



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA

***“Efecto de Simvastatina en el crecimiento tumoral y la concentración de adenosina desaminasa en suero de ratones Balb/c”***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

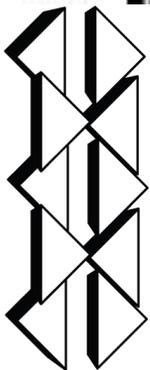
PRESENTA:

**JOSÉ GABRIEL AVILA IBARRA**

Director de Tesis: Dra. Christian Azucena Don López

Asesor Interno: Dra. María de Lourdes Mora García

Dr. Alberto Monroy García



**FES**  
ZARAGOZA

CDMX

Agosto 2023



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.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de investigación de Diferenciación Celular y Cáncer en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza a cargo de la Dra. María de Lourdes Mora García. La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del proyecto PAPIIT No. IN211822.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María de Lourdes Mora García y Dr. Alberto Monroy García por abrimme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte de su grupo de investigación. Igualmente por su apoyo, atención, disposición de guiarme en estos años para mi formación académica, profesional y personal.

A la Dra. Christian Azucena Don López por su apoyo en todo momento. Sus conocimientos y asesorías fueron determinantes para la realización de este trabajo. Gracias por ser mi directora de Tesis.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por sus enseñanzas, consejos, orientación y las buenas charlas desde el primer día. Aprecio mucho eso.

A la Dra. Gabriela Molina Castillo por compartir conmigo su atención, conocimientos y su valioso tiempo incontables veces.

## AGRADECIMIENTOS

A la vida por poder permitirme alcanzar este objetivo y ponerme en los tiempos y circunstancias precisas.

A mis padres Saúl y Yolanda: Hoy concluyo un trayecto de mi vida y sin duda alguna hubo días difíciles durante este, pero el saber que tenía su apoyo fue un aliento para seguir. Gracias por ser uno de los pilares para que esta meta se haya realizado. Igualmente a mis hermanos Luis, Yohaly y Diego; espero que esto sea una de las tantas cosas por las cuales se sientan orgullosos de mí.

A todos los compañeros, tutores y trabajadores del laboratorio L-3 de Inmunobiología sin excepción, desde quienes estuvieron y me apoyaron desde mi llegada, hasta quienes están al día de hoy. Nuevamente agradezco especialmente a Gaby por su ayuda y su compañía durante las desmadrugadas durante meses; A Azu por ser la mejor tutora y la doctora más buena onda del mundo, gracias por siempre estar en la disposición de orientarme y tenerme paciencia, te tqm.

A mis amigos y personas tan especiales con los cuáles tuve la dicha de compartir este camino, cada uno sabe quiénes son. No tengo palabras para describir lo afortunado que soy de conocerlos y pasar momentos de toda índole durante el trayecto porque sin duda fue más ameno hacerlo con su compañía. Así mismo, a cada uno de los compañeros de la carrera con quienes compartí tan siquiera algún minuto o un buen momento desde primer semestre hasta los últimos días.

A todos los profesores de la carrera de Biología por compartir sus conocimientos y experiencia con sus alumnos y permitirme querer más a esta ciencia con cada clase, cada práctica y cada momento dentro y fuera del aula.

## DEDICATORIA

*A las personas que han perdido la batalla contra el cáncer por encontrarse en un entorno desfavorable de recursos y de atención óptima.*

*A los colegas Biólogos que se han sentido perdidos en el mundo profesional y laboral. Que lo mejor siempre los persiga. Gracias por estudiar a la vida.*

*... Esto también va para ustedes.*

*“La vida no te da lo que quieres,  
sino lo que necesitas para evolucionar”.*

*- Berth Hellinger*

*“No es lo que conseguimos, sino en lo que nos convertimos,  
en qué contribuimos y lo que da significado a nuestras  
vidas”.*

*- Anthony Robbins*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
La vía adenosinérgica	6
Vía adenosinérgica como punto de control inmune	7
Componentes de la vía adenosinérgica	8
Adenosina desaminasa (ADA)	9
Rol de la vía adenosinérgica en el cáncer	10
Desregulación de la vía adenosinérgica en cáncer	11
La simvastatina como agente terapéutico contra el cáncer	12
La simvastatina en la inhibición de la vía adenosinérgica	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>15</b>
Cultivo de JC.	15
Ensayo de viabilidad celular para SIM: determinación de la IC <sub>50</sub> de simvastatina.	15
Inoculación de células tumorales en ratones.	16
Cuantificación de ADA en suero de ratón.	16
Determinación de ADA en sueros de ratón Balb/c mediante cromatografía en capa fina	17
Análisis estadístico de los datos.	18
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
Efectos de simvastatina sobre la proliferación en la línea celular JC.	19
Efecto de Simvastatina sobre el crecimiento tumoral en ratones Balb/c	20
Simvastatina aumenta sobrevivencia de ratones Balb/c	21
Efecto de simvastatina sobre la concentración de ADA en suero de ratones Balb/c	22

<b>Pentostatina inhibe la desaminación por ADA en sueros de ratones Balb/c tratados con simvastatina.</b>	<b>23</b>
<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	<b>25</b>
<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	<b>29</b>
<b><i>PERSPECTIVAS</i></b>	<b>29</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>30</b>

## **ABREVIATURAS**

**ADA:** Adenosina desaminasa

**ADA1:** Adenosina desaminasa-1

**ADA2:** Adenosina desaminasa-2

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADO:** Adenosina.

**ADP:** Difosfato de adenosina.

**AK:** Adenosina quinasa.

**AMP:** Monofosfato de adenosina.

**ARs:** Receptores de adenosina.

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**CaCU:** Cáncer cérvico-uterino.

**CM:** Cáncer de Mama

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

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

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

**eATP:** ATP extracelular

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

**FPP:** Farnesil pirofosfato.

**GGPP:** Gerangeranil pirofosfato.

**HMGCR:** 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A Reductasa

**HYP:** Hipoxantina.

**INO:** Inosina.

**NK:** células Natural killer

**MSC:** células del estroma mesenquimatoso

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

**Treg:** Linfocitos T reguladores

## RESUMEN

La adenosina juega un papel clave en la modulación de las respuestas inmunitarias en condiciones fisiológicas y patológicas como lo es el cáncer. La simvastatina, un fármaco reductor del colesterol al inhibir la enzima HMGCR es ampliamente utilizado y se ha reportado que es capaz de ejercer efectos antitumorales en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Por otra parte, la adenosina desaminasa es un regulador directo de la adenosina la cual es una molécula inmunosupresora secretada en altas concentraciones durante procesos patológicos como el cáncer, por ello se ha convertido en un objetivo terapéutico en varios modelos tumorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la Simvastatina en el crecimiento tumoral y la concentración de adenosina desaminasa en sueros de ratones BALB/c inoculados con células tumorales JC, de cáncer de mama. Se observó que la Simvastatina inhibió la proliferación de células JC de manera dependiente de las dosis, a 24 horas y 48 horas y en cuanto a la actividad enzimática, comparado con EHNA inhibidor específico de ADA. El crecimiento tumoral disminuyó al tratamiento con Simvastatina, la cual tuvo un efecto protector sobre los ratones al aumentar los días de supervivencia respecto a los no tratados con el fármaco (grupo control). Simvastatina fue capaz de disminuir la concentración de ADA en sueros de los ratones tratados, respecto a la detectada en el grupo control. Pentostatina, un antimetabolito análogo a las purinas, al igual que EHNA, inhibieron completamente la actividad enzimática de ADA presente en los sueros de los ratones, mientras que Simvastatina lo hizo parcialmente. Aquí, se constató que Simvastatina inhibió el crecimiento tumoral en ratones Balb/c inoculados con células JC e incrementó la supervivencia de los ratones tratados con el fármaco. Además, fue capaz de disminuir la concentración de ADA sérica. Por otro lado, la inhibición de ADA, con EHNA y Pentostatina, sugiere que ADA1 sea la principal fuente de ADA contenida en los sueros de ratones Balb/c inoculados con células JC. De acuerdo a esto, será interesante abordar como perspectiva la evaluación de diferentes concentraciones de Simvastatina en las cuales se halle la eficaz para

poder disminuir las concentraciones séricas de ADA sin que ello afecte la eficiencia inmune antitumoral.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada en mujeres jóvenes y es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en este grupo de edad. Tanto en el mundo como en México, éste representa un problema de salud grave. En las mujeres mexicanas, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más común, representando el 25% de los casos. Por lo anterior, es de gran importancia la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos.

Las células tumorales han desarrollado mecanismos como el escape inmunitario o vías inmunosupresoras que protegen al tumor y continúan operando desde la etapa temprana hasta la etapa avanzada para evitar ser reconocidas por el sistema inmunitario. Dentro de dichas estrategias podemos encontrar a la vía adenosinérgica, la cual ha sido considerada como un nuevo “mediador de puntos de control inmunitario” capaz de alterar la función del sistema inmunitario. El nucleósido adenosina (ADO) está involucrado en la regulación de diversos procesos fisiológicos y patológicos. En procesos tumorales ADO actúa promoviendo el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis, la quimio resistencia y la metástasis por lo que se ha considerado un objetivo terapéutico prometedor..

Dentro de la vía adenosinérgica, la adenosina desaminasa (ADA) es la enzima que cataliza la desaminación de adenosina y se ha planteado que puede tener un papel importante dentro del cáncer al funcionar como modulador clave de la función celular, a través de mecanismos dependientes del receptor de adenosina demostrando su mayor actividad en suero y tejidos tumorales en cáncer de mama y otros cáncer. La alta actividad de ADA podría dar una ventaja selectiva a las células cancerosas, por tanto, la inhibición de la degradación de adenosina merece una atención especial en la terapia del cáncer.

Las estatinas, que se usan para inhibir la HMG-CoA reductasa (HMGCR), enzima limitante de la velocidad para catalizar la síntesis de mevalonato, reducen el riesgo de cáncer, incluido el cáncer de mama. En el caso del cáncer de mama, el uso de Simvastatina se asocia con un riesgo reducido de cáncer de mama en estadio I-III.

Participa en la apoptosis y la regulación de la proliferación celular en células de cáncer de mama y muestran actividad antitumoral en una variedad de cánceres, incluidos el cáncer de pulmón y el cáncer gástrico. Para conocer mejor el efecto terapéutico de la Simvastatina sobre el cáncer, se necesita una comprensión más completa de esta estatina.

## MARCO TEÓRICO

### ***La vía adenosinérgica***

La señalización purinérgica sirve como un sistema de comunicación entre las células. Está involucrado en una variedad de mecanismos, que incluyen respuestas inmunitarias, inflamación, dolor, agregación plaquetaria, proliferación, muerte celular, desarrollo y neurotransmisión. La vía de la adenosina juega también un papel clave en la modulación de las respuestas inmunitarias en condiciones fisiológicas y patológicas. Fisiológicamente, los efectos antiinflamatorios de la adenosina equilibran la adenosina 5'-trifosfato (ATP) proinflamatoria, protegiendo los tejidos del daño causado por las células inmunitarias activadas. Patológicamente, el aumento de la actividad de la monofosfatasa de adenosina (AMPasa) en los tumores conduce a una mayor producción de adenosina, lo que genera un microambiente profundamente inmunodeprimido y promueve la progresión del cáncer (Azambuja *et al.*, 2019).

