



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Carrera de Biología
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Experimental Zaragoza

Diferenciación celular y cáncer
Laboratorio de Inmunobiología
**Efecto de $TGF\beta$, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $TNF\alpha$ y EGF en la
expresión de CD73 en la línea celular de cáncer de
mama HCC 1806.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Bióloga

Presenta:

Castro González Janeth Berenice

**Directora de Tesis: Dra. María de
Lourdes Mora García**



Ciudad de México, 2020



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.

Frosan et haec olim meminisse iuvabit

Virgilio, *La Eneida* , Libro I

“Wie lange können wir hier noch halten?”

Karl Von Vereiter.

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton.

∴ Agradecimientos

A la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto las puertas a sus aulas, es un orgullo pertenecer a tan honrosa institución.

A la Escuela Nacional Preparatoria Plantel 7, por ser la introductoria a la comunidad universitaria, de ti me llevo grandes momentos, experiencias y amistades.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por haberme adentrado a una de mis pasiones, la Biología, sin duda una de las mejores elecciones de mi vida.

Al Dr. Alberto Monroy y la Dra. Lourdes Mora, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así también Al Dr. Jorge Hernández, por sus enseñanzas y su forma siempre cordial ante todos.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología por todas las enseñanzas, risas y momentos compartidos. Les agradezco infinitamente en todo momento y me siento afortunada de haber colaborado con ustedes un ambiente de trabajo tan agradable.

A los profesores de la facultad: José Luis Guzmán, pues desde el curso propedéutico y hasta la fecha sigue alentándome a seguir adelante; a la profesora Leticia López Vicente, por darme la oportunidad y la confianza de realizar mi servicio social con ella, siempre un mundo de enseñanzas incluso fuera del aula; Judith Villavicencio, por sus consejos en cada clase.

∴ Dedicatorias

A mis padres, Faustino Castro Ávila y Patricia González Villeda, por su incondicional apoyo en todo momento. Así también a mi hermano, Erick Iván Castro González, por ser mi compañero de vida.

A Mauro Vera Garrido. Sacrificamos parte de nuestro tiempo, me viste crecer como persona, como estudiante, hemos compartido risas, llanto, momentos de felicidad, de tristeza, problemas y metas realizadas como ésta. No hay palabras para agradecer tu apoyo incondicional. Te amo y te amaré hasta el final de los tiempos.

A la memoria de Moisés González Villeda. Desearía que pudieras estar aquí presente para compartir este momento contigo, pues siempre tuviste la ilusión de ver a tu sobrina con un título profesional. Sé que donde quiera que estés te sientes orgulloso de esta meta lograda. Quienes nos aman jamás nos dejan, te extrañamo mucho.

A la memoria de Evangelina García. Doña Eva, usted que fue como una abuela para mí, y que se preocupó por mi familia sin tener el deber o la obligación. Mi eterno agradecimiento a usted por siempre

A los miembros de la familia González-Guzmán. Ustedes saben quiénes son y la forma en la que han alentado mi crecimiento educativo.

A mis amigos: Silvia y Alejandro. Gracias por la unidad que formamos dentro de las clases, pero sobre todo por la confianza generada fuera de estas, sin sus consejos, enseñanzas, risas y momentos difíciles mis pasos por la vida no sería los mismo. Sandra, por ser lo mejor que me ha dejado la vida laboral y que a pesar de la distancia, siempre estaremos juntas.

Tabla de contenido

5

1 .. ABREVIATURAS.....	6
2 .. RESUMEN.....	8
3 .. MARCO TEÓRICO	9
3.1 • CÁNCER.....	9
3.1.1 • Cáncer de mama.....	9
3.1.2 • Clasificación del cáncer de mama	13
3.2 • SISTEMA INMUNE.....	17
3.2.1 • Inmunidad Innata.....	18
3.2.2 • Inmunidad adaptativa.....	18
3.2.3 • Citocinas: generación y función.....	19
3.2.4 • Respuesta Inmune Tumoral.....	21
3.3 • VÍA ADENOSINÉRGICA.....	22
3.3.2 • CD73 y Adenosina en el cáncer.....	25
4.: JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
5.: OBJETIVO GENERAL	29
5.1.: OBJETIVOS PARTICULARES	29
6 .. HIPÓTESIS.....	29
7.: MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 CULTIVO CELULAR Y OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES.....	30
7.2 EXPRESIÓN DE CD73 EN PRESENCIA DE CITOCINAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	30
7.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CD73 Y SCD73 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).....	31
7.4 DETECCIÓN DE SCD73 POR LA TÉCNICA DE ELISA.....	32
7.5 CUANTIFICACIÓN DE ADENOSINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA RESOLUCIÓN (UPLC)	33
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	33
8 .. RESULTADOS.....	34
8.1 LAS CITOCINAS TGF-B, TNFA- EGF, IFN-A E IFN-B INCREMENTAN LA EXPRESIÓN DE CD73 EN MEMBRANA DE LAS CÉLULAS HCC1806 Y SU CAPACIDAD HIDROLÍTICA SOBRE AMP.....	34
8.2 SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS HCC1806 CULTIVADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LAS CITOCINAS TGF-B, TNF-A, EGF, IFN-A E IFN-B CONTIENEN SCD73 CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	36
9 .. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	42
10.: CONCLUSIONES	46
12.: REFERENCIAS.....	47

1 :: Abreviaturas

ADA	Adenosina Deaminasa
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina 5' difosfato
AMP	Adenosina 5' monofosfato
APCP	Adenosina 5' – $\alpha\beta$ -metileno difosfato
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5' trifosfato
CD39	e-NTPDasa-1 (del inglés, Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase)
CD73	Ecto 5' nucleotidasa
GPI	Glicofosfatidilinositol (del inglés glycosyl phosphatidylinositol)
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
CMTN	Cáncer de Mama Triple Negativo
EMT	Transición epitelio mesénquima (del inglés epithelial-mesenchymal transition)
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxinon-3-il) adenina
EGF	Factor de crecimiento endotelial (del inglés Endothelial Growth Factor)
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INF	Interferón
IL	Interleucina
IRA	Insuficiencia Renal Aguda
NK	Células Asesinas Naturales (del inglés Natural Killer)
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés monoclonal Antibody)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés Major Histocompatibility Complex)

OMS	Organización Mundial de la Salud	<hr/>
PE	Ficoeritrina	7
SFB	Suero Fetal Bovino	<hr/>
SIRA	Síndrome de Insuficiencia Respiratoria Aguda	
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima	
TGFβ	Factor de crecimiento transformante (del inglés Transforming Growth Factor)	
TNFα	Factor de Necrosis tumoral (del inglés Tumoral Necrosis Factor)	
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (del inglés Ultra Performance Liquid Chromatography).	
VPH	Virus de Papiloma Humano	

2 .:. Resumen

El cáncer de mama representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país. Esta enfermedad se caracteriza por tener amplia heterogeneidad molecular, por lo que su diagnóstico y tratamiento resultan ser un reto. Por tanto, es relevante conocer los mecanismos que favorecen el desarrollo de estos tumores. En este contexto, la generación de adenosina a través de la vía adenosinérgica, en donde el AMP es hidrolizado por la actividad de la ectonucleotidasa CD73, está relacionada con actividades protumorales tales como: resistencia a drogas, proliferación, migración y metástasis de las células tumorales, además de la supresión y evasión de la respuesta inmune anti-tumoral. La expresión de CD73 puede ser inducida por hipoxia o por la presencia de citocinas pro y anti-inflamatorias en el microambiente tumoral. Tomando en consideración que las citocinas TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β se producen de manera predominante en varios tipos de tumores, incluyendo en cáncer de mama, en este estudio analizamos el efecto de estas citocinas sobre la expresión de CD73 y la producción de la forma soluble de CD73 (sCD73) en las células tumorales HCC1806 de cáncer de mama, las cuales corresponden a un carcinoma escamoso acantolítico primario con características moleculares de triple negativo. La línea celular HCC1806 fue cultivada durante 72 hrs en presencia o ausencia (cultivo basal) de 25ng/mL de cada una de las citocinas. Posteriormente, la expresión de CD73 a nivel de membrana se determinó mediante citometría de flujo, y el contenido de sCD73 en el sobrenadante de cada cultivo, mediante la técnica de ELISA. La actividad catalítica de CD73 presente en las células se determinó al incubarlas en presencia de 2.5mg/mL de AMP durante 3h; mientras que la de sCD73, al incubar los sobrenadantes con AMP a una concentración final de 2.5mg/mL durante 24 h. Las citocinas EGF, IFN- α e IFN- β indujeron el mayor incremento en la expresión de CD73 en las células HCC1806, el cual se relacionó con una mayor capacidad de las células tumorales para generar adenosina. Sin embargo, el contenido de sCD73 en el sobrenadante de las células tratadas con las citocinas no incrementó respecto al del cultivo basal. De manera interesante, al evaluar la actividad hidrolítica de cada sobrenadante, se observó que solo al inhibir la actividad de adenosina desaminasa (ADA) se pudo detectar la presencia de adenosina, principalmente en el sobrenadante del cultivo de las células HCC1806 tratadas con IFN- α e IFN- β . que las citocinas empleadas en este estudio, además de tener un efecto en inducir la expresión de CD73 en membrana, también pudieran influir en la expresión y liberación de otras enzimas participantes en la vía adenosinérgica, tal como ADA. Lo cual será importante por su posible utilidad en el pronóstico de la enfermedad y para dirigir estrategias terapéuticas.

3 .:. Marco Teórico

3.1 • Cáncer

De acuerdo con la OMS¹, el cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se trata de un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con la capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, lo que se conoce como metástasis².

Este padecimiento es un proceso genético y las alteraciones genéticas pueden ser heredadas o producidas en alguna célula por un virus o una lesión provocada de manera externa. Así también se sabe de ciertos factores son capaces de originar cáncer, entre los que se encuentran la herencia, productos químicos, radiaciones ionizantes, infecciones o virus y los traumas².

Se sabe que hay más de 60 proto-oncogenes y 20 genes supresores de tumores. Los primeros estimulan normalmente la división celular, sin embargo, pueden presentar alteraciones en su estructura, desde cambios en la secuencia de ácidos nucleicos (mutaciones), así como pérdida de algunos segmentos de cromosomas (deleciones) o por traslado de un sector cromosómico a otro cromosoma (translocaciones). Por otra parte, los genes supresores son los encargados de contrarrestar a los proto-oncogenes. Estos cumplen su función de dos formas: a) frenando las ciclinas y dejando más tiempo a las células en fase G1, para dar oportunidad a los mecanismos de reparación del genoma y b) induciendo la apoptosis².

Esta enfermedad es la principal causa de muerte a nivel mundial. En el 2012 los principales tipos de cáncer fueron pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y cáncer de esófago. Principalmente el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia en las mujeres a nivel mundial, pues cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad. La supervivencia a este padecimiento difiere alrededor del mundo, pues en países desarrollados el índice de supervivencia es mayor que en países en vías de desarrollo como es el caso de México³.

3.1.1 • Cáncer de mama

El cáncer de mama es un proceso oncológico el cual se origina cuando las células de la glándula mamaria comienzan a crecer en forma descontrolada hasta formar un tumor. En etapas iniciales se presenta de manera subclínica en la mayoría de los casos, es decir, es detectable por estudios de imagen (mastografía, ultrasonido y resonancia magnética), en menor proporción por clínica (tumores palpables); sin

embargo, otra forma de presentación común es como un tumor no doloroso que hasta en 30% se asocia con adenopatías axilares⁴.

En 2013, el cáncer de mama ocupó la cuarta causa de mortalidad por tumores malignos en la población mexicana de 20 años y más. Por sexo, es la segunda causa de mortalidad en las mujeres de 20 años y más (14%), mientras que en hombres del mismo grupo de edad apenas representa el 0.1% de las muertes⁵.

Aunque no se conoce bien el origen exacto, son varios los factores de riesgo que se relacionan con la aparición de este tipo de cáncer, los más importantes son:

Edad: Puede afectar a cualquier mujer, sin embargo, el riesgo de padecerlo aumenta con la edad, ya que es más de cien veces frecuente en mujeres de 35 a 65 años. Incluso, los cánceres de seno más invasivos se descubren en mujeres de 55 años o más⁶.

Factores hormonales: Dentro de este rubro se encuentran la menarquia precoz, es decir, que hayan presentado ciclos menstruales antes de los 12 años. Este aumento en el riesgo podría deberse a una exposición más prolongada a las hormonas estrógeno y progesterona durante la vida. La menopausia tardía (después de los 55 años), al igual que la menarquía, representa un riesgo ligeramente mayor de padecer cáncer de seno⁷. La ausencia del embarazo o tener el primer embarazo después de los 35 años también son factores de riesgo⁸. Los embarazos múltiples y quedar embarazada a una edad temprana reducen el riesgo del cáncer de seno en general, aun así, el efecto del embarazo es diferente para los distintos tipos de cáncer de seno. Por ejemplo, el cáncer de seno conocido como triple negativo, el embarazo parece aumentar el riesgo⁹.

Lactancia: Algunos estudios, sugieren que la lactancia podría disminuir ligeramente el riesgo de cáncer de seno, especialmente si se prolonga por 1 ½ a 2 años. La explicación a este fenómeno se debe a que se reduce el número total de ciclos menstruales en la vida de la mujer¹⁰.

Administración de anticonceptivos orales: Cuando son controlados por un especialista no supone un aumento de riesgo, incluso es considerado como un factor protector. Se sabe que puede existir un efecto perjudicial cuando se toman durante más de 8 años¹¹.

Tratamiento hormonal sustituto: estos tratamientos de larga duración que combina estrógenos y progestágenos para mujeres posmenopáusicas no es lo adecuado, pues se ha demostrado un aumento en el riesgo de desarrollar este padecimiento¹². En la actualidad se sabe de diferentes tipos de terapias hormonales, de acuerdo

con las necesidades de cada paciente¹³. A continuación, se citarán a las más importantes:

Terapia hormonal combinada (HT): El uso de esta terapia aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama, así como las probabilidades de morir a causa de este cáncer, Este aumento de riesgo se puede observar tan solo con dos años de uso. También aumenta la probabilidad de que el cáncer sea detectado en una etapa más avanzada¹⁴.

Terapia hormonal bioidéntica: Se usa para describir versiones de estrógeno y progesterona con la misma estructura química que las encontradas de forma natural en las personas. El uso de estas hormonas ha sido promocionado en el mercado como una manera segura de tratar los síntomas de la menopausia, sin embargo, no hay muchos estudios que comparen estas hormonas con las “naturales” por lo que no existe evidencia de que sean más seguras o eficaces¹⁵.

Además de aumentar el riesgo de cáncer de seno, la terapia hormonal parece aumentar el riesgo de enfermedad cardíaca, coágulos sanguíneos o apoplejía (derrame cerebral)¹⁶.

Antecedentes familiares de cáncer de mama. Las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama poseen un riesgo alto de padecer la enfermedad y es mayor sobre todo si lo han padecido en edades tempranas. Así mismo, este se puede ver aumentado de manera considerable en función del número de familiares afectados, siendo modulado, además, por otros factores¹⁷. Por ejemplo, las mujeres que tienen parientes consanguíneos cercanos con cáncer de seno tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad. El que un familiar de primer grado (madre, hermana, hija) padezca cáncer de seno, duplica el riesgo en una mujer, y este puede aumentar aproximadamente tres veces, si dos familiares de primer grado padecen la enfermedad. Así mismo, las mujeres con un hermano o padre que haya tenido cáncer de seno también tienen un mayor riesgo de sufrir este padecimiento¹⁸.

Antecedente personal de cáncer de seno: Una mujer con cáncer de seno tiene un mayor riesgo de padecer un nuevo cáncer en el otro seno o en otra parte del mismo seno. Este riesgo es mayor para las mujeres jóvenes con cáncer de seno¹⁹.

Raza y origen étnico: Las mujeres de raza blanca tiene una probabilidad ligeramente mayor de padecer cáncer de seno que las mujeres de raza negra, aunque estas últimas tienen una mayor probabilidad de morir de este cáncer. En las mujeres menores de 45 años, el cáncer de seno es más común en las mujeres de raza negra. Las mujeres asiáticas, hispanas e indias americanas tienen un menor riesgo de padecer y morir de cáncer de seno²⁰.

Cambios genéticos: Se cree que entre el 5%-10% de los casos de cáncer de mama se originan directamente de defectos genéticos. Dentro de este rubro, se han caracterizado las mutaciones germinales en:

BRCA-1 y BRCA-2: Codifican proteínas esenciales en la reparación del ADN¹⁷. Las mutaciones de BRCA-1 están asociadas a la aparición de cáncer de mama en mujeres entre 40 y 50 años, así como también el riesgo de padecer otros tumores, por ejemplo, el de ovario²¹. BRCA-2 está asociado a la aparición de cáncer en edades más avanzadas (entre 60 y 70 años), además en la población general predispone a padecer cáncer de mama masculino, de ovario, vejiga, próstata y páncreas²². En algunas familias con mutaciones BRCA1, el riesgo de padecer cáncer de seno durante la vida es tan alto como 80%, pero en promedio este riesgo parece estar entre 55% y 65%. Para las mutaciones BRCA2 el riesgo es menor, pues se encuentra alrededor de 45%²³. No obstante, hay síndromes hereditarios que se asocian con el desarrollo de este padecimiento, como son el síndrome de Li-Fraumeni o Peautz- Jeghers²⁴.

