



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

*Efecto de la pentoxifilina en la regulación de CD73
en líneas celulares de cáncer de mama*

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

EMILIO ALEJANDRO GONZÁLEZ PADILLA

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR: DR. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

ASESORA: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

ASESOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

SINODAL: DRA. ROSARIO GARCÍA ROCHA

SINODAL: DRA. CHRISTIAN AZUCENA DON LÓPEZ



Ciudad de México

2025



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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México y particularmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por toda la educación que me brindó y por permitirme formarme como biólogo.

Al Laboratorio Inmunobiología de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM y al Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS por hacer posible la realización de este trabajo.

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

Se agradece a la cDra. Jessica Lakshmi Prieto Chávez del Centro de Instrumentos de Citometría de Flujo del IMSS por su apoyo en la adquisición de muestras.

También se agradece a la Dra. Martha Legorreta Herrera y a la M. en C. Teresita de Jesús Nolasco Pérez del Laboratorio de Inmunología Molecular de la UMIEZ por su apoyo en parte del equipo de laboratorio para llevar a cabo la presente investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás, Irma y Marcos, y a mis hermanas, Mariana y Daniela, por ser la mejor familia que podría haber deseado. Me considero increíblemente afortunado de tenerlos en mi vida. Gracias por su apoyo incondicional y por enseñarme, con su ejemplo, a crecer como persona cada día. También a mis gatitos, Copito y Grisi, que son parte importantísima de mi familia y siempre logran alegrar mi corazón con su ternura y compañía.

A Nati por ser una persona tan valiosa en mi vida, por acompañarme en todo momento y por iluminar mis días con felicidad y amor.

A la Dra. Lulú y al Dr. Alberto, por su confianza y por abrirme las puertas de un grandioso laboratorio que no solo me dio aprendizajes científicos, sino también personales.

Al Dr. Jorge, especialmente por ser mi guía durante todo este trayecto, le agradezco por su paciencia infinita, por todas las enseñanzas y grandes consejos que fueron muy importantes para mi desarrollo.

A la Dra. Azucena y al Dr. Juan por todo su apoyo, por sus palabras de ánimo y buenos consejos que aprecio mucho.

A la Dra. Rosario, por todo su tiempo apoyándome con la mejor disposición con ensayos, dudas y sugerencias que fueron de mucha ayuda.

A la cDra. Gaby por todas sus enseñanzas y ayudas desde que entré al labo, y por una gran amistad.

A Adrián, Vane, Luis, Ulises, Diana y David por su bonita amistad y a todas las personas que integran el equipo de laboratorio por hacer de mi estancia un lugar increíble.

A Pato, Isaac, Rayman, Cass y Chuy, gracias por hacer de la carrera una etapa inolvidable llena de momentos bonitos; y a Amaury y Christian por ser unos grandes amigos desde la prepa, valoro mucho su amistad.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Cáncer.....	2
2.2. Cáncer de mama.....	3
2.3. Transición epitelial mesenquimal.....	7
2.4. Vía adenosinérgica y CD73.....	9
2.5. Pentoxifilina.....	14
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	18
6. METODOLOGÍA.....	19
6.1. Cultivo celular.....	19
6.2. Ensayo de proliferación.....	19
6.3. Expresión de ARNm para CD73 y genes de EMT.....	20
6.4. Detección de CD73 mediante citometría.....	22
6.5. Cuantificación de TGF- β 1 mediante ELISA.....	22
6.6. Análisis estadístico.....	23
7. RESULTADOS.....	23
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
9. CONCLUSIONES.....	39
10. PERSPECTIVAS.....	39
11. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. RESUMEN

En México y en el mundo, el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente y con mayor tasa de mortalidad en las mujeres; comúnmente es clasificado en diferentes subtipos, donde el triple negativo (CMTN) representa el peor pronóstico ya que exhibe una pobre respuesta a los tratamientos tradicionales. En este contexto, la proteína CD73 ha sido descrita en tumores triple negativos como un blanco terapéutico potencial, ya que generalmente se sobreexpresa en el microambiente tumoral, promoviendo la evasión inmunitaria y procesos como la metástasis, mediante la activación de genes implicados en la transición epitelial-mesenquimal. Por otro lado, se ha demostrado que la pentoxifilina (PTX) posee probables efectos antitumorales en cáncer de mama, mientras que en glioblastoma reduce la viabilidad y la invasividad celular al disminuir los niveles de CD73. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto de PTX en la regulación de CD73 en líneas celulares de cáncer de mama humano triple negativo (HCC-1806, MDA-MB-231 y HCC-70) y luminal A (MCF-7). Se encontró que 1 mM de PTX redujo la proliferación de las líneas celulares de manera significativa; no obstante, después de 72 horas de tratamiento con PTX, se observó un aumento de CD73 tanto a nivel de proteína, como de ARNm, en las líneas celulares HCC-1806 y MDA-MB-231. Además, se observó un aumento en los factores de transcripción asociados con la transición epitelial-mesenquimal como Slug y Zeb1, y un incremento en TGF- β 1, lo que sugiere que existe asociación entre la expresión de CD73 y el desarrollo de un fenotipo mesenquimal. Los hallazgos indican que los efectos de PTX pueden depender del contexto celular y las condiciones específicas de tratamiento, por lo que, es necesario dilucidar su mecanismo de acción para explorar su uso en el tratamiento del cáncer de mama debido a su limitada respuesta en relación con las moléculas que participan en la progresión tumoral.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una diferenciación celular no regulada, lo que conlleva a consecuencias clínicas significativas debido a su potencial de proliferar e invadir múltiples sitios del cuerpo (Campos-Contreras *et al.*, 2020; Blanco *et al.*, 2018).

