan en la respuesta inmune antitumoral y, por otro lado, favoreciendo la invasión y metástasis de las células tumorales.

La inmunosupresión mediada por ADO normalmente representa un bucle autorregulador, que sirve para proteger al huésped de una activación inmunitaria excesiva y respuestas inflamatorias que podrían resultar en daño a los tejidos. Sin embargo, su presencia en un tumor y un exceso de ADO generado en el microentorno inflamatorio crónico suprime de manera indiscriminada todas las respuestas inmunitarias, incluidas las que atacan al tumor, y por lo tanto permite el crecimiento del tumor y su escape del control inmunitario (Muller-Haegle *et al.*, 2014). Además, también se ha reportado que altas concentraciones de ADO pueden tener un efecto tóxico para las células tumorales lo cual las puede llevar a muerte por apoptosis (Antonioli *et al.*, 2014; Faas *et al.*, 2017). Por lo que se ha encontrado que los niveles extracelulares e intracelulares de ADO son regulados por la actividad de la enzima ADA, lo cual puede volver resistentes a algunas células tumorales a la muerte inducida por ADO, debido a la presencia de altos niveles de expresión de ADA.

### **3.5 Adenosina desaminasa: Una enzima crítica en el metabolismo de las purinas**

La adenosina desaminasa es una enzima crucial en el metabolismo de las purinas con múltiples funciones, que actúa como catalizador, coestimulador, modulador alostérico y molécula de comunicación célula-célula (Figura 3) (Bagheri *et al.*, 2019). En humanos, se han identificado y designado diferentes isoformas de ADA, las

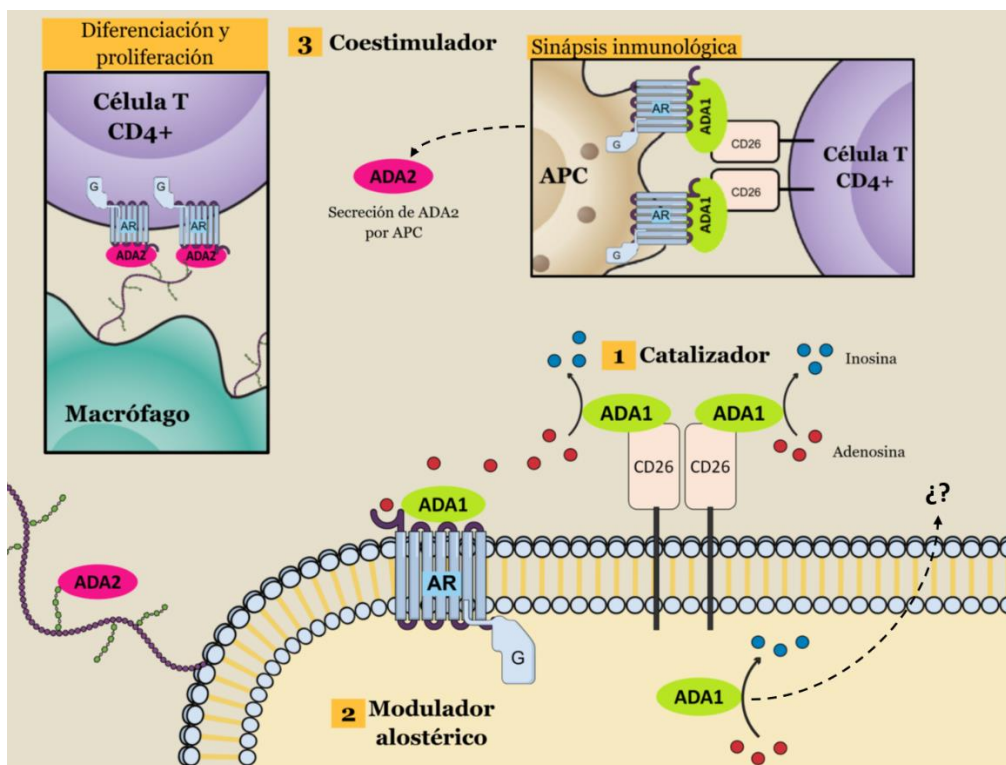
cuales corresponden a adenosina desaminasa-1 (ADA1), adenosina desaminasa-2 (ADA2) y adenosina desaminasa-3 (ADA3), de las cuales ADA1 y ADA2 presentan actividad enzimática funcional. Actualmente hay poca información disponible sobre la ADA3 y recientemente se descubrió otra proteína con características similares a ADA denominada ADAL (del inglés, *Adenosine Deaminase like-protein*) (Antonioli *et al.*, 2015).

ADA1, generalmente citado como ADA, es una proteína monomérica y puede existir como una forma de bajo peso molecular (41 kDa) o como un complejo heterooligomérico de alto peso molecular (>200 kDa) formado por dos subunidades ADA1 y la glicoproteína homodimérica no enzimática CD26, un marcador de activación de células T (ADA1cp). Se sabe que las isoenzimas ADA1 y ADA1cp representan hasta el 90% de la actividad total de ADA y que ADA1 se puede asociar con los receptores de adenosina A1, A2AR y A2BR (Bagheri *et al.*, 2019).

Por otra parte, ADA2 es un homodímero de 114 kDa, que se caracteriza por una compleja arquitectura multidominio, y muestra una gran similitud con el mecanismo enzimático de ADA1. ADA2 se ha detectado sólo en eucariotas y organismos multicelulares principalmente en el espacio extracelular, y se ha clasificado como un factor de crecimiento ADA (ADGF) debido a que en una variación de ADA1, presenta una secuencia peculiar de aminoácidos 80-100 en el extremo N-terminal, lo que explica su actividad como factor de crecimiento debido a su papel en el desarrollo de tejidos. Se ha demostrado que ADA2 humano tiene una afinidad 100 veces menor hacia la ADO que el ADA1 y contribuye poco a la actividad ADA del hígado y el bazo, pero considerablemente a la actividad ADA del suero (Cortés *et al.*, 2014). También se sabe que ADA2 humano es secretado específicamente por las células presentadoras de antígenos e induce la diferenciación de monocitos a macrófagos los cuales ejercen una función crítica en la defensa inmune y, de esta manera, la concentración de ADA2 aumenta en respuesta a una infección por microorganismos intracelulares (Zavialov *et al.*, 2010).

Ambas isoformas de ADA tienen importantes funciones en la regulación de múltiples procesos en la vía purinérgica. Se sabe que ADA1 y ADA2 se pueden conectar a la

superficie de las células (ecto-ADA) a través de proteoglicanos y ARs, lo que sugiere que también podría estar involucrado en la señalización célula-célula y que su presencia tendría un papel importante en ciertas patologías (Romanowska *et al.*, 2007). Por otro lado, además de la presencia de estas isoenzimas en las formas citosólica y ecto, también pueden secretarse en una variedad de condiciones, por ejemplo, ADA2 se secreta cuando los monocitos se diferencian en macrófagos. Asimismo, ADA1 y ADA2 son secretadas al suero y otros fluidos en diversas enfermedades (Iwaki-Egawa *et al.*, 2006).



**Figura 3. Representación esquemática de las principales funciones de adenosina desaminasa (ADA) en humanos.** (1) Actividad catalítica en la disminución de las concentraciones de ADO dentro de la célula (ADA1) para eliminar los derivados tóxicos de la ADO (desoxiadenosina), y fuera de la célula (ecto-ADA1 y ADA2) para desactivar los ARs. (2) Modulación alostérica de los ARs y CD26 para ADA1 o AR, proteoglicanos (PG) y otros receptores putativos para ADA2. (3) Coestimulador en la "sinápsis inmunológica".

Ecto-ADA desempeña un papel extra enzimático además de la desaminación de la ADO extracelular que conduce a reducir la estimulación de los ARs al unirse a CD26,

por tanto, ADA actúa como regulador alostérico. Al unirse simultáneamente a los ARs y CD26 en diferentes células, ecto-ADA media los contactos de célula a célula y, de esta manera, es posible que esta función puente de ecto-ADA facilite la transducción de señal intercelular importante para el desarrollo del tumor (Pacheco *et al.*, 2005).

Se sabe que la ADO puede tener diferentes efectos dependiendo del tejido y el curso del tiempo. Asimismo, la densidad de los diferentes ARs pueden tener funciones opuestas, de modo que la activación de un tipo de receptor puede provocar una reacción protectora, mientras que al activarse otro receptor puede darse una respuesta patológica (Fredholm, 2007). Por la misma razón, ADA puede tener efectos pro o antiinflamatorios dependiendo del estado inmune y el aumento crónico de los niveles de ADO, lo cual puede ser perjudicial para los tejidos del huésped, como se observa en modelos animales de enfermedad pulmonar o sepsis (Adanin *et al.*, 2002). Por lo que, en la fase tardía de los eventos patológicos, hay una inducción de mecanismos biológicos destinados a contrarrestar la producción excesiva de ADO extracelular y evitar la toxicidad potencial. De tal manera que la inducción de ADA representa un importante punto de control para regular los niveles de ADO extracelular y, en consecuencia, modular la estimulación de los ARs. ADA, por lo tanto, juega un papel crítico en el control de la magnitud de la respuesta purinérgica bajo condiciones fisiológicas y, en mayor medida, en presencia de eventos patológicos, ya que un aumento en la actividad de ADA resulta en inflamación y lesión tisular (Antonioli *et al.*, 2012). Por otra parte, la alta actividad de ADA ocurre en diversas enfermedades y trastornos, incluidos diferentes tipos de cáncer, además se ha reportado que los niveles de ADA en suero (Torgutalp *et al.*, 2017) así como en tejidos (Aghaei *et al.*, 2010) se asocia con la estadificación del cáncer. También se ha reportado que ADA puede desaminar análogos de ADO que se usan en quimioterapia y otros tratamientos y, por tanto, puede alterar o comprometer su actividad y especificidad (Liu, 2015). Esto sugiere que ADA puede ser un biomarcador relevante en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades.

### **3.6 La inhibición de la adenosina desaminasa como una estrategia de tratamiento eficaz para diversas enfermedades**

Adenosina es un regulador de la inflamación y la lesión tisular, y su presencia en los tejidos inflamados es modulada por la actividad de ADA (Antonioli *et al.*, 2012). Por tanto, la inhibición de ADA conduce a la acumulación de ADO en el sitio de inflamación y a la activación de respuestas purinérgicas para inhibir la producción de factores pro-inflamatorios, por lo que la inhibición de ADA ha sido sugerida como un tratamiento antiinflamatorio conveniente (Trincavelli, 2013). En los últimos años muchos estudios se han enfocado a encontrar inhibidores adecuados de ADA para incluirlos como potenciales agentes terapéuticos (Bagheri *et al.*, 2019). Convencionalmente, los inhibidores de ADA se han clasificado en dos tipos: 1) Inhibidores del estado de transición, cuando su estructura se asemeja a la del intermedio tetrahédrico que se forma durante el proceso de desaminación catalizado por la enzima; 2) Compuestos en estado fundamental, cuando su estructura es similar al sustrato endógeno, ADO (Terasaka, 2005).

Los principales ejemplos de inhibidores del estado de transición están representados por la coformicina natural (CF) y 2'-desoxicoformicina (DCF), también llamada pentostatina, aislados a mediados de los 70 de cultivos de bacterias aeróbicas gram positivas como *Nocardia interforma*, *Streptomyces kaniharaensis* y *Streptomyces antibioticus*. Ambos compuestos muestran una afinidad particularmente alta hacia ADA1 humana; aunque también inhiben a ADA2 (Antonioli *et al.*, 2012). Estos muestran una potente inhibición de ADA, mostrando valores de  $K_i$  de 10 y 2.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente y su notable eficacia se ha atribuido a una interacción larga, estrecha y casi irreversible con la enzima (Sauter *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha observado que estas moléculas tienen una marcada actividad inmunosupresora, y se han propuesto para el tratamiento de tumores malignos que afectan a las células B y T, caracterizadas por una mayor expresión de la actividad de ADA (Flinn, 2018).



La DCF ingresó a la práctica clínica en 1991 y, hasta la fecha, todavía representa el tratamiento estándar de oro para la leucemia de células pilosas (HCL), con lo cual una administración relativamente breve del medicamento permite lograr remisiones duraderas en más del 90% de los pacientes (Silva *et al.*, 2017). Otras enfermedades que responden al DCF adicionales incluyen leucemia linfocítica aguda y crónica, leucemia prolinfocítica, micosis fungoide, linfomas no Hodgkin de bajo grado e indolentes, así como linfoma o leucemia aguda de células T (Bagheri *et al.*, 2019).

Sin embargo, la DCF se caracteriza por un perfil farmacocinético desfavorable ya que sólo se administra de manera intravenosa y muestra también una alta toxicidad, que afecta principalmente al hígado, los riñones y el sistema nervioso central (Juliussen & Liliemark, 2006). La toxicidad de DCF surge de una inhibición de unión larga y estrecha de ADA, por esta razón, los esfuerzos de investigación se centran principalmente en descubrir inhibidores de unión reversibles, de acción corta y menos estrechos que, permitan una rápida recuperación de la enzima, con lo cual podrían ser más seguros y mejor tolerados (Reayi & Hosmane, 2004).