También se conocen otras mutaciones genéticas, las cuales se presentan con mucha menor frecuencia y la mayoría no aumenta el riesgo de padecer cáncer de seno. Algunos de estos son:

ATM: Este gen ayuda normalmente a reparar el ADN dañado. Heredar una copia anormal se ha asociado a una alta tasa de cáncer de seno en algunas familias²⁵.

TP53: Provee instrucciones para producir la proteína p53 que ayuda a detener el crecimiento de las células anormales. Las mutaciones hereditarias son poco comunes en este padecimiento²⁶.

CHEK2: Se encuentra asociado al síndrome de Li-Fraumeni, y aun cuando no exista el síndrome en el paciente, puede aumentar el riesgo de cáncer de seno aproximadamente al doble²⁷.

PTEN: Ayuda normalmente a regular el crecimiento celular. Las mutaciones hereditarias en este gen causan el síndrome de Cowden, un trastorno poco común que provoca que las personas tengan un mayor riesgo de padecer tumores cancerosos y no cancerosos en los senos, así como crecimientos en el tracto digestivo, la tiroides, el útero y los ovarios²⁸.

CDH1: Sus mutaciones hereditarias causan cáncer gástrico difuso igualmente hereditario. Las mujeres con mutaciones en este gen también tienen un riesgo aumentado de padecer cáncer de seno lobulillar invasivo²⁵.

STK11: Los defectos en este gen pueden causar el síndrome de Peutz-Jeghers. Las personas afectadas con este trastorno presentan puntos pigmentados en sus

labios, bocas, pólipos en los tractos urinarios y gastrointestinales y, un mayor riesgo de padecer diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de seno²⁸.

PALB2: Produce una proteína que interactúa con la proteína producida por el gen BCRA2. Las mutaciones en este gen pueden llevar a un mayor riesgo de padecer cáncer de seno. Sin embargo, aún no está claro si las mutaciones de PALB2 también aumentan el riesgo de padecer cáncer de ovario y cáncer de seno en los hombres²².

Falta de actividad física: Ingesta de grasas, fitoestrógenos y obesidad después de la menopausia aumentan el riesgo de padecer este tipo de cáncer²⁹. Se propone que la relación entre la obesidad y el riesgo de desarrollar cáncer de mama hormonal en las mujeres post menopáusicas se debe al mecanismo de la conversión hormonal de las grasas periféricas a estrógeno por la enzima aromatasa³⁰.

Tejido mamario denso: Las mujeres cuyos senos aparecen densos en los mamogramas tienen un riesgo de padecer cáncer de seno de 1.2 a 2 veces mayor que las mujeres con una densidad promedio en sus senos³¹. Sin embargo, el tejido mamario denso también puede causar que los mamogramas sean menos precisos³².

Tratamiento con radioterapia o exposición a radiación ionizante. En edades jóvenes aumenta el riesgo principalmente³³.

Químicos en el ambiente: Las sustancias encontradas en algunos plásticos, ciertos cosméticos y productos de cuidado personal, pesticidas y PCBs (bifenilos policlorinados) parecen tener propiedades cancerígenas, sin embargo, ninguna investigación muestra una clara asociación entre el cáncer de seno y la exposición a estas sustancias³⁴.

Consumo de tabaco: favorece la aparición de muchos tumores malignos, sin embargo, todavía no hay suficiente evidencia que compruebe su relación con el cáncer de mama¹².

Consumo de alcohol: En la actualidad existen estudios que sugieren que consumir alcohol en cantidad importante y de forma habitual favorece la aparición de cáncer de mama¹².

3.1.2 • Clasificación del cáncer de mama

Este tipo de cáncer se puede dividir en carcinomas invasores e *in situ*; los primeros se extienden a tejidos circundantes de la mama y los segundos, se encuentran localizados únicamente en el tejido mamario³⁵. A su vez, se pueden subdividir en

diferentes tipos, de acuerdo con la forma en que las células modificadas se ven al microscopio³⁶. A continuación, se hace mención a algunos de ellos.

Carcinoma ductal in situ: Se considera un cáncer de seno no invasivo o preinvasivo. Se caracteriza por la presencia de células epiteliales malignas que crecen dentro de los conductos mamarios, sin rebasar la membrana basal. Adopta diferentes patrones de crecimiento intraductal, así como características citológicas y de necrosis variable³⁷. Estos carcinomas son inicialmente sospechados por la existencia de un tumor palpable, o secreción por el pezón y la forma de presentación poco frecuente puede ser la enfermedad de Paget³⁸.

Carcinoma ductal invasivo (infiltrante): es el tipo más común de cáncer, constituyendo 80% de todos los casos. Comienza en un conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo del seno. Puede tener la capacidad de propagarse hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo³⁹. En este se incluyen todas aquellas lesiones que no presentan características morfológicas específicas y, por tanto, no se pueden sub-agrupar en distintos grupos; se asocia frecuentemente a la variedad no infiltrante, pero no necesariamente se origina de ella⁴⁰.

Carcinoma lobulillar in situ: La edad de aparición para este cáncer oscila entre 15 y más de 80 años, si bien el 90% de los casos aparecen en mujeres menores de 54 años, especialmente entre los 44 y 46, por lo tanto, se considera como una enfermedad de mujeres pre-menopáusicas. No produce masa palpable y es casi siempre un hallazgo anatomopatológico en biopsias por diversos tipos de patología benigna y maligna⁴¹. Se caracteriza por una proliferación sólida, oclusiva en los lobulillos de células pequeñas de tamaño uniforme, que puede extenderse a conductos interlobulillares. Se han descrito 2 tipos celulares en este tipo de carcinoma. El tipo A corresponde al clásico, de célula pequeña y uniforme. En cambio, las de tipo B son más grandes, más pleomórficas y los núcleos pueden tener nucléolos. Si la lesión está constituida solo por células de tipo B puede ser difícil de diferenciar de la afectación lobulillar por carcinoma ductal *in situ*⁴².

Carcinoma lobulillar invasivo (infiltrante): Comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). Una vez que invade el tejido graso mamario, puede diseminarse a otras partes del cuerpo a través de conductos linfáticos o el torrente sanguíneo. Puede propagarse a otras partes del cuerpo y los sitios más frecuentes a donde se disemina son los pulmones, hígado y huesos³⁹. Constituye entre el 2-15% de los distintos tipos histológicos de cáncer de mama⁴³. Asimismo, este tipo de cáncer se da a una edad tardía y tienen un mayor tamaño tumoral al momento del diagnóstico, también presenta una mejor diferenciación y mayor tendencia a ser positivo a receptores hormonales⁴⁴.

También hay algunos tipos de cáncer poco comunes

Cáncer inflamatorio de seno: Este tipo de cáncer invasivo del seno no es común. Representa aproximadamente 1-3% de todos los cánceres de seno. Por lo general, no se presenta una sola protuberancia o tumor, sólo hace que la piel del seno luzca rojiza y se sienta acalorada. También puede causar un aspecto grueso en la piel del seno con hoyuelos, similar a la cáscara de una naranja. Se sabe que estos cambios son causados por el bloqueo que producen células cancerosas en los vasos linfáticos de la piel⁴⁵. En sus etapas iniciales, el cáncer inflamatorio de seno a menudo se confunde con una infección en el seno (llamada mastitis), y se trata como una infección administrando antibióticos. Este tipo de cáncer de seno suele tener una mayor probabilidad de propagación y un peor pronóstico que el típico cáncer ductal invasivo o lobulillar invasivo⁴⁶.

Enfermedad de Paget del pezón: Este tipo de cáncer comienza en los conductos del seno y se propaga hacia la piel del pezón. Es un tipo poco común y representa alrededor de 0.7-4.3% de todos los casos del cáncer de seno y afecta casi exclusivamente a mujeres entre 24 y 84 años. La lesión se localiza en el pezón para luego extenderse hacia la areola. Es sintomático en un 25% de los pacientes causando: prurito, quemazón o dolor y clínicamente se observa una placa eritematosa descamativa, a veces con vesiculación⁴⁷. La pigmentación es rara, pero si aparece puede semejar un melanoma maligno. Eventualmente, la afectación puede extenderse a la piel del resto de la mama y en ocasiones el pezón puede aparecer retraído o deformado⁴⁸. Casi siempre está asociada al carcinoma ductal in situ o el carcinoma ductal infiltrante subyacente⁴⁹.

Tumor Filoides: Este tipo de tumor de seno es poco común y se forma en el estroma (tejido conectivo) del seno, a diferencia de los carcinomas, que se forman en los conductos o en los lobulillos. Otros nombres para estos tumores incluyen tumor filoides y cistosarcoma filoides. Por lo general son benignos, pero en pocos casos pueden ser malignos⁵⁰.

Los que son benignos se tratan extirpando el tumor y un borde de tejido normal del seno. Un tumor filoide maligno se trata extirpándolo junto con un borde más amplio de tejido normal, o mediante una mastectomía. Cuando un tumor filoide maligno se propaga, se puede tratar con la quimioterapia que se usa para los sarcomas de tejidos blandos⁵¹.

Angiosarcoma: Esta forma de cáncer se origina en las células que cubren los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos. En raras ocasiones, este cáncer se origina en los senos, representando un 0.05% de los tumores primarios de este órgano⁵². Estos tumores se originan espontáneamente o como complicación de la radioterapia. Tras

la radioterapia por cáncer de mama existe un riesgo del 0.3% al 4% de desarrollar un angiosarcoma, y la mayor parte de los casos se inicia entre 5 y 10 años después del tratamiento radiante⁵³.

Durante los últimos años se han identificado subtipos moleculares de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, *HER2-enriched*, *Basal-like*, y triple negativo⁵⁴. Estos grupos presentan diferencias en su incidencia, pronóstico y respuesta a los tratamientos. Los subtipos moleculares pueden ser identificados en todos los estadios de la enfermedad⁵⁵.

Tumores con receptores de estrógenos positivos

Tipo Luminal A: Estos suelen ser los tumores de mama más frecuentes (50-60% del total). Basándose en su perfil molecular, todos los casos de carcinoma lobulillar *in situ* son tumores Luminal A e igualmente, la gran mayoría de los carcinomas lobulillares infiltrantes tienen un perfil característico de Luminal A. Estos tumores generalmente muestran un bajo grado histológico y tienen un pronóstico excelente. A nivel inmunohistoquímico este cáncer se caracteriza por la expresión de Bcl-2 y la ausencia de sobreexpresión de HER2⁵⁶.

Tipo Luminal B: Estos tumores pertenecen al 10-20% del total, presentan un fenotipo más agresivo, con frecuencia muestran un mayor grado histológico y un mayor índice proliferativo, incluso tienen un pronóstico significativamente peor que los luminales A. A menudo estos tumores expresan EGFr, HER2 y ciclina E1. A pesar de que ambos tipos luminales expresan receptores estrogénicos, el tipo Luminal A goza de un pronóstico excelente, debido a que los tumores de Tipo Luminal B tienen una mayor expresión de genes tales como MKI67 y ciclina B1. Por lo tanto, se clasifica a los tumores de tipo Luminal B con un alto riesgo de recaída⁵⁷.

Tumores con receptores de estrógeno negativos.

Tipo HER2: Un 10-15% de todos los cánceres de mama corresponde a este grupo. Muestran una elevada expresión del gen HER2 y a genes de proliferación⁵⁸. De manera morfológica, los tumores enriquecidos con HER2 son altamente proliferativos, el 75% presenta un alto grado histológico y más de 40% tiene mutaciones de p53⁵⁹. Con frecuencia se asocia a Carcinoma ductal *in situ*; desde el punto de vista clínico se caracteriza por un mal pronóstico y también presentan una elevada quimiosensibilidad como los tumores basales⁶⁰.

Tipo Triple Negativo: Si las células cancerosas del seno no contienen receptores de estrógeno ni de progesterona y no tienen un exceso de HER2, se les llama triples negativos. Estos cánceres tienden a presentarse con más frecuencia en mujeres más jóvenes y en mujeres hispanas o de raza negra⁶¹. La conducta biológica de

este tipo de cáncer suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a presentar metástasis a distancia, comparada con los otros subtipos de cáncer de mama, predominando las metástasis viscerales (hígado, pulmón y sistema nervioso central), así mismo, tiene un curso clínico más agresivo, con recurrencias tempranas y con mayor riesgo de muerte, con respecto a los tumores dependientes de hormonas⁶². Debido a que las células tumorales no tienen receptores hormonales, la terapia hormonal no es útil en el tratamiento de estos cánceres. Tampoco son útiles los medicamentos dirigidos a HER2. No obstante la quimioterapia sigue siendo útil⁶³.

3.2 •Sistema Inmune

El sistema inmune está conformado por una serie de órganos, tejidos, células y productos celulares, que se distribuyen de manera amplia por todo el cuerpo. Su misión es proteger al organismo de las enfermedades causadas por la mayoría de patógenos (bacterias, virus, parásitos, hongos y otras sustancias extrañas)⁶³.

Con sus 2 líneas de defensa (la innata y la adaptativa), se encarga de reconocer ante la invasión de microorganismos en el cuerpo humano, y reacciona para la eliminación de estos⁶⁴ (Figura 1).

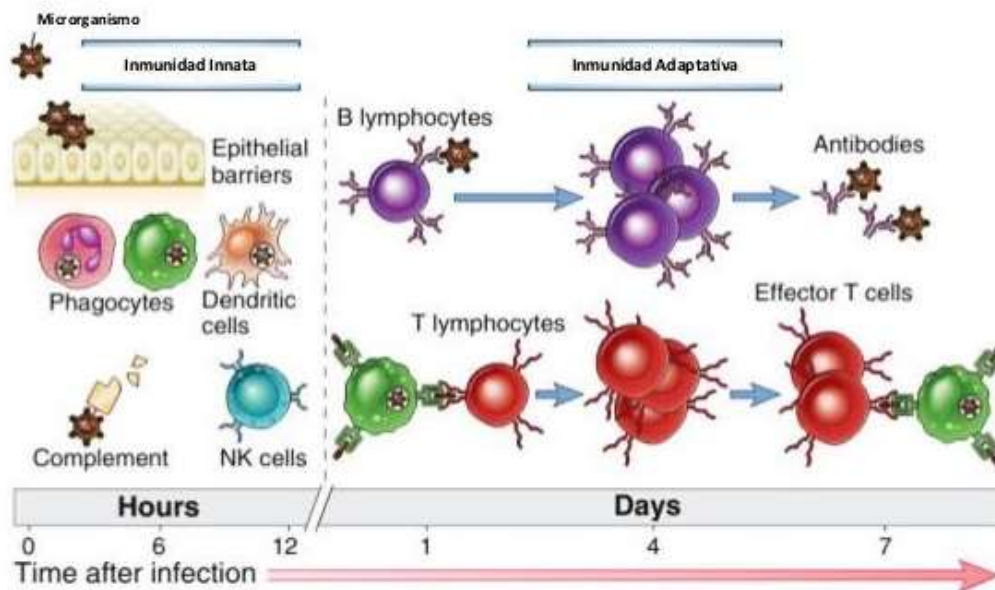


Fig. 1 Representación de la inmunidad innata y adaptativa y su respuesta ante una infección. Tomada de Abbas, 2015.⁶

3.2.1 • Inmunidad Innata

Es la primera línea de defensa del organismo, que impide la invasión y diseminación de patógenos. Consta de mecanismos de defensa bioquímicos que existen antes de la infección que pueden responder con rapidez a ella⁶³.

Los principales componentes de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas (epitelio y sustancias químicas antimicrobianas)⁶⁴ 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (NK) y 3) proteínas sanguíneas, incluyendo miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación⁶⁵.

Las células del sistema inmune innato reconocen un modelo molecular común y constante de la superficie de los microorganismos a través de los receptores celulares conocidos como *receptores de reconocimiento*. Estos se expresan fundamentalmente en la superficie de los neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras⁶⁶.

3.2.2 • Inmunidad adaptativa

Este se encarga de reconocer un gran número de sustancias microbianas y no microbianas, así como reaccionar ante ellas. Las características que definen la inmunidad adaptativa son la capacidad de distinguir diferentes sustancias (especificidad) y la capacidad de responder de forma más vigorosa a exposiciones repetidas al mismo microbio, (memoria)⁶⁷.

Los únicos componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción (anticuerpos)⁶⁸. Estos son las células que reconocen los antígenos extraños de manera específica y responden contra ellos, por lo que constituyen los mediadores de la inmunidad humoral y celular. Existen subpoblaciones de linfocitos que difieren de la forma de reconocer los antígenos y en sus funciones⁹⁶.

Los linfocitos B son células especializadas que tienen como función principal producir anticuerpos. Se desarrollan a partir de células madre de la médula ósea y cuando maduran, se encuentran en médula ósea, nódulos linfáticos, bazo, ciertas áreas del intestino y en menor extensión, en el fluido sanguíneo. Cuando son estimuladas, responden madurando en otros tipos de células llamadas células plasmáticas⁷⁰.

Los linfocitos T se encargan de atacar directamente a los antígenos extraños como bacterias, virus, hongos, tejidos trasplantados, etc., y también actuar como reguladores del sistema inmune⁶⁹.

Estos se desarrollan a partir de células madre de médula ósea. Los linfocitos T inmaduros migran al timo, aquí se convierten en linfocitos T maduros, para después dejar el timo y migrar a otros órganos del sistema inmune como el bazo, nódulos linfáticos, médula ósea y sangre⁷¹.

Estos linfocitos reaccionan con un antígeno específico, así como cada anticuerpo reacciona con un antígeno específico. También varían con respecto a su función: Linfocitos T citotóxicos (Tc), linfocitos T colaboradores (Th), y linfocitos T supresores/reguladores⁶³.