Uno de los desafíos que representa la biología del cáncer es su alta diversidad; sin embargo, Hanahan y Weinberg en diversas publicaciones a lo largo de los años (2000; 2011; 2022), han proporcionado una estructura conceptual para abordar esta complejidad al identificar una serie de características distintivas conocidas como "hallmarks", las cuales son: inmortalidad replicativa, inestabilidad del genoma y mutaciones, evasión de las señales de supresión del crecimiento, resistencia a la muerte celular, proliferación continua, metabolismo alterado, evasión de la destrucción inmune, inflamación promovida por el tumor, inducción de la angiogénesis, y activación de la invasión y metástasis; además en la última revisión propusieron cuatro nuevas características: desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, participación de microbiomas polimórficos y senescencia celular (Figura 1).

Estos hallmarks en conjunto actúan complementariamente y representan características evolutivas que favorecen la transformación de células normales en células malignas, promoviendo el desarrollo del tumor al mismo tiempo que explotan o sacrifican el tejido huésped (Fouad y Aanei, 2017).



Figura 1. Características distintivas del cáncer. Representación de las principales capacidades adquiridas por las células tumorales durante su desarrollo (Hanahan & Weinberg, 2022).

2.2. Cáncer de mama

Se denomina cáncer de mama al crecimiento descontrolado de células epiteliales que se originan en los conductos o lóbulos mamarios (Reilly, 2007). Esta enfermedad representa un reto significativo para la salud pública de las mujeres debido a su alta incidencia y elevada tasa de mortalidad, según estimaciones de Globocan (2024), a nivel mundial cada año se diagnostican aproximadamente 2.3 millones de nuevos casos de cáncer de mama y ocurren cerca de 665,000 muertes relacionadas con esta patología, además se prevé que durante las próximas décadas estas cifras aumentarán significativamente en muchas regiones del mundo (Bray *et al.*, 2024; Arnold *et al.*, 2022).

En México, ocupa el primer lugar de todas las neoplasias malignas detectadas en el sexo femenino (27.9%), de acuerdo con datos del INEGI (2023), la tasa de

incidencia en el año 2022 fue de 51.92 casos por cada 100 mil mujeres y se reportaron aproximadamente 8,000 defunciones, por lo que esta patología sigue afectando directamente la calidad de vida de miles de personas (Ferlay *et al.*, 2024; Ramos Águila *et al.*, 2015).

Los principales factores de riesgo asociados con el desencadenamiento de cáncer de mama son: edad avanzada, predisposición genética, factores reproductivos asociados a exposición a hormonas ováricas (tanto endógenas como exógenas), como una menarquía temprana o menopausia tardía. Mientras que factores ambientales como la dieta, el consumo de alcohol y la exposición a radiación juegan un papel menor, pero en conjunto son determinantes para el desarrollo de esta enfermedad; por lo tanto, la carcinogénesis ocurre debido a una compleja interacción de dichos factores (Henry *et al.*, 2020; Smolarz *et al.*, 2022; Admoun y Mayrovitz, 2022).

El diagnóstico adecuado del cáncer de mama requiere un enfoque multidisciplinario, ya que es una patología ampliamente heterogénea en términos de mecanismos moleculares y manifestaciones clínicas (Tao *et al.*, 2015), por lo que se clasifica de acuerdo a distintas categorías con el objetivo de determinar un plan de tratamiento óptimo para los pacientes, basado en la comprensión de las características biológicas del tumor y cómo estas influyen en su respuesta a diferentes opciones terapéuticas (Szymiczek *et al.*, 2021).