Por otra parte, el inhibidor eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA), es el principal representante de los inhibidores de estado fundamental, sin embargo, es el único inhibidor conocido que se une a la proteína ADA1 humana pero no a la isoforma ADA2 (Zavialov *et al.*, 2010). Se comporta como un inhibidor competitivo semi-estrecho, mostrando un valor de  $K_i$  de 1.14nM, y se une al sitio activo de ADA prefiriendo su forma abierta, lo cual fue descubierto a través de estudios de rayos X del complejo EHNA / ADA (Kinoshita *et al.*, 2008). Después de la síntesis de EHNA, se han realizado grandes esfuerzos para modificar residuos clave en la molécula, explorando profundamente los requisitos estructurales para el reconocimiento de enzimas y poder diseñar compuestos aún más efectivos. Nakajima y colaboradores en 2015 demostraron que la inhibición de ADA utilizando EHNA aumenta el nivel de adenosina intracelular dando como resultado la apoptosis de las células malignas del mesotelioma pleural maligno, el cual es un tumor maligno invasivo contra el cual no se ha proporcionado un tratamiento efectivo hasta el momento. Sin embargo, su uso aún no se ha llevado a la clínica debido a que se han exhibido algunos efectos

citotóxicos en diferentes líneas celulares. A su vez, se han realizado varios estudios que sugieren compuestos naturales como el jugo de tomate, *Urtica dioica*, metabolitos endófitos, *Syzygium cumini* y *Allium sativum*, o medicamentos comúnmente utilizados como el metotrexato y el compuesto organogermanio para inhibir la ADA (Trincavelli, 2013). En este contexto, se ha observado que, los altos niveles de ADO que se producen en presencia de inhibidores fuertes de ADA pueden resultar tóxicos y promover la apoptosis en distintos tipos de células no sólo células tumorales (Mistry *et al.*, 2006). Por ejemplo, la pentostatina puede inducir deficiencia inmune (Kraut *et al.*, 1990), pero el uso de inhibidores menos potentes como naringina puede prevenir este efecto indeseable (Li *et al.*, 2015), por lo cual resulta de gran relevancia la búsqueda de otros agentes o fármacos que tengan una actividad inhibitoria de ADA con menores efectos colaterales.

### **3.7 Las estatinas y su potencial como agentes terapéuticos en el cáncer**

Recientemente se han estudiado una gran variedad de fármacos que ejercen un efecto pleiotrópico además de sus propiedades ya conocidas para el tratamiento de distintas enfermedades entre ellas el cáncer. En este contexto, se ha descubierto que las estatinas tienen varios efectos sobre la salud humana, además de la disminución de la actividad de los niveles lipídicos, las estatinas pueden usarse para el tratamiento del cáncer debido a la inhibición de la vía del mevalonato y otras vías que aún no han sido completamente dilucidadas (Sopková *et al.*, 2017).

Las estatinas son los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Esta enzima cataliza la conversión de HMG-CoA en mevalonato, que son los intermedios en la ruta biosintética del colesterol, de esta manera, la inhibición de la síntesis de mevalonato anula la producción de isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) y gerangeranil pirofosfato (GGPP), intermedios cruciales en la señalización celular, diferenciación y proliferación. Estos compuestos pueden pertenecer a dos clases: hidrofílica (pravastatina y rosuvastatina) y lipofílica (cerivastatina, simvastatina, lovastatina, fluvastatina y atorvastatina), siendo la lipofilia de las estatinas lo que favorece el acceso de los fármacos a diferentes

tejidos (Iannelli *et al.*, 2018). Las estatinas juegan un papel importante en el desarrollo tumoral, porque pueden afectar el metabolismo de las células cancerosas. Su efecto se ha observado en varios procesos celulares, como, la angiogénesis, la metástasis, la apoptosis y la proliferación celular. Sin embargo, estos efectos dependen mucho del tipo de cáncer y las estatinas individuales varían en su potencial antitumoral. Datos recientes han revelado algunos mecanismos moleculares involucrados en la muerte celular de células malignas inducida por estatinas y sentaron las bases para explorar el papel de las estatinas como adyuvante en las terapias combinadas para el tratamiento del cáncer (Alsheikh-Ali *et al.*, 2008). La evidencia epidemiológica sugiere el efecto positivo del tratamiento con estatinas para el cáncer de próstata, páncreas, mama y colorrectal, además del efecto quimiopreventivo contra las neoplasias hematopoyéticas y el riesgo de cáncer de pulmón en pacientes con EPOC. Estos tipos de cáncer son candidatos para el uso de estatinas como terapia adyuvante, para los cuales se podría ofrecer un enfoque novedoso en la terapia de formas agresivas de cáncer en combinación con otros tratamientos contra el cáncer (Ahern *et al.*, 2011). Tomando en cuenta lo anterior, Crescencio y colaboradores en el 2009 sugirieron que las estatinas ejercen efectos antitumorales sobre líneas de cáncer cervical (Hela, Caski y ViBo) mediante la inhibición de la proliferación celular y la inducción de muerte celular y estrés oxidativo, señalando en ambos estudios que simvastatina fue la que ejerció un mayor efecto antitumoral. Estos investigadores reportaron que simvastatina era el inhibidor más efectivo de la proliferación sobre estas líneas tumorales sin embargo, al querer revertir el efecto antiproliferativo con mevalonato, éste no fue completamente anulado, lo que sugiere que otros metabolitos podrían tener un papel importante en la inhibición inducida por las estatinas en estas líneas celulares y a su vez, que éste fármaco podría tener efecto en la activación de otras vías de señalización y/o expresión de enzimas que influyan en su viabilidad.

Otro hallazgo interesante fue el de Kowalczyk y colaboradores en 2008, donde se estudió la influencia de fármacos cardiovasculares sobre la actividad de ADA, entre ellos la simvastatina, administrada a conejos. Los resultados obtenidos mostraron

que la simvastatina disminuyó significativamente la actividad de ADA, principalmente de la isoenzima ADA2.

#### **4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El CaCU es un problema importante de salud pública en México, siendo actualmente la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (Bray *et al.*, 2018). La infección por HR-HPV se considera el principal agente etiológico del CaCU (Doorbar *et al.*, 2012; Doorbar & Griffin, 2019). Sin embargo, se ha reportado que la presencia de factores inmunoreguladores pueden jugar un papel importante en la patofisiología de esta enfermedad. En este contexto, se ha reportado que la producción de ADO en el TME juega un papel importante en el desarrollo de tumores ginecológicos debido a su papel en la inmunosupresión y en favorecer la proliferación, migración e invasión de las células tumorales (Bahreyni *et al.*, 2017). Por otra parte, se sabe que los niveles de ADO son regulados de manera importante por la actividad de la enzima ADA, y que altas concentraciones de ADA en el TME pueden otorgar una ventaja selectiva a las células cancerosas para su sobrevivencia (Boison & Yegutkin 2019). Por tanto, la búsqueda de fármacos que regulen la expresión y/o actividad de ADA puede ser de interés terapéutico en esta enfermedad. En este respecto, la reutilización de medicamentos ha surgido como una estrategia para reducir el tiempo de desarrollo y como una fuente de tratamientos de bajo costo para satisfacer las mayores demandas y necesidades no satisfechas de los pacientes con cáncer. Las estatinas son fármacos ampliamente utilizados en el control del hipercolesterolemia, debido a la propiedad de inhibir la formación de mevalonato, un precursor del colesterol, además de los isoprenoides, ambos compuestos necesarios para la proliferación celular (Duncan *et al.*, 2004). Además, recientemente se ha reportado que simvastatina, una estatina lipofílica, es capaz de inhibir la actividad de ADA (Kowalczyk *et al.*, 2008).

Tomando en consideración que nuestro grupo de investigación reportó que células tumorales de CaCU presentan fuerte actividad de ADA (Ávila-Ibarra, 2011, Ávila-Ibarra, 2014) y son capaces de liberar ADA soluble en los sobrenadantes celulares

(Molina-Castillo, 2019), el presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de analizar si la simvastatina inhibe la expresión y actividad de ADA en células tumorales de CaCU y por tanto afecta su viabilidad, lo cual será de gran importancia para establecer nuevas estrategias terapéuticas contra esta enfermedad.

## **5. HIPÓTESIS**

Se sabe que ADO induce apoptosis en diferentes tipos de células tumorales y que la desaminación de ADO a INO mediante la actividad enzimática de ADA puede inhibir el efecto citotóxico de ADO. Nuestro grupo de investigación recientemente detectó la presencia y actividad de ADA tanto en células tumorales de CaCU, como en sobrenadantes de las mismas. Por otra parte, se ha reportado que simvastatina puede inhibir la proliferación de células tumorales y que al administrarla a conejos es capaz de reducir la actividad de ADA a nivel plasmático. Sin embargo, el efecto de este fármaco sobre la expresión y actividad funcional de ADA en células tumorales no ha sido determinado. En consecuencia, se espera que simvastatina inhiba la expresión y actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCU y disminuya la viabilidad de las células tumorales.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Analizar el efecto de simvastatina sobre la expresión, y actividad funcional de ADA y en la viabilidad de células tumorales de CaCU.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de simvastatina sobre la viabilidad de células tumorales de CaCU.
- Determinar el efecto de simvastatina sobre la actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCU.
- Determinar el efecto de simvastatina sobre la expresión de ADA de células tumorales de CaCU.
- Determinar el efecto de simvastatina sobre la actividad enzimática de ADA en sobrenadantes de cultivos de células tumorales de CaCU.
- Determinar la presencia de sADA en plasmas de pacientes con diferentes estadios de CaCU.
- Determinar el efecto de simvastatina sobre la actividad enzimática de ADA en plasmas de pacientes con diferentes estadios de CaCU.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Cultivo celular**

Se utilizaron tres líneas celulares de CaCU, Hela (VPH-18), CaSki (VPH-16) y C33A (VPH-), las cuales se cultivaron con medio de cultivo compuesto por: RPMI 1640 de (GibcoBRL Life Technologies) suplementado al 10% con Suero Fetal de Bovino (SFB) (GibcoBRL Life Technologies); antibióticos penicilina 100U/mL y estreptomina 100µg/mL. Las células fueron mantenidas bajo condiciones de esterilidad a temperatura constante de 37°C en una incubadora (Forma Scientific), con 5% de CO<sub>2</sub> y un ambiente de humedad saturante.

### **7.2 Preparación de Simvastatina**

La preparación de simvastatina se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Sadeghi *et al.*, 2000, brevemente: Se disolvieron 40mg de simvastatina (Mca Genérica, Farmacia del Ahorro, México) en 1000µL de etanol, se centrifugó a 500g durante 10 min y posteriormente se añadieron 750µL de NaOH 0.1N al sobrenadante colectado (aprox. 750µL) y se incubó a 50 °C durante 2h. El pH se llevó a 7.0 utilizando HCl. Posteriormente se le agregaron 5.08mL de medio OPTIMEM a lo recuperado y se filtró para esterilizar la solución con filtro de 0.22µm (Millipore, USA). La concentración de la solución final fue de 10mM, esta solución se mantuvo a 4 °C durante máximo un mes.

### **7.3 Efecto de simvastatina en la proliferación de células de CaCU: determinación de la IC<sub>50</sub> de simvastatina**

Se sembraron por triplicado 1x10<sup>4</sup> células de cada línea celular (CaSki, HeLa y C33), en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Costar, USA), en presencia de diferentes concentraciones de simvastatina (500µM, 250µM, 125µM, 62.5µM, 31µM, 15.5µM y 7.75 µM), en volúmenes finales de 100µL durante 24 h y 48 h. Como controles negativos se utilizaron células cultivadas sólo en medio de cultivo.

Monroy-Mora, K.A.

Al finalizar los tiempos de incubación, en cada pozo se adicionaron 20 $\mu$ L del reactivo de proliferación celular *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, USA) a una concentración final de 317 $\mu$ g/mL, y posteriormente las placas fueron incubadas por 4 h a 37°C. La reducción del compuesto de tetrazolio MTS a formazán por las células vivas fue medida a una longitud de onda de 490nm mediante un lector de placas para ELISA (Molecular Devices, USA). El porcentaje de proliferación celular se calculó considerando como (100%) la absorbancia de las células que sólo contenían medio de cultivo. Los valores de IC<sub>50</sub> de simvastatina sobre la proliferación de las células tumorales se calculó a través del software Graphpad Prisma versión 7 utilizando los valores normalizados de las absorbancias y el logaritmo de las concentraciones [ $\mu$ M] de simvastatina.