Linfocitos T citotóxicos (Tc): Se encargan de destruir al microorganismo invasor. Protegen al organismo de bacterias específicas y virus que tienen la habilidad de sobrevivir y reproducirse en las células del organismo. También responden a tejidos extraños (trasplantados)⁶⁹.

Linfocitos T colaboradores (Th): ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos y ayudan a los linfocitos Tc en el ataque a sustancias extrañas. Estos hacen la función de los linfocitos B más efectiva, provocando una mejor y más rápida producción de anticuerpos, y también hacen más efectiva la función de destrucción de los linfocitos Tc⁷².

Linfocitos T supresores (Tsup): Suprimen la actividad a linfocitos Th. Sin esta supresión, el sistema inmunológico seguiría activo después de superada la infección. Juntos (Linfocitos Th y Tsup) actúan a modo de termostato de todo el sistema de linfocitos activándolo y desactivándolo según las conveniencias⁷³.

3.2.3 •Citocinas: generación y función.

Las citocinas, son proteínas glicosiladas de bajo peso molecular, las cuales son sintetizadas y secretadas al medio extracelular. Están involucradas en los procesos de inmunidad e inflamación, regulando la amplitud y duración de la respuesta⁷⁴.

Existen citocinas que han conservado su terminología propia, para ser diferenciadas por la actividad que desempeñan. Entre ellas encontramos a los interferones (INF α , INF β , INF γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α)⁷⁵.

TNF α : Es producido fundamentalmente por el macrófago activado y tiene múltiples células diana en las que ejerce actividades muy diversas, asociadas con las respuestas inflamatorias y la resistencia normal del huésped a las infecciones, sirviendo como inmunoestimulador⁷⁶. También es sintetizado por: neutrófilos, linfocitos activados, células NK, células LAK, queratinocitos, fibroblastos, astrocitos, células de Langerhans, células endoteliales, células del músculo liso y algunas células transformadas⁷⁷.

Se ha visto que contribuye a la transición epitelio mesénquima en líneas celulares de cáncer de mama. También actúa como mediador de la producción de IL-6 en el microambiente tumoral⁷⁸. Como citocina proinflamatoria puede actuar como inductora de tumores ya que está implicado en la supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis⁷⁹.

INF α : Es producido principalmente por las células mononucleares de sangre periférica, linfocitos B y macrófagos⁸⁰. Tiene la capacidad de promover el crecimiento, diferenciación y función de diferentes células del sistema inmune, y aunado a esto puede modificar la actividad de células inmunes activadas para interactuar con células malignas o células infectadas por virus⁸¹. En el cancer de mama inflamatorio, la expresión de esta citocina aumenta las probabilidades de metástasis⁸².

INF β : Es sintetizado por los fibroblastos, en condiciones y bajo estímulos apropiados⁸³. Entre sus efectos biológicos se encuentran la actividad antiviral, capacidad antiproliferativa, efectos inmunomoduladores y actividad antitumoral⁸⁴. Así mismo, de los efectos comunes entre INF α e INF β , pueden modificar la producción de anticuerpos, la estimulación de los linfocitos T citotóxicos, incrementan la expresión de moléculas del MHC, reclutan células NK, entre otros⁸⁵. A pesar de tener actividades antitumorales, se sabe que en el cáncer de mama triple negativo promueven la diferenciación celular lo que promueve su agresividad⁸⁶.

TGF β : es sintetizado por diversos tipos celulares, entre los que se encuentran los linfocitos, macrófagos fibroblastos, monocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células del riñón, plaquetas, células de la placenta y células tumorales⁸⁷. Contribuye a la motilidad de las células de cáncer de mama. De manera interesante se ha descubierto que las células adherentes son capaces de metastatizar a nódulos linfáticos⁸⁸. El aumento en la expresión de esta citocina lleva a la pérdida de la respuesta inhibitoria de la proliferación celular y representa un mecanismo de escape celular tumoral que favorece la evolución del proceso neoplásico⁸⁹.

EGF: Es un péptido que promueve el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia celular a través del ligando con su receptor (EGFR), presente en la superficie de la membrana celular⁹⁰. En los seres humanos y otros mamíferos se encuentra en plaquetas y macrófagos, así también en diversos fluidos, como la orina, leche, plasma y saliva. Su importancia es fundamental en la formación, mantenimiento y reparación de los tejidos⁹¹. Existe evidencia de un supuesto papel del EGF y su receptor (EGFR) en procesos de metástasis en diferentes tumores⁹². Varios estudios han demostrado que la expresión de esta citocina y la activación de

su receptor se relaciona con poca supervivencia libre de enfermedad y, en general, mal pronóstico, ya que hay mayor riesgo de recurrencia del padecimiento⁹³.

3.2.4 • Respuesta Inmune Tumoral

El microambiente tumoral juega un papel importante en la biología del tumor contribuyendo a la iniciación, promoción, progresión tumoral y a la respuesta a la terapia. Las moléculas del sistema inmune son un componente fundamental del microambiente tumoral. La composición y características del microambiente tumoral experimenta amplias variaciones y es grande su influencia en la determinación de la respuesta antitumoral⁹⁴.

Las células NK y los linfocitos T son capaces de desencadenar respuestas antitumorales potentes. Por una parte, los linfocitos T cooperadores (CD4) ejercen una función reguladora sobre los linfocitos T citotóxicos (CD8), células NK y macrófagos mediante la secreción de diversas citocinas, especialmente Interleucina 2 (IL-2), Interferón gamma (INF_{γ}), también pueden secretar Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) para aumentar la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (MHC-1) en la célula tumoral y su sensibilidad a los linfocitos T citotóxicos, los cuales lisan directamente las células neoplásicas⁹⁵.

Por otra parte, las células NK son eficientes en la destrucción de células tumorales. Ellas cuentan con los mismos mecanismos citolíticos de los linfocitos T citotóxicos, pero, a diferencia de estos, no efectúan un reconocimiento antigénico⁹⁶. En ratones y en seres humanos que presentan una deficiencia en la actividad de estas células, se observó una resistencia disminuida al desarrollo de tumores malignos. Datos experimentales mostraron una baja frecuencia de metástasis en ratones *nude*, los cuales carecen de los mecanismos de defensa normales mediados por linfocitos T por defectos moleculares a nivel del estroma tímico, pero poseen altos niveles de células NK, por lo que estos aportaron el concepto de que las células NK son de gran importancia en el control de la diseminación metastásica⁹⁷.

Se sabe que los linfocitos B no poseen un efecto antitumoral directo; sin embargo, las inmunoglobulinas secretadas al reconocer y unirse a los antígenos tumorales favorecen la opsonización y fagocitosis por parte de los macrófagos. También pueden intervenir en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, actuando como puente entre las células tumorales, células NK y los macrófagos⁹⁵.

Sin embargo, las células tumorales muchas veces inducen un microambiente supresor que favorece el desarrollo de poblaciones de células inmunes inmunosupresoras, como las células supresoras mieloides y los linfocitos T reguladores⁹⁸.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos T tienen la capacidad de secretar citocinas, las cuales son glicoproteínas de bajo peso molecular, que ayudan a efectuar las funciones de las células. Sin embargo, también son producidas por las células cancerígenas, donde actúan promoviendo el crecimiento tumoral y evadiendo la respuesta inmune⁹⁹.

3.3 • Vía Adenosinérgica

El ATP (trifosfato de adenosina) es un nucleótido que normalmente se encuentra en todas las células y es bien conocido su rol intracelularmente como energía para el metabolismo. Además de este papel intracelular, el ATP extracelular contribuye a la regulación de varios procesos biológicos como son: funciones cardíacas, neurotransmisión, contracción muscular, inflamación, vasodilatación, entre otros^{100,101}.

Estos nucleótidos pueden ser liberados por una gran variedad de células en respuesta a múltiples señales de estrés como son, la hipoxia o condiciones de inflamación; sin embargo, estos pueden ser hidrolizados en cascada de la siguiente manera ATP/ADP a AMP por NTPDasas (CD39), AMP a adenosina por la ecto 5' nucleotidasa (conocida también como CD73) y finalmente la adenosina a inosina por adenosina desaminasa¹⁰².

CD39 (NTPDasa 1, E.C. 3.6.1.5) es una proteína integral de membrana que fosfohidroliza ATP y ADP (aunque esta última menos eficientemente) de manera dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} para obtener como resultado AMP (Heine *et al*, 2001). Esta conversión de ATP a AMP es reversible gracias a la acción de cinasas localizadas extracelularmente; ATP>ADP por la NDP cinasa y AMP>ADP por el adenilato cinasa¹⁰³.

Se han identificado 8 formas análogas de esta ectoenzima en mamíferos: NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3 y NTPDasa8, se encuentran unidas a la membrana celular, NTPDasa4-7 comparten localización intracelular y NTPDasa5-6 han sido reportadas como formas solubles¹⁰⁴.

La enzima CD39 se encuentra expresada constitutivamente en bazo, timo, pulmón y placenta. Estos órganos están asociados con células endoteliales y poblaciones de células inmunes como son los linfocitos B, células NK, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T reguladores¹⁰⁵.

La expresión de CD39 es regulada por varias citocinas pro inflamatorias, estrés oxidativo e hipoxia a través de factores de transcripción como Sp1 y Stat3¹⁰⁶. También su expresión se ve incrementada en algunos tumores sólidos, por ejemplo, en cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de páncreas. Se sabe

que en la leucemia está involucrada en el desarrollo y progresión del padecimiento¹⁰⁷.

El segundo paso en el metabolismo de estos nucleótidos es realizado por CD73, también conocida como ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'-NT, EC.3.1.3.5). Está anclada a la membrana celular y se encuentra en muchos tipos de cánceres humanos y murinos y se encarga de desfosforilar AMP para generar Adenosina¹⁰⁸ (Figura 2).

Caso contrario a lo que sucede con el CD39, aquí la conversión de AMP a adenosina es reversible solo siguiendo el transporte intracelular de adenosina donde la adenosina cinasa puede convertir la adenosina a AMP¹⁰³.

Se encuentra en una variedad de tejidos tales como el colon, cerebro, hígado, pulmón y corazón, así como en leucocitos derivados de sangre periférica, bazo, nódulos linfoides, timo y médula ósea¹⁰⁹. CD73 se ha clonado con ADN de rata, ratón y bovinos, mostrando homologías al CD73 humano del 89, 94 y 94% respectivamente¹¹⁰.

También se tiene evidencia de que la expresión y función de CD73 se puede sobre regular bajo condiciones de hipoxia, presencia de mediadores pro inflamatorios como son el TGF- β , INFs, TNF α , interleucinas (IL-1 β) y prostaglandina E₂. Principalmente el incremento en la expresión de CD73 se ha reportado en varios tejidos neoplásicos, sugiriendo que esta enzima se encuentra involucrada en la progresión de las mismas¹¹¹.

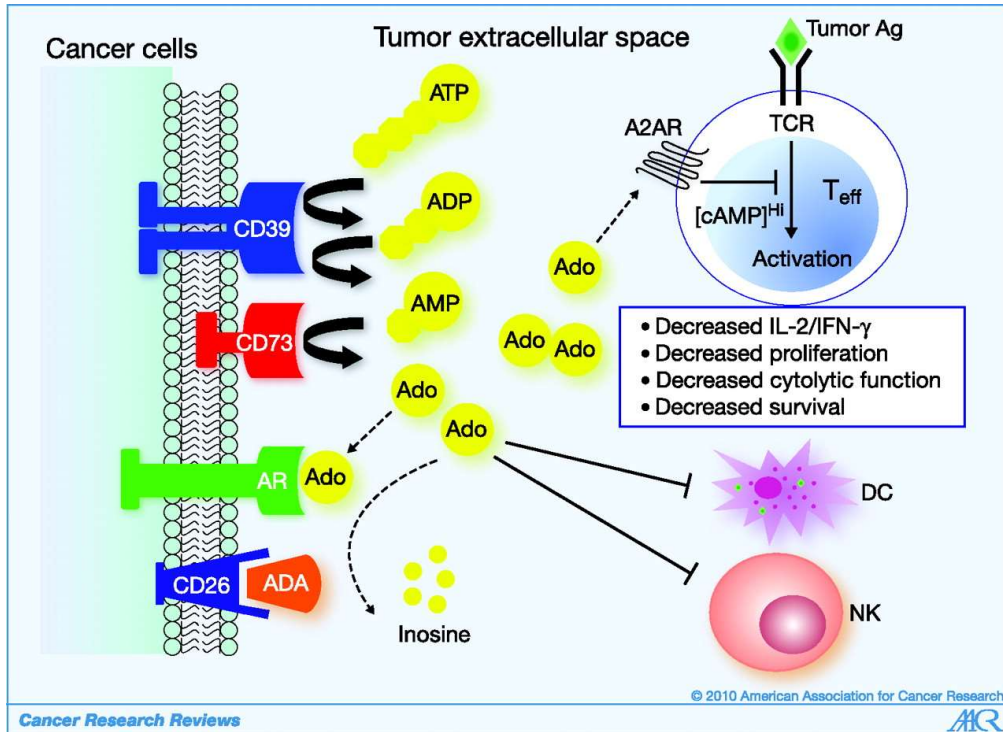


Fig. 2: Esquema donde se muestra la vía Adenosinérgica. CD39 se encarga de desfosforilar ATP y ADP para convertirlo en AMP. Por su parte CD73 degrada AMP para generar Adenosina, la cual ejerce un efecto inhibitor en Linfocitos T, células dendríticas y células NK. Tomado de Tomada de Abbas, 2015.⁶²

3.3.1 • Ectoenzimas en la vía purinérgica

Además de CD39 y CD73, existen otras enzimas que transforman el ATP como las fosfatasas y cinasas, que son un grupo de enzimas que juegan un papel importante en la regulación o fosforilación y desfosforilación de grupos fosforilados tanto intracelular como extracelular. Tenemos dos clases de enzimas implicadas en estos procesos:

Fosfatasa alcalina (AP): Son enzimas que se localizan en la membrana plásmática a través de GPI. Forman homodímeros y poseen 3 cationes en cada sitio catalítico. Liberan el fosfato orgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizan nucleósidos 5'-tri-, -di- y -monofosfato, generando los nucleósidos correspondientes. Hay 4 diferentes isoformas (intestinal, placentaria, células germinales e hígado-hueso-riñón), las primeras 3 isoformas son consideradas tejido-específicos, mientras que la última isoforma es tejido-no específico y se encuentra distribuida a través de todo el cuerpo teniendo su máxima expresión en hígado, hueso y riñón¹¹². Dentro de la vía adenosinérgica las AP pueden hidrolizar ATP extracelular vía ADP y AMP a Adenosina. Estas son las únicas ecto

nucleotidasas que pueden desfosforilar secuencialmente nucleósidos trifosfatados a nucleósidos. Las AP de igual forma se pueden encontrar de forma soluble siendo éstas el resultado de la acción de fosfolipasas C fosfatidilinositol específicas. Son abundantes en el suero, aproximadamente un 95% de las fosfatasa alcalinas que se encuentran circulando en el suero se deriva del hueso e hígado¹⁰⁴.

Ectonucleótido pirofosfatasa/fofodiesterasa (E-NPP): Son glicoproteínas ancladas a membrana por un único segmento, con el extremo catalítico hacia el espacio extracelular^{113,114}. La familia de ecto-NPP consiste de una familia de siete ectoenzimas las cuales se relacionan estructuralmente (NPP1 a NPP7). Tres miembros de esta familia de ectoenzimas, NPP1, 2 y 3, hidrolizan enlaces 5'-monodiester en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de nucleósidos 5'-monofosfato¹¹⁵. NPP1-NPP3 tienen una amplia distribución en los tejidos, pueden ser co-expresadas en el mismo tejido o incluso en la misma célula. A menudo se expresan en superficies epiteliales. Pueden estar también en forma soluble principalmente en el suero, sin embargo, el mecanismo por el cual es liberada aun no es dilucidado¹⁰⁴.

3.3.2 •CD73 y Adenosina en el cáncer

La evidencia sugiere que la interacción entre las células tumorales y su microambiente son esenciales para la progresión del tumor. Algunos estudios han propuesto que CD39 y CD73 generan inmunosupresión en el ambiente, incrementando los niveles de adenosina que promueven el desarrollo y la progresión del cáncer¹¹⁶. También se ha observado una alta expresión y actividad de ambas ectoenzimas tanto en tumores sólidos como sanguíneos, lo que sugiere que el papel de estas enzimas es promover el crecimiento y la infiltración del tumor hacia otros tejidos¹¹⁷.

La sobre expresión de CD73 se ha asociado con la resistencia a drogas, por lo que se ha llegado a proponer como un blanco terapéutico, donde combinando un tratamiento anti-CD73 con quimioterapia o inmunoterapia, podría ser efectiva en el tratamiento de cáncer en pacientes con altos niveles de CD73¹¹⁸. También se ha propuesto que favorecen el crecimiento del tumor pues Bavaresco¹¹⁹ encontró que dando un tratamiento con APCP (Adenosina 5' – $\alpha\beta$ -metileno difosfato el cual funge como inhibidor de Adenosina Desaminasa) a células de Glioma, estas redujeron su proliferación en un 30% mientras que aquellas que fueron tratadas con Adenosina, incrementaron su proliferación en un 35%. Sin embargo, otros estudios contradicen lo antes mencionado pues muestran que la adenosina también puede inhibir el crecimiento y proliferación celular al inducir apoptosis¹²⁰.