La clasificación histopatológica se basa en la estructura del tejido mamario, el cual se encarga de permitir la producción, transporte y secreción de leche durante la lactancia materna, y se compone principalmente de una serie de conductos ramificados que se extienden desde el pezón hasta las unidades lobulillares del conducto terminal o TDLU (por sus siglas en inglés, terminal duct lobular units), las cuales conforman los lóbulos. El sistema ductal y las TDLU están recubiertos por dos capas celulares: una capa interna luminal formada por células epiteliales y una capa externa mioepitelial, que está en contacto con la membrana basal (Figura 2A) (Sgroi, 2010).

En el cáncer de mama las lesiones epiteliales preinvasivas de la mama, ya sea carcinoma ductal *in situ* (CDIS) o carcinoma lobular *in situ* (CLIS), se caracterizan por una proliferación anormal de células epiteliales neoplásicas que permanece confinada dentro de la red ductal-lobulillar, sin invadir la membrana basal ni el tejido estromal circundante. Estas lesiones representan una etapa temprana en la progresión del cáncer de mama y, aunque no son invasivas, requieren atención debido a su potencial de malignización (Nolan *et al.*, 2023).

El cáncer de mama invasivo se caracteriza por la propagación de células neoplásicas más allá de la membrana basal que pueden variar morfológicamente, con el potencial de migrar hacia otros órganos, lo que les confiere una alta agresividad. El carcinoma ductal invasivo (CDI) es el tipo más común de cáncer de mama entre todos los casos, mientras que el carcinoma lobular invasivo (CLI) representa aproximadamente del diez al quince por ciento de todos los casos; el resto son subtipos histológicos menos comunes (0.1-7%), como los carcinomas mucinosos, cribiformes, micropapilares, papilares, tubulares, medulares y apocrinos (Figura 2C) (Cuthrell y Tzenios, 2023; Tsang y Gary, 2020).

Por otro lado, en la práctica clínica, se clasifica en cuatro subtipos diferentes basados en la expresión génica de los receptores de estrógeno (RE), los receptores de progesterona (RP), y el oncogén Her2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano): Luminal A, luminal B, HER2 sobreexpresado y triple negativo (Figura 2D) (Luque *et al.*, 2021).

Los subtipos luminales son positivos a receptores de estrógeno y positivos progesterona en diferente grado. El luminal A, constituye el 50-60% de los luminales; es el que tiene un mejor pronóstico, y menor incidencia de recaídas, debido a que presenta principalmente una buena respuesta a la hormonoterapia. Mientras que el subtipo Luminal B, expresa en menor cantidad receptores de progesterona y tiene un mayor nivel de proliferación (Lucena *et al.*, 2021).

El subtipo de HER2 sobreexpresado, representa alrededor del 15% de todos los cánceres invasivos de mama. Estos tumores presentan genes asociados a HER2/neu y genes ubicados en el amplicón de HER2 en el cromosoma 17q12 (Tsang y Tse, 2020). Suelen ser de grado alto, sin receptores de estrógeno ni progesterona, y tienen un curso clínico agresivo. Sin embargo, responden bien a la terapia específica contra HER2, lo que mejora significativamente los resultados (Lucena *et al.*, 2021).

Por último, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por no expresar significativamente ninguno de los tres receptores implicados en esta clasificación. Constituyen el 10-15% de los tumores mamarios y generalmente, presentan una alta tasa de proliferación, alteración en genes de reparación del ADN, así como una elevada inestabilidad genómica (Luque *et al.*, 2021). Por estas razones, no responden a terapias hormonales y representan un peor pronóstico en comparación con los otros subtipos de cáncer de mama (Won y Spruck, 2020).

Así mismo, en 2011, Lehmann y colaboradores, describieron seis subtipos dentro del CMTN: Basal-like 1 y 2 (bl1 y bl2), inmunomodulador, mesenquimático, mesenquimático stem-like y luminal receptor androgénico. Los cuales difieren en términos de su comportamiento clínico, respuesta a la quimioterapia y supervivencia; por lo que, es necesario identificar estas características específicas para permitir desarrollar tratamientos dirigidos a estas neoplasias (Gon *et al.*, 2017).