#### **7.4 Efecto de simvastatina sobre la actividad funcional de ADA en células tumorales de CaCU**

Se cultivaron 4x10<sup>5</sup> células de cada línea celular en cajas Petri de 5mL por duplicado, en presencia de su correspondiente IC<sub>50</sub> de simvastatina y con la mitad de la concentración del IC<sub>50</sub>. Como control negativo las células fueron cultivadas únicamente con RPMI y SFB 10%, durante 48 h. A las 48 h las células fueron recolectadas y colocadas en tubos Eppendorf en presencia 50 $\mu$ L de ADO 10mM. Como control positivo de inhibición de ADA, se colocaron células tumorales en presencia de Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-3-nonil (EHNA), inhibidor específico de ADA, a una concentración final de 1mM en un volumen total de 100 $\mu$ L. Al inicio de cada cultivo y después de 6h se tomaron alícuotas de 1 $\mu$ L de cada sobrenadante y se colocaron sobre laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel para realizar una cromatografía en capa fina (CCF) (5.5cm x 5.5cm) (Sigma, USA). Como testigos se emplearon muestras de 1 $\mu$ L de ADO, INO e HYP (Sigma, Life Science), cada una a la concentración de 10mM. Las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 2.5mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: isobutanol (38%), etilacetato (22.2%), metanol (16.6%) y amoníaco (22.2%) en esas proporciones, respectivamente. Las muestras fueron



Monroy-Mora, K.A.

eluidas durante 40 min en la cámara de elución y posteriormente las laminillas fueron retiradas para su secado a temperatura ambiente. Finalmente, los productos generados fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

### **7.5 Efecto de simvastatina sobre la expresión de ADA en líneas celulares de CaCU**

La expresión de ARN mensajero de ADA en las células tumorales de CaCU tratadas con simvastatina se determinó por la técnica de RT-PCR. Para ello, las diferentes líneas celulares fueron cultivadas durante 48 h en presencia o ausencia de su respectivo IC<sub>50</sub> de simvastatina. Después de retirar el medio de cultivo, las células adheridas se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se lisaron, agregando 1mL de TRIzol Reagent directamente a la caja hasta lograr una mezcla homogénea, ésta fue recuperada en un tubo eppendorff de 1.5mL. El homogenizado se incubó 5 min a temperatura ambiente, luego se le adicionaron 200µL de cloroformo por cada mL de TRIzol Reagent y se agitó vigorosamente por 15 s para después incubarse a temperatura ambiente durante 3 min. En seguida se centrifugó a 12 000 xg durante 15 min a 4°C y se colectó la fase acuosa que contenía el ARN en un tubo para Eppendorf nuevo. A éste se le añadieron 500µL de isopropanol a -20°C por cada mL de TRIzol Reagent para precipitar el ARN, se mezcló suavemente y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 12 000 xg durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante, al botón se le agregó 1mL de etanol al 75% se resuspendió y centrifugó para hacer el lavado. El botón se puso a secar por inversión sobre una toalla de papel absorbente evitando la deshidratación total. Finalmente, el ARN se disolvió en 15-30µL de agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC) y se colocó en un tubo para microcentrífuga nuevo de 0.6mL. Se procedió a cuantificar el ARN obtenido utilizando un espectofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

Para obtener el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir del ARN, se utilizó el kit *High Capacity RNA to cDNA* (ThermoFisher Scientific). Para ello

todos los componentes y el procedimiento se realizaron en frío dentro de una campana para PCR y en microtubos para PCR estériles (uno para cada muestra de ARN). Estos tubos contenían 10 $\mu$ L de 2X RT Buffer, 1 $\mu$ L de 20X RT Enzyme Mix, 2 $\mu$ g de ARN (o lo calculado previamente después de la cuantificación) y se llevaron a 20 $\mu$ L de volumen final con agua libre de nucleasas. Los tubos se taparon y se centrifugaron para eliminar burbujas y asegurar que toda la mezcla quedara en el fondo del tubo, luego se colocaron las muestras en el termociclador con las siguientes condiciones de reacción: 37°C por 60 min, 95°C por 5 min y 4°C el tiempo que sea necesario para que la reacción se detuviera. Finalmente se realizó una dilución 1:10 tomando 5 $\mu$ L del ADNc concentrado y añadiendo 45 $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Posteriormente se procedió a la amplificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa punto final utilizando el PCR Master Mix (Promega).

El volumen total de la reacción se llevó a 25 $\mu$ L, los preparados de las reacciones se realizaron sobre hielo en una campana para PCR. Para cada muestra se colocaron en un microtubo para PCR 12.5 $\mu$ L de PCR Master Mix 2X, 2 $\mu$ L de los oligonucleótidos para ADA, sentido: 5'-GTG TAA GCA CGC GTT GTA CTG-3' y antisentido 5'-CGT AGT AAG TGG GAG GGA ACC-3' (Integrated DNA Technologies); 2 $\mu$ L de los oligonucleótidos para Beta-actina sentido: 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' y antisentido 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3' (Integrated DNA Technologies); 5 $\mu$ L de la dilución del ADNc; y se llevó a 25 $\mu$ L con agua libre de nucleasas. Se homogenizaron las reacciones y se centrifugaron para eliminar burbujas y asegurar que toda la mezcla quedara en el fondo del tubo, luego se colocaron las muestras en el termociclador con las siguientes condiciones de reacción: Pre-incubación 95°C-5 min, desnaturalización 95°C-1 min, alineación 57°C- 1 min, elongación 72°C- 1 min, elongación final 72°C- 10 min y enfriamiento 22°C- 10 min. Se repitieron 35 ciclos desde desnaturalización a elongación. Por último, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3%, posteriormente se tiñó con Gel Red Nucleic Acid Stain (Sigma-Chemical, USA) para poder observar el amplificado de las muestras.

### **7.6 Efecto de simvastatina sobre la actividad de ADA en sobrenadantes de células tumorales de CaCU**

Para analizar el efecto de simvastatina sobre la actividad funcional de ADA liberado en sobrenadantes de cultivos celulares de CaCU, se cultivaron  $2.5 \times 10^6$  células de cada línea celular en placas de 24 pozos en un volumen final de 2mL con medio OPTIMEM libre de SFB durante 48 h. Posteriormente, los sobrenadantes fueron recolectados y centrifugados a 6 000 xg durante 6 min para sedimentar las células y restos celulares, 50 $\mu$ L de cada sobrenadante fueron colocados en tubos Eppendorf e incubados en presencia 50 $\mu$ L de ADO 10mM (a una concentración final de 5mM). Como control positivo de inhibición de ADA, se añadió el inhibidor específico de ADA (EHNA) a una concentración final de 1mM en un volumen total de 100 $\mu$ L, o 1mM de simvastatina, y se procedió a incubarlos a 37°C. Al inicio de cada incubación y después de 6 h se tomaron alícuotas de 1 $\mu$ L de cada sobrenadante y se colocaron sobre laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel para realizar la CCF (5.5cm x 5.5cm) (Sigma, USA). Como testigos se emplearon muestras de 1 $\mu$ L de ADO, INO e HYP (Sigma, Life Science) a una concentración de 10mM cada una. Las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 2.5mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil, mencionada anteriormente). Las muestras se eluyeron durante 40 min y posteriormente las laminillas fueron retiradas para su secado a temperatura ambiente. Finalmente, los productos generados fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

### **7.7 Detección de ADA en plasmas de pacientes con diferentes etapas de CaCU**

Para la detección de ADA en plasmas de pacientes con diferentes etapas de CaCU, se utilizaron 5 muestras de plasmas de pacientes de cada una de las siguientes etapas: Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LIEBG), Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (LIEAG) y CaCU. Además, se emplearon plasmas de Donadoras

Normales sin infección por VPH (Tabla 1). Las muestras plasmáticas fueron obtenidas de mujeres que asistieron a programas de detección temprana en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y al servicio de ginecología del Hospital de Oncología, CMN SXXI del IMSS, Ciudad de México, México, entre abril de 2016 y mayo de 2018, después obtener el consentimiento informado avalado por el Comité Local de Bioética de Hospital de Oncología CMN SXXI IMSS (R-2016-3602-31).

Las muestras plasmáticas de cada etapa fueron analizadas en conjunto, haciendo mezclas de 100 $\mu$ L de cada uno de los plasmas. Se determinó la concentración total de proteína de cada mezcla empleando una curva de calibración con albúmina sérica bovina utilizando la técnica de Bradford, 50 $\mu$ g de proteína total de cada mezcla fueron cargados en geles de poliacrilamida y separados por electroforesis. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa empleando una cámara de electrotransferencia (Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System, USA). Posteriormente el gel fue bloqueado con una solución TBS-Tween 20/5% de BSA durante toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados con TBS-Tween y luego se agregó el anticuerpo primario (ADA Antibody Novusbio<sup>®</sup>) a una dilución de 1:500 en una solución de TBS-Tween 20/3% de BSA en agitación suave. Después de retirar la solución con anticuerpo, la membrana fue lavada con TBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (Peroxidase Labeled Antibody to Rabbit IgG KPL<sup>®</sup>) a una dilución de 1:1500 en TBS-Tween-20/BSA 3% dejándolo en agitación suave por 1 h, transcurrido el tiempo se retiró el anticuerpo secundario y la membrana fue lavada 5 veces con TBS-Tween. Para revelar la presencia de ADA en la membrana de nitrocelulosa, se tiñó con 200 $\mu$ L de luminol/ enhancer solution y 200 $\mu$ L de Stable peroxide solution (Sigma-Aldrich, USA). Finalmente, la membrana fue revelada con ayuda del equipo ChemiDoc MD Imaging System Biorad<sup>®</sup> y del software Studio Image 6.0.

Etapa	Número de muestra cervical	Edad (años)	Número de parejas sexuales	Número de embarazos	Tipo de VPH
Normales	1	28	3	0	S/VPH
	2	32	2	1	S/VPH
	3	26	1	0	S/VPH
	4	41	3	3	S/VPH
	5	25	4	0	S/VPH
LIEBG	1	32	1	1	67
	2	36	3	3	16
	3	27	2	1	33
	4	42	1	1	66
	5	39	2	2	73, 83
LIEAG	1	32	3	3	16, 39
	2	36	2	2	18
	3	29	3	1	16
	4	35	4	2	16, 45
	5	26	3	3	18, 52, 45, 33
CaCU	1	48	2	2	31
	2	50	4	4	69, 71, 81, 84
	3	37	3	3	39, 68
	4	41	2	2	16
	5	55	3	5	16, 18

**Tabla 1. Datos clínicos de las pacientes con diferentes etapas de desarrollo de CaCU y donadoras normales de las cuales fueron obtenidas las muestras séricas.** Muestras de suero de sangre periférica de 5 mujeres de cada uno de los siguientes grupos, fueron utilizadas en el estudio: Donadoras normales (Normales), Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LIEBG), Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (LIEAG) y CaCU, obtenidas en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No.4 y del Hospital de Oncología CMN SXXI del IMSS. Las edades promedio (años) de cada grupo fueron: 30.4, 35.3, 31.6 y 46.2 respectivamente. El número de parejas sexuales promedio por cada grupo fueron: 2.6, 1.8, 2.2 y 2.8, respectivamente. El número de embarazos promedio reportado para cada grupo fueron: 0.8, 1.6, 2.2 y 3.2, respectivamente.

### **7.8 Efecto de simvastatina sobre la actividad de ADA en plasmas de pacientes con diferentes estadios de CaCU**

Para determinar el efecto de simvastatina sobre la actividad de ADA en plasmas de pacientes con diferentes etapas de CaCU, muestras de 3 $\mu$ L de cada mezcla de plasmas fueron diluidos con 10 $\mu$ L de agua MILI-Q, y colocados en placas de 96 pozos bajo las siguientes condiciones: ausencia de inhibidores (como control negativo), EHNA (concentración final de 1mM) como control positivo, y simvastatina (concentración final de 1mM). A cada muestra se adicionó ADO (concentración final

Monroy-Mora, K.A.

de 5mM). La placa fue incubada a 37°C y muestras de 1µL de cada reacción fueron tomadas a 0, 24, 48 y 72 h y colocadas en laminillas de CCF. Como testigos se emplearon muestras de 1µL de ADO, INO e HYP (Sigma, Life Science) a una concentración de 10mM cada una. Las laminillas de CCF se colocaron en una cámara de elución conteniendo 2.5mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil, mencionada anteriormente). Las muestras fueron eluidas durante 40 min y posteriormente fueron retiradas para su secado a temperatura ambiente. Finalmente, los productos generados fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV).