La metástasis es una de las características más representativas en los tipos de cáncer más agresivos y es la principal causa de muerte en los pacientes. CD73 se

encuentra asociado a la metástasis de tumores tanto en modelos experimentales como en pacientes, pues se ha identificado a esta ectoenzima como regulador de la transición epitelio mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) lo que indica que promueve la migración e invasión de las células tumorales a inducir esta transición¹²¹.

La descontrolada proliferación de las células del cáncer necesita abundante nutrición y oxígeno, por lo que se da una alta formación de nuevos vasos sanguíneos para poder sustentar el crecimiento de estas células tumorales. Estudios *in vivo* han reportado que la inhibición de CD73 reduce la angiogénesis y por lo tanto el crecimiento de melanoma en modelos murinos, y también que la terapia con anticuerpo monoclonal Anti-CD73 reduce significativamente la formación de vasos sanguíneos^{122, 123}.

Como inmunosupresor, CD73 genera adenosina que puede unirse a 4 receptores (A1, A2A, A2B y A3) que se encuentran acoplados a proteínas G y de esta forma ejercer efecto sobre el sistema inmune de diversas formas¹²⁴.

Altas concentraciones de adenosina pueden afectar directamente la capacidad de las células NK para producir TNF α e INF γ y de esta forma inhibir la actividad lítica de las células NK¹²⁵. Los macrófagos también se ven afectados, debido a la interacción de la Adenosina con los receptores A2A que son expresados en estas células, en consecuencia, se libera IL-4 e IL-10 lo que contribuye a la supresión de la respuesta inmune antitumoral, promoviendo el crecimiento del tumor¹²⁴. También afecta a los linfocitos debido al aumento en los niveles de cAMP intracelular que disminuye la función de los linfocitos T antitumorales y promueve la apoptosis, lo que contribuye a la evasión inmune del tumor¹²⁶ (Figura 3).

Por otra parte, concentraciones elevadas de Fosfatasa alcalina está asociada con diversos padecimientos, especialmente el cáncer. En estos pacientes, una elevada presencia de esta ectoenzima es un claro indicativo de que la enfermedad se ha esparcido al hígado o los huesos, principalmente si se trata de neoplasias de tiroides, mama, colon y próstata¹²⁷. Como es bien sabido, existen isoformas de tejido específico y no específico; la primera isoforma se encuentra altamente expresada en carcinomas hepáticos, mientras que la segunda está presente de manera elevada en el plasma de pacientes con cáncer de mama, osteosarcomas, enfermedad de Paget y metástasis óseas¹²⁸. El papel metabólico de esta ectoenzima en el cáncer es la abrupta hidrólisis de nucleótidos extracelulares en nucleósidos y otras moléculas que están implicadas en la alteración del funcionamiento normal en las vías de señalización purinérgicas, las cuales son responsables de funciones de la adhesión, proliferación y crecimiento celular¹²⁹.

Para el caso del ectonucleótido Pirofosfatasa/Fosfodiesterasa, la literatura reporta que su actividad interfiere en procesos, como la proliferación celular motilidad y angiogénesis¹³⁰.

Se sabe que NPP2 es secretada por diversas células cancerosas incluyendo células de pulmón y mama. El crecimiento tumoral y la motilidad se han atribuido a la producción de ácido lisofosfatídico, además, en una reacción acoplada con 5'ecto-nucleotidasa, tiene el potencial de hidrolizar ATP a Adenosina el cual es un factor promotor de crecimiento tumoral y estimulador de la angiogénesis¹¹³.

NPP3 también se asocia con la transformación maligna e invasiva de las células, así mismo esta forma localizada en suero ha servido como un marcador tumoral en cáncer de colon y en las vías biliares¹³¹.

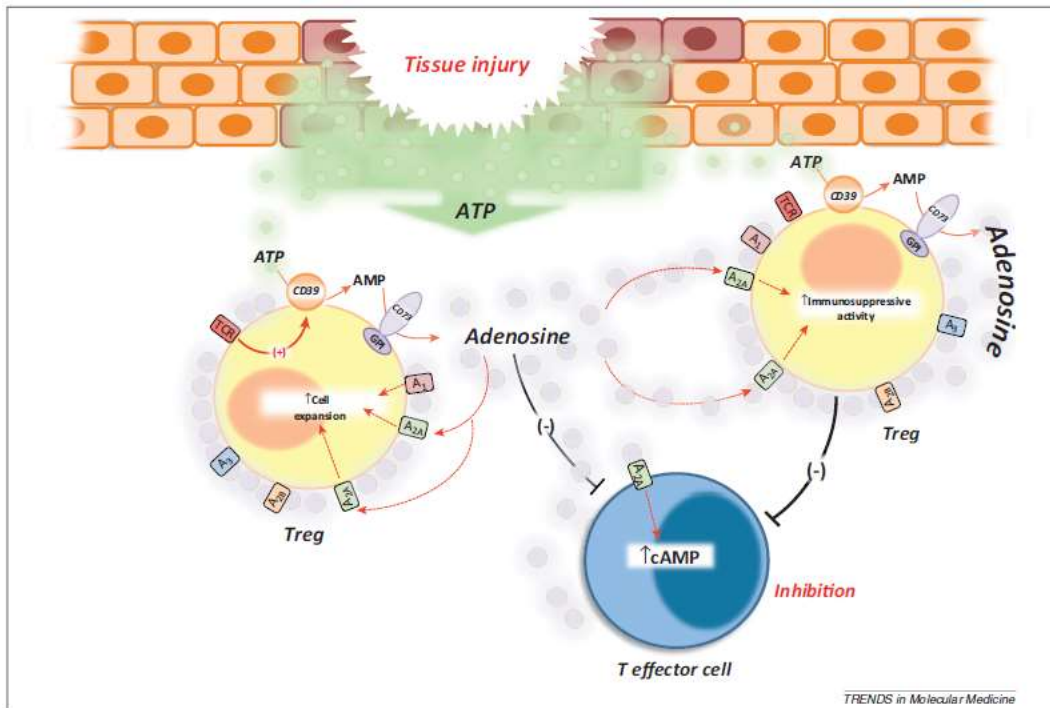


Fig.3: Imagen donde se muestran las rutas que usa CD39 y CD73 para la modulación de los linfocitos T reguladores. La activación de los receptores de linfocitos T induce la actividad de CD39 por lo que incrementa el metabolismo de ATP, generando adenosina. La acción inhibitoria de los linfocitos T reguladores se da por la activación del receptor A_{2A} con lo que se reduce la actividad inmune. Tomado de Antonioli, 2013 ¹¹³.

3.3.4 • CD39 y CD73 solubles (sCD39 y sCD73)

Recientemente se ha visto que la forma soluble y catalíticamente activa de CD39 se encuentra en la sangre periférica humana y murina¹³². De acuerdo con evidencia bioquímica, las formas solubles de las NTPDasas suelen perder gran parte de su actividad catalítica¹³³. CD39 ha sido encontrada en micropartículas dentro del plasma humano y murino donde se ha visto que tiene un papel en el intercambio de señales reguladoras entre los leucocitos y las células vasculares, así como en exosomas de células de diversos tipos de cáncer^{134,135}. También se ha reportado previamente la forma soluble de esta ectoenzima en nervios simpáticos de puercos de guinea; sin embargo, no se ha determinado la naturaleza de esta¹³⁶.

La forma soluble de CD73 ha sido descrita en gran variedad de tejidos, incluyendo el suero (derivado del hígado principalmente) y fluidos sinoviales. Aquí conservan su actividad catalítica, incrementan su expresión ante enfermedades inflamatorias y suelen conferir actividad enzimática¹²³. Esta ectoenzima se encuentra anclada a membrana plasmática por el extremo C-terminal de glicofosfatidilinositol (GPI), y su forma en plasma se debe posiblemente como consecuencia a la actividad de la fosfolipasa glicofosfatidilinositol específica¹³⁷. Se ha reportado que los niveles séricos de sCD73 aumentaron en los diversos pacientes con cáncer en comparación con los sujetos normales y se asociaron con la progresión de la enfermedad. En otro informe reciente, hubo una correlación significativa entre la actividad enzimática de sCD73 y los resultados clínicos en pacientes con melanoma metastásico avanzado que implican a sCD73 como biomarcador de pronóstico serológico¹³⁸.

4.: Justificación y planteamiento del problema

En nuestro país, el cáncer de mama representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres⁵. Si bien no se conoce la causa exacta por la cual se origina este padecimiento, existen varios factores que pueden estar asociados con la progresión de este tipo de cáncer¹². Se sabe que el microambiente tumoral desarrolla diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune, y uno de ellos, recientemente estudiado es la vía adenosinérgica, específicamente la acción de la ectoenzima CD73, la cual es capaz de desfosforilar AMP para obtener adenosina¹¹⁵ y que ejerce un efecto inmunosupresor en linfocitos TCD4+ y TCD8+. Aunado a esto, diversos factores producidos en el microambiente tumoral, tal como TGF- β y factores pro-inflamatorios como IFNs inducen la expresión de CD73 en las células tumorales y la producción de la forma solubles (sCD73), que además participan de manera importante en la progresión y desarrollo de metástasis en cáncer de mama^{139,140,141,142}. Tomando en consideración que las citocinas TGF- β , TNF- α ,

EGF, IFN- α e IFN- β se producen de manera predominante en varios tipos de tumores^{123,103,111}, incluyendo en cáncer de mama, en este estudio analizamos el efecto de estas citocinas en la expresión de CD73 y producción de sCD73 en células tumorales de cáncer de mama. Lo cual es de gran relevancia para contribuir en el conocimiento de los mecanismos que favorecen el desarrollo de la enfermedad y poder disponer de mejores herramientas para dirigir estrategias terapéuticas en el control de la misma.

5.:. Objetivo General

Analizar el efecto de TGF β , EGF, TNF α , IFN α e IFN β sobre la inducción de la expresión de CD73 en membrana y producción de sCD73 en células tumorales de cáncer de mama.

5.1.:. Objetivos particulares

- Determinar la expresión de CD73 en la membrana de células de cáncer de mama HCC1806 cultivadas en presencia de TGF β , EGF, TNF α , IFN α e IFN β .
- Identificar la presencia de CD73 en forma soluble (sCD73) en sobrenadante de la línea celular HCC1806 cultivada en presencia de TGF β , EGF, TNF α , IFN α e IFN β .
- Analizar la actividad catalítica de CD73 y sCD73 producida por la línea celular HCC1806 estimuladas con las citocinas mencionadas.

6 .:. Hipótesis

La generación de adenosina en el microambiente tumoral, a través de la hidrólisis de AMP por la actividad enzimática de CD73 (tanto anclada a la membrana como en su forma soluble), tiene una función importante en la supresión de la respuesta inmune y en la progresión tumoral. Asimismo, se ha reportado que la expresión de CD73 en las células tumorales puede ser inducida bajo condiciones de hipoxia y citocinas entre otros factores. Tomando en consideración que las citocinas TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β se producen de manera predominante en varios tipos de tumores, incluyendo el cáncer de mama, entonces, si cultivamos células de cáncer de mama en presencia de estas citocinas, se espera que la expresión de CD73 en membrana y la producción de sCD73 sea inducida.

7.:. Materiales y Métodos

7.1 Cultivo celular y obtención de sobrenadantes.

Se utilizaron células de cáncer de mama de la línea HCC1806 (Tabla 1) las cuales fueron mantenidas en cultivo utilizando medio RPMI 1640 de GibcoBRL (Life Technologies), suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) GibcoBRL (Life Technologies), antibióticos (penicilina 100U/mL y estreptomina 100ug/mL), bajo condiciones de esterilidad a una temperatura constante de 37°C en incubadora (Forma Scientific), con 5% de CO₂ y un ambiente de humedad saturante.

Tabla 1. Características de la línea celular de cáncer de mama utilizada en este trabajo. Tomado de ATCC, 2017.

Línea celular	Enfermedad	Tipo celular	Expresión génica	Sexo, edad y etnia
HCC1806	TNM estadio IIB, grado 2, carcinoma escamoso acantolítico primario	Epitelial	(-) HER2, ER, PR y expresión de p53 (+) EGP2 y citoqueratina 19	Hembra 60 años Negro

Una vez que las cajas de cultivo llegaron al 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo, fueron despegadas, lavadas con PBS y contadas con ayuda de un hemocitómetro. 1×10^7 células fueron cultivadas e incubadas por 72 horas en placas de 6 pozos con 2mL de medio Opti-MEM® (Life Technologies) libre de suero para el grupo control, así como en presencia de TNF- α , IFN- α , INF- β , TGF- β y EGF (R&D Systems) a una concentración de 25 ng/mL. Una vez transcurrido este tiempo se colectaron los sobrenadantes, fueron centrifugadas a 10 000 RPM por 10 minutos para después filtrarse con el fin de eliminar restos celulares.

7.2 Expresión de CD73 en presencia de citocinas por citometría de flujo.

Para la determinación de expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales, se llevó a cabo mediante citometría de flujo. En una placa de 6 pozos estéril se sembraron pozos con 50 000 células en un volumen final de 2mL de RPMI+ SFB al 10%, sin tratamiento, o con 25ng/mL de las citocinas.

El cultivo se mantuvo por 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el medio y se despegaron las células con ayuda de verseno (500 μ L por pozo) para dejar incubar por 5 minutos. Después se colectó en tubos de 2mL y posteriormente se centrifugó en frío por 5 minutos a 3000 RPM. Se desechó el sobrenadante y se

resuspendió con 100 μ L de PBS con SFB al 2%, nuevamente se centrifugó en frío por 5 minutos a 3000 RPM para quitar el exceso de verseno.

Se desechó el sobrenadante y se adicionaron donde correspondía 10 μ L de anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD73 humano acoplado a ficoeritrina (BD Biosciences) en 50 μ L de PBS con SFB al 2% por muestra (Excepto el pozo de auto fluorescencia) para dejar incubar por 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Después de este tiempo se hicieron 2 lavados más con 100 μ L de PBS con SFB 2% para retirar el exceso de anticuerpo. Las células se pasaron a tubos para citometría de flujo con 300 μ L de PBS con SFB 2% por cada uno, y se mantuvieron en frío hasta evaluar la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo FACS-Calibur (BD Biosciences). De este modo se obtuvieron ls siguientes muestras:

- 1.- Para medir auto fluorescencia (Células sin tratamiento ni anti CD73)
- 2.- Testigo (Células solo con el anticuerpo monoclonal anti CD73)
- 3.- Células con las citocinas a una concentración de 25 ng/mL y anti CD73

7.3 Determinación de la actividad catalítica de CD73 y sCD73 mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La conversión de Adenosina 5'-monofosfato (AMP) a Adenosina se analizó por medio de este ensayo. Para la determinación de la actividad catalítica de CD73 se cultivaron 1×10^7 células en placas de 6 pozos con 2mL de medio Opti-MEM® (Life Technologies) libre de suero y se dejaron en incubación por 72 horas con las citocinas a analizar en una concentración de 25 ng/mL. Trascurrido este tiempo, cada tratamiento fue incubado con 2.5mM de AMP y en presencia y ausencia de difosfato de adenosina 5'-(α,β -metileno) (APCP, Sigma USA), inhibidor específico de CD73, a una concentración de 2.5 mg/mL. A las 0, 1 y 3 horas fueron colectadas muestras de 2 μ L de los sobrenadantes.

Para el caso de sCD73, los sobrenadantes concentrados de las líneas celulares fueron incubados en placas de 96 pozos con 10mM de AMP y APCP, para obtener una concentración final de 2.5mM de AMP y APCP en un volumen final de 100 μ L. Para inhibir la actividad de ADA en los sobrenadantes, eritro-9-(2-hydroxynon-3-il) adenina (EHNA, Sigma USA), inhibidor específico de la enzima isoforma-1 de adenosina desaminasa, a una concentración final de 1mM. A las 0 y 24 horas fueron colectadas muestras de 2 μ L de los sobrenadantes para ser eluidas en CCP y cromatografía de ultra-resolución (UPLC).

Las muestras se colocaron sobre laminillas de CCF Fluorescentes de poliéster contenido sílica gel (Sigma USA) (5x8cm) y para la observación de hidrólisis de los nucleótidos de adenina y la generación de adenosina, las laminillas se colocaron verticalmente en una cámara de elución con 2mL de una mezcla de solventes orgánicos (Fase móvil) compuesta por: Isobutanol: Alcohol isoalmílico: Etoxietanol: Amoniaco: Agua (9:6:18:9:15), que se dejó correr por aproximadamente 45 minutos. Pasado este tiempo se retiró la laminilla para su secado a temperatura ambiente. Como controles se emplearon muestras de 1µL de soluciones de AMP, Adenosina (Ado) e Inosina (Sigma, Life science) a una concentración de 5mg/mL. Los compuestos de AMP y Adenosina fueron visualizados y se tomaron fotografías a través de un transiluminador en una cámara con luz ultravioleta (UV).

7.4 Detección de sCD73 por la técnica de ELISA

Para determinar la presencia de sCD73 en los sobrenadantes de las células tumorales cultivadas en ausencia o presencia de las diferentes citocinas, se empleó un ensayo de ELISA. Para ello, se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano para ELISA/RIA (Corning, USA), en donde se colocaron por triplicado 100µL de los sobrenadantes y se incubaron una hora a 37°C; transcurrido este tiempo se incubó durante toda la noche en refrigeración a 4° C. Para realizar una curva patrón, en otros pozos se colocó una serie de diferentes concentraciones (1.25-40 ng/mL) de la enzima recombinante de CD73.