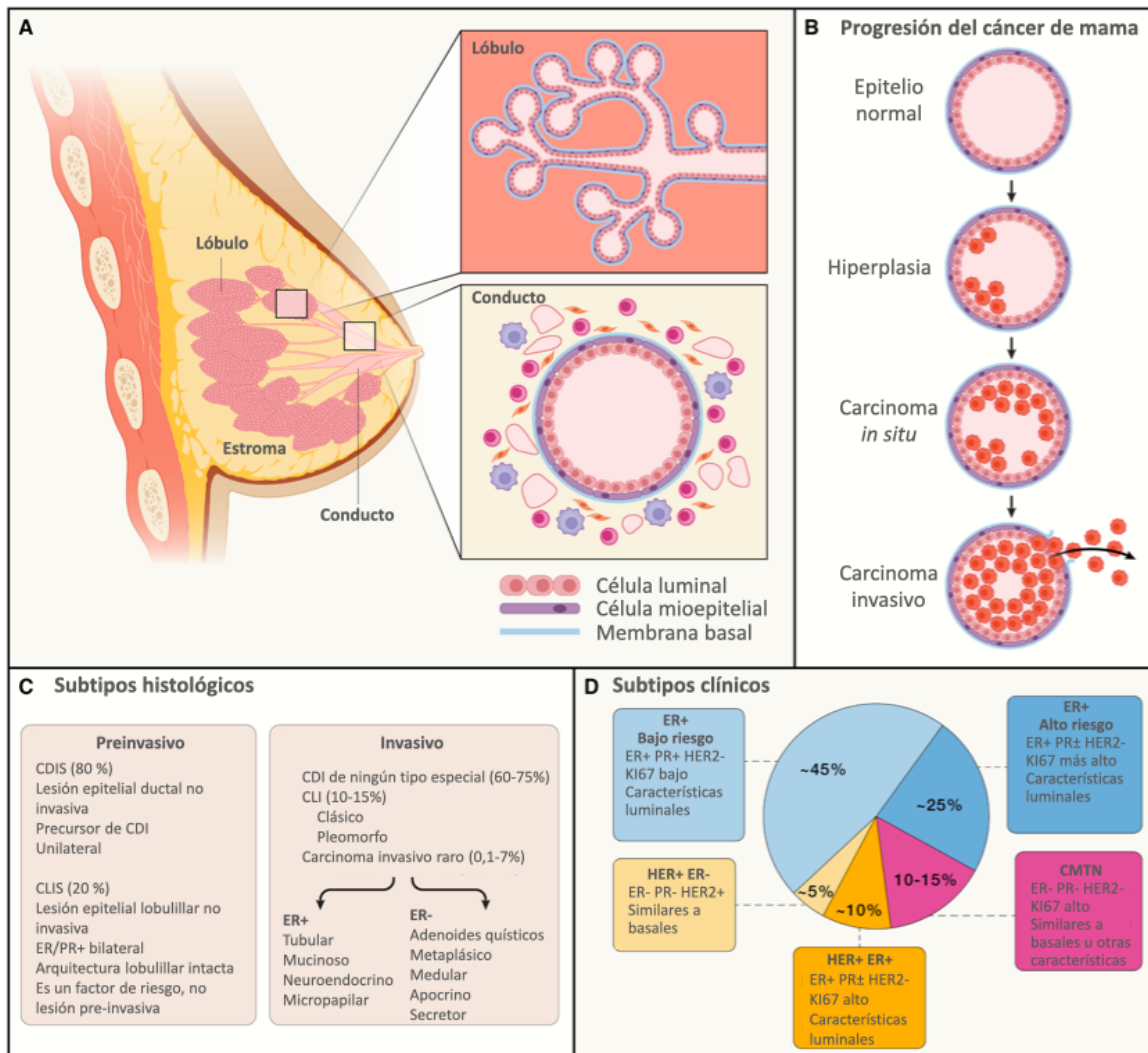


Figura 2. Estructura del tejido mamario y clasificación del cáncer de mama. A) Representación esquemática de los componentes de la mama. B) Patogénesis del cáncer de mama. C) Subtipos histológicos y (D) clasificación clínica (Nolan *et al.*, 2023).

2.3. Transición epitelial mesenquimal

Como se mencionó, una de las características distintivas del cáncer es el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, es decir, la capacidad de las células para modificar sus características en función de los entornos en constante cambio que experimentan, con el fin de adaptarse al microambiente tumoral (Teeuwssen y Fodde, 2019).

Un tipo de plasticidad, es la transición epitelial-mesenquimal conocida como EMT (por sus siglas en inglés, epithelial-mesenchymal transition), la cuál es importante para el desarrollo del tumor mamario (Sterneck *et al*, 2020). Este proceso es un programa celular reversible donde ocurre una transición celular dinámica de un estado epitelial adherente a un estado mesenquimal móvil (Brabletz *et al*, 2012), por lo que ocurren modificaciones en la polaridad célula-célula, en la remodelación del citoesqueleto, y consecuentemente múltiples rasgos asociados a la neoplasia maligna de alto grado, como la mejora en la capacidad migratoria e invasiva del tumor, mediante su diseminación en órganos secundarios (Bhatia *et al*, 2020).