### **7.9 Análisis estadístico**

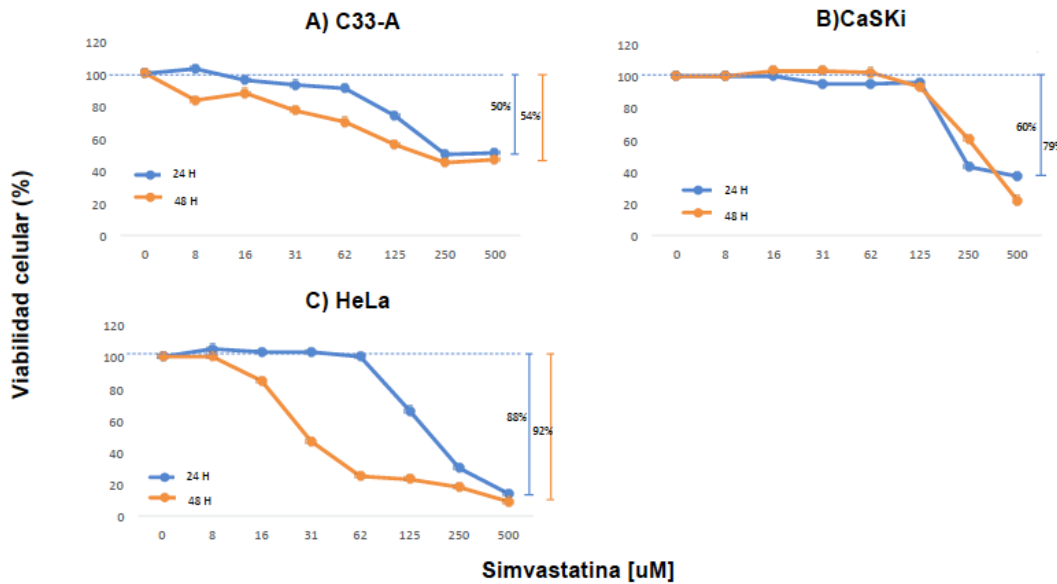
Se utilizó análisis de varianza no paramétrico empleando la prueba de Dunnett a través del software Graphpad Prisma versión 7. Cada experimento fue llevado a cabo por triplicado con tres repeticiones de manera independiente una  $P < 0.05$  fue considerada significativa. Todos los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SE.

## **8. RESULTADOS**

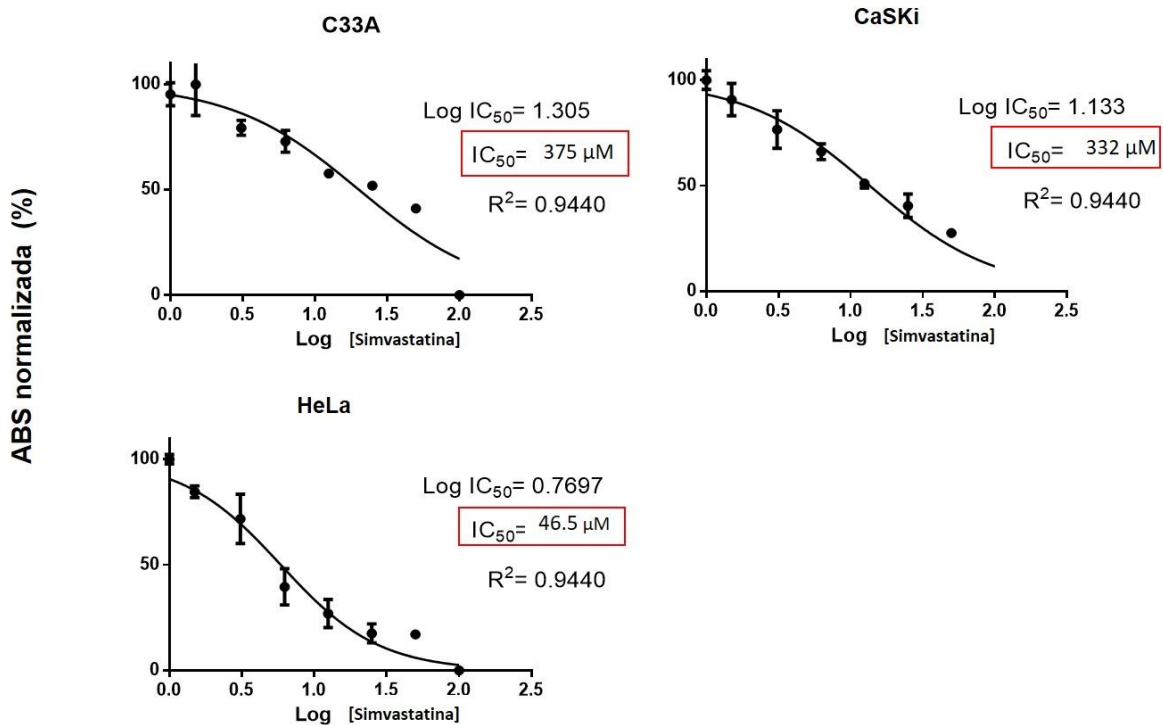
### **8.1 Simvastatina disminuyó la viabilidad de células tumorales de CaCU**

Se ha reportado que, las estatinas utilizadas como fármacos fundamentales en el tratamiento del hipercolesterolemia son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales al inducir la detención del ciclo celular y desencadenar la muerte por apoptosis (Denoyelle, 2001). Con la finalidad de analizar el efecto de simvastatina sobre la viabilidad de células tumorales de CaCU,  $1 \times 10^4$  células tumorales CaSki, HeLa y C33 fueron cultivadas durante 24 y 48 h, por triplicado, en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Costar, USA), en presencia de diferentes concentraciones de simvastatina ( $500 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$ ,  $125 \mu\text{M}$ ,  $62.5 \mu\text{M}$ ,  $31 \mu\text{M}$ ,  $15.5 \mu\text{M}$  y  $7.75 \mu\text{M}$ ) en volúmenes finales de  $100 \mu\text{L}$ . Como control negativo se utilizaron células cultivadas sólo con medio de cultivo. La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico de MTS empleando el reactivo CellTiter 96®. Los resultados obtenidos muestran que, en relación al control negativo, simvastatina disminuyó la viabilidad de las tres líneas celulares de manera dependiente de la dosis, de tal manera que el mayor porcentaje de inhibición se observó a las 48 h de cultivo empleando la concentración de  $500 \mu\text{M}$ . Bajo estas condiciones, la inhibición de la viabilidad celular en C33A, CaSki y HeLa fue de 54%, 79% y 92%, respectivamente, (Figura 4).

Por otro lado, se obtuvo el valor de la concentración de simvastatina para inhibir en 50% la viabilidad celular ( $\text{IC}_{50}$ ) de cada línea celular. Para las células C33A, CaSki y HeLa, las  $\text{IC}_{50}$  obtenidas fueron  $375 \mu\text{M}$ ,  $332 \mu\text{M}$  y  $46.5 \mu\text{M}$ , respectivamente, (Figura 5).



**Figura 4. Efecto de Simvastatina en la viabilidad de células tumorales de CaCu.**  $1 \times 10^4$  células tumorales C33-A (A), CaSKi (B) y HeLa (C) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y posteriormente tratadas a diferentes concentraciones de Simvastatina (0–500  $\mu$ M) durante 24 y 48 h (H). Se muestra el porcentaje de la viabilidad respecto al control (células sin tratamiento). Datos obtenidos de tres experimentos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Se indica la media  $\pm$  SEM.



**Figura 5. Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) de simvastatina para las líneas celulares C33A, CaSKi y HeLa.** Se muestran los valores de  $IC_{50}$  de simvastatina para las líneas celulares C33-A (A), CaSKi (B), HeLa (C), las cuales fueron obtenidas mediante el software Graphpad Prisma versión 7, utilizando los

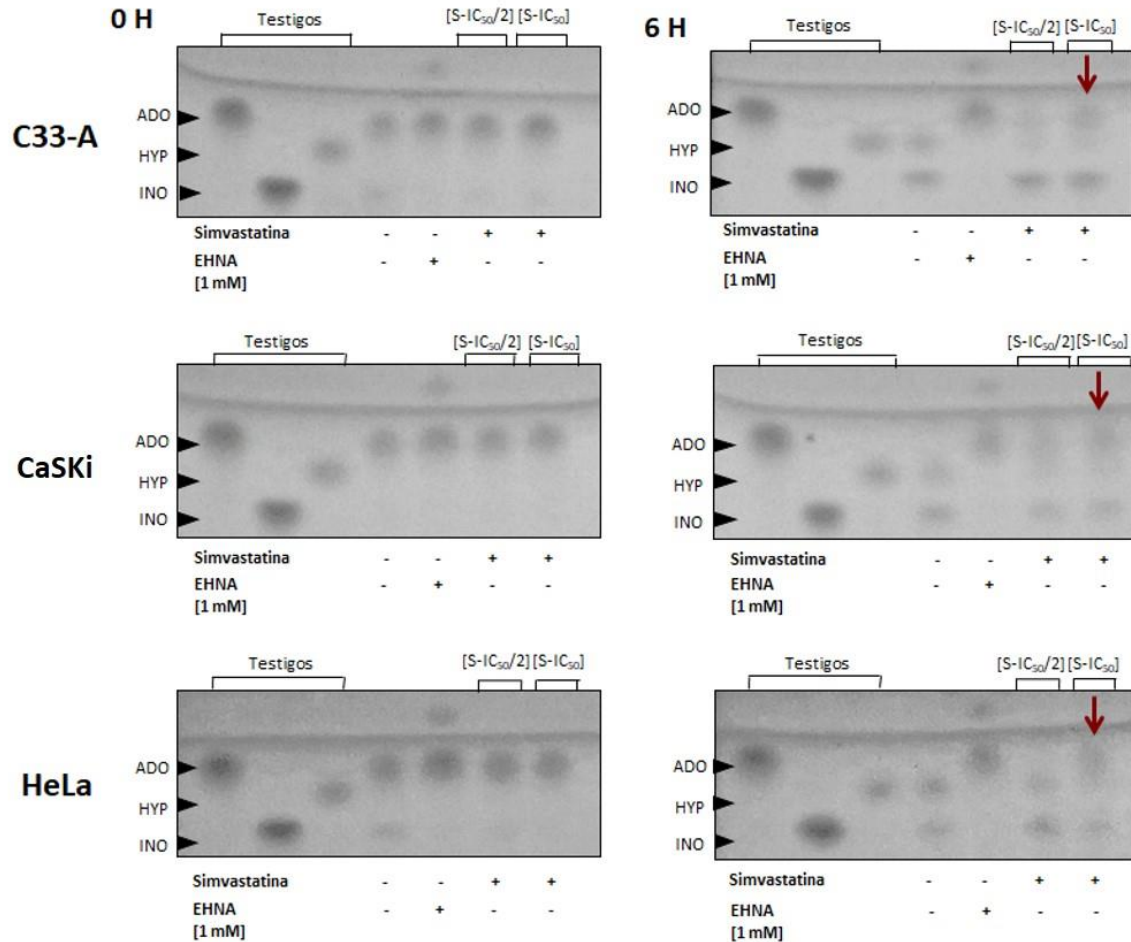


valores normalizados de los porcentajes de viabilidad y el valor logarítmico de las concentraciones [ $\mu$ M] de simvastatina. Datos obtenidos de tres experimentos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Se indica la media  $\pm$  SEM.

## **8.2 Simvastatina disminuyó parcialmente la actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCU**

Se sabe que la ADO extracelular puede unirse y activar cuatro receptores de adenosina (ARs), A1, A2A, A2B y A3, que se expresan en diferentes combinaciones en la superficie de casi todos los tipos de células, y la activación de éstos puede desencadenar múltiples procesos celulares tales como la proliferación, migración o incluso, la muerte celular (Haskó *et al.*, 2008). También se ha reportado que, la expresión de la enzima ADA puede tener un efecto protector en las células tumorales, al disminuir la concentración local de ADO, debido a la desaminación de ADO en INO (Nakajima *et al.*, 2015). Tomando en consideración que la simvastatina es capaz de disminuir la actividad de ADA plasmática (Kowalczyk *et al.*, 2008), se procedió a analizar el efecto de esta estatina sobre la actividad enzimática de ADA en las células tumorales de CaCU. Para ello, se cultivaron  $4 \times 10^5$  células C33A, CaSki y HeLa durante 48 h en presencia de la correspondiente IC<sub>50</sub> de simvastatina. Como control negativo las células fueron cultivadas únicamente con medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron recolectadas, lavadas e incubadas durante 6 h en presencia de 5mM de ADO. Como control positivo de la inhibición de ADA, se utilizó, EHNA (E), un inhibidor específico de ADA, a una concentración final de 1mM. La actividad enzimática de ADA fue monitoreada mediante CCF tomando muestras de los sobrenadantes celulares al inicio (0 h) y después de las 6 h de incubación. Los resultados muestran que las tres líneas celulares de CaCU tuvieron la capacidad de desaminar completamente la ADO en INO (Figura 6, Ctl (-)). La adición de EHNA a las células inhibió completamente la actividad enzimática de ADA, observándose solo la presencia de ADO en los sobrenadantes celulares. De manera interesante, la adición de la IC<sub>50</sub> de simvastatina, calculada para cada línea celular, inhibió de manera parcial la actividad enzimática de ADA en las células tumorales de CaCU, observándose en los sobrenadantes ADO, INO e HYP como