Un metabolito principal del que depende toda la vida es el trifosfato de adenosina o ATP, que es bien conocido y sirve como molécula de energía de la célula. Fisiológicamente, en el tejido normal, el ATP se localiza en el compartimento intracelular a concentraciones superiores a 1  $\mu\text{M}$  pero inferiores a 10  $\mu\text{M}$  (Ke Dong *et al.*, 2016), mientras que los niveles extracelulares en el microambiente tumoral (TME) están en el rango de un nivel micromolar alto (50–200  $\mu\text{mol/L}$ ) (Vultaggio, 2020)

Es importante destacar que los niveles de ATP extracelular (eATP) aumentan significativamente en respuesta a eventos que alteran los tejidos, incluida la inflamación, la hipoxia o la isquemia, así como en el contexto de una neoplasia maligna. La hidrólisis de ATP extracelular por ectonucleotidasas unidas a la membrana genera adenosina inmunosupresora, que actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa para prevenir la inflamación excesiva y el daño tisular (Allard *et al.* 2018). La adenosina extracelular, participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos que incluyen vasodilatación, reabsorción de agua por los riñones, percepción del dolor y ajuste fino del ciclo sueño. Además de ello, se involucra ya sea como un metabolito intracelular de la síntesis de ácidos nucleicos, en la regulación de la carga de energía o como un mensajero intercelular en los sistemas neurológico, cardiovascular e inmunológico. Sirve como molécula inmunorreguladora para proteger los tejidos normales de la inflamación, y puede afectar la inmunidad antitumoral (Vigano *et al.*, 2019).

### ***Vía adenosinérgica como punto de control inmune***

Como tal, la vía adenosinérgica juega un papel clave en la modulación de las respuestas inmunes en condiciones fisiológicas y patológicas, así como en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune (Ke Dong, Gao & Zhang, 2016). Protege los tejidos normales del daño inflamatorio, mientras que en condiciones patológicas puede deteriorar la inmunidad antitumoral y promover el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis, la quimio resistencia y la metástasis sobre las células tumorales (Azambuja *et al.*, 2019). En la etapa tardía de la inflamación, la adenosina contribuye de manera relevante a la resolución de la inflamación, repolarizando el fenotipo antiinflamatorio de poblaciones de células inmunes como macrófagos, CD o neutrófilos y contrarrestando así la respuesta inmune adquirida, actuando directamente sobre las células efectoras T estimulando la expansión y las funciones de las células T<sub>reg</sub> inmunosupresoras. El efecto de ADO es mediado principalmente por los receptores A<sub>2A</sub>, funcionando como un potente vasodilatador. Así mismo, la producción disminuida de adenosina conduce a una

fuga vascular como resultado de la activación disminuida de los receptores A<sub>2B</sub> de adenosina en el endotelio vascular (Hanskó & Cronstein, 2013).

Se ha encontrado de igual manera que la ADO es producida por células B que secretan IL-6 y está involucrada en la inhibición de las células T (Huang & Zili *et al.*, 2019). Así mismo, se ha demostrado que en los tumores hay competencia en la conversión de ATP en adenosina, mediante la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en células cancerosas y células inmunitarias reguladoras. Estas dos ectonucleotidasas, modulan la señalización purinérgica eliminando mediadores de nucleótidos extracelulares, en gran medida proinflamatorios, para generar nucleósidos de adenosina inmunosupresores (Allard *et al.*, 2017).

Se ha indicado también que la expresión de CD73 en las células NK humanas aumenta después de que estas células están en contacto con las células del estroma mesenquimatoso (MSC) y que esto podría estar involucrado en un proceso inmunosupresor (Monguió *et al.* 2017).

En esta vía, la ADO generada por las ectonucleotidasas CD39 y CD73 ha sido considerada como un nuevo mediador de puntos de control inmunológico que deteriora la función de este sistema (Huang *et al.*, 2019).

## ***Componentes de la vía adenosinérgica***

### ***Ectonucleotidasas CD39 y CD73***

Algunas ectonucleotidasas que cooperan en la generación de adenosina extracelular a través de la hidrólisis de ATP son CD39 y CD73, inclinando así la balanza hacia microambientes inmunosupresores. CD39 y CD73 son importantes para calibrar la duración, la magnitud y la composición del "halo purinérgico" que rodea a las células inmunitarias. Degradan ATP, ADP y AMP a adenosina, pueden verse como "interruptores inmunológicos" que desplazan la actividad de las células

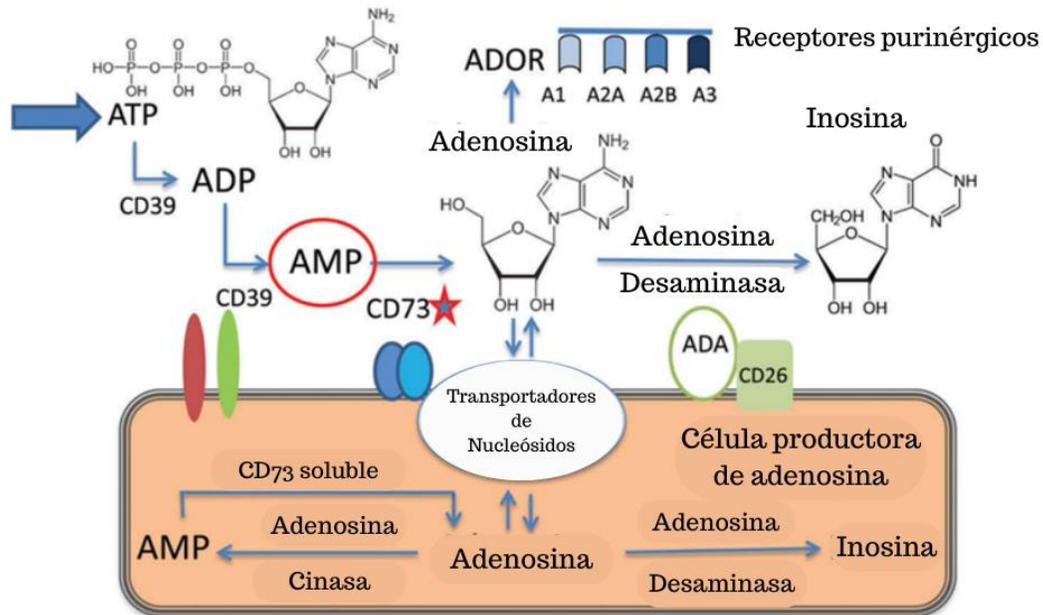
inmunitarias proinflamatorias impulsadas por ATP hacia un estado antiinflamatorio mediado por adenosina (Antonioli *et al.*, 2013).

CD39 (ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1; E-NTPDase1) es una ectoenzima de membrana integral que fosfohidroliza ATP, y menos eficientemente ADP, en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , para producir AMP. Se expresa constitutivamente en el bazo, el timo, el pulmón y la placenta, y en estos órganos se asocia principalmente con células endoteliales y poblaciones de células inmunitarias, como células B, células asesinas naturales (NK), células dendríticas, células de Langerhans, monocitos, macrófagos, células mesangiales, neutrófilos y células T reguladoras (Tregs). La expresión de CD39 está regulada por varias citocinas proinflamatorias, el estrés oxidativo y la hipoxia (Antonioli *et al.*, 2013)

El segundo paso en el metabolismo de los nucleótidos de purina lo realiza el CD73, también conocida como ecto-5'-nucleotidasa (NT5E), es una AMP hidrolasa que forma parte del mecanismo enzimático extracelular que regula la conversión de ATP extracelular desfosforilando el AMP en adenosina (Figura 1). Estructuralmente, CD73 es un dímero de dos subunidades idénticas de 70 kD, ancladas a la membrana plasmática a través de un residuo de serina C-terminal, Ser 523, unido a glicosilfosfatidil inositol (GPI). El transporte epitelial de iones y fluidos, el mantenimiento de la barrera tisular, la hipoxia, el preconditionamiento isquémico y la inflamación se han relacionado estrechamente con la actividad de CD73 (Antonioli *et al.*, 2013).

**Receptores de ADO:** La adenosina, resultado de la hidrólisis del ATP ejerce su efecto inmunosupresor al unirse a sus receptores los cuales son una familia de receptores acoplados a proteínas G. Esta familia incluye cuatro isoformas, A1R, A2AR, A2BR y A3R. A1R, A2AR y A3R, que exhiben alta actividad en una baja concentración de ADO (1-100 nM), son receptores de alta afinidad, pero A2BR es un receptor de baja afinidad que solo exhibe actividad en entornos con altos niveles de ADO. El A1R tiene una distribución amplia y es particularmente abundante en los nervios, el corazón y los riñones. A2AR se expresa en cáncer, células natural killer (NK), células T  $\text{CD4}^+$ , células B, linfocitos T reguladores (Tregs), fibroblastos

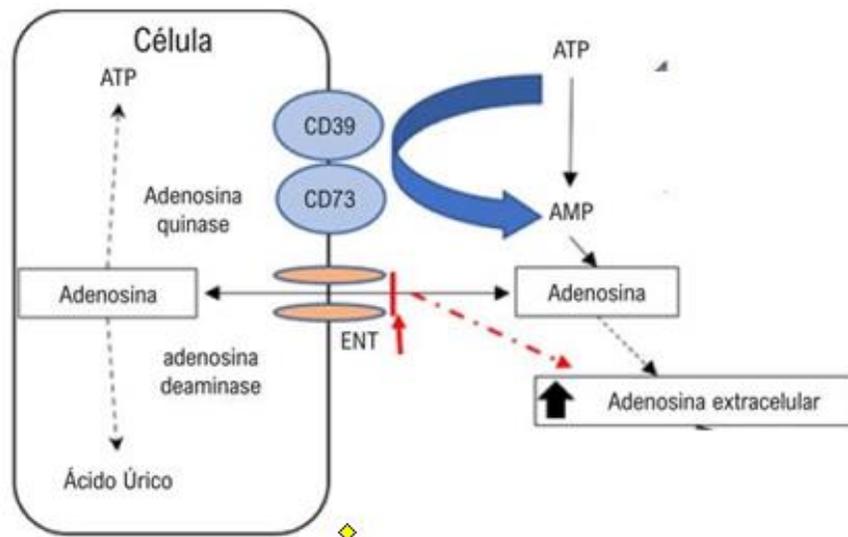
asociados al cáncer (CAF), células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos, el endotelio y el área estriatal. A2BR se distribuye en el endotelio, Células Supresoras Derivadas de Mieloides (MDSC), CAF, células dendríticas (DC) y células tumorales. A3R se expresa en los sistemas nervioso y cardiovascular, subconjuntos de células inmunes, hígado y células tumorales (Antonioli *et al.*, 2013).



**Figura 1. Vía de adenosina a nivel intracelular y extracelular.** Hidrólisis de ATP mediante CD39 para producir ADP y AMP. AMP se hidroliza a Adenosina mediante CD73 a nivel extracelular e intracelular. La adenosina a su vez es desaminada a Inosina por parte de ADA. Tomado y modificado de Whiteside, 2017.

### **Adenosina desaminasa (ADA)**

Como se mencionó anteriormente, la adenosina puede interactuar con los receptores de adenosina o ser transportada al citosol mediante transportadores de nucleósidos y desaminarse a inosina por la adenosina desaminasa (ADA), (Maneechotesuwan *et al.*, 2016) (Figura 2).



**Figura 2.** Formación de adenosina en el espacio extracelular por la degradación de ATP y la adenosina y degradación de la adenosina hacia Inosina por la acción de ADA.

La adenosina desaminasa sérica es una enzima que cataliza la conversión irreversible de adenosina en inosina y desoxiadenosina en desoxiinosina. Estos sustratos son muy tóxicos para las células vivas y la ADA juega un papel importante en la desintoxicación. ADA aparece en el suero y en la mayoría de los tejidos, especialmente en los tejidos linfoides, dado que es necesario para la diferenciación de monocitos a macrófagos y para el desarrollo de linfocitos B y T. (Tecles *et al.*, 2018). Existen tres isoformas de la enzima denominadas ADA1, ADA2 y ecto-ADA.