La inestabilidad fenotípica que experimenta el tumor debido a este proceso tiene influencia en su heterogeneidad, lo que conlleva cambios en las redes de señalización oncogénica, por lo que desde una perspectiva molecular, los principales marcadores asociados con el fenotipo epitelial, como la E-cadherina, las ocludinas y las citoqueratinas, disminuyen su expresión, mientras que los marcadores mesenquimales, como la N-cadherina, la fibronectina y la vimentina, son inducidos o incrementados. Esta regulación coordinada de la represión de genes epiteliales y la inducción de genes mesenquimales es mediada por diversos factores de transcripción, entre los cuales se incluyen Snail, Slug, Zeb1, Zeb2 y Twist1 (Figura 3) (Iser *et al*, 2022; Puisieux *et al*, 2014).

La expresión de estos factores de transcripción puede darse simultáneamente y formar redes, sin embargo, sus funciones suelen ser distintas. Se activan a través de cascadas de señalización y promueven el cambio de programas transcripcionales, de manera que su expresión se correlaciona con malos resultados clínicos en los distintos tipos de cáncer (Georgakopoulos *et al*, 2020).

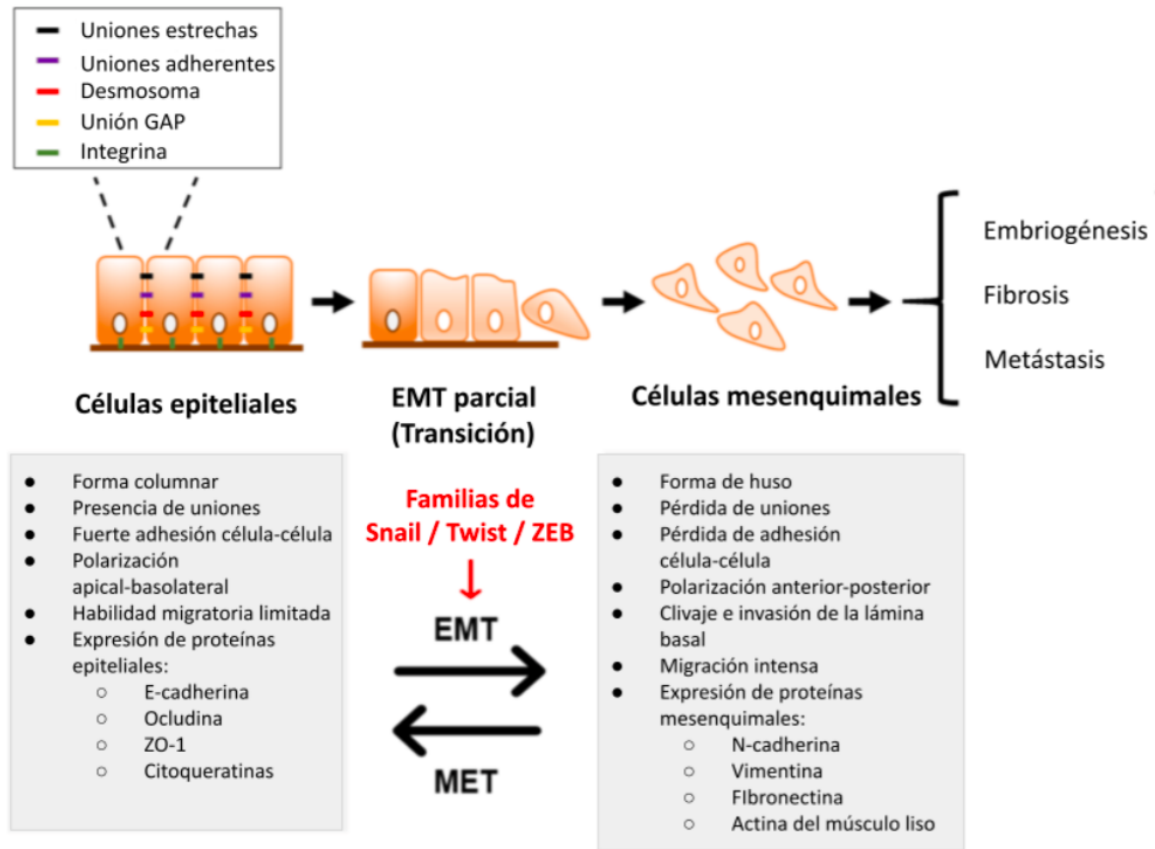


Figura 3. Características de la EMT. Las células epiteliales están unidas a la membrana basal y conectadas entre sí. La EMT, implica que las células epiteliales pierdan marcadores específicos y adquieran características mesenquimales, aumentando su motilidad e invasividad. Este proceso, que es reversible a través de la MET (por sus siglas en inglés, mesenchymal-epithelial transition), está regulado por factores de transcripción como Snail, Twist y Zeb (Kang *et al.*, 2021).