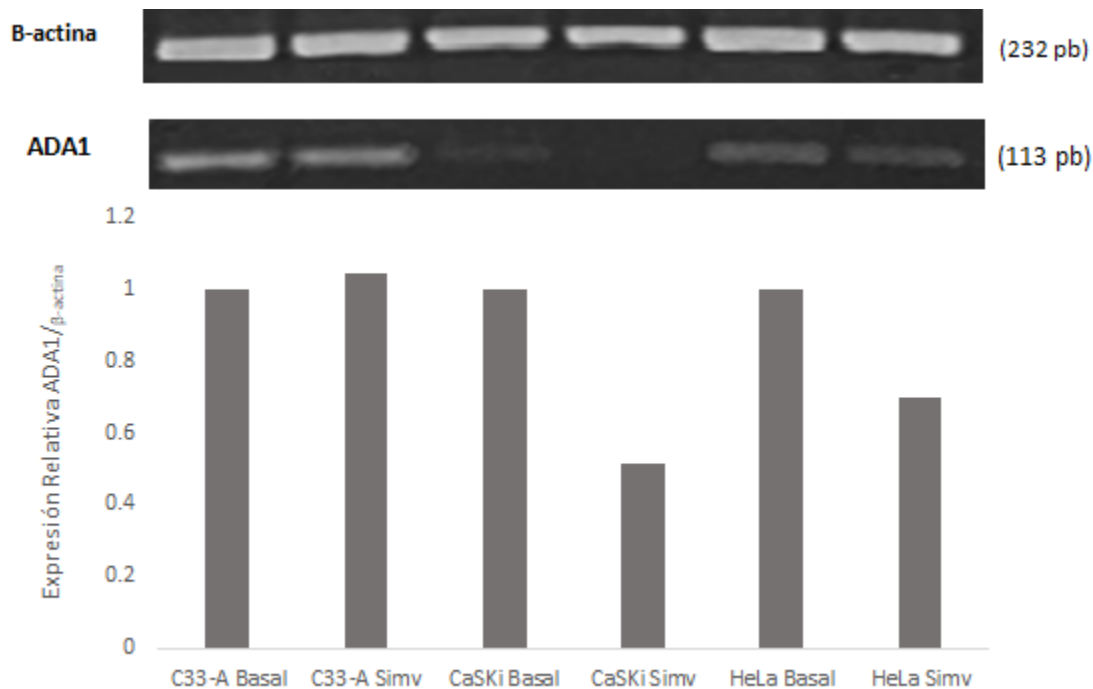
productos de la reacción (Figura 6). Es importante mencionar que al utilizar la mitad de la  $IC_{50}$  de simvastatina ( $IC_{50}/2$ ) para cada línea celular, el efecto inhibitorio de ADA fue menor (Figura 6). Estos resultados permiten sugerir que además de tener un efecto inhibitorio de la viabilidad en las células tumorales de CaCU, simvastatina tiene la capacidad de inhibir, al menos parcialmente, la actividad enzimática de ADA en las mismas.



**Figura 6. Efecto de simvastatina en la actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCU.** Células tumorales C33A, CaSki y HeLa ( $4 \times 10^5$ ) fueron cultivadas durante 48 h en presencia o ausencia de la correspondiente  $IC_{50}$  de simvastatina (S- $IC_{50}$ ) o la mitad de dicha concentración (S- $IC_{50}/2$ ) y posteriormente incubadas en presencia de ADO (5mM concentración final). La actividad enzimática de ADA fue monitoreada mediante CCF tomando muestras de los sobrenadantes celulares al inicio (0 h) y después de las 6 h de incubación. Como control positivo de la inhibición de ADA, se utilizó, EHNA (E), un inhibidor específico de ADA, a una concentración final de 1mM. Adenosina (ADO), inosina (INO) e Hipoxantina (HYP) sintéticas fueron utilizadas como marcadores de corrimiento en la CCF.

### 8.3 Simvastatina disminuyó parcialmente la expresión de ARNm de ADA en células tumorales de CaCU positivas para HPV 16 y 18

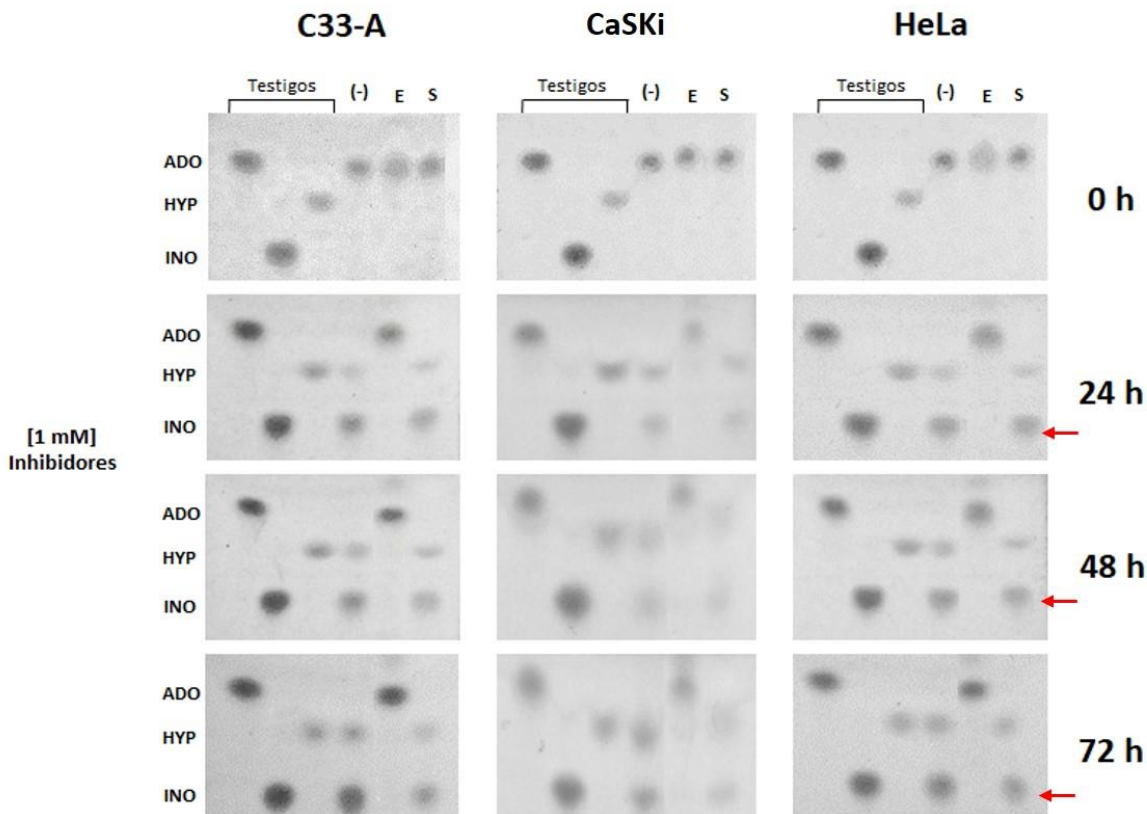
Con la finalidad de analizar el efecto de simvastatina sobre la expresión de ARNm de ADA en las células tumorales de CaCU, se realizó una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa). Para ello  $3 \times 10^6$  células de las tres líneas celulares previamente cultivadas durante 48 h en presencia o ausencia de la respectiva  $IC_{50}$  de simvastatina, fueron lisadas con TRIzol para obtener el ARNm y posteriormente se realizó la retro-transcripción a ADNc. En seguida se realizó la PCR empleando los primers específicos para ADA1 y  $\beta$ -actina, finalmente se realizó una electroforesis en agarosa al 3% para observar la expresión de las secuencias obtenidas. Los resultados mostraron que simvastatina disminuyó la expresión de ARNm de ADA en células tumorales CaSKi y HeLa en aproximadamente 50% y 30%, respectivamente, mientras que en las células C33A la expresión de ARNm de ADA no se vio afectada con el tratamiento (Figura 7). Estos resultados permiten sugerir que simvastatina puede tener un efecto inhibitorio sobre ADA, tanto a nivel de su expresión como de su actividad enzimática.



**Figura 7. Efecto de simvastatina en la expresión de ARNm de ADA en células tumorales de CaCU.** Células tumorales C33A, CaSki y HeLa ( $3 \times 10^6$ ) previamente cultivadas durante 48 h en presencia o ausencia de la correspondiente  $IC_{50}$  de simvastatina, fueron lisadas con TRizol para obtener el ARNm y posteriormente el ADNc mediante retrotranscripción. Se muestran los productos de RT-PCR de ADA-1 y  $\beta$ -actina, así como de la expresión relativa (ADA-1/ $\beta$ -actina). La expresión basal de ADA-1 para cada línea celular (en ausencia de simvastatina) fue normalizada a 1. Experimento representativo de tres realizados de manera independiente.

#### **8.4 Simvastatina no disminuyó la actividad enzimática de ADA presente en sobrenadantes de células tumorales de CaCU**

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación se demostró la presencia de sADA catalíticamente activa en sobrenadantes de cultivos de células tumorales de CaCU (Molina-Castillo, 2019). Con la finalidad de analizar el efecto de simvastatina en la actividad de sADA presente en los sobrenadantes de células tumorales de CaCU,  $2.5 \times 10^6$  células tumorales C33A, CaSki y HeLa fueron cultivadas durante 48 h en  $500 \mu\text{L}$  de medio de cultivo OPTIMEM libre de SFB. Los sobrenadantes fueron colectados y centrifugados para eliminar cualquier resto celular. Alícuotas de  $50 \mu\text{L}$  de estos sobrenadantes fueron incubados durante 0, 24, 48 y 72 h a una concentración final de 5mM de ADO (control (-)), y de ADO junto con 1mM de EHNA o 1mM de simvastatina. Mediante CCF se evidenció la capacidad de sADA para desaminar la ADO en INO y su posterior degradación a HYP. Los resultados presentados en la Figura 8 muestran que, como se ha encontrado anteriormente, los sobrenadantes de las tres líneas celulares convirtieron la ADO en INO a partir de las 24 h de incubación (controles negativos (-)); asimismo, EHNA (E) inhibió completamente la conversión de ADO a INO en los sobrenadantes de las tres líneas celulares desde el inicio del experimento. Sin embargo, después de 72 h de incubación simvastatina (S) no inhibió la actividad enzimática de sADA contenida en los sobrenadantes de las tres líneas celulares de CaCU (Figura 8).



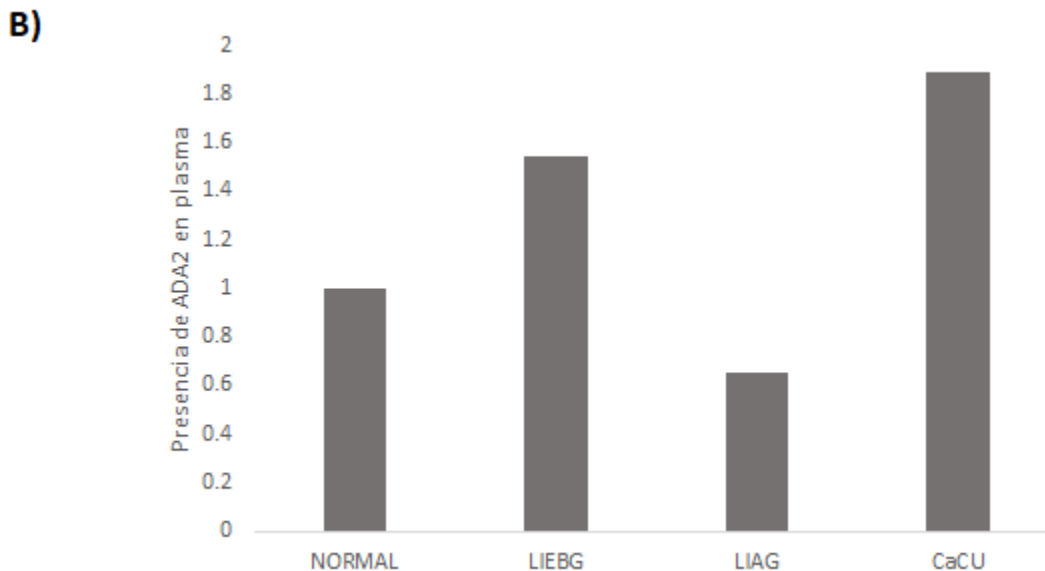
**Figura 8. Actividad enzimática de ADA soluble (sADA) en sobrenadantes de líneas celulares de CaCU.**  $2.5 \times 10^6$  de células tumorales de C33-A (A), CaSki (B) y HeLa (C), fueron cultivadas durante 48 h en 500  $\mu$ L de medio de cultivo OPTIMEM libre de SFB. Los sobrenadantes fueron colectados y centrifugados para eliminar los restos celulares. Alícuotas de 50  $\mu$ L de estos sobrenadantes fueron incubados durante 0, 24, 48 y 72 h a una concentración final de 5mM de adenosina (ADO) (control (-)), y de ADO en presencia de 1mM de EHNA (E) o 1mM de simvastatina (S). ADO, INO e HYP sintéticas fueron utilizadas como testigos de corrimiento en la CCF.