**ADA1**, Es una proteína monomérica de 40 kDa, está presente en todos los tejidos, en todas las células, incluidos los eritrocitos. Es de gran importancia en el desarrollo y proliferación de los linfocitos (Pérez-Aguilar *et al.*, 2010). Aunque no se ha estudiado bien cómo se regulan los niveles de ADA1.

**ADA2**, una enzima de 110 kDa, que consta de 511 residuos de aminoácidos, está codificada por el locus *ADA2*. ADA2 se considera crítico para el mantenimiento de la integridad vascular y responsable de la degradación extracelular de la adenosina. y es resistente a la inhibición por la erythro-9- (2-hydroxy- 3-nonil)

adenina (EHNA). Es la isoforma predominante en suero, se encuentra solo en monocitos y macrófagos y es liberada por estas células cuando son estimuladas por la presencia de microorganismos en su interior. También se ha implicado en la regulación de la proliferación de células T activadas y macrófagos, así como en la diferenciación de monocitos en macrófagos. (Zervou *et al.*, 2020)

La ADA2 no es ubicua y coexiste con ADA1 excepto en monocitos-macrófagos humanos, siendo la principal isoenzima de ADA encontrada en el suero humano. ADA2 tiene un pH óptimo de 6,5, lo que lo hace eficaz para desaminar altas concentraciones de adenosina en un entorno ligeramente ácido, por ejemplo, durante la inflamación (Zervou *et al.*, 2020).

La afinidad de ADA1 por la adenosina es 100 veces mayor que la de ADA2, y la ADA1 es inhibida por el análogo EHNA, pero ADA2 no lo es tanto, la actividad plasmática de ADA2 se realiza a una concentración saturada de adenosina que es ~ 10 000 veces mayor que la fisiológica, y en presencia de EHNA para inhibir ADA1. En estas condiciones *in vitro*, ADA2 representa la mayor parte de la actividad de ADA medida en plasma (Pérez, 2010).

La deficiencia genética de ADA1 da como resultado una inmunodeficiencia combinada grave, mientras que la deficiencia de ADA2 provoca vasculitis sistémica e insuficiencia de la médula ósea. ADA1 es altamente eficiente en sitios biológicos donde el pH es neutro incluso si la concentración de sustrato es baja. Además, podría interactuar con proteínas de membrana y existir como una ectoenzima (eADA), desaminando Ado y dAdo en el espacio extracelular (Pérez, 2010).

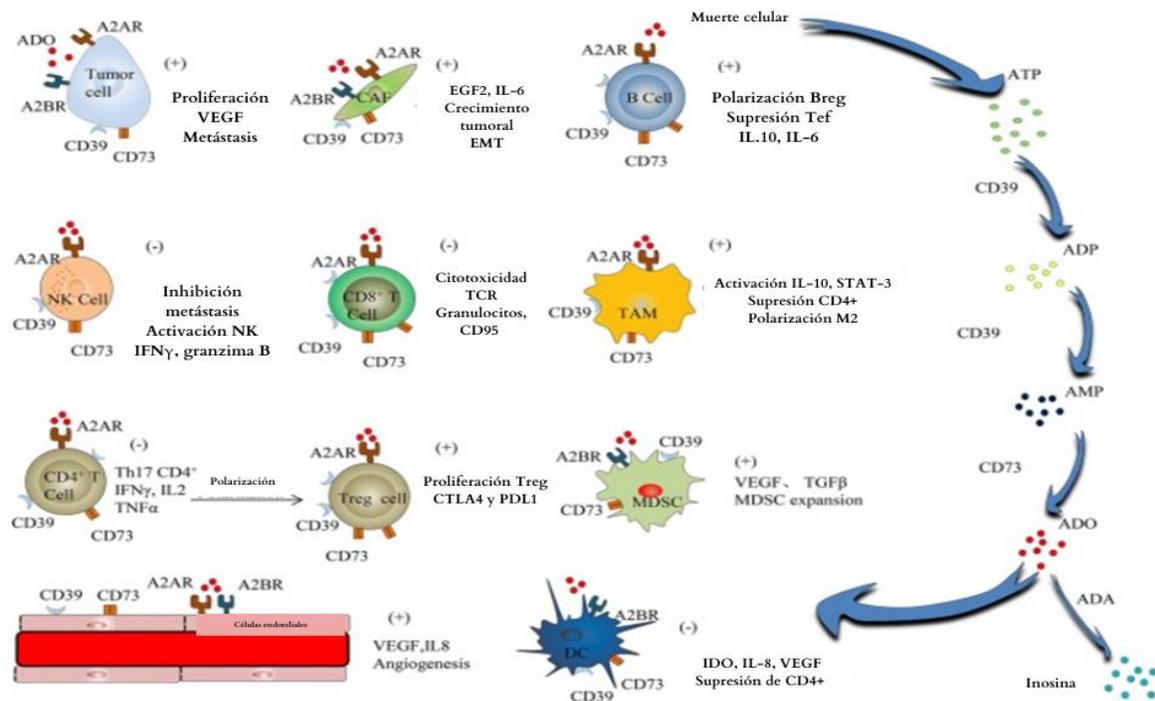
Las citocinas que inducen la secreción de ADA2, incluidas la Interleucina (IL) -12, IL-18 e interferón- $\gamma$ , no afectan la actividad de ADA1 (Lee, 2020).

Aunque ADA1 y ADA2 son exclusivamente citosólicas, la tercera isoforma es considerada una ectoenzima (ecto-ADA) puesto que se ha detectado en la superficie de células B, macrófagos y células T de sangre periférica, conectado a la superficie de las células a través de proteoglicanos lo que sugiere que también

podría estar involucrado en la señalización célula-célula y que su presencia tendría un papel importante en ciertas patologías (Monroy-Mora, 2020).

### ***Rol de la vía adenosinérgica en el cáncer***

En humanos, se ha demostrado la sobreexpresión de CD73 en varios cánceres como el melanoma, carcinoma de ovario, de mama, de colon, de cabeza y cuello (Turiello *et al.*, 2020). Existen reportes de una posible relación entre la alta expresión de CD39 / CD73 y un mal pronóstico en diferentes tipos tumorales. Este complejo participa en el proceso de inmunoescape tumoral al inhibir la activación, la expansión clonal y la localización de las células T específicas del tumor. Además, en particular CD39 puede contribuir como iniciadora de la angiogénesis tumoral (Tecles *et al.*, 2018) (Figura 3)



**Figura 3. Proceso de la vía adenosinérgica en el microambiente Tumoral.** Se muestra su mecanismo de inmunosupresión, metástasis, angiogénesis. ADO media las respuestas inmunosupresoras para la protección de los tejidos adyacentes a la inflamación de los ataques de las células inmunitarias. Tomado y modificado de Huang, 2019

Para el caso de CD73 se ha reportado que puede regular a la baja la apoptosis de las células leucémicas de Jurkat, regulando negativamente la frecuencia de factores anti apoptóticos como lo son BCL2 y BCLxL y en años recientes se ha propuesto que la alta expresión de CD73 puede funcionar como un biomarcador de metástasis en melanoma y cáncer de mama (Azambuja *et al.*, 2019).

De igual forma, ADA resulta de gran importancia durante el desarrollo del cáncer, debido a su actividad reguladora de la reserva de adenosina intra y extracelular. Se ha demostrado que la expresión de ambas isoenzimas de ADA (ADA1 y 2) se encuentra elevada en los tejidos tumorales de pacientes con cáncer de mama y que correlaciona con el grado del tumor, el tamaño y la afectación de los ganglios linfáticos. Si bien, la actividad de ADA2 se ha visto incrementada en el suero de

pacientes, en el tejido mamario maligno se ha revelado una actividad mucho mayor de ADA1 que de ADA2 y no se han encontrado diferencias en las actividades séricas de ambas isoenzimas entre las neoplasias mamarias malignas y benignas (Lee, 2020).

Las células cancerosas podrían ser una fuente potencial de ADA y la mayor actividad de la ADA tumoral podría ser un reflejo de la acumulación de células inmunitarias ricas en ADA en los tumores de mama malignos. La ADA en el tumor igualmente podría derivar de células endoteliales que proliferan activamente durante la angiogénesis tumoral. Se ha propuesto que la alta actividad de ADA en el microambiente tumoral puede ser un mecanismo compensatorio contra una acumulación tóxica de sus sustratos debido al aumento del metabolismo de las purinas y pirimidinas en los tejidos cancerosos. La alta actividad de ADA podría dar una ventaja selectiva a las células cancerosas que producen una gran cantidad de hipoxantina (Zajac *et al.*, 2018).

### ***Desregulación de la vía adenosinérgica en cáncer***

Se ha reportado que la expresión de CD39 está aumentada en varios tumores sólidos como cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de páncreas, así como en la leucemia linfocítica crónica, lo que sugiere que esta enzima también participa en el desarrollo y progresión de neoplasias. Recientemente, se ha demostrado que una forma soluble catalíticamente activa de CD39 circula en sangre humana y murina (Apasov *et al.*, 2001).

El estrés producto de la hipoxia en el microambiente tumoral conduce a la acumulación de adenosina extracelular, principalmente a partir de la degradación de ATP a difosfato de adenosina (ADP) mediante CD39 y de este a monofosfato de adenosina (AMP) para por último convertirse en adenosina gracias a la acción de CD73. La expresión y función de esta última está regulada positivamente en condiciones hipóxicas, así como por la presencia de varios mediadores proinflamatorios, como el factor de crecimiento transformante (TGF)  $-\beta$ , interferones

(IFN), factor de necrosis tumoral (TNF)  $-\alpha$ , interleucina (IL)  $-1\beta$  y prostaglandina  $E_2$ . También se ha informado de un aumento en la expresión de CD73 en varios tejidos neoplásicos, lo que sugiere la participación de esta enzima en la aparición y progresión de la neoplasia (Luning, 2012).

Por último, la adenosina generada mediante la vía adenosinérgica es degradada por ADA y convertida en inosina. De tal manera que, la deficiencia de ADA da como resultado niveles elevados de adenosina y dATP, cuya acumulación es tóxica para los linfocitos. Además, en ausencia de ADA se promueve la liberación mitocondrial de citocromo *c* provocando la apoptosis (Luning, 2012) y el agotamiento severo de las células T, células B y células NK (Apasov *et al.*, 2001). Lo anterior, provoca una de las inmunodeficiencias más graves conocidas que afecta a los seres humanos, conocida como inmunodeficiencia severa combinada.

Es por ello que, las investigaciones actuales se han centrado en la selección de las vías metabólicas del ATP celular que pueden alterarse durante patologías como la tumorigénesis. La hidrólisis de ATP extracelular en adenosina por ectonucleotidasas se ha documentado como una nueva vía de control inmunológico que puede deteriorar significativamente la inmunidad antitumoral de múltiples tipos de cáncer considerándose una barrera significativa para la eficacia de las terapias inmunes y convirtiéndose en una importante diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.

### ***La Simvastatina como agente terapéutico contra el cáncer***

La Simvastatina es un fármaco del grupo de las estatinas que son comúnmente utilizadas como fármacos para reducir el colesterol. Su función es inhibir moléculas pequeñas de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa de la vía del mevalonato, también conocida como vía de biosíntesis del colesterol, de esta forma, anula la producción de isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) y gerangeranil pirofosfato (GGPP), intermedios cruciales en la señalización celular, diferenciación y proliferación (Monroy-Mora, 2020). Recientemente, han atraído la atención como

agentes terapéuticos potenciales en varios tipos de cáncer, incluidos el de colon, pulmón y mama (Wang *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que las estatinas participan en la apoptosis y la regulación de la proliferación en las células de cáncer de mama. Simvastatina inhibe HMGCR, induce la apoptosis en las células cancerosas, regula a la baja Akt y NF- $\kappa$ B, el óxido nítrico y regula al alza ROS (Bai *et al.*, 2019).