2.4. Vía adenosinérgica y CD73

En el microambiente tumoral, muchas vías de señalización son altamente activas y participan en el desarrollo del cáncer. En este contexto, se ha demostrado ampliamente que la denominada vía adenosinérgica tiene un papel funcional en la progresión del tumor sólido, al atenuar las respuestas inmunes antitumorales y promover el escape inmunológico de las células tumorales (Soleimani *et al.*, 2019).

En condiciones fisiológicas normales, los puntos de control inmunitarios juegan un papel fundamental al proteger los tejidos contra el daño durante el proceso inflamatorio del sistema inmune, el cual es desencadenado para combatir infecciones patógenas (Xia *et al.*, 2023). La presencia de ATP extracelular (eATP) en el microambiente tumoral funciona como una señal de alerta para las células inmunitarias, ya que este nucleótido se libera a través de mecanismos como lisis celular y/o muerte, o por vías activas que involucran canales de connexina y panexina; consecuentemente promueve una respuesta inmune antitumoral mediante la señalización de los receptores P2X y P2Y, la activación del inflamasoma de la proteína 3 (NLRP3), con la que se desencadena una respuesta inflamatoria (Antonioli *et al.*, 2008).

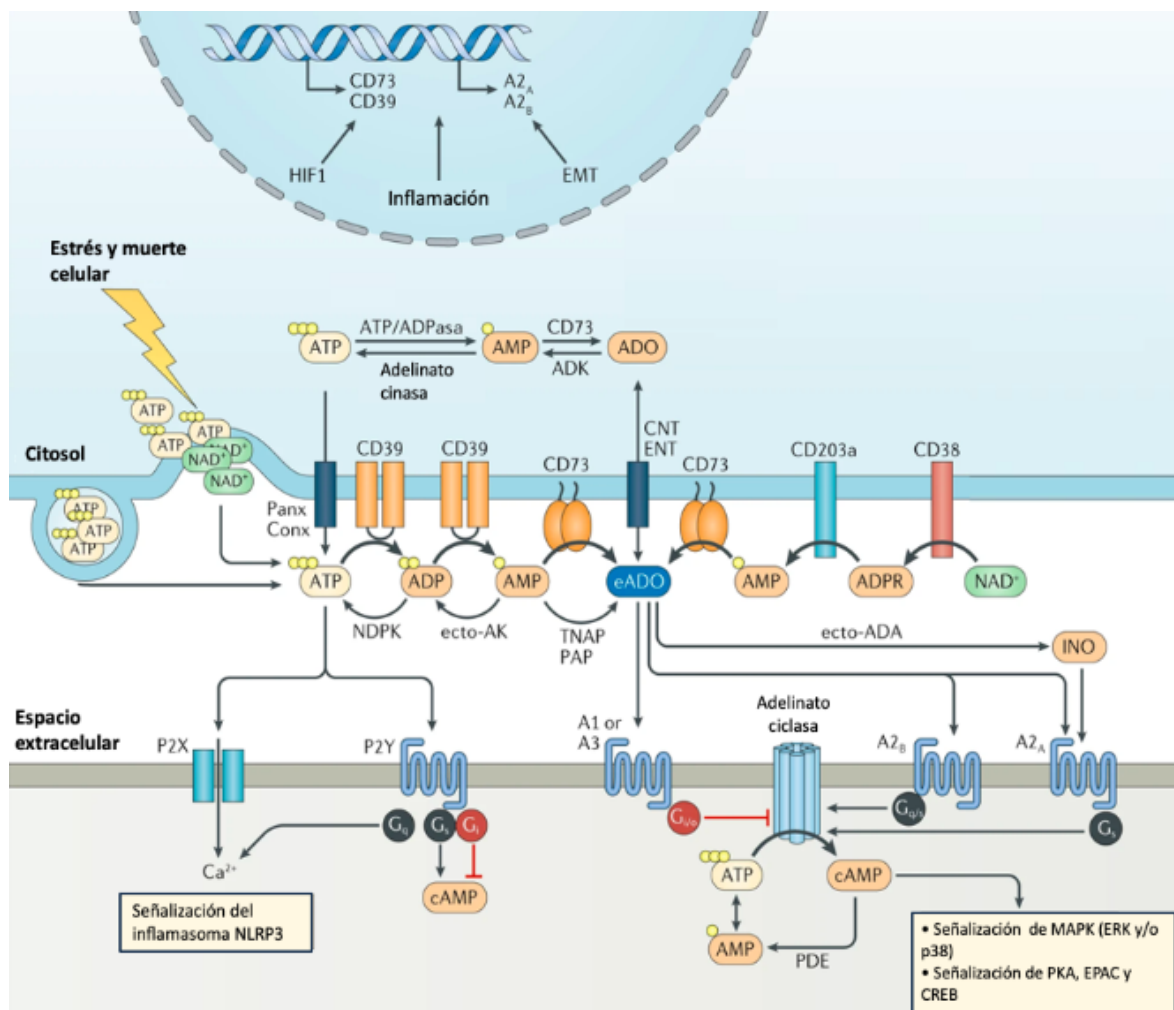
Sin embargo, para convertir este entorno inmunoestimulante e inflamatorio a un entorno inmunosupresor y antiinflamatorio, las ectoenzimas de la vía adenosinérgica participan en este cambio (Figura 4). En la vía canónica, CD39, comúnmente sobreexpresada en varios tipos de cáncer, es capaz de degradar el ATP hasta AMP, el cual, CD73 defosforila para generar adenosina (ADO) de manera irreversible, promoviendo así el agotamiento de ATP y la acumulación de ADO. Por otro lado, la vía conocida como no canónica implica la interacción de NAD⁺ como sustrato de CD38 para generar ADP-ribosa (ADPR), que luego se procesa en AMP por el miembro 1 de la familia de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP1; también conocido como CD203a) y de igual manera, CD73 se encarga de la producción de ADO; por lo tanto, CD73 representa el punto donde convergen ambas vías (Allard *et al.*, 2020; Azambuja *et al.*, 2019).