Al día siguiente, se procedió a hacer 2 lavados con PBS, previo al bloqueo. El bloqueo de cada placa, consistió en la adición de 200µL de solución compuesta por PBS-SFB al 2% y 2% de albúmina sérica bovina (BSA), se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Posteriormente los pozos fueron lavados 4 veces con 300ul de PBS-SFB al 2%, enseguida se adicionaron 100µL de anticuerpo primario (anti-CD73 Novus-Biological) a una dilución de 1:1000 en PBS-SFB al 2% y se incubó por 1 hora a 37°C. Después se lavó la placa 6 veces con 300µ µL/pozo de PBS-SFB al 2% y se agregó anticuerpo secundario *Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatasa Conjugated* (Milipore) diluido 1:500 en PBS-SFB al 2%, se incubó 1 hora. Pasado este tiempo, los pozos fueron lavados 8 veces con PBS-SFB al 2%. A continuación, se adicionaron 100ul a cada pozo del sustrato para la fosfatasa alcalina, disolviendo 0.03g de sustrato (Sigma) a 5mL de Dietanolamina. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora.

Finalmente, ésta fue leída en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Los pozos de curva patrón fueron considerados como positivos, mientras que los pozos con medio Opti-MEM® se consideraron como negativos.

7.5 Cuantificación de adenosina mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)

Para determinar la cantidad de adenosina producida por la forma soluble de CD73, se utilizó el equipo de UPLC aquity (Waters, USA) y el software Empower 3 (Waters, USA). Se prepararon estándares de adenosina a una concentración de 1mg/mL disuelta en fase móvil (0.5% acetonitrilo: 5% metanol: 94.5% acetato de sodio 0.25M, pH 6.3) además de diluciones seriadas (1:1000) para establecer límites de detección y una curva patrón de 10 puntos empleando adenosina pura.

Los sobrenadantes de las células utilizados previamente se colocaron en tubos con 200µL de fase móvil, agitándose por 1 minuto y se centrifugaron por 3 minutos a 12000 rpm para estabilizar la adenosina. Después se ultra-filtraron utilizando filtros de amición de 3000 daltones (Millipore, USA) e introducidas al equipo para la determinación en las condiciones siguientes:

Velocidad de flujo 1.0mL/min

Detector UV 254-260 nm

Tiempo de retención 2.0 min

T ambiente

Columna de fase reversa LiChrosferRP (tamaño 125mm x am, 5mm de tamaño de partícula).

La adenosina se cuantificó con la comparación del tiempo de retención de la muestra y el de adenosina pura.

7.6 Análisis estadísticos

Todos los datos numéricos fueron presentados como el valor promedio +/- SD de tres experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas mediante análisis estadístico multivariado utilizando el software GraphPad Prism versión 6 (software GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). Las diferencias estadísticas fueron consideradas significativas a una $p < 0.05$.

8 :: Resultados

8.1 Las citocinas TGF- β , TNF α - EGF, IFN- α e IFN- β incrementan la expresión de CD73 en membrana de las células HCC1806 y su capacidad hidrolítica sobre AMP.

Se sabe que la generación de adenosina en el microambiente tumoral, a través de la hidrólisis de AMP por la actividad enzimática de CD73, tiene una función importante en la supresión de la respuesta inmune y en la progresión tumoral. Asimismo, la expresión de CD73 en los tejidos tumorales puede ser inducida bajo condiciones de hipoxia y citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias entre otros factores¹⁴³. Tomando en consideración que las citocinas TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β se producen de manera predominante en varios tipos de tumores^{144,103,111}, incluyendo en cáncer de mama, en este estudio analizamos el efecto de estas citocinas sobre la expresión de CD73 y la capacidad de generar adenosina en células tumorales de cáncer de mama. Para ello, células de la línea tumoral HCC1806 de carcinoma escamoso acantolítico primario, fueron cultivadas durante 72hrs en presencia o ausencia de 25ng/mL de cada una de las citocinas antes mencionadas. Posteriormente, se analizó la expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales mediante citometría de flujo, empleando el anticuerpo monoclonal anti-CD73-PE. Los resultados muestran que el tratamiento de las células tumorales con TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β incrementaron la expresión de CD73 en 42%, 30%, 190%, 220% y 280%, respectivamente (Figura 4).

Por otra parte, con la finalidad de analizar si el incremento en la expresión de CD73 inducido por las diferentes citocinas modificaba la capacidad de las células HCC1806 para generar adenosina, 1×10^7 de células HCC1806 previamente estimuladas durante 72h con cada una de las citocinas fueron incubadas durante 3h con 2.5 mg/mL de AMP y en presencia o ausencia de 2.5mg/mL de difosfato de adenosina 5'-(α , β -metileno) (APCP) (inhibidor específico de CD73), en un volumen total de 100 μ L. Al inicio (0h) y al final (3h) de la incubación se tomaron alícuotas de 2 μ L de cada sobrenadante y fueron eluidas en cromatografía de capa fina para visualizar los productos de la hidrólisis. De manera general, se observó que las células HCC1806 sin tratamiento (Basal) o tratadas con las diferentes citocinas, generaron dos productos de la hidrólisis de AMP: uno correspondiente a adenosina; y otro, de mayor contenido, correspondiente a inosina (producto desaminado de adenosina) (Fig. 5A), indicando que además de presentar actividad endonucleotidasa, estas células presentan fuerte actividad de la enzima adenosina desaminasa. Asimismo, mediante análisis densitométrico de los subproductos correspondientes a adenosina, se observó que las diferentes citocinas incrementaron la capacidad de las células tumorales para generar mayor cantidad

de adenosina a partir de AMP en relación con el cultivo basal (Fig 5B-C). Asimismo, es de notar que la adición de APCP, inhibidor competitivo de CD73, como era de esperarse, disminuyó la capacidad de las células tumorales para generar adenosina, principalmente en aquellas tratadas con EGF, IFN- α e IFN- β (Fig. 5B).

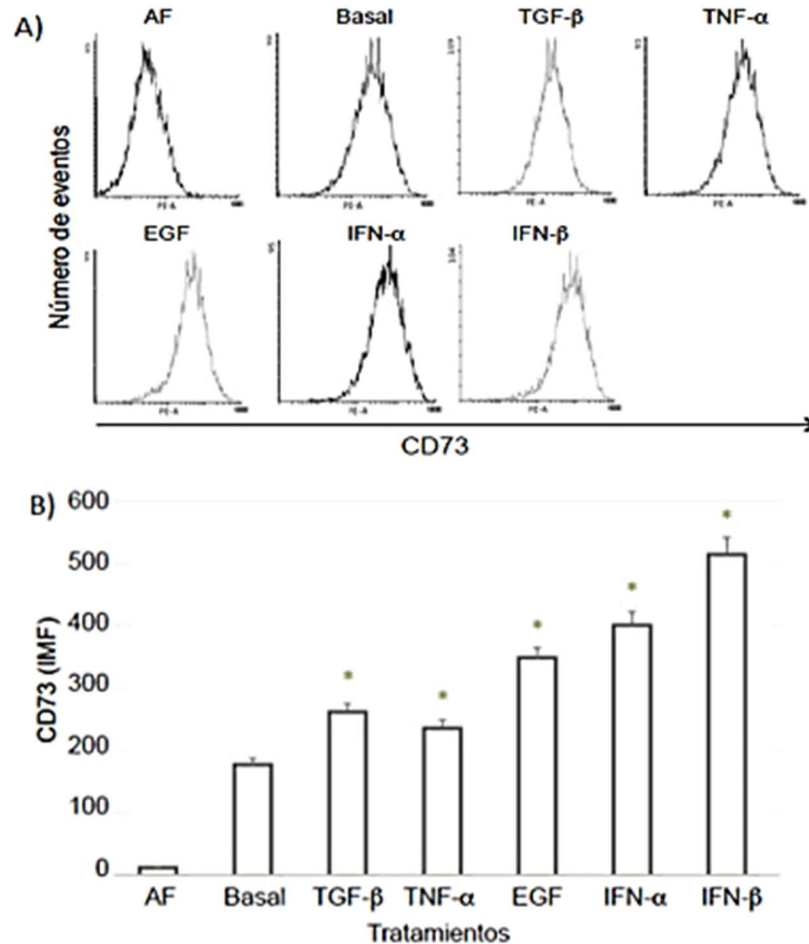


Fig 4. Las citocinas TGF- β , EGF, IFN- α , IFN- β y TNF- α indujeron incremento en la expresión de CD73 en la membrana de células tumorales HCC1806 de cáncer de mama. La línea celular HCC1806 de carcinoma escamoso acantolítico primario, fue cultivada durante 72hrs en presencia de 25ng/mL de cada una de las siguientes citocinas: TGF- β , EGF, IFN- α , IFN- β y TNF- α . Se determinó a expresión de CD73 mediante citometría de flujo. A) Se muestran los histogramas de las células teñidas con un anticuerpo isotipo control (AF), la expresión basal de CD73 en las células tumorales (Basal), y la expresión de CD73 en las células tratadas con cada citocina. B) Se muestran los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) de 10, 000 eventos evaluados en cada tratamiento. Experimento representativo de 3 ensayos realizados. *, indica diferencias significativas $p < 0.05$, respecto al basal.

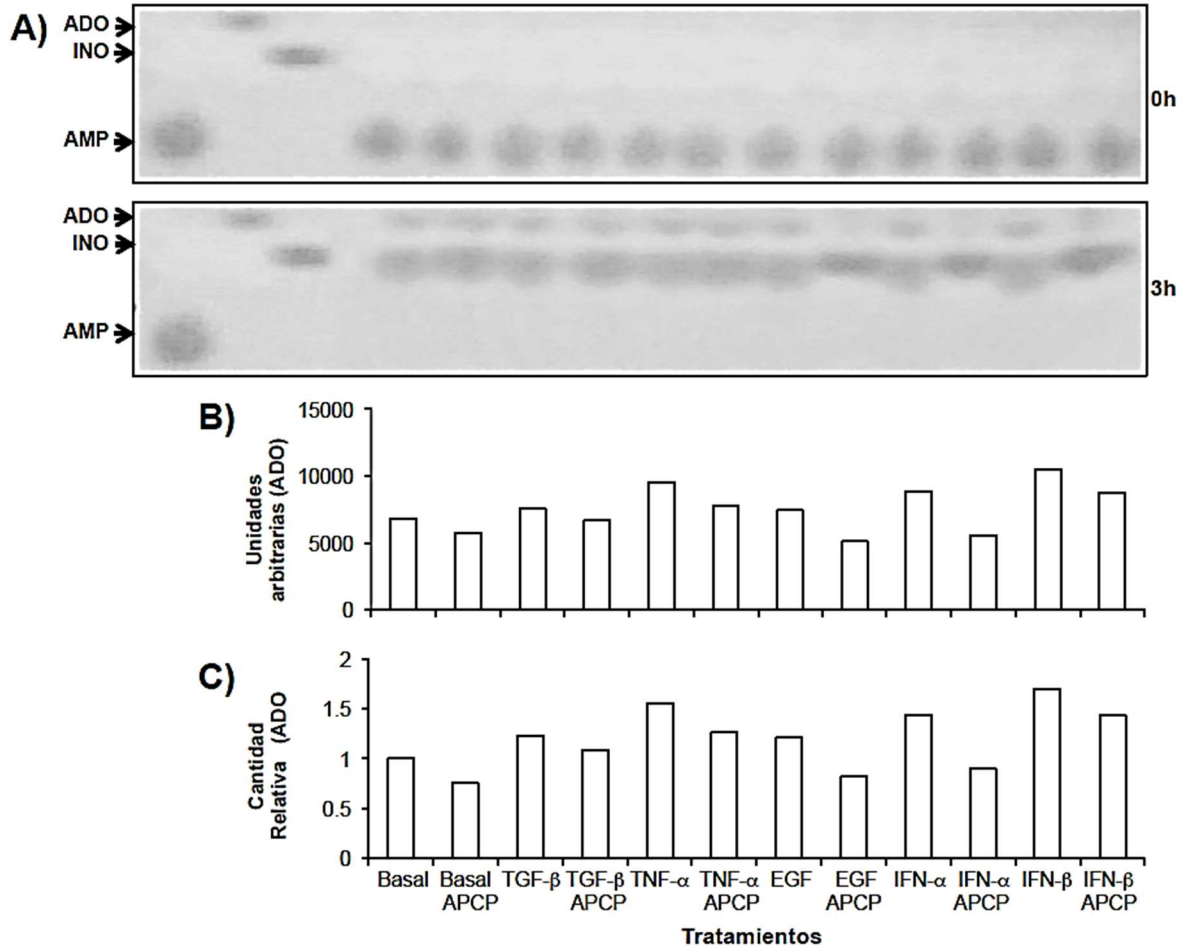


Fig. 5 Las citocinas TGF-β, EGF, IFN-α, IFN-β y TNF-α incrementaron la capacidad de las células tumorales HCC1806 de cáncer de mama para generar adenosina. 1×10^7 células HCC1806 cultivadas previamente durante 72h en presencia o ausencia de 25ng/mL de TGF-β, EGF, IFN-α, IFN-β y TNF-α fueron incubadas durante 3h con 2.5 mg/mL de AMP y en presencia o ausencia de 2.5mg/mL de adenosina 5'-(α, β-metilen) difosfato (APCP) (inhibidor competitivo de CD73) en un volumen total de 100uL. A) Se muestra la cromatografía del sustrato (AMP) y productos de la hidrólisis, adenosina (ADO) e inosina (INO), al inicio (0h) y al final (3h) de la incubación. Las lecturas obtenidas del análisis densitométrico (unidades arbitrarias) de las manchas correspondientes a la adenosina generada por las células tumorales, y la cantidad de adenosina, relativa a la producida por las células en condiciones basales, son mostrados en B) y C), respectivamente. Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

8.2 Sobrenadantes de las células HCC1806 cultivadas en presencia y ausencia de las citocinas TGF-β, TNF-α, EGF, IFN-α e IFN-β contienen sCD73 con actividad enzimática.

La forma soluble de CD73 (sCD73) se ha reportado en variedad de tejidos conservando su actividad catalítica (Allard *et al*, 2014). Asimismo, recientemente se ha propuesto que los niveles séricos de sCD73 pueden ser utilizados como un

biomarcador en cáncer (Morello et al, 2017). Con la finalidad de analizar si las citocinas TGF- β , EGF, IFN- α , IFN- β y TNF- α inducen la producción de sCD73 en células de cáncer de mama, 1×10^7 células HCC1806 fueron cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de cada una de ellas. Los contenidos de sCD73 en los sobrenadantes se determinaron a través de ensayos de ELISA. Para ello se realizó una curva estándar utilizando CD73 recombinante humana (Figura 6). Tomando como base los valores de la curva estándar, se detectaron 6.77 ng/mL de sCD73 en el sobrenadante de las células tumorales HCC1806 en condiciones normales de cultivo (Basal); mientras que los contenidos de sCD73 detectados en los sobrenadantes de las células tumorales cultivadas en presencia de las diferentes citocinas fueron muy similares a los detectados en condiciones basales de cultivo (6.78-6.88ng/mL) (Figura 6), lo cual sugiere que estas citocinas no favorecen la producción de sCD73 en estas células tumorales.

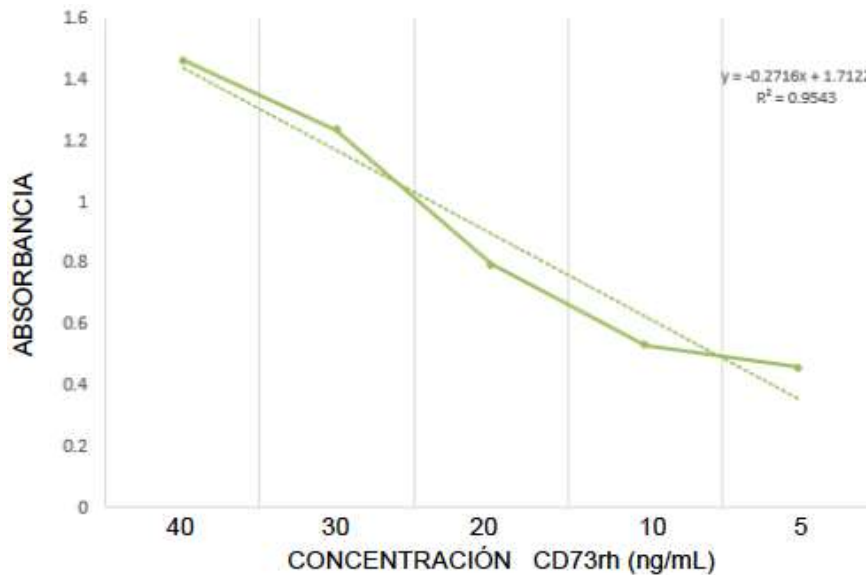


Fig. 5 Curva estándar de concentración de sCD73. La curva estándar de sCD73 se determinó empleando diferentes concentraciones de proteína CD73 recombinante humana (CD73rh), la detección de esta proteína se realizó mediante la técnica de ELISA, como se describió en la metodología. Esta curva estándar fue utilizada para determinar los contenidos de sCD73 en los sobrenadantes de las células HCC1806 cultivadas en presencia de las diferentes citocinas. Se muestra el valor promedio de las determinaciones realizadas por triplicado y la regresión lineal (línea punteada) de estos valores.