En estudios sobre cáncer de ovario, se ha examinado el efecto de la Simvastatina sobre la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de ovario, Hey y SKOV3, donde este fármaco muestra una inhibición eficaz en la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis en ambas líneas celulares (Stine *et al.*, 2016). Los efectos antitumorigénicos de la Simvastatina también se reflejan en el aumento de las ROS y el daño del ADN. Aunado a esto, la Simvastatina puede funcionar para inhibir la adhesión y la invasión en las células de cáncer de ovario, así como para inducir la apoptosis, la detención del ciclo celular, el estrés celular y la reducción de la angiogénesis. Se ha encontrado de igual forma, una reducción sustancial en el crecimiento del tumor en modelos de ratón de cáncer de ovario seroso tratados con Simvastatina (Stine *et al.*, 2016).

Por ejemplo, en modelos de cáncer de mama, se ha demostrado que las células MDA-MB-231 son más sensibles a la toxicidad de la Simvastatina que a otros tipos de estatinas en distintas concentraciones de manera dependiente, además de un aumento del gen supresor de tumores p21 y p27 e inhibe significativamente la invasión de las células. Incluso, se ha mostrado su eficacia al aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células tumorales y generar daño en el ADN de las mismas (Bai *et al.*, 2019).

La Simvastatina inhibe significativamente la vía de señalización de PI3K / Akt / mTOR aumentando la expresión de PTEN, un supresor de tumores. De esta manera, la Simvastatina desactiva también las vías de señalización MAPK / ERK en el cáncer de mama (Wang *et al.*, 2015).

En modelos de ratón, la Simvastatina altera el potencial metastásico de las células tumorales, inhibiendo significativamente el establecimiento de colonias dentro de otros órganos como pulmón o cerebro (Wolfe *et. al.*, 2015).

Además, en trabajos previos observamos que la Simvastatina inhibió la proliferación de células de cáncer de mama murino de manera dependiente de las dosis (Avila Ibarra, 2022).

### ***La Simvastatina en la inhibición de la vía adenosinérgica***

Kowalczyk y colaboradores en 2008 hallaron que la Simvastatina inhibe hasta en un 50% la actividad de ADA en plasma de conejos, especialmente el isotipo ADA2 (Kowalczyk & Kopff, 2008). De igual manera, se ha demostrado que Simvastatina revierte la actividad de ADA suprimida por IL-13 que conduce a la regulación a la baja de la señalización de adenosina. (Maneechotesuwan *et al*, 2016).

Además, Monroy Mora en 2020, constató que Simvastatina tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de ADA en líneas celulares de CaCu (C33-A, Caski, HeLa) de manera parcial y demostró que Simvastatina disminuyó la expresión de ARNm de ADA en células tumorales CaSKi y HeLa en aproximadamente 50% y 30%, respectivamente, sugiriendo que Simvastatina puede tener un efecto inhibitorio sobre ADA, tanto a nivel de su expresión como de su actividad enzimática. Sin embargo, halló que la Simvastatina no inhibió la actividad enzimática de sADA (adenosina desaminasa sérica) contenida en los sobrenadantes de las tres líneas celulares de CaCU. Así mismo, reveló que los niveles de ADA1 Y ADA2 presentan más de dos veces su cantidad en plasma de pacientes con CaCU en relación a la contenida en los plasmas de los pacientes normales.

## **JUSTIFICACIÓN**

La vía adenosinérgica juega un papel clave en la modulación de las respuestas inmunes en condiciones fisiológicas y patológicas. En procesos neoplásicos puede inhibir la inmunidad antitumoral y promover el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis, la quimio resistencia y la metástasis de las células tumorales. La

adenosina resultante de esta vía puede interactuar con sus receptores o ser transportada al citosol y desaminarse a inosina mediante la enzima adenosina desaminasa (ADA), cuya actividad regula la reserva de adenosina intra y extracelular funcionando como modulador clave de la función celular lo cual podría dar una ventaja selectiva a las células cancerosas favoreciendo su sobrevivencia.

En tejidos tumorales como el cáncer de mama los niveles de adenosina desaminasa (ADA) se han visto elevados, funcionando como un modulador clave de la función celular y la respuesta antitumoral.

Con la finalidad de contrarrestar los efectos negativos de la expresión de ADA en los tumores, se han empleado fármacos como las estatinas. Las estatinas usadas comúnmente como fármacos para reducir niveles de colesterol, han sido probadas como inhibidores de ADA. Por ejemplo, Kowalczyk y colaboradores en 2008 hallaron que la Simvastatina inhibe hasta en un 50% la actividad de ADA en plasma de conejos (Kowalczyk *et al.*, 2008) y nuestro equipo de investigación reportó que Simvastatina inhibió la proliferación de células tumorales de CaCU y disminuyó la expresión del ARNm de ADA (Monroy-Mora, 2020).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de Simvastatina en el crecimiento tumoral y la concentración de ADA en suero de ratones Balb/c inoculados con células JC. Los resultados obtenidos de este trabajo podrían ser importantes, considerando que esta enzima brinda ventaja selectiva a las células cancerosas al regular la reserva de adenosina intra y extracelular. De tal manera que, su inhibición podría mejorar la respuesta antitumoral observándose la reducción de crecimiento tumoral y podría sugerirse como coadyuvante de las terapias antitumorales actuales.

## HIPÓTESIS

Se sabe que Simvastatina reduce la proliferación de células tumorales, disminuye la expresión de ADA en membrana, y la concentración de ADA en plasma. Por lo cual, se espera que al administrar Simvastatina a ratones Balb/c inoculados con células tumorales JC, el crecimiento tumoral y la concentración de ADA en suero disminuyan, y se incremente la sobrevivencia de los animales tratados.

## OBJETIVOS

### General.

- Evaluar el efecto de Simvastatina en el crecimiento tumoral y la concentración de adenosina desaminasa en suero de ratones *BALB/c*, inoculados con células tumorales JC

### Particulares

- Evaluar el efecto de Simvastatina sobre la viabilidad en la línea celular JC de cáncer de mama.
- Inducir crecimiento tumoral en ratones de la cepa Balb/c con la línea celular JC de cáncer de mama.
- Monitorear crecimiento tumoral y supervivencia en ratones tratados con Simvastatina vía oral.
- Analizar la concentración de ADA en suero de ratones con crecimiento tumoral y tratados con Simvastatina.

## MATERIAL Y MÉTODO

### ***Cultivo de JC.***

Se utilizaron células de la línea celular JC, las cuales se cultivaron con medio de cultivo compuesto por RPMI 1640 de (GibcoBRL Life Technologies) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) (GibcoBRL Life Technologies). Las células fueron mantenidas bajo condiciones de esterilidad a temperatura de 37°C en una incubadora (Forma Scientific), con 5% de CO<sub>2</sub> y un ambiente de humedad saturante.

### ***Ensayo de viabilidad celular: determinación de la IC<sub>50</sub> de Simvastatina.***

Se sembraron por triplicado  $1 \times 10^4$  células de la línea celular JC en placas de 96 pozos de fondo plano en presencia de diferentes concentraciones de Simvastatina (2mM, 1mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.06 mM, 0.03 mM, 0.0 mM) en volúmenes finales de 100  $\mu$ L a 24 y 48 horas. Se eliminaron los sobrenadantes y se reemplazó con 20  $\mu$ L de solución CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA), el cual contiene un compuesto de tetrazolio, que es bio-reducido por las células en un producto de formazán que es soluble en medio de cultivo de tejidos a una concentración final de 317  $\mu$ g/mL, y posteriormente las placas fueron incubadas por 1.5 h a 37°C. La reducción del compuesto de tetrazolio MTS a formazán es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo y fue medida a una longitud de onda de 490 nm mediante un lector de placas para ELISA.

La concentración de Simvastatina para inhibir la viabilidad celular en 50% (IC<sub>50</sub>) se evaluó con la ayuda del software GRAPH-PAD PRISM.

### ***Inoculación de células tumorales en ratones.***

Para la inmunización e inducción de tumores se usaron grupos de cinco ratones hembra de la cepa BALB/C de 6-8 semanas de edad, del bioterio de la facultad de Estudios Superiores Zaragoza, donde se mantuvieron en condiciones reguladas de bioterio, alimento y agua a libre disposición. El ensayo se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-062- ZOO-1999 y el manual del Comité Institucional para el Cuidado y el Uso de los Animales Experimentales CICUAE-FMVZ-UNAM para el manejo de animales de experimentación. Los ratones se distribuyeron en grupos de cinco ratones: Grupo control (ratones solo con inoculación con células JC sin tratamiento), grupo tratado (ratones inoculados con células tumorales y tratados con Simvastatina 10mM. A los ratones se les inoculó de manera subcutánea  $1 \times 10^6$  células JC suspendidas en 0.1 mL de PBS a nivel dorsal. A partir del día 0 el monitoreo se efectuó cada tercer día. El volumen del tumor fue calculado tras medir el largo y ancho del mismo con ayuda de un vernier y aplicando la siguiente fórmula:  $V = (R1 + R2^2)/2$ , donde R1 y R2 fueron los valores obtenidos a partir de la medición perpendicular del tumor. Después de 14 días de la inoculación cuando los tumores fueron palpables (0.5cm), se inició el tratamiento con Simvastatina vía oral en el agua de uso a una concentración de 114  $\mu\text{g}$  por día para cada ratón.

### ***Cuantificación de ADA en suero de ratón.***

#### *Obtención de sueros*

Transcurridos 30 días de monitoreo del crecimiento tumoral o alcanzados 2 cm de volumen, se procedió a sacrificar a los ratones de cada grupo mediante exanguinación axilar, cortando la vena axilar bajo anestesia. Posterior a ello, la sangre obtenida se centrifugó (8000 rpm/10 minutos) para obtener el suero, el cual se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior en los ensayos de detección de anticuerpos (ELISA).

### *Detección de ADA mediante la técnica ELISA.*

La detección de anticuerpos mediante ELISA se realizó de la manera siguiente: Por triplicado se colocaron 100  $\mu$ L de muestras de suero diluidas (1:200) en PBS en una placa de 96 pozos de fondo plano, se cubrió con aluminio y se incubó por una hora a 37°C. Se incubó por una noche en refrigeración a 4°C. Al siguiente día se desecharon los sobrenadantes de la placa y se realizaron 2 lavados con 300  $\mu$ L/pozo de TBS Tween 20 al 0.1% y se colocaron 100  $\mu$ L de solución bloqueadora TBS-BSA compuesta por TBS-Tween 20 al 0.1% y 2% de albumina sérica bovina (BSA 2%), se incubó por dos horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron 4 lavados con 300  $\mu$ L/pozo de TBS Tween 20 y se añadieron 100  $\mu$ L de anticuerpo primario (Anti-ADA) (*Novus NBP1-87404*) /pozo a una dilución de 1:1000 en solución TBS-BSA 2% y se incubó a 37°C por dos horas. Posteriormente se lavó 6 veces con 300  $\mu$ L /pozo de TBS Tween 20 y se agregó el anticuerpo secundario (*Goat Anti rabbit IgG, Millipore Corp*) 100  $\mu$ L/pozo a una dilución de 1:1000 en solución TBS-BSA 2%, se incubó por dos horas. Se realizaron 8 lavados más con 300  $\mu$ L /pozo de TBS Tween 20. Por último, se adicionaron 100  $\mu$ l de una solución de 0.03gramos de sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma USA), por cada 5ml de solución de Dietanolamina y se incubaron una hora más a 37°C.

La reactividad enzimática se evaluó por formación de color, mediante un lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 405 nm. La densidad óptica fue equivalente a la cantidad de ADA presente en los sueros.