### 8.5 Detección de alto contenido de la isoforma de ADA2 en plasmas de pacientes con CaCU

Recientemente se reportó que la presencia de sADA en sueros puede ser de utilidad en el diagnóstico de pacientes con cáncer renal (Pirinççi, *et al.*, 2016). Además se ha reportado que la presencia de sADA2 en plasma de pacientes con cáncer se correlaciona con el grado de avance del tumor (Roberts *et al.*, 2012). Tomando en consideración que células de CaCU son capaces de producir sADA, se procedió a analizar la presencia de esta enzima en plasmas de pacientes con CaCU. Para ello, 50  $\mu$ g de proteína total de muestras de plasmas de pacientes con diferentes etapas

de la enfermedad (LIEBG, LIEAG y CaCU), así como de donadoras normales (Normal), fueron analizadas mediante la técnica de Western Blot utilizando un anticuerpo que reconoce ambas isoformas de ADA (ADA1 y ADA2). Al revelar las proteínas del Western Blot, se observaron bandas de 41 kDa y 70 kDa (correspondiente al peso de ADA1), y de 114 kDa (correspondiente al peso de ADA2), (Figura 9A). Cabe mencionar que el análisis densitométrico de las bandas de 114 kDa, reveló que los plasmas de pacientes con CaCU presentaron más de dos veces la cantidad de esta proteína en relación a la contenida en los plasmas de las donadoras normales y de las pacientes con LIEAG (Figura 9B). Por otro lado, es importante mencionar que la banda de 41 kDa fue detectada únicamente en los plasmas de pacientes con CaCU (Figura 9A).



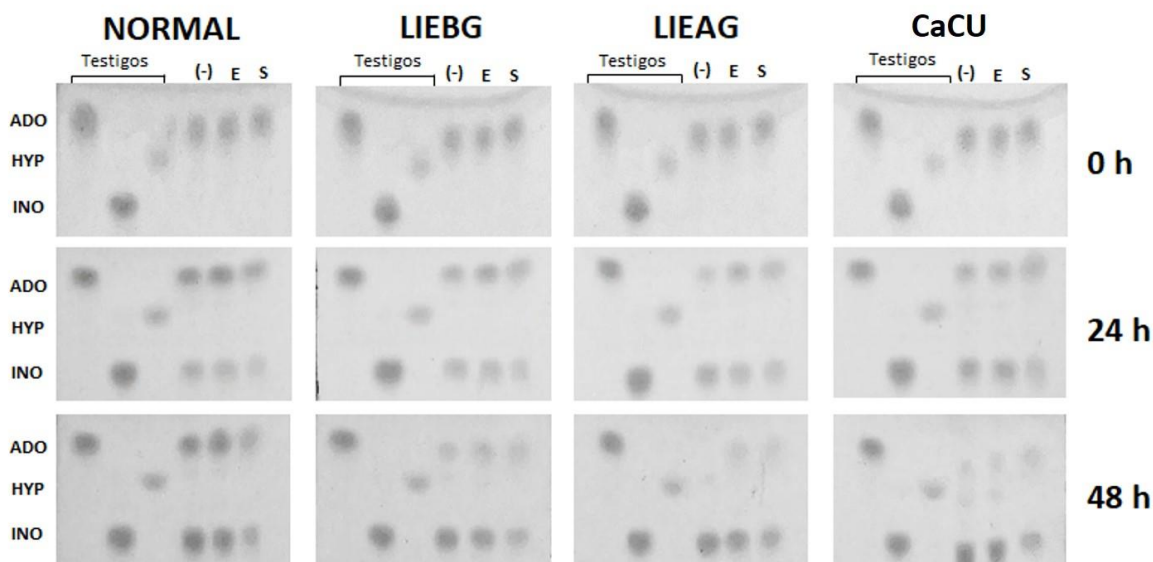


**Figura 9. Presencia de ADA en plasmas de pacientes con CaCU.** Muestras plasmáticas (50 $\mu$ g) de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y cáncer cérvico-uterino (CaCU), así como de donadoras normales sin infección por VPH (Normal) fueron analizadas mediante la técnica de Western Blot para detectar la presencia de ADA1 y ADA2 utilizando un anticuerpo que reconoce ambas isoformas. A) Se muestra la presencia de bandas de 41 kDa y 70 kDa (correspondiente al peso de ADA1), y de 114 kDa (correspondientes al peso de ADA2). B) Se muestran las lecturas obtenidas del análisis densitométrico de ADA2 (unidades arbitrarias) de las bandas de proteína de las diferentes muestras analizadas. Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

### **8.6 Simvastatina no tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de sADA presente en plasmas de los diferentes estadios de CaCU**

Con la finalidad de analizar el efecto de simvastatina en la actividad de sADA contenida en los plasmas de pacientes con diferentes etapas del CaCU y de donadoras normales, 3 $\mu$ L de cada una de las mezclas plasmáticas (Normal, LIEBG, LIEAG y CaCU) fueron incubadas durante 48 h a una concentración final de 5mM de ADO (control (-)), y de ADO en presencia de 1mM de EHNA o 1mM de simvastatina. Mediante CCF se evidenció la capacidad de sADA para convertir la ADO en INO e HYP. De manera interesante se pudo observar una diferencia importante en la velocidad de conversión de ADO a INO entre los plasmas de los pacientes con LIEAG y CaCU respecto a los plasmas de las donadoras normales y pacientes con LIEBG, ya que a las 48 h de incubación los plasmas de las pacientes

con LIEAG y CaCU convirtieron casi completamente la ADO en INO e HYP, mientras que los plasmas de mujeres normales y LIEBG tuvieron una conversión parcial de ADO a INO (Figura 10). Estos resultados sugieren que la cantidad ADA enzimáticamente activa incrementa notablemente con el grado de avance de la enfermedad.



**Figura 10. Actividad enzimática de ADA soluble (sADA) en plasmas de pacientes con CaCU.** Muestras plasmáticas (3 $\mu$ L) de pacientes con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG), lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y cáncer c $\acute$ ervico-uterino (CaCU), así como de donadoras normales (Normal) fueron incubados durante 0, 24 y 48 h en presencia de 5mM de adenosina (ADO) (concentraci3n final) (control (-)), y de ADO en presencia de 1mM de EHNA (E) o 1mM de simvastatina (S). Se muestra mediante CCF, la conversi3n de ADO a inosina (INO) por sADA y la generaci3n de Hipoxantina (HYP) como productos de la reacci3n. ADO, INO e HYP sint $\acute$ ticas fueron utilizadas como testigos de corrimiento en la CCF.

## 9. DISCUSI3N

La ADA es considerada como una enzima crucial en la limpieza del metabolismo de las purinas, debido a que regula las concentraciones intra y extracelulares de ADO, al convertirla en INO (Moreno *et al.*, 2018). Se sabe que ADO es una purina antiinflamatoria que regula numerosas funciones fisiol3gicas al interactuar con sus receptores acoplados a prote $\acute$ inas G (Fredholm *et al.*, 2011). En consecuencia, la actividad de ADA puede tener efectos pro o antiinflamatorios en tejidos dependiendo



de cuánto tiempo haya pasado desde el comienzo de la lesión (Park & Gupta, 2012). También se sabe que las concentraciones de ADA incrementan en diferentes enfermedades y que esta enzima puede desaminar a análogos de ADO que se usan en quimioterapia y otros tratamientos (Glazer, 1980; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017), lo cual puede alterar o comprometer su actividad y especificidad. Por tanto, estas actividades hacen que ADA sea un blanco terapéutico potencial para tratamiento de diversas enfermedades (Cortés *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015).

Por otro lado, las estatinas son fármacos ampliamente utilizados en el control de la hipercolesterolemia, debido a la propiedad de inhibir la formación de mevalonato, un precursor del colesterol, además de los isoprenoides, ambos compuestos necesarios para la proliferación celular (Duncan *et al.*, 2004). Además, recientemente se ha reportado que simvastatina, una estatina lipofílica, es capaz de inhibir la actividad de ADA (Kowalczyk *et al.*, 2008). En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se reportó que células tumorales de CaCU presentan actividad de ADA (Ávila-Ibarra, 2011, Ávila-Ibarra, 2014) y son capaces de liberar sADA activa en los sobrenadantes celulares (Molina-Castillo, 2019). Por lo que el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de simvastatina sobre la expresión y actividad funcional de ADA, así como en la viabilidad de células tumorales de CaCU.

Inicialmente se analizó el efecto de simvastatina sobre la viabilidad de células tumorales de CaCU, encontrándose un efecto inhibitorio de ésta en las células C33A, CaSki y HeLa de manera dependiente de la dosis. Estos resultados se encuentran acorde con los obtenidos por Crescencio y colaboradores en 2009, quienes al evaluar el efecto de varias estatinas en la proliferación de células tumorales de CaCU, encontraron que simvastatina fue el inhibidor más efectivo de la proliferación de las células tumorales de CaCU. Además, sugirieron que la inhibición de la vía del mevalonato no es la única en la cual las estatinas pueden interferir, por lo que otros metabolitos podrían tener un papel importante en la inhibición de la proliferación celular inducida por la simvastatina en las células de CaCU. En este contexto, Nakajima y colaboradores en 2015 encontraron que la

inhibición de ADA con EHNA indujo apoptosis en células de mesotelioma maligno como consecuencia del incremento de ADO intracelular y activación de la cinasa dependiente de AMP (AMPK). Por lo que, se consideró que ésta podría la vía por la cual simvastatina podría inhibir la viabilidad de las células tumorales de CaCU.

Para corroborarlo, las células tumorales C33A, CaSki y HeLa fueron cultivadas en presencia de su correspondiente  $IC_{50}$  de simvastatina, observándose que esta estatina inhibió, al menos de manera parcial, la expresión de ARNm de ADA en las células CaSki (50%) y HeLa (30%), mientras que en la línea celular C33A, no se observó inhibición en la expresión de ARNm de ADA. Este efecto puede estar relacionado con el nivel de expresión de ARNm de ADA detectado en las líneas celulares, observándose que CaSki fue la que mostró la menor expresión y C33A la mayor expresión de ARNm de ADA. De hecho, estos resultados concuerdan con los contenidos de la proteína ADA detectados en un estudio previo (Monroy-Mora A, 2019), en donde se encontró que la línea C33A presentó la mayor cantidad de ADA, tanto de manera intracelular como extracelular, respecto a las líneas HeLa y CaSki. No obstante, en este estudio también encontramos que las  $IC_{50}$  de simvastatina fueron capaces de inhibir parcialmente la actividad de ADA en las tres líneas celulares, por lo que probablemente se requiera de mayor concentración de esta estatina para inhibir en mayor porcentaje la síntesis de ARNm de ADA en estas líneas celulares y, por tanto, para abatir su actividad.

Por otro lado, se observó que los sobrenadantes de las tres líneas celulares tuvieron la capacidad de convertir ADO en INO, la cual fue inhibida cuando EHNA fue adicionada a los sobrenadantes, un inhibidor específico de ADA1 (Niedzwicki *et al.*, 1991), lo cual sugiere que la actividad de ADA presente en los sobrenadantes de estas células se deba principalmente a ADA1. No obstante, se observó que simvastatina no tuvo efecto inhibitorio sobre la actividad de ADA de los sobrenadantes, sin embargo será conveniente analizar si se requiere de mayor concentración de esta estatina para inhibir la actividad de ADA soluble, o si el efecto de simvastatina solo afecta la producción de ADA en las células tumorales de CaCU.

Por otra parte, al analizar la presencia de ADA en plasmas de pacientes con CaCU, mediante ensayos de Western Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que detecta un epítipo de 28 aa presente tanto en ADA1 como en ADA2, se pudo detectar la presencia de 3 diferentes bandas de aproximadamente 114 kDa, 70 kDa y 41 kDa de peso, y una banda tenue aproximadamente de 50 kDa. Se ha reportado que la forma monomérica de ADA1 o forma pequeña pesa entre 33-41 kDa, y las formas hetero-oligoméricas o forma grande, compuestas por dos subunidades ADA1 y la glicoproteína homodimérica CD26, pueden pesar más de 200kDa (Tsuboi *et al.*, 1995; Franco *et al.*, 1997). Mientras que la isoenzima ADA2, corresponde a una proteína de aproximadamente 110 kDa (Zavialov & Engström, 2005). De manera interesante, se encontró que las tres bandas de proteínas se presentaron con mayor intensidad en los plasmas de pacientes con CaCU. De hecho, la mayor cantidad de ADA2 se detectó en los plasmas de pacientes con CaCU en relación a los plasmas de pacientes con etapas menos avanzadas de la enfermedad y concordó con una mayor capacidad para convertir ADO en INO, sugiriendo que la producción de ADA1 y ADA2 incrementa en estas pacientes. De hecho, observamos que la actividad de ADA fue mayor en los plasmas derivados de las pacientes con etapas más avanzadas de la enfermedad. Es importante mencionar que los plasmas de pacientes con LIEBG aparentemente mostraron mayor contenido de ADA2 que los de pacientes con LIEAG, lo cual pueda estar asociado con la respuesta inmune inflamatoria típica de las lesiones precursoras, en donde la activación de los monocitos (principales productores de ADA2) sean los que liberen a esta enzima (Iwaki-Egawa *et al.*, 2006). Por otro lado, la banda tenue de aproximadamente 50 kDa, detectada esencialmente en los plasmas de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCU, probablemente corresponda a alguna otra isoforma de ADA generada en menor proporción que la de ADA1 y ADA2 en estos pacientes, debido a que se ha asociado alto grado de polimorfismo en el gen de ADA1 en el desarrollo de varias enfermedades (Salehabadi *et al.*, 2016).