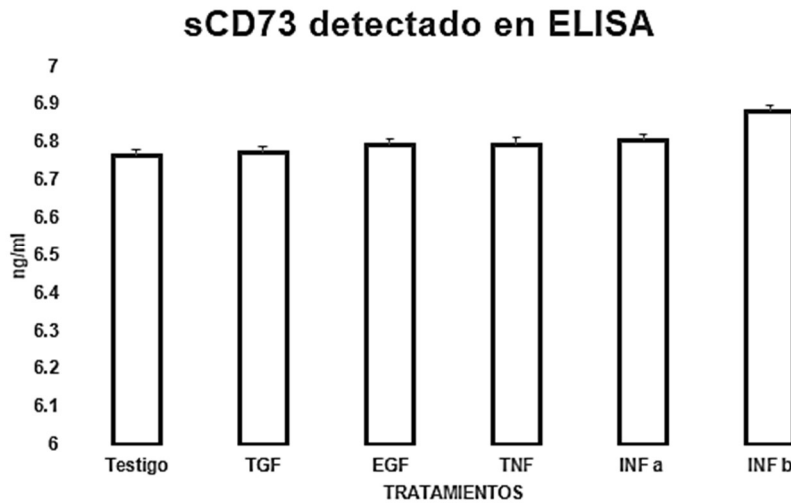


Fig. 6. Efecto de TGF- β , EGF, IFN- α , IFN- β y TNF- α en la inducción de sCD73 en células tumorales HCC1806 de cáncer de mama. 1×10^7 células tumorales HCC1806 de mama fueron cultivadas durante 72 h en medio libre de suero en presencia y ausencia de 25 ng/mL de TGF β , EGF, TNF α IFN α e IFN β . Los sobrenadantes fueron colectados y los contenidos de sCD73 fueron determinados por triplicado mediante ensayos de ELISA. Ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

Para analizar la actividad de sCD73 detectado en los sobrenadantes de las líneas celulares cultivadas en presencia o ausencia de cada una de las citocinas, éstos fueron incubados inicialmente con 10mM de AMP y APCP para obtener una concentración final de 2.5mM. Al realizar las cromatografías en capa fina bajo estas condiciones, después de 24hrs de incubación no se detectaron productos de la hidrólisis del AMP (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se adicionó EHNA, inhibidor específico de ADA, se lograron detectar bandas correspondientes a adenosina (Fig. 7A). Al realizar el análisis densitométrico de las bandas obtenidas, se observó que las bandas correspondientes a los sobrenadantes de las células HCC1806 cultivadas en presencia de las citocinas, principalmente con IFN- α e IFN- β , mostraron un mayor contenido de adenosina respecto al sobrenadante de las células cultivadas en ausencia de las mismas. Asimismo, la adición de APCP inhibió parcialmente (30-70%) la actividad de sCD73 contenida en los sobrenadantes (Fig. 7B-C).

Estos resultados sugieren que los sobrenadantes de las células cultivadas en ausencia o presencia de las diferentes citocinas, además de contener sCD73, presentan contenidos importantes de sADA y probablemente de otras enzimas solubles que participan en la generación de subproductos derivados de adenosina.

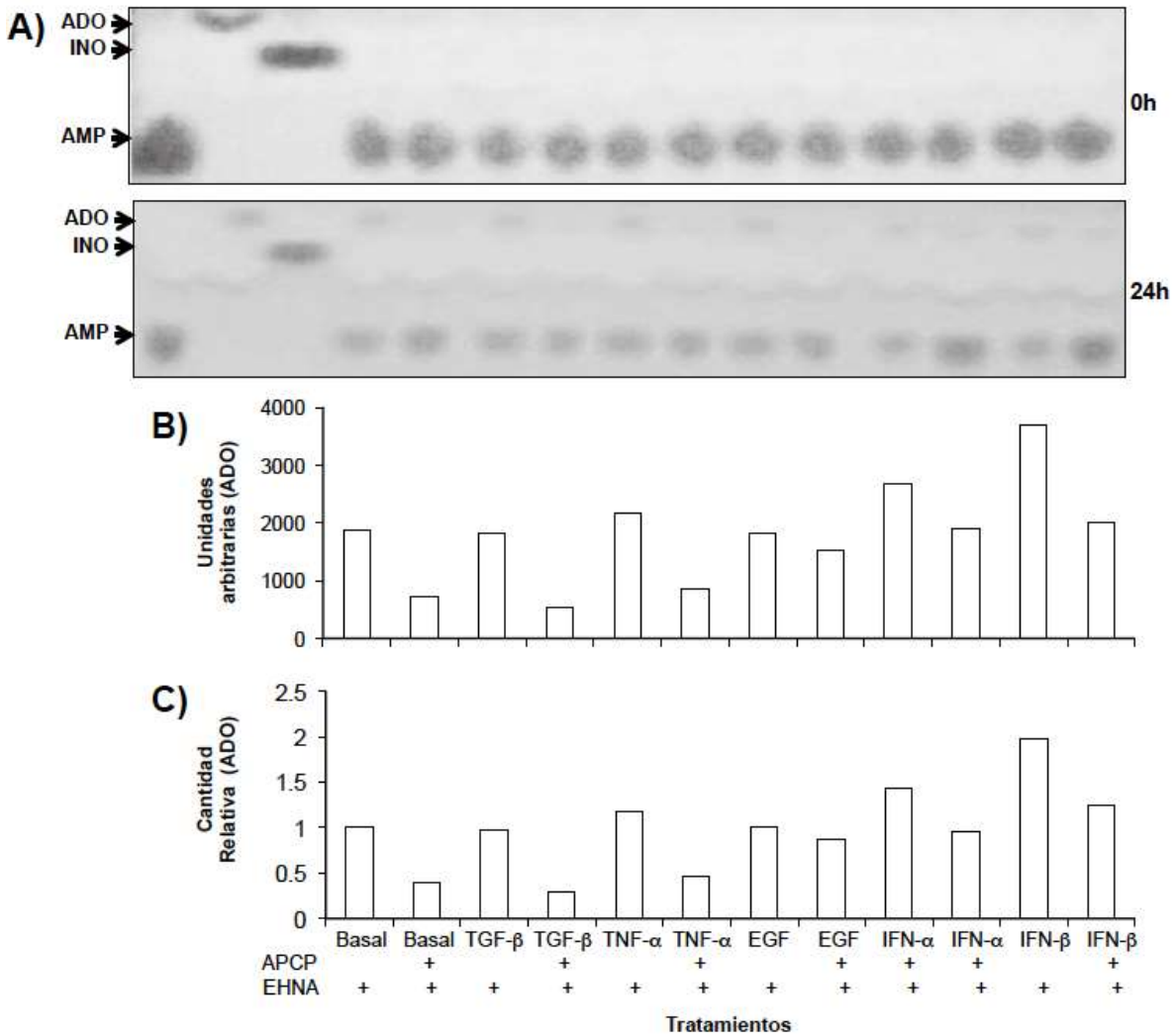


Fig. 7 Actividad de sCD73 en sobrenadantes de las células tumorales HCC1806 cultivadas en presencia o ausencias de las citocinas TGF-β, EGF, IFN-α, IFN-β y TNF-α. 1x10⁷ células HCC1806 fueron cultivadas durante 72h en medio libre de suero y en presencia o ausencia de 25ng/mL de TGF-β, EGF, IFN-α, IFN-β y TNF-α. Posteriormente los sobrenadantes fueron centrifugados y filtrados para eliminar los restos celulares. En seguida éstos fueron incubados durante 24h con 10mg/mL de AMP y en presencia o ausencia de 10mg/mL de adenosina 5'-(α, β-metilen) difosfato (APCP) (inhibidor competitivo de CD73), para tener una concentración final de 2.5mg/mL de AMP y APCP en un volumen total de 100μL. A) Se muestra la cromatografía del sustrato (AMP) y productos de la hidrólisis, adenosina (ADO) e inosina (INO), al inicio (0h) y al final (24h) de la incubación. Las lecturas obtenidas del análisis densitométrico (unidades arbitrarias) de las manchas correspondientes a la adenosina generada por la actividad de sCD73. La cantidad de adenosina, relativa a la producida por las células en condiciones basales, es mostrada en B) y C), respectivamente. Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

Para confirmar la actividad de sCD73 contenida en los diferentes sobrenadantes, los productos de de la hidrólisis de AMP fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (UPLC). Para ello se elaboró una curva estándar con diferentes concentraciones de adenosina pura (Fig. 8).

40

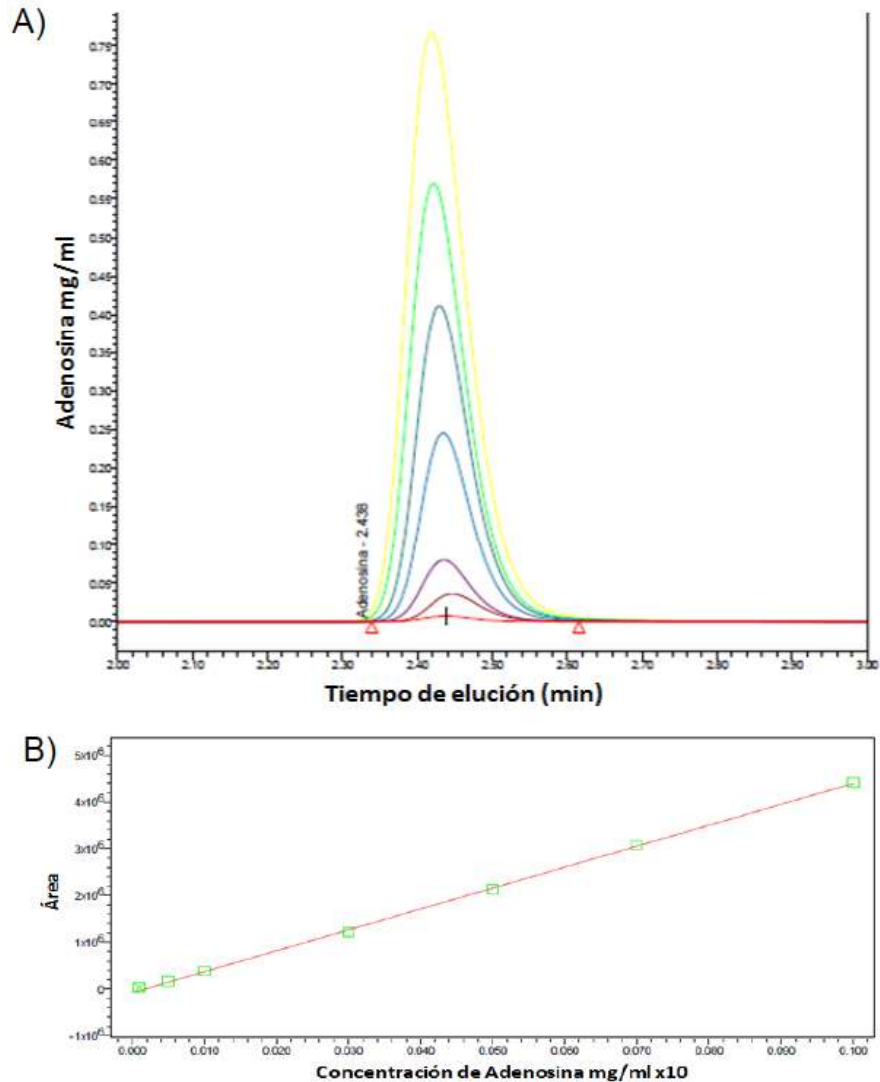


Fig. 8. Curva estándar de adenosina. A) se muestran los histogramas de diferentes concentraciones de adenosina eluyendo a 2.438 min. B) se muestra la línea de regresión lineal con una correlación $r=0.9997$.

Al analizar los productos de la hidrólisis de AMP generados por sCD73 contenido en los sobrenadantes de las células HCC1806, se observó que los obtenidos de las células cultivadas en presencia de $\text{INF-}\alpha$ e $\text{INF-}\beta$ generaron las mayores cantidades de adenosina, 470 ± 43 ng/mL y 740 ± 42 ng/mL, respectivamente; mientras que los obtenidos de las células tratadas con $\text{TGF-}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$ produjeron cantidades

similares a la condición basal (350 ± 50 ng/mL) de adenosina. Es importante mencionar que el sobrenadante de las células HCC1806 tratadas con EGF produjo menor cantidad de adenosina (172 ± 43 ng/mL). Asimismo, APCP inhibió parcialmente la actividad de sCD73 (Fig. 9). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el análisis densitométrico de las bandas de adenosina generadas por sCD73.

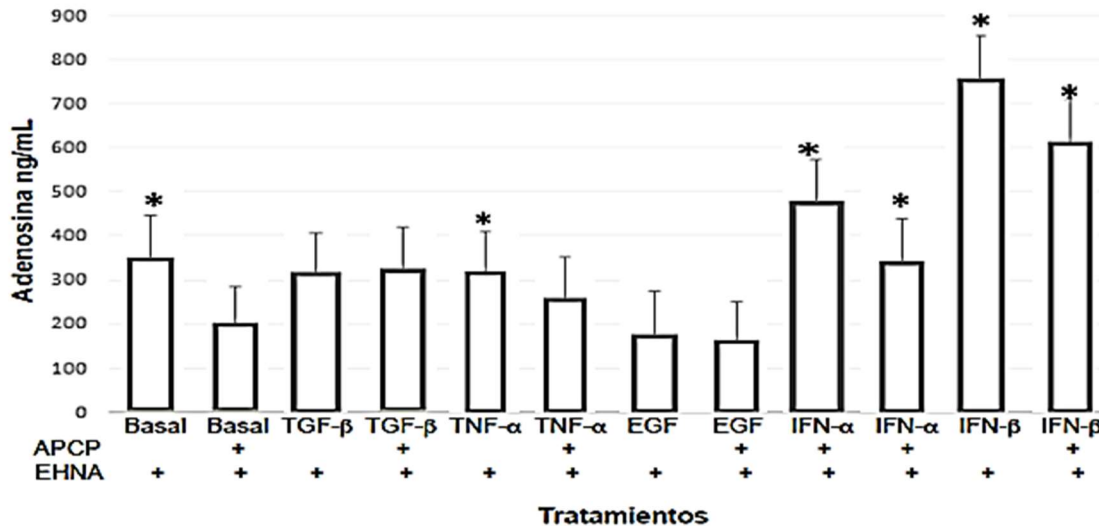


Fig. 9. Adenosina generada por la actividad de sCD73 en sobrenadantes de las células tumorales HCC1806 cultivadas en presencia o ausencias de las citocinas TGF- β , EGF, IFN- α , IFN- β y TNF- α . Las cantidades de adenosina generada por la actividad hidrolítica de sCD73 después de incubar durante 24h cada uno de los sobrenadantes con AMP, APCP (inhibidor específico de CD73) y EHNA (inhibidor específico de ADA). Se muestra el valor promedio de adenosina \pm DS. +, indica diferencia significativa vs basal, $p < 0.001$.

9 .: Análisis de Resultados

La adenosina generada en el microambiente tumoral a través de la hidrólisis de AMP por la actividad enzimática de CD73, constituye uno de los mecanismos que contribuyen a la progresión del cáncer, ya que la señalización de adenosina sobre receptores purinérgicos tipo 1 (A1R, A2AR, A2BR y A3R) sobre las células tumorales está relacionada con actividades protumorales tales como: resistencia a drogas, proliferación, migración y metástasis de las células tumorales, además de la supresión y evasión de la respuesta inmune anti-tumoral^{145,146,108,147}. De hecho, la expresión de CD73 en los tejidos tumorales puede ser inducida bajo condiciones de hipoxia, por el efecto de citocinas pro-inflamatorias (Interferones, TNF- α , IL-1 β) y anti-inflamatorias (TGF- β), así como por prostaglandina-E2, entre otras moléculas, que se producen en el microambiente tumoral¹⁴³. Tomando en consideración que las citocinas TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β se producen de manera predominante en varios tipos de tumores^{144,108,111}, incluyendo en cáncer de mama, en este estudio analizamos el efecto de estas citocinas sobre la expresión de CD73 y la capacidad de generar adenosina en células tumorales de cáncer de mama. En este contexto, el cáncer de mama es el tipo más común en mujeres alrededor del mundo, además de ser un padecimiento complejo por su gran heterogeneidad molecular y por tanto en su manejo clínico¹⁴⁸. De acuerdo a la clasificación molecular del cáncer de mama, el triple negativo (CMTN) es considerado el de peor pronóstico, puesto que además de tener “un estado inmunohistoquímico para cánceres con biología y conducta heterogénea”⁶¹, según su diagnóstico, manejo y seguimiento resultan ser un reto, pues a pesar de las altas tasas de respuesta a la quimioterapia al inicio del tratamiento, éstas no suelen ser prolongadas, debido a los mecanismos de resistencia a fármacos y supresión de la respuesta inmune que se desarrollan de forma prematura estos tumores⁶³. Por tanto, resulta importante conocer los mecanismos que favorecen la progresión tumoral. En este contexto, se ha reportado que la alta expresión de CD73 en tumores de pacientes con CMTN está fuertemente asociado con una baja tasa de supervivencia promedio y/o supervivencia libre de enfermedad^{118,149}. Por tanto, fue de nuestro interés analizar en este estudio el efecto de las citocinas TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β sobre la expresión de CD73 en las células HCC1806, las cuales corresponden a un carcinoma escamoso acantolítico primario cuya expresión génica está catalogada dentro de los cánceres más agresivos con características de CMTN.