### ***Determinación de ADA en sueros de ratón BALB/c mediante cromatografía en capa fina***

Para la determinación de la isoforma predominante de ADA, se analizaron 7 diferentes muestras de sueros de ratones BALB/c. Donde 5 $\mu$ L de cada suero fueron colocados en tubos Eppendorf e incubados en presencia de 95 $\mu$ L de ADO 5mM con medio OPTIMEM libre de SFB. 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. Se utilizó pentostatina a una concentración (10  $\mu$ M) para inhibir la actividad de ADA2

Al inicio de la incubación y después de 24, 48 y 72 horas se tomaron alícuotas de 1 $\mu$ L de cada sobrenadante y se colocaron sobre laminillas fluorescentes de poliéster de sílica gel para realizar la Cromatografía en capa fina (CCF), (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: isobutanol (7mL), etil acetato (4mL), metanol (3mL) y amonio (4mL). Las muestras se eluyeron durante 30 minutos y posteriormente las laminillas fueron retiradas para su secado a temperatura ambiente. Los productos generados fueron visualizados y fotografiados a través de un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

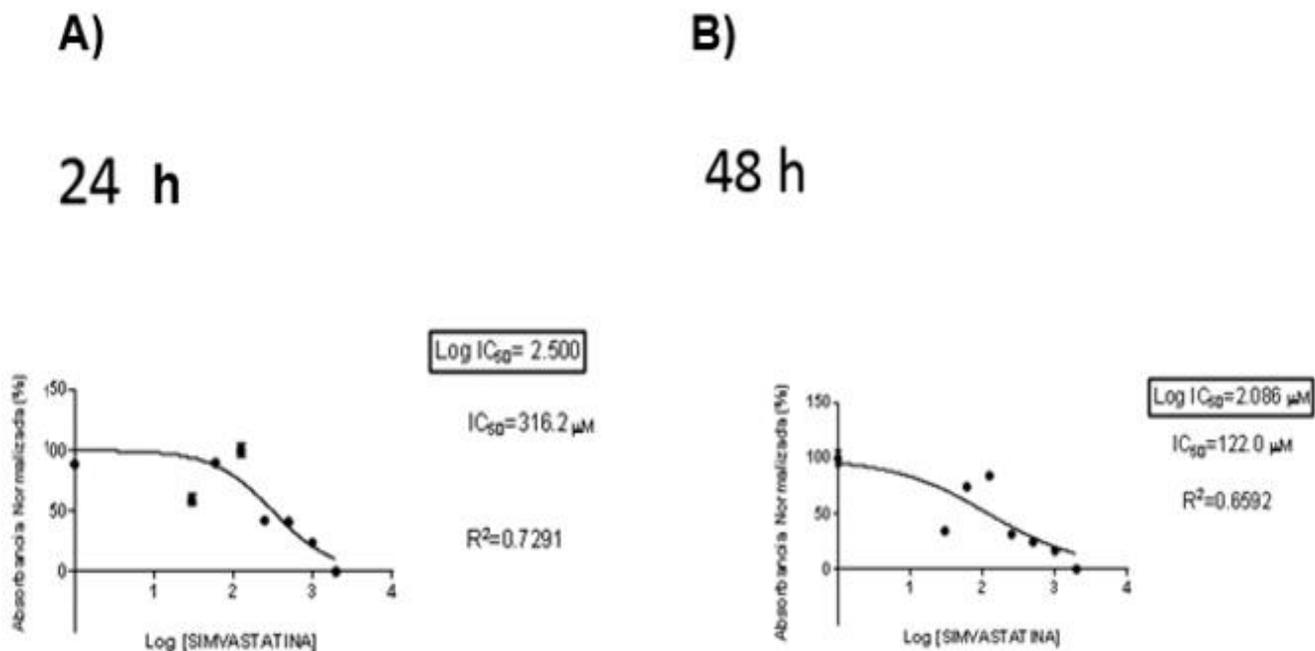
### ***Análisis estadístico de los datos.***

Los datos de volumen tumoral obtenidos durante el experimento fueron evaluados ante un análisis de varianza (ANDEVA), seguida de una prueba de Tukey para determinar las diferencias en cada uno de los grupos control o de tratamiento.

## RESULTADOS

### ***Efectos de Simvastatina sobre la proliferación en la línea celular JC.***

Para poder analizar el efecto de Simvastatina en la proliferación celular se realizó un ensayo de viabilidad. Para ello,  $1 \times 10^4$  células JC se colocaron en una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 o 48 horas con diluciones seriadas de Simvastatina (2 mM, 1mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.06 mM, 0.03 mM, 0.0 mM) por triplicado. Como control negativo se utilizaron células cultivadas sólo con medio de cultivo. Al concluir el periodo de incubación, se adicionaron 5µl de Cell Titer y se incubaron por 1.5 horas a 37 °C en oscuridad y se midió la densidad óptica a 490 nm. El tratamiento con Simvastatina durante 48 horas produjo un mayor efecto inhibitorio de la viabilidad de las células JC que el producido en las células incubadas durante 24 horas. De hecho, la IC<sub>50</sub> obtenida en las células tratadas por 48 horas con Simvastatina fue de 122 µM, mientras que en aquellas tratadas durante 24 horas fue de 316.2 µM (figura 4A y 4B).

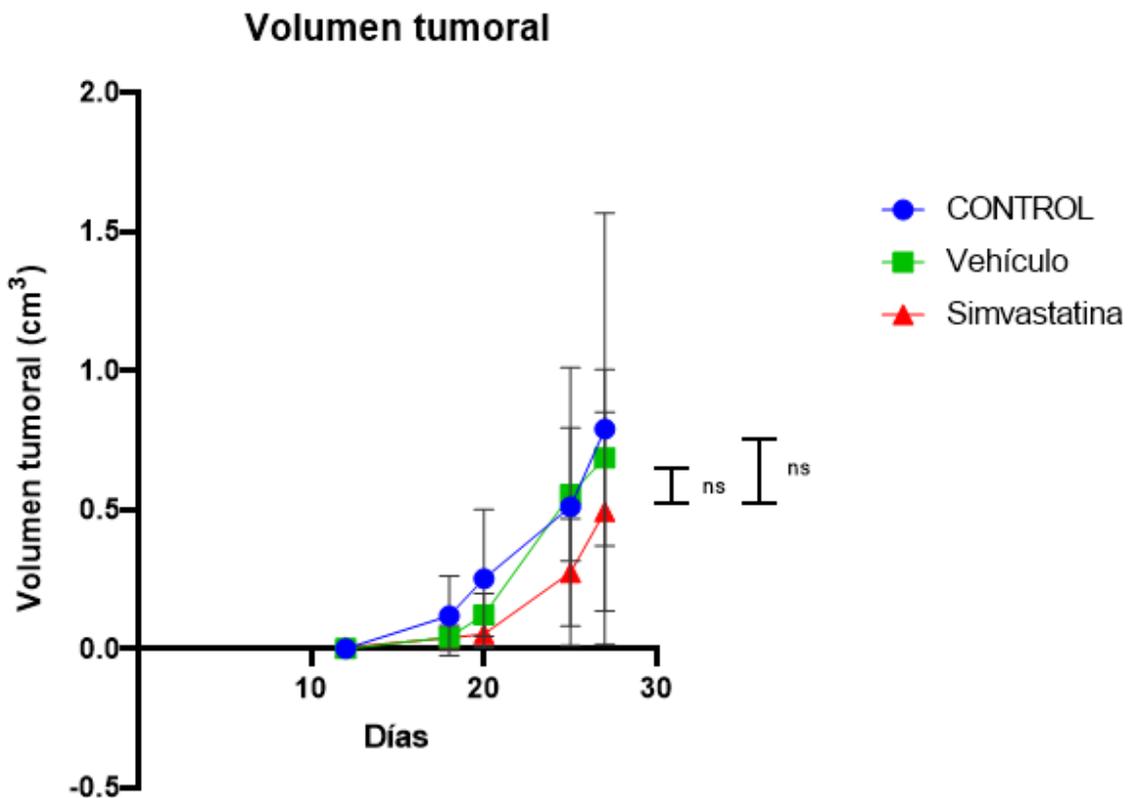


**Figura 4. Simvastatina inhibe la viabilidad de células tumorales JC.** Se muestra la  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^4$  células JC tratadas con diluciones seriadas de Simvastatina (2 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.06 mM, 0.03 mM, 0.0 mM). La  $IC_{50}$  se calculó a 24 horas (A) y a 48 horas (B) mediante el software Graphpad Prisma versión 8.

### **Efecto de Simvastatina sobre el crecimiento tumoral en ratones Balb/c**

Para evaluar el efecto de la simvastatina en el crecimiento de los tumores en ratones hembra de la cepa Balb/c, éstos fueron inoculados a nivel dorsal de manera subcutánea con  $1 \times 10^6$  células JC suspendidas en 0.1 mL de PBS. Después de 14 días de la inoculación de las células tumorales, se establecieron grupos de cinco ratones para llevar a cabo los tratamientos de la siguiente manera: Grupo control, sin tratamiento; Grupo experimental (Simvastatina), ratones que recibieron 20ug de Simvastatina diariamente por vía oral; Grupo vehículo, ratones que recibieron solución vehículo en donde la Simvastatina fue disuelta. Después de 27 días de monitoreo, se encontró que los ratones de los grupos control y vehículo, presentaron

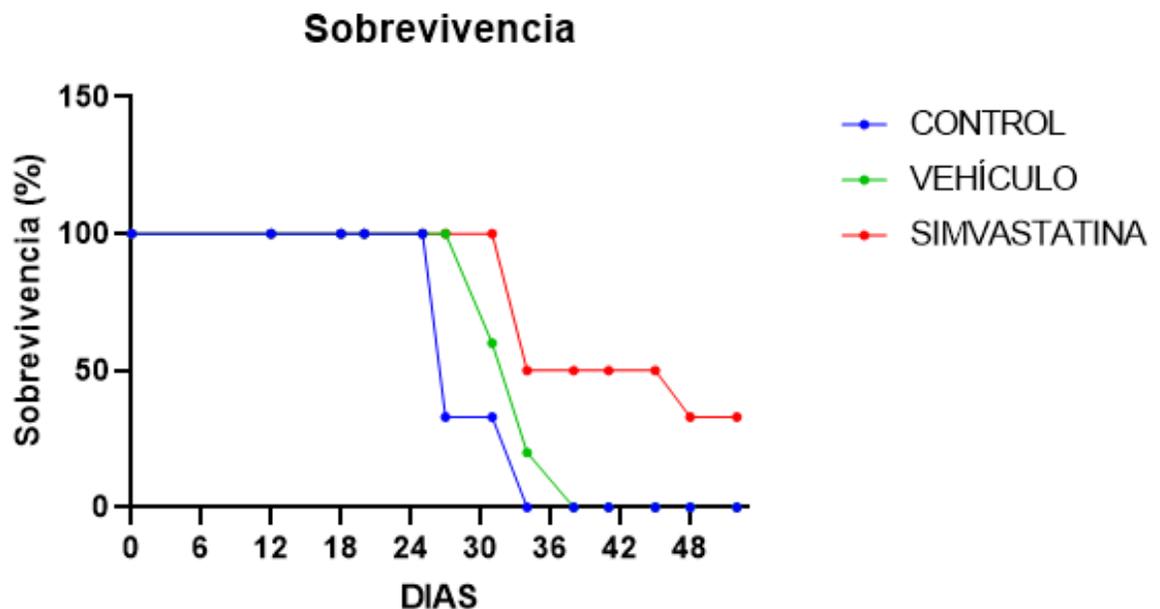
un crecimiento tumoral similar, en donde el volumen tumoral promedio fue de  $0.7\text{cm}^3 \pm 0.3340$  y  $0.6\text{cm}^3 \pm 0.1337$ , respectivamente; mientras que el grupo tratado con Simvastatina mostró una tendencia a disminuir el crecimiento tumoral, obteniéndose un tamaño promedio de  $0.4\text{cm}^3 \pm 0.1296$ , aproximadamente 40% respecto al crecimiento tumoral del grupo control (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto de Simvastatina en el crecimiento tumoral de ratones Balb/c inoculados con células JC. Células JC ( $1 \times 10^6$ ) fueron inoculadas en cada uno de los ratones Balb/c, 14 días después se establecieron grupos de 5 ratones los cuales recibieron los siguientes tratamientos: Grupo control, sin tratamiento; Grupo experimental (Simvastatina) 20ug diariamente por vía oral; Grupo vehículo, ratones que recibieron solución vehículo (etanol 0.2%). Se muestra el volumen tumoral total a los 27 días. Diferencia no significativa ( $P > 0.001$ ).