Una vez generada, la ADO puede tomar distintas vías:

- Unirse y estimular a cuatro diferentes receptores de adenosina acoplados a proteínas G, llamados A1, A2A, A2B y A3, los cuales difieren en su afinidad por la adenosina y en las vías de señalización asociadas. Los receptores

A1 y A3 inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (AC) y estimulan la activación de la fosfolipasa C (PLC). Por otro lado, tanto los receptores A2A como A2B promueven la actividad de la AC, lo que inicia la señalización dependiente de cAMP. Sin embargo, el receptor A2B, que tiene una menor afinidad por la adenosina, también puede activar la PLC. Se ha reportado que todos los receptores de adenosina desencadenan las vías MAPK y, en algunos tipos de células, el fosfatidilinositol 3-quinasa; en consecuencia, esta familia de receptores puede conferir a las células diversas características protumorales (Gessi *et al.*, 2011; Allard *et al.*, 2014).

- Metabolizarse a inosina (INO) e hipoxantina (HYP) a través de reacciones secuenciales de las enzimas adenosina deaminasa (ADA) y purina nucleósido fosforilasa (PNP) (Boison y Yegutkin, 2019).
- Transportarse al interior de la célula a través de transportadores de nucleósidos equilibrados (ENT) o concentrados (CNT). Una vez en el citosol, la ADO puede ser catabolizada a INO por ADA citosólica, convertida reversible en S-adenosil-homocisteína (SAH) por S-adenosil-homocisteína hidrolasa (SAHH) o fosforilada de nuevo a AMP por adenosina quinasa (ADK). El ATP intracelular se puede generar después a partir de AMP y ADP mediante adenilato quinasas. El AMP cíclico intracelular (AMPc) y el AMP también se pueden generar a partir del ATP a través de la actividad del adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa (PDE), respectivamente (Allard *et al.*, 2020).



Por todo esto, la ecto-5'-nucleotidasa, también conocida como CD73, es una importante glicoproteína en la vía adenosinérgica, la cual está anclada por medio del glicosilfosfatidilinositol (GPI) y es codificada por el gen *NT5E* (Roh *et al.*, 2020). La forma madura de esta enzima consta de 523 aminoácidos y sus formas funcionales están presentes en forma de homodímeros con interacciones no covalentes (Figura 5) (Soleimani *et al.*, 2019).

El nivel de expresión de CD73 es más alto en la mayoría de los tumores sólidos humanos y debido a que el estrógeno suprime dicha proteína en cáncer de mama, las pacientes con el subtipo triple negativo, comúnmente sobreexpresan CD73.

Además, su presencia está estrechamente asociada a la condición de hipoxia (a través de la activación de HIF-1 α) y a la sobreexpresión de factores EGF, TGF- β 1, IL-6, entre otros (Baghbani *et al.*, 2021).

También, es importante destacar que las terapias antitumorales como la quimioterapia o la radioterapia inducen daño tisular y muerte celular, por lo que la correspondiente liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP), como el ATP, pueden contribuir potencialmente al desarrollo del cáncer mediante la acción de la vía adenosinérgica, siendo este equilibrio decisivo para el resultado de un tratamiento clínico dado (Campos-Contreras *et al.*, 2020).

Diversos estudios han observado que existe un potencial vínculo entre los componentes de la vía adenosinérgica y el fenotipo similar a la EMT en diferentes tumores, ya que se ha observado que la expresión tanto de CD73 como de CD39, se altera durante procesos metastásicos (Hasmim *et al.*, 2022; Antonioli *et al.*, 2013).