En el presente estudio se encontró que las citocinas utilizadas indujeron incremento diferencial en la expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales HCC1806 en relación a su expresión basal. Dicho incremento se asoció con mayor capacidad de las células tumorales para generar adenosina a partir de la hidrólisis

de AMP, principalmente cuando las citocinas EGF, IFN- α e IFN- β fueron añadidas a los cultivos celulares. Por otra parte, al evaluar el efecto de las citocinas en la producción de sCD73, se observó que al analizar los contenidos de sCD73 en los sobrenadantes de las células tumorales en presencia de las citocinas, no hubo diferencias respecto al sobrenadante del cultivo basal. Sin embargo, al evaluar la actividad hidrolítica de cada sobrenadante, solo al inhibir la actividad de adenosina desaminasa (ADA), se detectó la generación de adenosina, principalmente en el sobrenadante del cultivo de las células HCC1806 en presencia de IFN- α e IFN- β sugiriendo que las citocinas empleadas en este estudio, además de tener un efecto diferencial en inducir la expresión de CD73, al menos en membrana celular, también pudieran influir en la expresión y liberación de otras enzimas, tal como ADA.

Se ha reportado que en algunas enfermedades que cursan con procesos inflamatorios, tal como el Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS por sus siglas en inglés), el incremento en sCD73 se ha asociado fuertemente con la presencia de altas concentraciones de IFN- α ¹⁵⁰. Asimismo, en cáncer de mama, la presencia de IFN- α y otros factores como TNF α y TGF β , están implicados en la diafonía entre los tumores y su microambiente inflamatorio^{151,152,153}. Por tanto, la capacidad de estas citocinas para inducir la expresión de CD73 y la liberación de sCD73 en células tumorales de cáncer de mama, puede tener un valor importante como factor pronóstico y posible blanco terapéutico en esta enfermedad.

Por otra parte, se observó que EGF indujo fuerte expresión de CD73 en las células tumorales HCC1806. Se sabe que el EGF es un conductor de la metástasis en el cáncer de mama, debido a su capacidad de inducir la transición epitelio mesénquima (TEM) en las células tumorales¹⁵⁴. La presencia del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico en las células tumorales de cáncer de mama se ha asociado fuertemente como un marcador predictivo de mal pronóstico clínico¹⁵⁵, ya que la unión de EGF a este receptor activa diversas vías de señalización, como la proteína Cinasas C-delta, las cinasas activadas por mitógenos o la producción de la ectoenzima metaloproteínasa 9^{93,155}. Por tanto, si la señalización de adenosina en células tumorales promueve su capacidad migratoria, y EGF induce incremento en la expresión de CD73, entonces éste puede ser un mecanismo de retroalimentación, mediante el cual EGF pueda promover la TEM en las células tumorales de cáncer de mama.

En adición a lo anterior, se ha reportado que TGF β también es un potente inductor de la TEM en células de mama¹⁵⁷. Asimismo, se ha encontrado que el microambiente tumoral del CMTN se encuentra enriquecido de esta citocina, la cual puede producirse por células estromales o tumorales¹⁵⁸. Además, se ha demostrado que en pacientes con CMTN, que han recibido quimioterapias, la señalización autócrina del TGF- β promueve la presencia de células cancerosas, que deriva en la

recurrencia de la enfermedad, metástasis y resistencia a multidrogas¹⁵⁹. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que la señalización de adenosina a través del receptor A2B, promueve la producción de TGF- β en células tumorales de CaCu¹⁶⁰, por lo que la inducción de CD73 en la membrana de las células tumorales de cáncer de mama a través de la acción de citocinas como EGF, TNF- α e IFN- α e IFN- β , utilizadas en el presente estudio, pueden potenciar la TEM en este tipo de cáncer.

Aunque TNF- α no tuvo un efecto importante en la inducción de CD73 en las células tumorales HCC1806, se ha reportado que esta citocina se encuentra en altas concentraciones dentro del tumor mamario, así como en el medio estromal y también ejerce efecto sobre la TEM^{161,162}, aumentando la agresión tumoral y la supervivencia de las células estromales mesenquimales^{163,164}.

Por otra parte, la forma soluble de CD73 también ha llamado la atención en diversos grupos de estudio, pues en la literatura se reporta que se encuentra presente en individuos sanos¹⁰². De hecho, Pettengill *et al*¹⁶⁵, dilucidaron que la actividad catalítica de sCD73 en plasma de recién nacidos es mayor en comparación con la actividad catalítica de esta ectoenzima en el plasma de los adultos, concluyendo que de esta forma el neonato adquiere un estado inmunológico antiinflamatorio. Sin embargo, la concentración de sCD73 se modifica en enfermedades inflamatorias e infecciones subyacentes¹⁵². Por ejemplo, en pacientes con pancreatitis aguda se ha visto que los niveles de CD73 soluble decrecen conforme a la severidad del padecimiento, además de que la actividad catalítica de ADA puede tener un valor pronóstico en la predicción del desarrollo de pancreatitis aguda grave¹⁶⁶. Por otro lado, Suvi *et al*¹⁶⁷ exploraron los niveles de sCD73 y la relación con la evolución de pacientes con sepsis grave, así como su posible asociación con la Insuficiencia Renal Aguda (IRA). Ellos encontraron que los niveles de sCD73 eran generalmente bajos en pacientes con sepsis severa, mientras que en pacientes con IRA los niveles de esta forma soluble eran más altos en comparación con los individuos que no presentaban este padecimiento.

Por otra parte, la importancia clínica de sCD73 ha sido reportada en pacientes con melanoma metastásico, debido a que esta ectonucleotidasa puede ser un biomarcador pronóstico en el tratamiento de la enfermedad, ya que niveles plasmáticos altos de sCD73 se relacionaron con baja respuesta a la terapia con nivolumab¹⁶⁸. Por lo cual resulta importante dilucidar en varias neoplasias la participación de las células tumorales en la producción de sCD73. Nuestro grupo de trabajo encontró que células tumorales de CaCu y células estromales mesenquimales derivadas de tumores de CaCu producen sCD73 con importante actividad catalítica, y que citocinas anti-inflamatorias favorecen su producción¹⁶⁹. En el presente estudio encontramos que las células HCC1806 produjeron sCD73 a

bajos niveles y que las citocinas TGF- β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β aparentemente no indujeron incremento en la producción de esta ectonucleotidasa. De manera interesante, al analizar la actividad enzimática de sCD73 contenida en los diferentes sobrenadantes, no se pudo detectar la generación de adenosina a partir de la hidrólisis de AMP, a menos que EHNA, inhibidor específico de la enzima ADA1, fuera adicionado. Lo cual sugiere que las células HCC1806 liberan, *per se*, altos contenidos de ADA.

La enzima ADA cataliza la desaminación de adenosina o desoxiadenosina en inosina o desoxi-inosina, respectivamente. Se han identificado dos isoenzimas con actividad de ADA en tejidos humanos, ADA1 y ADA2. La isoenzima ADA1, que corresponde a un monómero soluble de 363 aminoácidos con un peso de 41 kDa, regula principalmente la concentración intracelular de ADO, y se ha reportado que protege a los linfocitos T de la apoptosis inducida por la interacción de ADO-A2AR¹⁷⁰. Esta enzima también puede encontrarse asociada a CD26, una glicoproteína con actividad dipeptidil peptidasa IV que se encuentra anclada a la membrana celular¹⁷¹. Por otra parte, la isoenzima ADA2, que corresponde a una proteína de 110 kDa, se localiza en el espacio extracelular y tiene 100 veces menos afinidad para la ADO que ADA1, y alcanza su actividad máxima en sitios de alta concentración de ADO y de bajo pH, como ocurre en el microambiente tumoral, sitios altamente hipóxicos y de inflamación¹⁷². Además, la concentración de ADA2 en suero se correlaciona con la progresión del crecimiento del tumor, lo cual identifica a ADA2 como un biomarcador conveniente en el seguimiento de pacientes con cáncer¹⁷³.

En diversos estudios, la actividad de ADA se ha encontrado incrementada en células y tejidos cancerosos¹⁷⁴. Aghaei¹⁷⁵ reportó que la actividad de la isoenzima ADA2 se encuentra incrementada en el suero de pacientes con cáncer de mama. De hecho, Walia¹⁷⁶ considerará que la expresión de ADA era el mejor parámetro para la detección del cáncer de mama. Por otra parte, al comparar la actividad de ADA entre tumores de mama benignos y malignos, se encontró que la actividad de ADA en los tumores benignos fue significativamente más baja que en los tumores malignos¹⁷⁷. En otros estudios, los valores altos de ADA y de CD73 fueron observados en pacientes de cáncer de mama, además de que la actividad de estas dos moléculas presentó una correlación positiva. Así mismo se observó que en pacientes en estadio clínico 4 es mayor la actividad de ADA, por lo tanto, concluyen que mientras mayor sea el avance del padecimiento y el proceso inflamatorio del mismo, mayor es la actividad de ADA¹⁷⁸. Por lo que se sugiere que el incremento en la producción de ADA en las células tumorales sea un mecanismo de compensación contra la acumulación toxica de adenosina.

En nuestro estudio encontramos que la adición de EHNA tuvo un efecto importante en inhibir la actividad de ADA en los sobrenadantes de las células, lo cual sugiere que una proporción importante de ADA contenida en los sobrenadantes corresponda a ADA1, ya que se tiene reportado que ADA2 no es inhibida por EHNA¹⁷⁹. Cabe mencionar que al adicionar EHNA a los sobrenadantes derivados de los cultivos de las células HCC1806 tratadas con IFN- α e IFN- β , se detectó mayor actividad de sCD73, al generar mayor cantidad de adenosina a partir de AMP, sugiriendo que estos sobrenadantes pudieran contener únicamente ADA1. En este sentido, resultará importante conocer en estudios posteriores si células tumorales HCC1806 producen tanto ADA1 como ADA2, y las concentraciones de estas enzimas son modificadas bajo el tratamiento con las diferentes citocinas.

En nuestros resultados también observamos que la inhibición de sCD73 con APCP fue parcial en la mayoría de los casos, lo cual sugiere que otras ectoenzimas con capacidad de hidrolizar AMP, tales como la fosfatasa alcalina y Pirofosfatasa/Fosfodiesterasa pudieran estar contenidas en los sobrenadantes. La fosfatasa alcalina (AP) ha sido citada en la literatura como un biomarcador que ayuda a monitorear el cáncer de mama, debido a que el nivel de AP en suero de pacientes con cáncer de mama avanzado alcanza un valor de 2-3 veces superior al detectado en mujeres sanas¹⁸⁰. Asimismo, se ha reportado que los niveles de AP plasmático correlacionan con metástasis a hueso e hígado, así como con los niveles de TGF β , TNF α , IL-1 e IL-2¹⁸¹. En relación a las enzimas de la familia E-NNP, Buffon y colaboradores¹⁸² reportaron una expresión exacerbada de las enzimas NNP1 y NNP3 en las células Walker 256 de carcinoma de mama en ratas Wistar, en comparación con las células contenidas en ascites¹⁸³. Asimismo, se ha reportado que la expresión de NNP1 en las células Walker 256 puede ser inducida por TGF β ^{184,114}. En consecuencia, resultará importante conocer si las citocinas utilizadas en el presente estudio inducen la producción de AP y E-NNP en las células tumorales HCC1806. Lo cual será de gran importancia para dilucidar su participación en la modulación de las diferentes enzimas que participan en la vía adenosinérgica y que tienen una función relevante para favorecer la progresión de la enfermedad.

10.:. Conclusiones

- ✓ Las citocinas TGF β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β indujeron un incremento diferencial en la expresión de CD73 en la membrana de las células tumorales HCC1806 de CMTN.
- ✓ El incremento en la expresión de CD73 en las células HCC1806 se relacionó con mayor capacidad de las células tumorales para generar adenosina a partir de la hidrólisis de AMP.

- ✓ La forma de sCD73 fue detectada en sobrenadantes de las células HCC1806 y sus niveles aparentemente no fueron modificados por el tratamiento de las células con las citocinas TGF β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β .
- ✓ La actividad de ADA1 fue detectada en sobrenadantes de las células HCC1806, debido a que su inhibición con EHNA, permitió detectar la adenosina generada a través de la actividad hidrolítica de sCD73 sobre AMP.
- ✓ Nuestros resultados permiten sugerir que las citocinas TGF β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β , las cuales juegan un papel importante en la evolución del cáncer de mama, pueden ejercer un efecto importante en modular la expresión de CD73 y ADA y probablemente otras ectoenzimas que participan en la vía adenosinérgica.

11 .:. Perspectivas

El desarrollo del presente estudio permitió conocer la participación de las citocinas TGF β , TNF- α , EGF, IFN- α e IFN- β en la expresión de CD73 y producción de CD73 en las células tumorales HCC1806 de cáncer de mama con características de CMTN. Será muy importante conocer el efecto de estas citocinas en otras líneas celulares con características de CMTN e incluso de otros tipos moleculares para tener una mayor información al respecto. La presencia de la enzima ADA toma gran relevancia por la gran actividad detectada en los sobrenadantes, lo cual lleva a cuestionar sobre el papel funcional de esta enzima en sus dos isoformas funcionales (ADA1 y ADA2), y si éstas pueden ser inducidas por las citocinas que se utilizaron en este estudio. Debido a que ADA es considerada como un biomarcador en cáncer de mama, su asociación con la presencia de citocinas, podría ayudar a mejorar el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, así como en el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

Finalmente, sería importante determinar la presencia de enzimas como AP y de la familia de NNP en las células tumorales de cáncer de mama y sobrenadantes de las mismas, debido a que su papel funcional puede contribuir a la progresión de la enfermedad.

12.:. Referencias

1. Organización Mundial de la Salud [OMS]. Cáncer. Estados Unidos: 2015; [12 de diciembre del 2017]. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

2. Fernández, *et al.* Manual de enfermería Oncológica. Argentina; Instituto Nacional del Cáncer. Ministerio de Salud. 2008.
3. Organización Panamericana de la Salud [OPS]. 19 de octubre: Día Mundial de la Lucha contra el Cáncer de Mama. Paraguay. 2012. [15 de diciembre del 2017]. Disponible en: http://www.paho.org/par/index.php?option=com_content&view=article&id=796:19-octubre-dia-mundial-lucha-contra-cancer-mama&Itemid=255
4. Arce, *et al.* Oncoguía, Cáncer de mama. InCan. 2011; 6: 77-86.
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [INEGI]. Estadísticas a propósito del... día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). México. 2015. [21 de diciembre de 2017]. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
6. Colditz G y Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 2000; 152(10):950-64
7. Marshall, *et al.* Adjuvant therapy with zoledronic acid (AZURE-BIG 01/04): the influence of menopausal status and age on treatment effects. *J Clin Oncol*, 2012; 30 (suppl; abstr 502).
8. Rosner, *et al.* Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer. *The Nurse's Health Study. Am J Epidemio.* 1994; 193(8):819-35, 1994
9. Azim *et al.* Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies. *Eur J Cancer.* 2011; 47(1):74-83, 2011.
10. Freudenheim, *et al.* Lactation history and breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 1997; 146:932-938.
11. Russo, *et al.* Developmental Cellular and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000; 27:17-37.
12. Angarita F y Acuña S. Cáncer de seno: de la epidemiología al tratamiento. *Univ. Med. Bogotá.* 2008; 49(3): 344-372.
13. Chen, *et al.* Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA.* 2002; 287:734-741.
14. Goss, *et al.* Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Eng J Med.* 2011; 364(25):2381-2391.
15. Heiss, *et al.* Health risk and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA.* 2008; 299:1036-1045.
16. Anderson *et al.* Conjugated equine estrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health initiative randomized placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(5):476-486.
17. Garber J, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J clin Oncol.* 2005; 23(2): 276-92.