## **Simvastatina aumentó la supervivencia de ratones BALB/c**

Para analizar el efecto de la Simvastatina sobre la supervivencia de los ratones BALB/c inoculados con las células tumorales JC y que posteriormente recibieron los diferentes tratamientos, se monitoreo de los ratones se prolongó hasta los 48 días de haber recibido el inóculo de las células tumorales. Ninguno de los ratones del grupo control o vehículo sobrevivieron después de 33 y 37 días, respectivamente. Sin embargo 2/5 ratones tratados con Simvastatina sobrevivieron después de 48 días (Figura 6). Estos resultados sugieren que el tratamiento de los ratones con Simvastatina, además de tener un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral, aumenta su supervivencia respecto a los ratones utilizados como control.

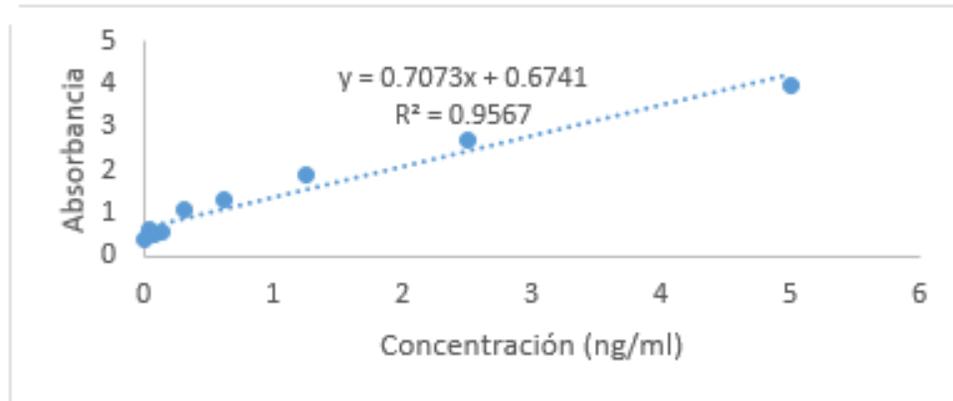


**Figura 6.** Efecto de Simvastatina en la supervivencia de ratones Balb/c inoculados con células tumorales JC. Células JC ( $1 \times 10^6$ ) fueron inoculadas en cada uno de los ratones Balb/c, 14 días después se establecieron grupos de 5 ratones los cuales recibieron los siguientes tratamientos: Grupo control, sin tratamiento; Grupo experimental (Simvastatina) 20ug diariamente por vía oral; Grupo vehículo, ratones que recibieron solución vehículo (etanol 0.2%). Se muestra el seguimiento de la supervivencia de los grupos de ratones a 48 días después de haber recibido el inóculo de las células tumorales.

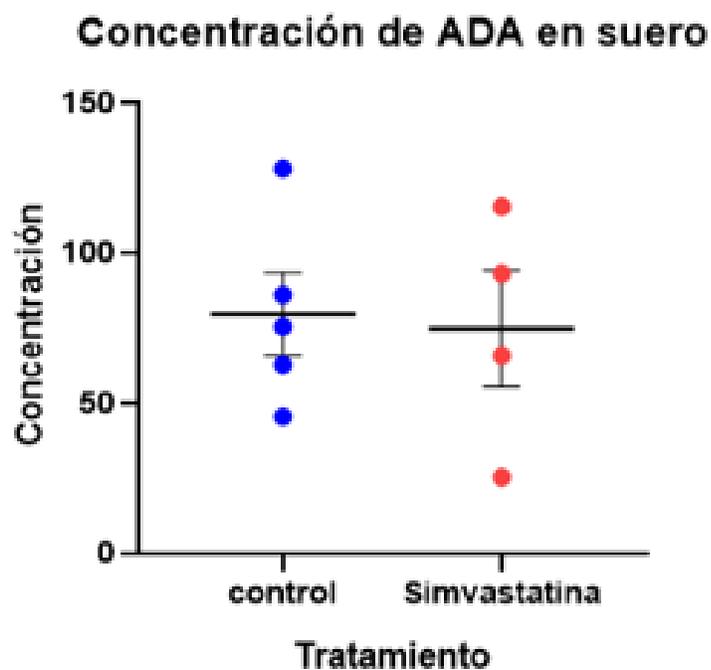
### ***Simvastatina disminuye la concentración de ADA sérica en ratones Balb/c inoculados con células tumorales JC***

Para determinar la concentración de ADA en los sueros de los ratones BALB/c inoculados con las células tumorales JC, se llevó a cabo un ensayo de ELISA. Después de 27 días, de haber inoculado las células tumorales JC, se obtuvieron muestras séricas de los ratones. Se colocaron por triplicado 100  $\mu$ L de muestras de suero diluidas (1:200) en PBS en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se añadieron 100  $\mu$ L de anticuerpo / pozo a una dilución de 1:1000 en solución TBS-BSA 2%. Como control positivo se realizó una curva de concentración con enzima recombinante humana ADA (Figura A). Los sueros de los ratones tratados con Simvastatina mostraron una tendencia a disminuir la concentración de ADA ( $74.84 \pm 33.5719$ ) en relación a los sueros de los ratones del grupo control ( $79.51 \pm 27.7442$ ), respectivamente (Figura 7). Es importante mencionar que la concentración de ADA sérica mostró una correlación inversa respecto al volumen tumoral ( $r=0.963$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 8).

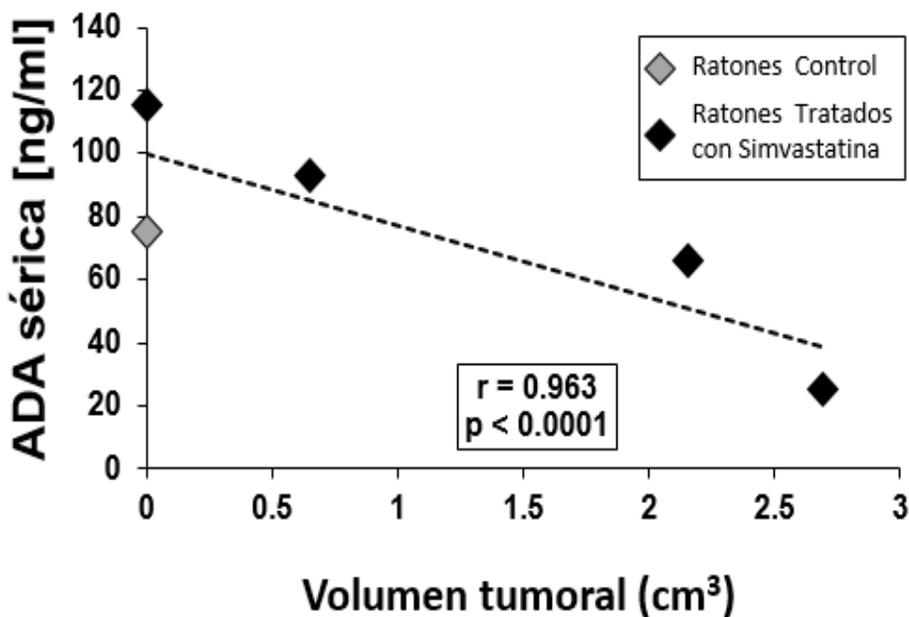
A)



B)



**Figura 7.** Simvastatina disminuye la concentración de ADA sérica en ratones BALB/c inoculados con células JC. Muestras de suero de ratones sin tratamiento (control) o de ratones tratados con Simvastatina (Simvastatina) fueron analizadas por ELISA para determinar las concentraciones de ADA. A) Se muestra la curva patrón de ADA recombinante humana. (B) Se muestran las concentraciones de ADA sérica de los ratones BALB/c inoculados con células JC, y de ratones inoculados con células JC y tratados con Simvastatina durante 27 días.

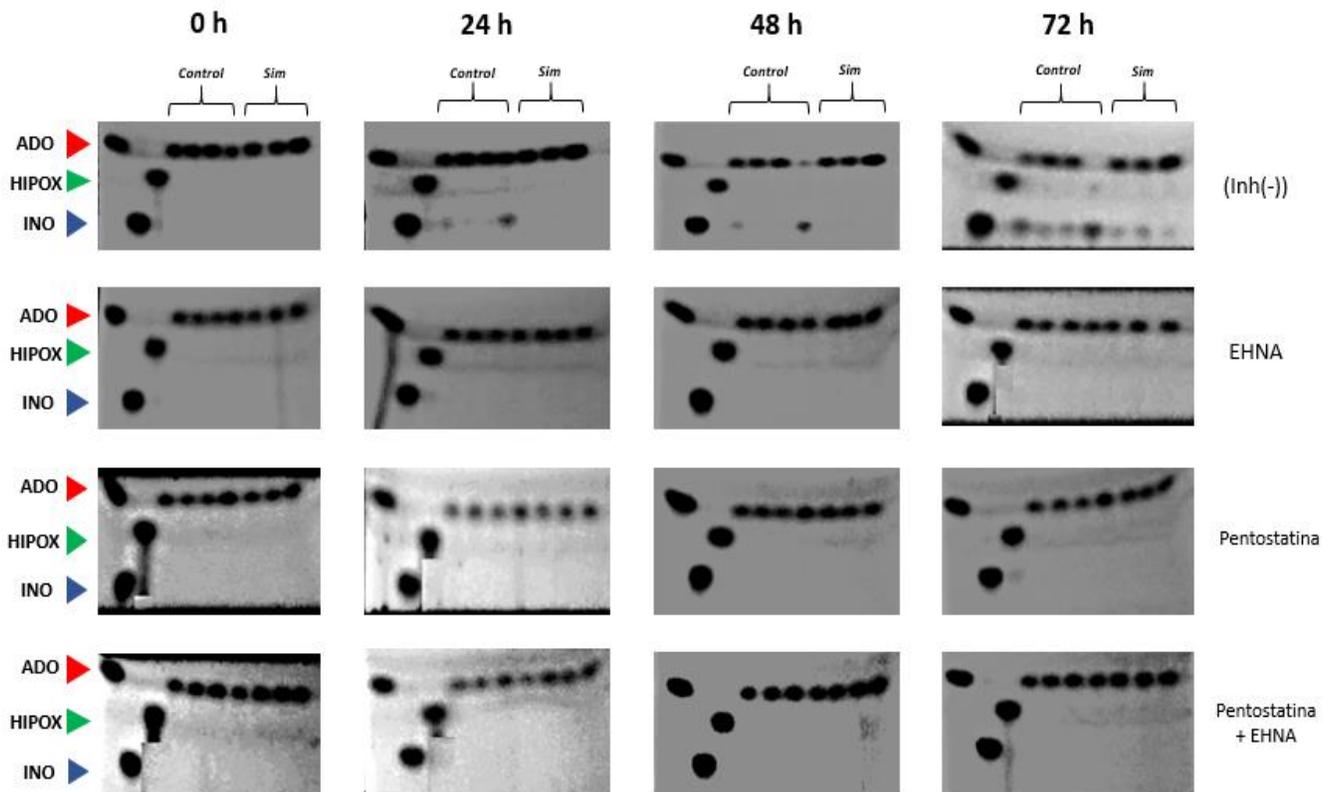


**Figura 8.** Se muestra la correlación entre la concentración de ADA en sueros y el volumen tumoral de ratones BALB/c inoculados con células JC con o sin tratamiento de Simvastatina. Spearman,  $r=0.963$ ,  $P<0.0001$ .