Por otro lado, a diferencia de ADA1, ADA2 es una enzima que se localiza en el espacio extracelular y se ha visto que coexiste con ADA1 solo en monocitos-macrófagos. De hecho, la producción de ADA2 por los macrófagos aumenta en

respuesta a una infección por microorganismos intracelulares (Gakis, 1996). Tomando en consideración que la infección por HPV es un factor relevante en la fisiopatología del CaCU (Doorbar & Griffin 2019), y basándonos en los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible sugerir la hipótesis de que la infección por HPV en estas pacientes pudiera ser un factor condicionante en la producción de ADA2, y por tanto considerar a ADA2 como un biomarcador interesante en el seguimiento de estas pacientes, tal como se ha observado en pacientes que cursan diferentes enfermedades incluyendo cáncer (Iwaki-Egawa *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2012; Yurt *et al.*, 2014; Kutryb-Zajac *et al.*, 2016). Por lo que, estudios posteriores en los cuales se analice el contenido de ADA2 en un mayor número de pacientes de cada una de las etapas de desarrollo del CaCU, será indispensable para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, el uso de inhibidores de ADA en el tratamiento del cáncer ha sido muy limitado, sobre todo en su aplicación clínica. Por ejemplo, se ha observado que 2'-desoxiadenosina (análogo de adenosina) es capaz de inhibir la proliferación de células de leucemia y linfoma (Honma, 2001; Johnston 2011); EHNA, es capaz de inducir apoptosis de células de mesotelioma pleural maligno, una enfermedad contra la cual no se ha encontrado tratamiento efectivo hasta el momento (Nakajima *et al.*, 2015); pentostatina (un fuerte inhibidor de la ADA) y la cladribina (el derivado clorado de desoxiadenosina) son muy eficientes en el tratamiento de la leucemia de células pilosas (Piro *et al.*, 1990; Johnston 2011). Sin embargo, la mayoría de los inhibidores de ADA producen fuertes efectos adversos en los pacientes tratados, además de baja estabilidad química, farmacocinética deficiente y un metabolismo rápido (Terasaka *et al.*, 2004; Grever, 2011; Johnston, 2011). En consecuencia, hay un interés continuo en la búsqueda de inhibidores de ADA más estables, fácilmente reversibles, de acción corta y de baja toxicidad. Actualmente, solo los análogos de purina, tal como la pentostatina y cladribina (2-chlorodeoxyadenosine: CdA) han recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de la leucemia de células pilosas, aunque su mecanismo de acción preciso en esta enfermedad aún permanece desconocido (Grever, 2011; Johnston, 2011). El presente estudio es el primero en demostrar que simvastatina,

además de inhibir la proliferación, es capaz de inhibir la expresión y actividad enzimática de ADA en las células tumorales de CaCU. Por tanto, si ADA controla los niveles de ADO que señalizan a las células tumorales y las protege de la citotoxicidad inducida por este nucleósido, entonces la inhibición de la producción de ADA, y/o de su actividad, durante el desarrollo del CaCU, podría ser potencialmente una estrategia terapéutica para esta enfermedad.

## 10. CONCLUSIONES

Simvastatina inhibió la proliferación de células tumorales de CaCU de manera dependiente de la dosis, la IC<sub>50</sub> fue de 375mM para C33A, 332mM para CaSki y 46.5mM para HeLa.

Las células C33A, CaSki y HeLa tratadas con la correspondiente IC<sub>50</sub> de simvastatina mostraron una disminución de la actividad enzimática de ADA. Además, simvastatina disminuyó la expresión de ARNm de ADA en CaSki (50%) y HeLa (30%).

Los sobrenadantes de las células C33A, CaSki y HeLa mostraron actividad enzimática de ADA, la cual fue inhibida por EHNA, pero no por simvastatina.

Plasmas de pacientes con CaCU presentaron fuerte actividad enzimática de ADA y ésta aparentemente incrementó en relación a la etapa de desarrollo del CaCU (Normal<LIEBG<LIEAG<CaCU).

Se reveló la presencia de proteínas de aproximadamente 41 kDa y 70 kDa (correspondiente al peso molecular de ADA1) y un alto contenido 114 kDa (correspondiente al peso molecular de ADA2) en plasmas de pacientes con etapas avanzadas de CaCU.

Simvastatina no inhibió la actividad enzimática de ADA contenida en los plasmas de pacientes con diferentes etapas de desarrollo de CaCU.

## **11. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO**

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, resulta de interés caracterizar en futuros estudios, si ambas isoformas de ADA (ADA1 y ADA2) son expresadas y liberadas como sADA por las células tumorales de CaCU. Asimismo, resultará relevante caracterizar las isoformas de sADA encontradas en los plasmas de pacientes con CaCU y determinar sus contenidos en un mayor número de muestras plasmáticas, lo cual aportará datos importantes para considerar su utilidad como un potencial biomarcador asociado con el desarrollo de esta enfermedad.

Por otro lado, será importante conocer la capacidad de simvastatina para inhibir tanto la expresión como la actividad enzimática de ADA1 y ADA2 en células tumorales de CaCU, y desarrollar ensayos experimentales para evaluar la estabilidad, actividad, reversibilidad y toxicidad de simvastatina como inhibidor de ADA en modelos experimentales desarrollados tanto *in vitro* como *in vivo*.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Adanin, S., Yalovetskiy, I., Nardulli, B., Sam, A., Jonjev, Ž., & Law, W. (2002). Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*, 282(5), R1324-R1332. doi: 10.1152/ajpregu.00373.2001.
- Aghaei, M., Karami-Tehrani, F., Salami, S., & Atri, M. (2010). Diagnostic Value of Adenosine Deaminase Activity in Benign and Malignant Breast Tumors. *Archives Of Medical Research*, 41(1), 14-18. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.10.012.
- Ahern, T., Pedersen, L., Tarp, M., Cronin-Fenton, D., Garne, J., & Silliman, R. et al. (2011). Statin Prescriptions and Breast Cancer Recurrence Risk: A Danish Nationwide Prospective Cohort Study. *JNCI Journal Of The National Cancer Institute*, 103(19), 1461-1468. doi: 10.1093/jnci/djr291.
- Allard, B., Beavis, P., Darcy, P., & Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current Opinion In Pharmacology*, 29, 7-16. doi: 10.1016/j.coph.2016.04.001.
- Alsheikh-Ali, A., Trikalinos, T., Kent, D., & Karas, R. (2008). Statins, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Risk of Cancer. *Journal Of The American College Of Cardiology*, 52(14), 1141-1147. doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.037.
- Antonioli, L., Colucci, R., La Motta, C., Tuccori, M., Awwad, O., & Da Settimo, F. et al. (2012). Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. *Current Drug Targets*, 13(6), 842-862. doi: 10.2174/138945012800564095.
- Antonioli, L., Colucci, R., Pellegrini, C., Giustarini, G., Sacco, D., & Tirota, E. et al. (2015). The AMPK enzyme-complex: from the regulation of cellular energy homeostasis to a possible new molecular target in the management of chronic inflammatory disorders. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, 20(2), 179-191. doi: 10.1517/14728222.2016.1086752.
- Antonioli, L., Csóka, B., Fornai, M., Colucci, R., Kókai, E., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2014). Adenosine and inflammation: what's new on the horizon?. *Drug Discovery Today*, 19(8), 1051-1068. doi: 10.1016/j.drudis.2014.02.010.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends In Molecular Medicine*, 19(6), 355-367. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005.
- Ávila-Ibarra, L.R. (2011). Análisis de la actividad funcional de la 5'-ectonucleotidasas CD73 (EC3.1.3.5) en líneas celulares tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura. UNAM. México, D.F.

- Ávila-Ibarra, L.R. (2014). Análisis funcional de la vía adenosinérgica (CD39/CD73/Adenosina) como mecanismo inmunosupresor en células tumorales de cáncer de cuello uterino. Tesis de Maestría. UNAM. México. D.F.
- Bagheri, S., Saboury, A., & Haertlé, T. (2019). Adenosine deaminase inhibition. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 141, 1246-1257. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.078.
- Bahreyni, A., Samani, S., Ghorbani, E., Rahmani, F., khayami, R., & Toroghian, Y. et al. (2017). Adenosine: An endogenous mediator in the pathogenesis of gynecological cancer. *Journal Of Cellular Physiology*, 233(4), 2715-2722. doi: 10.1002/jcp.26056.
- Benedet, J. (2000). Progress in gynecologic cancer detection and treatment. *International Journal Of Gynecology & Obstetrics*, 70(1), 135-147. doi: 10.1016/s0020-7292(00)00232-0.
- Boison, D., & Yegutkin, G. (2019). Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 36(6), 582-596. doi: 10.1016/j.ccell.2019.10.007.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & 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. doi: 10.3322/caac.21492.
- Cortés, A., Gracia, E., Moreno, E., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E., & Casadó, V. (2014). Moonlighting Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. *Medicinal Research Reviews*, 35(1), 85-125. doi: 10.1002/med.21324.
- Crescencio, M., Rodríguez, E., Páez, A., Masso, F., Montañó, L., & López-Marure, R. (2009). Statins inhibit the proliferation and induce cell death of human papilloma virus positive and negative cervical cancer cells. *International Journal Of Biomedical Science*, 4, 411-420.
- Denoyelle, C. (2001). Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*, 22(8), 1139-1148. doi: 10.1093/carcin/22.8.1139.
- Doorbar, J., & Griffin, H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research*, 7, 176-179. doi: 10.1016/j.pvr.2019.04.005.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I., Stoler, M., Broker, T., & Stanley, M. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Duncan, R., Lau, D., El-Sohehy, A., & Archer, M. (2004). Geraniol and  $\beta$ -ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochemical Pharmacology*, 68(9), 1739-1747. doi: 10.1016/j.bcp.2004.06.022.



- Ervik M., Lam F., Ferlay J., Meryy L., Soerjomataram I., & Bray F. (2016). Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>, accessed [15/06/2019].
- Faas, M., Sáez, T., & de Vos, P. (2017). Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?. *Molecular Aspects Of Medicine*, 55, 9-19. doi: 10.1016/j.mam.2017.01.002.
- Flinn, A., & Gennery, A. (2018). Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet Journal Of Rare Diseases*, 13(1). doi: 10.1186/s13023-018-0807-5.
- Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E., & Lluís, C. (1997). Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. *Progress In Neurobiology*, 52(4), 283-294. doi: 10.1016/s0301-0082(97)00013-0.
- Fredholm, B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 1315-1323. doi: 10.1038/sj.cdd.4402132.
- Fredholm, B., IJzerman, A., Jacobson, K., Linden, J., & Müller, C. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 1-34. doi: 10.1124/pr.110.003285.
- Gakis, C. (1996). Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *European Respiratory Journal*, 9(4), 632-633. doi: 10.1183/09031936.96.09040632.
- Giuliani, P., Zuccarini, M., Buccella, S., Peña-Altamira, L., Polazzi, E., & Virgili, M. et al. (2017). Evidence for purine nucleoside phosphorylase (PNP) release from rat C6 glioma cells. *Journal Of Neurochemistry*, 141(2), 208-221. doi: 10.1111/jnc.14004.
- Glazer, R. (1980). Adenosine deaminase inhibitors: Their role in chemotherapy and immunosuppression. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, 4(4). doi: 10.1007/bf00255266.
- Grever, M. (2011). Hairy cell leukemia: a successful model for experimental therapeutics—pentostatin and new ideas. *Leukemia & Lymphoma*, 52(sup2), 25-28. doi: 10.3109/10428194.2011.577851.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 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. doi: 10.1038/nrd2638.