18. Pharoah, *et al.* Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 1997; 71(5):800-809.
19. Rhiem, *et al.* The risk of contralateral breast cancer in patients from BRCA1/2 negative high-risk families as compared to patients from BRCA1 or BRCA2 positive families: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res*. 2012; 14(6): R156.
20. García J y Martín M. *Oncología Cáncer de mama*. 2da edición. Madrid. Servicio de Oncología, Hospital Clínico San Carlos. Pp 130. 2009.
21. Figueroa *et al.* Cáncer de mama familiar, BRCA1 positivo. *Rev. Chil Cir*. 2009; 61:547-551.
22. Lee, *et al.* Immunolocalization of BCRA-1 protein un normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation whit other biological parameter. *Histopathology*. 1999; 34:106-117.
23. Rebbeck, *et al.* Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J. Med*. 2002; 346: 1616-1622.
24. Easton, *et al.* Genome wide association study identifies novel breast cancer susceptibility. *Nature*. 2007; 447(7148): 1087-93.
25. Bahcall O. Common variation and heritability estimates for breast, ovarian and prostate cancers. *Nature Genetics*. 2013; 8: 255-266.
26. King, *et al.* National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. Tamoxifen and breast cancer incidence among women whit inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Breast Cancer Prevention Trial*. *JAMA*. 2001; 286:2251-2256.
27. Fong, *et al.* Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009;361(2): 123-134.
28. Trock, *et al.* Meta-analysis of intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(7):459-71.
29. Calle E, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanism. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(8):579-591.
30. Rosenberg, *et al.* Performance benchmarks for screening mammography. *Radiology*. 2006;241(1): 55-66.
31. Saslow, *et al.* American Cancer Society guidelines for breast screening whit MRI as an Adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin*. 2008;57: 75-89,
32. Bathia *et al.* Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1996; 334(12):745-51.
33. Calderon-Garciduenas, *et al.* Risk factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Publica Mex*. 2000; 42(1):26-33.
34. Sanfilippo J. y Moreno M. *Cáncer de mama*. Seminario El ejercicio actual de la medicina. México. Facultad de Medicina. UNAM. 2008. [03 de enero del 2011] Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/abr_01_ponencia.html

35. Guzmán-Santos, *et al.* Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. Archivos de medicina. iMedPub. 2012; 8(1:1):3823/082.
36. Picca, *et al.* Calcification in the breast; A radiology perspective. Applied Radiology. 2003; 29-37.
37. Leonard G, Swain S. Ductal carcinoma-in situ and the role of systemic therapy. J Clin Oncol. 2003; 221-228.
38. Uribe A. Cáncer de mama. Rev Obstet. Ginecol. 2009; 4(3):223-232.
39. Celorio, *et al.* Fundamentos de Oncología Ginecológica. 1ra edición. España. Pp 637. Ediciones Diaz De Santos; 1990.
40. Sapino, *et al.* Mammographically detected in situ lobular carcinomas of the breast. Vorchows Arch. 2000; 436:421-30.
41. Haagensen, *et al.* C Lobular neoplasia (lobular carcinoma in situ) of breast. Cancer. 2000; 42: 717-69.
42. Lee, *et al.* Clinical pathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: A case control study. World J Surg Oncol. 2010; 8: (34) 1186-1277
43. Pestalozzi, *et al.* A distinct clinical and prognostic feature of infiltrating lobular carcinoma of the breast: Combined results of 15 international breast cancer study group clinical trials. J Clin Oncol. 2008; 26(18):3006-3014.
44. Robertson, *et al.* Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. CA Cancer J Clin. 2010; 60(6):351-75.
45. Overmoyer B. Inflammatory breast cancer: novel preoperative therapies. Clinical Breast Cancer. 2010; 10(1):27-32
46. Taylor, *et al.* An unusually extensive case of Paget's disease of the nipple. Breast. 2001. 10:442-446.
47. Singh, *et al.* Is mastectomy overtreatment for Paget's disease of the nipple? Breast. 2001; 10: 442-446.
48. Sahoo, *et al.* Bilateral Paget's disease of the nipple associated with lobular carcinoma in situ. Arch Pathol Lab Med. 2002; 126:90-92.
49. Guerrero, *et al.* Malignant phyllodes tumor of the breast: Review of the literature and case report of stromal overgrowth. Surg Oncol. 2003;12: 27-37.
50. MacDonald, *et al.* Malignant Phyllodes Tumor of the female breast. Cancer. 2006; 107:2127-2133.
51. Parker, *et al.* Angiosarcoma developing in a breast after conservation treatment for breast cancer. AM J Clin Oncol. 2003; 26(5):486-8.
52. Billings *et al.* Cutaneous angiosarcoma following breast-conserving surgery and radiation: an analysis of 2-7 cases. Am J Surg Pathol. 2004;28(6):781-8.
53. Perou, *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. Nature. 2005; 406(6797):74752.
54. Prat A y Perou C. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol. Onco. 2010;5(1): 5-23.

55. Rouzier, *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5678-5685.
56. Brenton, *et al.* Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol.* 2005; 23:7350-7360.
57. Cheang, *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009; 101:736-50.
58. Cheang *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14:1368-76.
59. Oakman, *et al.* Management of triple negative breast cancer. *Breast. Eslevier.* 2010;19(5):312-21
60. Dent, *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(15):4429-4434.
61. Carey, *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-2334.
62. Abbas *et al.* *Inmunología celular y molecular.* 8° Edición. España. Elsevier Saunders. Pp 2. 2015.
63. Iwasaki A y Medzhitov, R. Regulation of adaptative immunity by the innate immune system. *Science.* 2010; 327:291-295.
64. Parham P. *Inmunología.* 2° edición. México. Editorial Médica Panamericana. Pp 248.2005
65. Janeway C y Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.
66. Chaplin D. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117; 430-435.
67. LaRosa D y Orange J. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121: 364-369.
68. Tortora G. *Introducción a la microbiología.* 9° edición. México. Editorial médica Panamericana. Pp 509-515. 2007.
69. Youinou P. B cells conducts the lymphocyte orchestra. *J Autoimmun.* 2007; 28:143-151.
70. Bosco, *et al.* Peripheral T cells in the thymus: have they just lost their way or do they do something? *Immunol Cell Biol.* 2009;87(1): 50-75.
71. Reinhardt, *et al.* T helper Cell effector fates. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18:271-277.
72. Askenasy *et al.* Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev.* 2008; 7: 370-375.
73. Dinarello C y Cannon J. Cytokine measurements in septic shock. *Ann inter Med.* 2000;119 (8):843-854.
74. Mocellin S y Nitti D. TNF and cáncer: the two sides of the coin. *Front Biosci.* 2008; 13:2774-2783.

75. Bertazza L y Mocellini S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr Med Chem*. 2010;17(29):3337-3352.
76. Baud V y Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*. 2001; 11(9): 372-377.
77. Linden, J., Cekic, C. Regulation of Lymphocyte Function by Adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012;32: 2097–2103.
78. Aggarwal, *et al*. TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006; 56:161-186.
79. Deker, *et al*. The ying and yang of type interferons. *Antiviral Res*. 2006; 71:108-116.
80. Theofilopoulos, *et al*. Type I interferon (α , β) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 307-336.
81. Jonasch E y Haluska F. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications and toxicities. *Oncologist*. 2001; 6:34-55
82. Kim, *et al*. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and on vivo. *Oncogene*. 2004; 23:1125-1135.
83. Connett, *et al*. Interferon regulatory factor I (IRF-1) and IRF-2 expression in breast cancer tissue microarrays. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25: 587-97.
84. Allavena, *et al*. Review chemokines in cancer related inflammation. *Exp Cells Res*. 2011;317(5): 664-673.
85. Lazár-Molnár, *et al*. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000;12(6): 547-554.
86. Peralta-Zaragoza, *et al*. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en el cáncer. *Salud Pública de México*. 2001; 43(4): 340-351.
87. Giamperi, *et al*. Intravital imaging illuminates transforming growth factor beta signaling switches during metastasis. *Cancer Res*. 2010;70(9):3435-3439.
88. Jakowlew S. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(3): 435-457.
89. Harris, *et al*. Transforming growth factor-b in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25: 435-457.
90. Herbst R. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2004; 59(2-suppl): 21-6.
91. Kruger J y Reddy K. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res*. 2003; 1: 801-809.
92. Nicholson, *et al*. EGFR and cancer prognosis. *European Journal Cancer*. 2001; 37(9): 5-15.

93. Snook A y Waldman S. Advances in cancer immunotherapy. *Discov Med.* 2013; 15: 120-125.
94. Díaz-Rubio E y García C. *Oncología clínica básica*. 1° Edición. España. Arán Ediciones. Pp 67. 2000.
95. Batista A. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *MEDISAN.* 2003; 7(2): 75-88.
96. Rabinovich, G. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina*. 1° Edición. España. Editorial Médica Panamericana. Pp 410. 2004.
97. Mitra, *et al.* Antitumor immune responses. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5(28):1-19
98. Nicolini, *et al.* Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor. Rev.* 2006; 17(5): 325-337.
99. Hoebertz, *et al.* Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(6),290-297
100. Burnstock G y Knight G. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev Cytol.* 2004; 240:31-304.
101. Yegutkin G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochimica et biophysica Acta.* 2008; 1783(5): 673-694.
102. Beavis *et al.* CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. 2012; 33(5):231-237.
103. Zimmermann, *et al.* Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signalling.* 2012; 8:437-502.
104. Dwyer, *et al.* CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* 2007; 3:171-180.
105. Bastid *et al.* ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene.* 2012; 103:269-278.
106. Stagg J y Smith M. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 2010;29 (39):5346-5358.
107. Thompson, *et al.* Critical role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 2004; 200:1395-1405.
108. Resta R y Thompson F. T cell signaling through CD73. *Cell. Signal.* 1998; 9(2):131-139.
109. Regateiro, *et al.* Generation of anti inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41:2955-2965.
110. Goding *et al.* Physiological and pathophysiological functions of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochem Biophys Acta.* 2003; 1638(1)1-19.
111. Stefan, *et al.* NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(10): 542-550.

112. Vollmayer, *et al.* Hydrolysis of diadenosine polyphosphatases. *Eur J Biochem.* 2003; 270(14): 2971-2978.
113. Antonioli *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine.* 2013; 9(6):355-367.
114. Schuler, *et al.* Phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ CD39⁺ FOXP3⁺ and CD4⁺ CD39⁺ FOXP3^{neg} T-cell subsets in cancer patients. *Immunity* 2012;36: 362-373.
115. Loi, *et al.* CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(27): 11091-11096.
116. Bavaresco *et al.* The role of ecto-5' nucleotidase/CD73 in glioma line proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2008; 319(1-2):61-68.
117. Wang M y Ren L. Growth inhibitory effect and apoptosis induced by extracellular ATP and adenosine on human gastric carcinoma cells: involvement of intracellular uptake of adenosine. *Acta pharmacologica Sinica.* 2006; 27(8):1085-1092.
118. Xion, *et al.* NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell and Tissue Research.* 2014;335 (2): 365-374
119. Kolszalka, *et al.* Inhibition of Cd73 simulates the migration and invasion of B16F10 melanoma cells in vitro, but results in impaired angiogenesis and reduced melanoma growth in vivo. *Oncology Reports.* 2014;31(2): 819-827.
120. Allard *et al.* Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *International Journal of cancer.* 2014; 134(6): 1466-1473.
121. Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signalling.* 2013; 9(2): 145-165.
122. Raskovalova, *et al.* Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J immunol.* 2005;175: 4383-4391.
123. Whitstide, *et al.* The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Current Medicinal Chemistry.* 2011; 18(34): 5217-5223.
124. Sharma, *et al.* Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem.* 2014; 29: 269-278.
125. Anderson *et al.* Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol.* 2004; 164:841-847.
126. Lalles J. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev.* 2014; 72:82-94.

127. Jimenez-Andrade, *et al.* Inflamación y angiogenesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. *Medigrafic.* 2011; 6(2): 111-119.
128. Yano, *et al.* Expression and localization of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase. I-1 (ENPP/PC-1) and-3 (ENPP3/CD203c/PP-beta/B101gp130(RB13-6)) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer letters.* 2004; 207(2): 139-147.
129. Yegutkin G. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated vía integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *FASEB J.* 2012; 26: 3875-3883.
130. Yegutkin, *et al.* Effect of shear stress on the release of soluble ectoenzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Brit J Pharmacol.* 2000; 129: 921-926.
131. Banz *et al.* CD39 is incorporated into plasma microparticles where it maintains functional properties and impacts endothelial activation. *Brit J Haematol.* 2008; 142:627-637.
132. Clayton, *et al.* Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol.* 2011; 187: 676-683.
133. Westfall D y Todorov L. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 303:439-444.
134. Lehto M y Sharom F. Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'- nucleotidase by phospholipase C. Catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. *Biochem J.* 1998; 332: 101-109.
135. Ghasem Ghalamfarsa, Mohammad Hossein Kazemi, Sahar Raoofi Mohseni,
136. Ali Masjedi, Mohammad Hojjat-Farsangi, Gholamreza Azizi, Mehdi Yousefi &
137. Farhad Jadidi-Niaragh. CD73 as a potential opportunity for cancer Immunotherapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2019; 23: 127–142.
138. Ibrahim, *et al.* Hormonal-receptor positive breast cancer: IL-6 augments invasion and lymph node metastasis via stimulating cathepsin B expression. *J Adv Res.* 2016; 7:661-70.
139. Hernández-Bedoilla, *et al.* Calcium-sensing-receptor (CaSR) controls IL-6 secretion in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells by a dual mechanism revealed by agonist and inverse-agonist modulators. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 436:159-68.
140. Went, *et al.* Transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene.* 2010; 29:6485-98.

141. Xu, *et al.* Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF- β . *Int J Oncol.* 2012; 41:959-68.
142. American Type Culture Collection. 2017. [10 de Febrero del 2017]. Disponible en: www.atcc.org
143. Antonioli L, Yegutkin G. G., Pacher P, Blandizzi C. & Haskó G. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends in cáncer.* 2016; 2:95-109. 2016.
144. Allard *et al.* Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: multiplex analysis of a phase III clinical trial. *Annals of Oncology* 2017; 29:1056-1062.
145. Gao, *et al.* The roles of CD73 in cancer. *BioMed Research International.* 2014; 20(14): 654-663.
146. Acosta-Maldonado, *et al.* Ectonucleotide Pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and Adenosine Deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. *Clinical Biochemistry.* 2008; 41: 400-406.
147. Walia, *et al.* Serum adenosine deaminase in breast cancer patients. *Indian J.* 1995; 101: 241- 249.
148. Herve, *et al.* New targeted therapies for breast cancer. *World J Clin Cases.* 2014; 2(12): 769-786.
149. Buisseret, *et al.* Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: multiplex analysis of a phase III clinical trial. *Annals of Oncology.* 2018; 29: 1056-1062.
150. Bellingan *et al.* The effect of intravenous interferon beta-1a on lung, CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: An open label study. *Lancet epidemiol.* 2007; 17:491-497,
151. Ben-Neriah y Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B matchmaker. *Nat Immunol.* 2011; 12: 715-723.
152. Miranda P. Expresión y significación clínica de las citoquinas en el cáncer de mama. Tesis de doctorado. Investigación en cirugía y especialidades médico-quirúrgicas. Universidad de Oviedo. 2014.
153. Ma, *et al.* Interferon-alpha promotes immunosuppression through INFR1/STAT1 signalling in head and neck squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2019; 120: 317.330.
154. Thiery J y Sleeman J, Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cells Biol.* 2006; 7:131-142.
155. Barr *et al.* Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to mesenchymal like transitions. *Clinical & Experimental metastasis.* 2008; 25:685-693.

156. Mani, *et al.* The epithelial mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; 133 (4): 704-715.
157. Biere, *et al.* Transforming growth factor- β regulates mammary carcinoma cells survival and interaction with the adjacent microenvironment. *Cancer Res*. 2008; 68 (16):1809-1819.
158. Bholra, *et al.* TGF β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest*. 2013; 123(3):1348-1358.
159. García-Rocha R. *et al.* Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine* 2019; 118:71-79.
160. Lui, *et al.* Tumor necrosis factor alpha regulator and therapeutic agent on breast cancer. *Pham Biotechnol*. 2016; 17:486-494.
161. Katanoiv, *et al.* Regulation of the inflammatory profile of stroma cells in human breast cancer: prominent roles for TNF α and the NF-Kappa β pathway. *Stem Cells Res*. 2015; 6: 87-94.
162. Ben-Baruch S. The tumor promoting flow of cells into within an out of the tumor site. Regulation by the inflammatory axis of TNF alpha and chemokines. *Cancer Microenviron*. 2012; 5:151-169.
163. Mazaki, *et al.* Tumor Necrosis Factor- α produced by osteoclast might induce intractable pain in a rat spinal metastasis model of breast cancer. *Spin Surg Relat Res*. 2019; 3(3):261.266.
164. Suvi, *et al.* Soluble CD73 in critically ill septic patients. Data from the prospective FINNAKI Study. *Plos One*. 2016; 10: 1311 (1-14).
165. Morello S, *et al.* Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *J Transl Med*. 2017; 15:244-257.
166. Molina G. Determinación de la actividad funcional de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 solubles (sCD39 y sCD73) en líneas de cáncer cérvico uterino. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. 2016.
167. Lewis, *et al.* Walker 256 tumor cells increase substance P immunoreactivity locally and modify the properties of the blood-brain barrier during extravasation and brain invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2013; 30:1-12.
168. Cortés, A. *et al.* Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Medicinal Research Reviews*. 2014; 35: 85–125.
169. Zavalov, A *et al.* Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 288:279–90.
170. Roberts, E, Roberts, O. Plasma adenosine deaminase isoform 2 in cancer patients undergoing chemotherapy. *British Journal of Biomedical Science*. 2012; 69:11–3.

171. Eroglu *et al.* Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol.* 2000; 17:319-324.
172. Aghaei, *et al.* Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. *Clinical biochemistry.* 2005; 38: 887-891.
173. Aghaei *et al.* Diagnostic value of Adenosine deaminase activity in benign and malignant breast tumors. *Archives of Medical Research.* 2009; 41:14-18.
174. Mahajan, *et al.* Oxidative stress and Its relationship with adenosine deaminase activity in various stages of breast cancer. *Ind J Clin Biochem.* 2013; 1:51-54.
175. Ratech, *et al.* Comparison and possible homology of isozymes of adenosine deaminase in Aves and humans. *Enzyme.* 1981;26: 74–84.
176. Foulkes, *et al.* Triple negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine.* 2010; 363: 1938-1948.
177. Usoro, *et al.* Calcium inorganic phosphatases activities in breast cancer patients in Calabar Nigeria. *African Health Science.* 2010; 10(1): 7-13.
178. Buffon *et al.* NTPDase and 5'-ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009; 1770(8): 1259-1265.
179. Huang *et al.* Expression of the murine plasma cell nucleotide pyrophosphohydrolase PC-1 is shared by human liver, bone, and cartilage cells. *Journal of Clinical Investigation.* 2004; 94(2): 560-567.
180. Colgan S, *et al.* Physiological roles for ecto-5'- nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2006; 2(2): 351-60.
181. Nielsen, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10:5367-74.
182. Honma, *et al.* The influence of inflammatory cytokines on estrogen production and cell proliferation in human breast cancer cells. *Endocr J.* 2002; 49:371-377.
183. Fini, *et al.* Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto 5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *Biochem J.* 2003; 372: 442-451.
184. Millan, *et al.* Alkaline phosphatases. Structure, substrate, specificity and functional relatedness to other members of a large super family of enzymes. *Purinergic Signaling.* 2006; 2:335-341.