***Pentostatina inhibe la actividad de ADA presente en sueros de ratones BALB/c tratados con Simvastatina.***

Con el objetivo de determinar la actividad de ADA en los sueros de los ratones BALB/c: 4 muestras de ratones del grupo control y 3 de ratones tratados con Simvastatina. Para ello, 5µL de cada suero fueron colocados en tubos Eppendorf e incubados 0, 24, 48 y 72 h en presencia de una concentración final de 5mM de ADO, y bajo los siguientes tratamientos: Sin inhibidor (Inh (-)); en presencia de 1mM de EHNA (EHNA), inhibidor específico de ADA1; en presencia de 10 uM de pentostatina (Pentostatina), inhibidor de ADA1 y ADA2; y en presencia de 10uM

de pentostatina y 1mM de EHNA, con volúmenes finales de 100  $\mu$ L. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina. Después de 24h de incubación, se observó que los sueros de los ratones (Inh (-)) comenzaron a convertir la ADO en INO; mientras que, los sueros de los ratones tratados con Simvastatina mostraron menor capacidad para convertir la ADO en INO, aún después de las 72 horas de incubación (mostrado en recuadros color rojo). Por otro lado, se observó que la adición de EHNA, Pentostatina o EHNA + Pentostatina produjo la inhibición completa de la actividad de ADA en las diferentes muestras de sueros (Figura 9). Estos resultados indican que los sueros de los ratones inoculados con las células tumorales JC y que recibieron Simvastatina, además de mostrar menores concentraciones de ADA sérica (Figura 7), presentaron menor capacidad para desaminar ADO a INO (Figura 9), y que ADA1 sea la principal isoforma de ADA contenida en estas muestras séricas.



**Figura 9. Actividad enzimática de ADA en suero de Ratones Balb/c inoculados con células tumorales JC.** Sueros de ratones Balb/c inoculados con células tumorales JC y mantenidos durante 27 días sin tratamiento (Ctrl) o tratados con Simvastatina (Sim) fueron incubados a una dilución 1:20 en presencia de ADO (5mM concentración final) por 0, 24, 48 y 72 horas, en ausencia de inhibidor de ADA (Inh (-)), o en presencia 1mM del inhibidor de ADA1 (EHNA), de 10uM del inhibidor de ADA1/ADA2 (pentostatina), o de ambos inhibidores EHNA+Pentostatina. Adenosina (ADO), Inosina (INO) e Hipoxantina (HYPOX) fueron utilizadas como testigos de corrimiento en la Cromatografía de Capa Fina.

## DISCUSIÓN

En años recientes se ha descrito la relevancia de la vía adenosinérgica dentro de los procesos de desarrollo del cáncer, por ejemplo, se ha asociado con una vía de señalización de la adenosina (generada por las ectonucleotidasas CD39/CD73) sobre sus receptores específicos y su impacto con la progresión tumoral, a través de la activación de mecanismos como la proliferación celular desordenada, la promoción de la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis, resistencia a fármacos e inmunosupresión, (Pfaffenzeller *et al.*, 2020). Por ejemplo, se ha encontrado que CD73 se sobreexpresa en melanoma y cáncer de mama (Huang *et al.*, 2019). Sin embargo, las altas concentraciones de adenosina producida dentro del microambiente tumoral, como ocurre en los tumores ginecológicos (Bagheri *et al.*, 2019), pueden ser reguladas por la adenosina desaminasa (ADA), cuya alta expresión se ha relacionado con la protección del tumor al efecto citotóxico de adenosina (Kutryb-Zajac *et al.*, 2018). Por tanto, la inhibición de la degradación de adenosina merece una atención especial en la terapia del cáncer (Kutryb-Zajac *et al.*, 2018). ADA es una enzima que cataliza la reacción de desaminación de adenosina a inosina dentro del metabolismo de las purinas (Allison *et al.*, 2022). La actividad de ADA se halla en prácticamente todos los tejidos. Sin embargo, su mayor actividad se encuentra en el tejido linfoide, principalmente en los linfocitos T. De la misma manera, se ha propuesto a ADA como un marcador de la inmunidad mediada por células y su actividad puede estar aumentada en patologías como linfomas o enfermedades autoinmunes (Coitinho *et al.*, 2007). La inhibición de ADA conduce a la supresión de la proliferación celular en leucemias y linfomas (Ozomi, 1998). Además, dicha inhibición disminuye el tamaño y crecimiento tumoral en modelos de ratón con líneas celulares de cáncer de mama (Kutryb, 2018). Sin embargo, el efecto de ADA en ciertos tumores aún no se ha esclarecido totalmente. Por lo tanto, el análisis de la inhibición de esta enzima resulta ser interesante como estrategia terapéutica en cáncer (LinWang *et al.*, 2021). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito que ADA se expresa diferencialmente entre las líneas celulares de CaCu, mostrando que el Hidrocloruro de adenina (eritro-9-(2-Hidroxi-

3-nonil) (EHNA), inhibidor específico para ADA1, redujo la actividad enzimática de ADA en las células tumorales, además de inducir su apoptosis, mostrando que la presencia de ADA en las células tumorales de CaCu puede tener una función protectora ante el efecto citotóxico de ADO (Monroy-Mora, 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que las estatinas, que son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima A (HMG-Co A) reductasa, una enzima implicada en la síntesis del colesterol, especialmente en el hígado, inducen la apoptosis y regulan la proliferación de células en modelos tumorales.

En este contexto, la Simvastatina ha sido evaluada como un inhibidor efectivo de la viabilidad de células tumorales de cáncer cérvico uterino, mediante la inhibición de la vía del mevalonato (Crescencio, 2009). De igual forma, como un importante fármaco antitumoral en neoplasias como próstata, pulmón y de mama (Wolfe *et al.*, 2015). En modelos de cáncer de mama, se ha demostrado que las células MDA-MB-231 son sensibles a la toxicidad de la Simvastatina de manera dependiente de la dosis, e inhibe significativamente la invasión de las células tumorales (Wang, 2016). En modelos de ratón, la Simvastatina también altera el potencial metastásico de las células tumorales, impidiendo el establecimiento de colonias dentro de otros órganos como pulmón o cerebro (Wolfe, 2015).

Por otro lado, en algunos estudios se ha demostrado que el tratamiento con Simvastatina disminuye la actividad enzimática de ADA en sueros de ratones con tumores (Kutryb-Zajac *et al.*, 2018), o en plasmas de conejo (Kowalczyk *et al.*, 2008). En ensayos realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha encontrado que Simvastatina tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de ADA en células tumorales de CaCu (Monroy Mora, 2020). En el presente estudio, utilizando células JC de cáncer de mama y un modelo tumoral de células JC en ratones BALB/c, encontramos que Simvastatina disminuyó la viabilidad de las células tumorales cultivadas *in vitro* de manera dependiente de la dosis y del tiempo de cultivo, debido a que a 48 horas de cultivo se requirió de 50% de la dosis de Simvastatina utilizada a las 24 horas para obtener la IC50. Resultados similares fueron reportados por Yao y colaboradores en 2021; y Rezano y colaboradores en 2019, quienes

mostraron que Simvastatina inhibe fuertemente a las células MDA-MB-231 y en menor grado a MCF-7, lo cual fue asociado con la inhibición de la enzima HMGCR para lograr la inhibición de la vía del mevalonato. De igual manera, Wang y colaboradores en 2016 determinaron que la Simvastatina induce la apoptosis, inhibe la proliferación y suprime las vías PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK en el cáncer de mama, y estos efectos antitumorales son mediados por la inhibición de la vía del mevalonato. Además, en 2009, Crescencio y colaboradores hallaron que la Simvastatina era el inhibidor más eficaz de proliferación de las células tumorales de CaCU.

En nuestro modelo de estudio también encontramos que el tratamiento con Simvastatina tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tumores, encontrándose disminución de 40% respecto a los ratones que no recibieron tratamiento. Este efecto también se vio reflejado en una mayor supervivencia (más de 10 días) de los ratones tratados con Simvastatina en comparación con los del grupo Control y Vehículo. Kutryb-Zajac y colaboradores en 2018, mostraron resultados similares al utilizar 2'desoxicoformicina (dCF) para inhibir ADA en modelos tumorales de mama, mostrando así una disminución en el crecimiento y masa tumoral. En otro estudio también se encontró que la Simvastatina inhibe el proceso de angiogénesis tumoral de mama mediante la regulación negativa de HIF-1 $\alpha$  (Chang *et al.*, 2018). Además, en otros tipos de cáncer, como el de colon, se ha descrito que la Simvastatina puede tener un papel quimiopreventivo, ya que puede inhibir el crecimiento tumoral, y reducir el proceso de metástasis (Gohlke *et al.*, 2022) y, por lo tanto, explica los efectos benéficos de las estatinas sobre los tumores malignos.

Por otro lado, en nuestro estudio encontramos que los sueros de los ratones tratados con Simvastatina presentaron menores concentraciones de ADA y capacidad para desaminar la ADO en INO, que los sueros de ratones del grupo control (ratones que recibieron células JC y no recibieron tratamiento). Estos resultados son similares a los obtenidos por Kowalczyk *et al.*, 2008, quienes encontraron que sueros de ratones tratados con Simvastatina mostraron

disminución de 50% de la actividad de ADA presente en el plasma de conejos. No obstante, hay que considerar que en comparación al estudio de Kowalczyk, nuestro estudio se llevó a cabo en un modelo de tumor en ratones BALB/c, en donde varias fuentes celulares ricas en ADA pueden contribuir a la liberación de ADA soluble contenida en los plasmas de estos ratones. Por ejemplo, la acumulación de células inmunitarias, así como las células endoteliales activadas en los tumores de mama malignos durante la angiogénesis tumoral, exhiben una gran actividad de ADA (Antonioli *et al.*, 2012; Kutryb-Zajac *et al.*, 2016). En nuestro estudio también encontramos una correlación inversa entre las concentraciones séricas de ADA y el tamaño tumoral. En este sentido, es conocido que altos niveles de ADO en el microambiente tumoral se asocian con mayores efectos inmunosupresores, y que la desaminación de ADO mediante la presencia de ADA podría atenuar dicho efecto inmunosupresor (Kutryb-Zajac *et al.*, 2018), lo cual nos hace suponer que la acumulación de ADO, asociada con un menor contenido de ADA sérica, podría conducir a un aumento en el crecimiento y progresión tumoral en los ratones.