- Honma, Y. (2001). A Novel Therapeutic Strategy Against Monocytic Leukemia with Deoxyadenosine Analogs and Adenosine Deaminase Inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, 42(5), 953-962. doi: 10.3109/10428190109097714.
- Iannelli, F., Lombardi, R., Milone, M., Pucci, B., De Rienzo, S., Budillon, A., & Bruzzese, F. (2018). Targeting Mevalonate Pathway in Cancer Treatment: Repurposing of Statins. *Recent Patents On Anti-Cancer Drug Discovery*, 13(2), 184-200. doi: 10.2174/1574892812666171129141211.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2015. Accesado (20/08/2018), disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.
- Insinga, R., Perez, G., Wheeler, C., Koutsky, L., Garland, S., & Leodolter, S. et al. (2011). Incident Cervical HPV Infections in Young Women: Transition Probabilities for CIN and Infection Clearance. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20(2), 287-296. doi: 10.1158/1055-9965.epi-10-0791
- Iwaki-Egawa, S., Yamamoto, T., & Watanabe, Y. (2006). Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. *Biological Chemistry*, 387(3), 319-321. doi: 10.1515/bc.2006.042.
- Johnston, J. (2011). Mechanism of Action of Pentostatin and Cladribine in Hairy Cell Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 52(sup2), 43-45. doi: 10.3109/10428194.2011.570394.
- Juliusson, G., & Liliemark, J. (2006). Purine Analogues: Rationale for Development, Mechanisms of Action, and Pharmacokinetics in Hairy Cell Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics Of North America*, 20(5), 1087-1097. doi: 10.1016/j.hoc.2006.06.007.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., y Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. W.H. Freeman.
- Kinoshita, T., Tada, T., & Nakanishi, I. (2008). Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 373(1), 53-57. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.180.
- Kowalczyk, E., Kopff, M., Kowalski, J., Kopff, A., Mikhailidis, D., Barylski, M., & Banach, M. (2008). Effect of Cardiovascular Drugs on Adenosine Deaminase Activity. *Angiology*, 59(6), 740-744. doi: 10.1177/0003319708323495.
- Kraut, E., Neff, J., Bouroncle, B., Gochnour, D., & Grever, M. (1990). Immunosuppressive effects of pentostatin. *Journal Of Clinical Oncology*, 8(5), 848-855. doi: 10.1200/jco.1990.8.5.848.
- Kutryb-Zajac, B., Mateuszuk, L., Zukowska, P., Jaształ, A., Zabielska, M., & Toczek, M. et al. (2016). Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovascular Research*, 112(2), 590-605. doi: 10.1093/cvr/cvw203.

- Li, G., Nakagome, I., Hirono, S., Itoh, T., & Fujiwara, R. (2015). Inhibition of adenosine deaminase (ADA)-mediated metabolism of cordycepin by natural substances. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(2), e00121. doi: 10.1002/prp2.121.
- Liu, H., & Xia, Y. (2015). Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *Journal Of Applied Physiology*, 119(10), 1173-1182. doi: 10.1152/jappphysiol.00350.2015.
- Martens, J., Smedts, F., Ploeger, D., Helmerhorst, T., Ramaekers, F., Arends, J., & Hopman, A. (2009). Distribution Pattern and Marker Profile Show Two Subpopulations of Reserve Cells in the Endocervical Canal. *International Journal Of Gynecological Pathology*, 28(4), 381-388. doi: 10.1097/pgp.0b013e31819932f8.
- Mistry, D., Chambers, M., & Mason, R. (2006). The role of adenosine in chondrocyte death in murine osteoarthritis and in a murine chondrocyte cell line. *Osteoarthritis And Cartilage*, 14(5), 486-495. doi: 10.1016/j.joca.2005.11.015.
- Molina-Castillo, G. (2019). Efecto de TGF $\beta$ , INF- $\beta$ , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino. Tesis de Maestría. UNAM. México, D.F.
- Monroy M. A. (2019). Efecto de la inhibición de adenosina deaminasa (ADA) en la proliferación y viabilidad de células tumorales de cáncer cérvico-uterino. Tesis Licenciatura. UNAM. México.
- Moreno, E., Canet, J., Gracia, E., Lluís, C., Mallol, J., & Canela, E. et al. (2018). Molecular Evidence of Adenosine Deaminase Linking Adenosine A2A Receptor and CD26 Proteins. *Frontiers In Pharmacology*, 9. doi: 10.3389/fphar.2018.00106.
- Muller-Haegeler, S., Muller, L., & Whiteside, T. (2014). Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert Review Of Clinical Immunology*, 10(7), 897-914. doi: 10.1586/1744666x.2014.915739.
- Nakajima, Y., Kanno, T., Nagaya, T., Kuribayashi, K., Nakano, T., Gotoh, A., & Nishizaki, T. (2015). Adenosine Deaminase Inhibitor EHNA Exhibits a Potent Anticancer Effect Against Malignant Pleural Mesothelioma. *Cellular Physiology And Biochemistry*, 35(1), 51-60. doi: 10.1159/000369674.
- Niedzwicki, J., Kouttab, N., Mayer, K., Carpenter, C., Parks, R., Abushanab, E., & Abernethy, D. (1991). Plasma adenosine deaminase 2: a marker for human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2(4), 178-182.
- Pacheco, R., Martinez-Navio, J., Lejeune, M., Climent, N., Oliva, H., & Gatell, J. et al. (2005). CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(27), 9583-9588. doi: 10.1073/pnas.0501050102.
- Parham, P. (2011). *El sistema inmune*. 3ª edición. México: Manual Moderno.

- Park, J., & Gupta, R. (2012). Adenosine Metabolism, Adenosine Kinase, and Evolution. *Adenosine*, 23-54. doi: 10.1007/978-1-4614-3903-5\_2.
- Pirinççi, N., Kaya, T., Kaba, M., Ozan, T., Geçit, İ., & Özveren, H. et al. (2016). Serum adenosine deaminase, catalase, and carbonic anhydrase activities in patients with renal cell carcinoma. *Redox Report*, 22(6), 252-256. doi: 10.1080/13510002.2016.1207364.
- Piro, L., Carrera, C., Carson, D., & Beutler, E. (1990). Lasting Remissions in Hairy-Cell Leukemia Induced by a Single Infusion of 2-Chlorodeoxyadenosine. *New England Journal Of Medicine*, 322(16), 1117-1121. doi: 10.1056/nejm199004193221605.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413-92. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289>.
- Reayi, A., & Hosmane, R. (2004). Inhibition of Adenosine Deaminase by Novel 5:7 Fused Heterocycles Containing the Imidazo[4,5-e][1,2,4]triazepine Ring System: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 47(4), 1044-1050. doi: 10.1021/jm0304257.
- Reich, O., & Regauer, S. (2017). Thin HSIL of the Cervix. *International Journal Of Gynecological Pathology*, 36(1), 71-75. doi: 10.1097/pgp.0000000000000311.
- Roberts, E., & Roberts, O. (2012). Plasma adenosine deaminase isoform 2 in cancer patients undergoing chemotherapy. *British Journal Of Biomedical Science*, 69(1), 11-13. doi: 10.1080/09674845.2012.11669915.
- Romanowska, M., Ostrowska, M., & Komoszyński, M. (2007). Adenosine ecto-deaminase (ecto-ADA) from porcine cerebral cortex synaptic membrane. *Brain Research*, 1156, 1-8. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.037.
- Sadeghi, M., Collinge, M., Pardi, R., & Bender, J. (2000). Simvastatin Modulates Cytokine-Mediated Endothelial Cell Adhesion Molecule Induction: Involvement of an Inhibitory G Protein. *The Journal Of Immunology*, 165(5), 2712-2718. doi: 10.4049/jimmunol.165.5.2712.
- Salehabadi, M., Farimani, M., Tavilani, H., Ghorbani, M., Poormonsefi, F., & Poorolajal, J. et al. (2016). Association of G22A and A4223C ADA1 gene polymorphisms and ADA activity with PCOS. *Systems Biology In Reproductive Medicine*, 62(3), 213-222. doi: 10.3109/19396368.2016.1143055
- Sauter, C., Lamanna, N., & Weiss, M. (2008). Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, 4(9), 1217-1222. doi: 10.1517/17425255.4.9.1217.
- Silva, A. da., Santurio, J., Roza, L., Bottari, N., Galli, G., Morsch, V., Schetinger, M. R. C., Baldissera, M. D., Stefani, L. M., Radavelli, W. M., Tomasi, T., & Boiago, M. M. (2017). Aflatoxins produced by

Monroy-Mora, K.A.

Aspergillus parasiticus present in the diet of quails increase the activities of cholinesterase and adenosine deaminase. *Microbial Pathogenesis*, 107, 309-312. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.041.

Sopková, J., Vidomanová, E., Strnádel, J., Škovierová, H., & Halašová, E. (2017). The role of statins as therapeutic agents in cancer. *General Physiology And Biophysics*, 36(05), 501-511. doi: 10.4149/gpb\_2017045.

Terasaka, T. (2005). Non-nucleoside adenosine deaminase inhibitors: 2000 – 2004. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*, 15(7), 817-828. doi: 10.1517/13543776.15.7.817.

Terasaka, T., Kinoshita, T., Kuno, M., & Nakanishi, I. (2004). A Highly Potent Non-Nucleoside Adenosine Deaminase Inhibitor: Efficient Drug Discovery by Intentional Lead Hybridization. *Journal Of The American Chemical Society*, 126(1), 34-35. doi: 10.1021/ja038606l.

Torgutalp, M., Efe, C., Babaoglu, H., & Kav, T. (2017). Relationship between serum adenosine deaminase levels and liver histology in autoimmune hepatitis. *World Journal Of Gastroenterology*, 23(21), 3876. doi: 10.3748/wjg.v23.i21.3876.

Trincavelli, M. (2013). Unveiling the binding mode of adenosine deaminase inhibitors to the active site of the enzyme: implication for rational drug design. *Purinergic Signalling*, 9(1), 1-3. doi: 10.1007/s11302-013-9353-8.

Tsuboi, I., Sagawa, K., Shichijo, S., Yokoyama, M., Ou, D., & Wiederhold, M. (1995). Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 and human immunodeficiency virus type 1 infections. *Clinical Diagnostic Lab Of Immunology*, (5), 626-630.

Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., & Shah, K. et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal Of Pathology*, 189(1), 12-19. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1<12::aid-path431>3.0.co;2-f

Whiteside, T. (2017). Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Review Of Anticancer Therapy*, 17(6), 527-535. doi: 10.1080/14737140.2017.1316197.

Wu, X., Liu, X., Jiao, Q., Fu, S., Bu, Y., Song, F., & Yi, F. (2014). Cytotoxic T Lymphocytes Elicited by Dendritic Cell-Targeted Delivery of Human Papillomavirus Type-16 E6/E7 Fusion Gene Exert Lethal Effects on CaSki Cells. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, 15(6), 2447-2451. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.6.2447.

Yurt, S., Küçükergin, C., Yigitbas, B., Seçkin, Ş., Tigin, H., & Koşar, A. (2014). Diagnostic utility of serum and pleural levels of adenosine deaminase 1–2, and interferon- $\gamma$  in the diagnosis of pleural tuberculosis. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 9(1). doi: 10.1186/2049-6958-9-12.

Monroy-Mora, K.A.

- Zavialov, A., & Engström, Å. (2005). Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochemical Journal*, 391(1), 51-57. doi: 10.1042/bj20050683.
- Zavialov, A., Gracia, E., Glaichenhaus, N., Franco, R., Zavialov, A., & Lauvau, G. (2010). Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal Of Leukocyte Biology*, 88(2), 279-290. doi: 10.1189/jlb.1109764.
- Zavialov, A., Yu, X., Spillmann, D., Lauvau, G., & Zavialov, A. (2010). Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(16), 12367-12377. doi: 10.1074/jbc.m109.083527.
- Zhang, X., Liu, J., Tang, P., Liu, Z., Guo, G., Sun, Q., & Yin, J. (2017). Identification of a New Uncompetitive Inhibitor of Adenosine Deaminase from Endophyte *Aspergillus niger* sp. *Current Microbiology*, 75(5), 565-573. doi: 10.1007/s00284-017-1418-4.

### **13. APÉNDICE.**

#### **Preparación de RPMI**

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

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

#### **Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

8 g de Cloruro de sodio

0.2 g de cloruro de potasio

0.2 g de fosfato de potasio monobásico

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

#### **Preparación de verseno (para 2 L)**

Tris base 6.88 g

16 g NaCl

0.8 g KCl

0.4 g EDTA

Ajustar pH a 7.7

#### **Preparación de tripsina**

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

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

### Preparación de Buffer RIPA

Para un volumen de 250 mL agregar:

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
<b>NP<sub>4</sub>O</b>	1.25	0.5%
<b>Tris-HCl pH 7.4 1M</b>	5	20mM
<b>NaCl 5M</b>	7.5	0.15M
<b>EDTA 0.25M</b>	2.5	1mM
<b>NaDOC (10%w/v)</b>	12.5	0.5%
<b>SDS (10%w/v)</b>	2.5	0.1%

Finalmente, llevar a 250 mL volumen final con agua destilada y almacenar a 4°C. (Al utilizar se añadieron 10 µL de inhibidores de proteasas por cada 50 mL de buffer).

### Preparación de Buffer de Laemmli (5x)

Reactivo	Peso (gr) o Volumen (mL)
<b>Tris base</b>	0.378
<b>SDS</b>	1
<b>Beta mercaptoetanol</b>	1
<b>Glicerol</b>	5
<b>Azul de Bromofenol</b>	0.05

Llevar a un volumen final de 10 mL con agua MiliQ.



Monroy-Mora, K.A.

**Preparación de TBS-T**

60 mL NaCl 2.5 M

20 mL Tris base 1 M

1 mL Tween

Ajustar pH a 7.5.