Tomando en cuenta que la expresión de ADA1 y ADA2 se encuentran elevadas en los tejidos tumorales y sueros de pacientes con cáncer de mama (Lee, 2020), en nuestro modelo, en el cual se utilizaron células JC de cáncer de mamam murino, se pretendió analizar si ambas isoformas de ADA estaban contenidas en los sueros de los ratones bajo experimentación. Para ello, se utilizaron los inhibidores EHNA, específico para ADA1 (Nakajima, *et al.*, 2015), y Pentostatina, el cual inhibe tanto a ADA1 como a ADA2 (Kutryb-Zajac *et al.*, 2018). En nuestro estudio encontramos que EHNA, Pentostatina o la combinación de ambos inhibidores, inhibieron completamente la actividad de ADA contenida en los sueros de los ratones del grupo control y de los ratones tratados con Simvastatina, lo cual hace sugerir que ADA1 es la principal isoforma que se encuentra contenida en los sueros de estos ratones. EHNA es un inhibidor análogo de purina que bloquea la actividad de ADA de manera irreversible y su uso clínico no a sido aprobado por la FDA, debido a su uso puede generar un alto grado de toxicidad (Trincavelli *et al.*, 2013). Por lo que se requiere de inhibidores estables de ADA de acción corta y baja toxicidad. En este contexto, se ha propuesto que pentostatina, la cual tiene afinidad tanto para ADA1 como para

ADA2, puede ser eficaz en el tratamiento de diferentes tumores que sobre-expresen ADA (Lee *et al.*, 1984). No obstante, aunque ya ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de leucemia de células pilosas, su mecanismo de acción aún no ha sido completamente esclarecido (Grever *et al.*, 2019). En nuestro estudio observamos que Simvastatina, además de disminuir la viabilidad de las células tumorales, disminuyó la concentración de ADA en los sueros de los ratones inoculados con las células tumorales JC. En este sentido, en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se observó que Simvastatina disminuyó la expresión de RNAm de ADA1 en células de CaCu (Monroy-Mora, 2020), en consecuencia, es factible que la disminución de la concentración de ADA contenida en los sueros de los ratones tratados con Simvastatina pueda deberse a este efecto. Por lo cual, será importante estudiar a profundidad la cinética de inhibición de la expresión de ADA por Simvastatina y su impacto en la reducción del crecimiento tumoral en tumores que sobre-expresan ADA.

## CONCLUSIONES

Simvastatina inhibió la proliferación de células JC de manera dependiente de las dosis, en donde la IC<sub>50</sub> fue de 316  $\mu$ M a 24 h y 122  $\mu$ M a 48 h.

Simvastatina inhibió el crecimiento tumoral en ratones Balb/c inoculados con células JC y tuvo un incremento notable en la sobrevivencia de los ratones tratados con el fármaco respecto al grupo control.

Simvastatina redujo la concentración de ADA sérica de ratones Balb/c inoculados con células JC.

La inhibición de ADA, con EHNA y Pentostatina, sugiere que ADA1 sea la principal fuente de ADA contenida en los sueros de ratones Balb/c inoculados con células JC.

## PERSPECTIVAS

- *Evaluar el efecto de diferentes dosis de simvastatina en la disminución de la expresión de ADA en tejidos tumorales y de las concentraciones séricas de ADA.*
- *Determinar el efecto del tratamiento de Simvastatina en las poblaciones de linfocitos T infiltradas en los tumores.*

## BIBLIOGRAFÍA

- Ke Dong, Gao Z., Zhang H. (2016). *The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases*. *Immunologic Research*. 64(5): 1133–1141
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological reviews*, 276(1), 121–144.
- Vigano, S., Alatzoglou, D., Irving, M., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., Romero, P., & Coukos, G. (2019). Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function. *Frontiers in immunology*, 10, 925.
- Azambuja, JH, Ludwig, N., Braganhol, E. y Whiteside, TL (2019). La inhibición de la vía adenosinérgica en el cáncer rejuvenece la inmunidad innata y adaptativa. *Revista internacional de ciencias moleculares* , 20 (22), 5698.
- Hanskó, G. & Cronstein, B. (2013). *Regulation of Inflammation by Adenosine*. *Frontiers Immunology* 4: 85
- Huang, Y., Gu, Z., Fan, Y., Zhai, G., Zhao, X., Sun, Q., Shi, Y. & Lin, G. (2019). Inhibición de la vía adenosinérgica: la parte indispensable de la terapia oncológica en el futuro. *Señalización purinérgica* , 15 (1), 53–67.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 19(6), 355–367.
- Tecles, F., Rubio, C. P., Contreras-Aguilar, M. D., López-Arjona, M., Martínez-Miró, S., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. J. (2018). Adenosine deaminase activity in pig saliva: analytical validation of two spectrophotometric assays. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 30(1), 175–179.
- Maneechotesuwan, K., Kasetsinsombat, K., Wongkajornsilp, A., & Barnes, P. J. (2016). Simvastatin up-regulates adenosine deaminase and suppresses osteopontin expression in COPD patients through an IL-13-dependent mechanism. *Respiratory research*, 17(1), 104.

- Pérez-Aguilar, Mary Carmen, Goncalves, Loredana, Ibarra, Alba, & Bonfante-Cabarcas, Rafael. (2010). Adenosin deaminasa como molécula coestimuladora y marcador de inmunidad celular. *Investigación Clínica*, 51(4), 561-571.
- Zervou, M. I., Goulielmos, G. N., Matalliotakis, M., Matalliotaki, C., Spandidos, D. A., & Eliopoulos, E. (2020). Role of adenosine deaminase 2 gene variants in pediatric deficiency of adenosine deaminase 2: A structural biological approach. *Molecular medicine reports*, 21(2), 876–882.
- Lee, Y. (2020). *Total adenosine deaminase highly correlated with adenosine deaminase 2 activity in serum*. 81:31
- Monroy-Mora, K. (2020). *Efecto de simvastatina sobre la expresión de adenosina desaminasa en células tumorales de cáncer cérvico-uterino*. Facultad de Estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México
- Luning, T. (2012). *Restoring balance to B cells in ADA deficiency*. The journal of clinical investigation. 122(6): 1960–1962
- Apasov, SG, Blackburn, MR, Kellems, RE, Smith, PT y Sitkovsky, MV (2001). La deficiencia de adenosina desaminasa aumenta la apoptosis tímica y causa una señalización defectuosa del receptor de células T. *El diario de investigación clínica* , 108 (1), 131–141.
- Kutryb-Zajac, B., Koszalka, P., Mierzejewska, P., Bulinska, A., Zabielska, M. A., Brodzik, K., Skrzypkowska, A., Zelazek, L., Pelikant-Malecka, I., Slominska, E. M., & Smolenski, R. T. (2018). Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor-dependent mechanisms. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(12), 5939–5954.
- Wang, T., Seah, S., Loh, X., Chan, C. W., Hartman, M., Goh, B. C., & Lee, S. C. (2016). Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget*, 7(3), 2532–2544.

- Bai, F., Yu, Z., Gao, X., Gong, J., Fan, L., & Liu, F. (2019). Simvastatin induces breast cancer cell death through oxidative stress up-regulating miR-140-5p. *Aging*, 11(10), 3198–3219.
- Stine, E., et. al. (2016). *The HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, exhibits anti-metastatic and anti-tumorigenic effects in ovarian cancer.* *Oncotarget*. 7(1): 946–960
- Kowalczyk, E. & Kopff, M. (2008). *Effect of Cardiovascular Drugs on Adenosine Deaminase Activity.* *Angiology* 59(6).
- Wolfe, A. R., Debeb, B. G., Lacerda, L., Larson, R., Bambhroliya, A., Huang, X., Bertucci, F., Finetti, P., Birnbaum, D., Van Laere, S., Diagaradjan, P., Ruffell, B., Trenton, N. J., Chu, K., Hittelman, W., Diehl, M., Levental, I., Ueno, N. T., & Woodward, W. A. (2015). Simvastatin prevents triple-negative breast cancer metastasis in pre-clinical models through regulation of FOXO3a. *Breast cancer research and treatment*, 154(3), 495–508.
- Allison, T. R., Hunsaker, J. J. H., La'ulu, S. L., & Genzen, J. R. (2022). Evaluation of an adenosine deaminase (ADA) assay in serum, pleural, pericardial, peritoneal, and cerebrospinal fluids on the Roche cobas c501 analyzer. *Clinical biochemistry*, 109-110, 57–63.
- Coitinho, Cecilia, San Martín, Rosario, Mier, Cristina, Rodríguez, Roxana, Zunino Torres, Silvia, & Rivas, Carlos. (2007). Utilidad de la dosificación de adenosin deaminasa en el diagnóstico de la tuberculosis pleural: Primera experiencia nacional. *Revista Médica del Uruguay*, 23(1), 19-24.
- Monroy-Mora, A. (2019). *Efecto de la inhibición de adenosina deaminasa (ADA) en la proliferación y viabilidad de células tumorales de cáncer cérvico-uterino.* Facultad de Estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México
- Yao, X., Xie, Cao, Tang, Men, Peng & Yang (2021). Simvastatin induced ferroptosis for triple-negative breast cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 311.

- Rezano, A., Ridhayanti, F., Rangkuti, A. R., Gunawan, T., Winarno, G. N. A., & Wijaya, I. (2021). Cytotoxicity of Simvastatin in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 22(S1), 33–42.
- Kutryb-Zajac, B., Koszalka, P., Mierzejewska, P., Bulinska, A., Zabielska, M. A., Brodzik, K., Skrzybkowska, A., Zelazek, L., Pelikant-Malecka, I., Slominska, E. M., & Smolenski, R. T. (2018). Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor-dependent mechanisms. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(12), 5939–5954.
- Wang, JC, Li, XX, Sun, X., Li, GY, Sun, JL, Ye, YP, Cong, LL, Li, WM, Lu, SY, Feng, J. y Liu, PJ (2018). La activación de AMPK por simvastatina inhibió la angiogénesis del tumor de mama al impedir el factor proangiogénico inducido por HIF-1 $\alpha$ . *Ciencia del cáncer* , 109 (5), 1627–1637.
- Gohlke, B. O., Zincke, F., Eckert, A., Kobelt, D., Preissner, S., Liebeskind, J. M., Gunkel, N., Putzker, K., Lewis, J., Preissner, S., Kortüm, B., Walther, W., Mura, C., Bourne, P. E., Stein, U., & Preissner, R. (2022). Real-world evidence for preventive effects of statins on cancer incidence: A trans-Atlantic analysis. *Clinical and translational medicine*, 12(2), e726.
- 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 : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 35(1), 51–60.
- Lee, N., Russell, N., Ganeshaguru, K., Jackson, B. F., Piga, A., Prentice, H. G., Foa, R., & Hoffbrand, A. V. (1984). Mechanisms of deoxyadenosine toxicity in human lymphoid cells in vitro: relevance to the therapeutic use of inhibitors of adenosine deaminase. *British journal of haematology*, 56(1), 107–119.

- Biri, H., *et. al.*, (1999). Activities of DNA turnover and free radical metabolizing enzymes in cancerous human prostate tissue. *Cancer investigation*, 17(5), 314–319.
- Pérez-Aguilar, Mary Carmen, & Rondón-Mercado, R. (2015). Adenosin deaminasa en la tripanosomiasis experimental: futuras implicaciones. *Investigación Clínica*, 56(3), 309-319.
- Kutryb-Zajac, B., Mateuszuk, L., Zukowska, P., Jaształ, A., Zabielska, M. A., Toczek, M., Jablonska, P., Zakrzewska, A., Sitek, B., Rogowski, J., Lango, R., Slominska, E. M., Chlopicki, S., & Smolenski, R. T. (2016). Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovascular research*, 112(2), 590–605.
- Monguió-Tortajada, M., Roura, S., Gálvez-Montón, C., Franquesa, M., Bayes-Genis, A., & Borràs, F. E. (2017). Mesenchymal Stem Cells Induce Expression of CD73 in Human Monocytes *In Vitro* and in a Swine Model of Myocardial Infarction *In Vivo*. *Frontiers in immunology*, 8, 1577..
- Vultaggio-Poma, V., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2020). Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells*, 9(11), 2496.
- Ozomi Niitsu, Yuri Yamaguchi, Masanori Umeda, Yoshio Honma. (1998) Human Monocytoid Leukemia Cells Are Highly Sensitive to Apoptosis Induced by 2'-Deoxycoformycin and 2'-Deoxyadenosine: Association With dATP-Dependent Activation of Caspase-3, *Blood*, 92(9), 3368-3375, ISSN 0006-4971,