En este contexto, Zhi y colaboradores (2007) reportaron que el silenciamiento de CD73 en células tumorales de cáncer de mama MB-MDA-231, conduce a una reducción significativa del crecimiento, de la adhesión a la matriz extracelular y la inhibición de la invasión y la migración celular.

Además, Iser y colaboradores (2022), realizaron un estudio para determinar esta correlación en 21 tipos de cáncer, y encontraron que esta asociación es altamente significativa en adenocarcinoma de próstata, el carcinoma de mama, el adenocarcinoma de ovario y el carcinoma urotelial de la vejiga. Por lo tanto, CD73 se ha convertido recientemente en un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer.

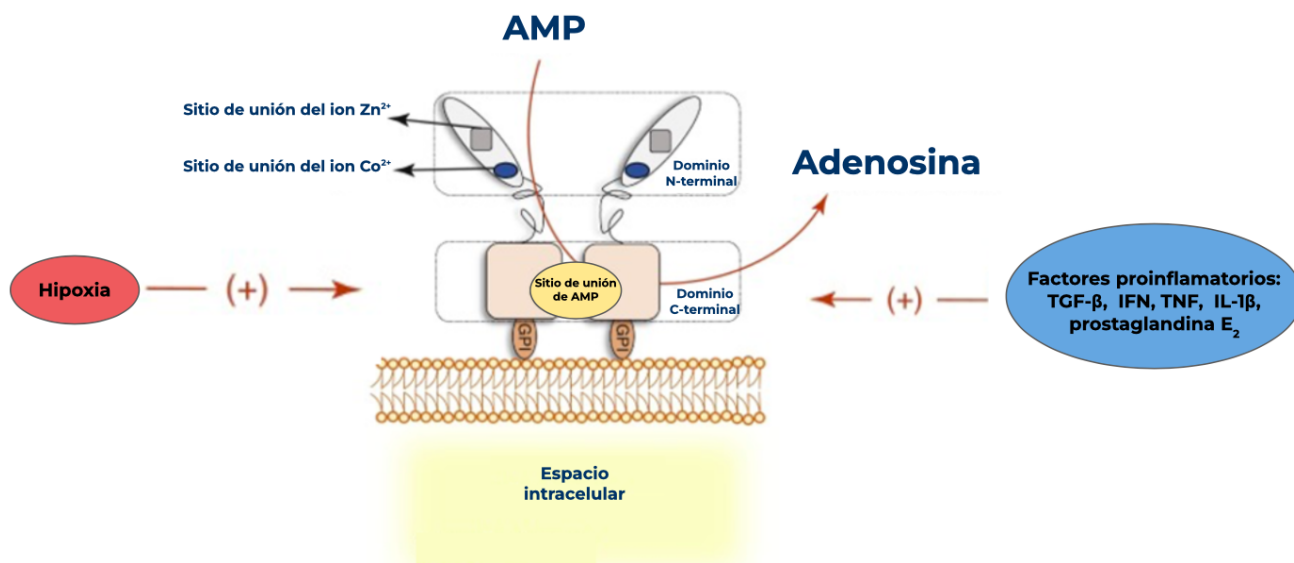


Figura 5. Estructura y regulación de CD73. CD73 está compuesto por dos subunidades unidas por enlaces no covalentes y ancladas a la membrana plasmática mediante un residuo de serina C-terminal que se conecta a glicosilfosfatidil inositol (GPI). En su forma madura, el dominio C-terminal proporciona un sitio de unión para AMP, mientras que el péptido señal del dominio N-terminal coordina la unión con dos iones metálicos divalentes catalíticos (Zn^{2+} y Co^{2+}). Abreviaturas: AMP, adenosina monofosfato; IFN, interferones; IL-1 β , interleucina-1 β ; TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; TNF, factor de necrosis tumoral (Antonioli *et al.*, 2017).

2.5. Pentoxifilina

En general, el desarrollo de nuevos fármacos representa un proceso muy largo y costoso; por lo tanto, una de las estrategias actuales consiste en utilizar un medicamento existente que ya ha sido aprobado y aplicarlo para tratar una nueva enfermedad, lo que conlleva una reducción significativa en los costos y el tiempo de investigación, permitiendo así encontrar nuevas terapias para enfermedades como el cáncer (Masuda *et al.*, 2020).

La pentoxifilina (PTX) es un derivado sintético de la metilxantina, utilizado principalmente en la práctica clínica para tratar enfermedades arteriales inflamatorias. Entre estas afecciones se incluye la claudicación intermitente tanto en las extremidades superiores como inferiores, así como enfermedades

vasculares periféricas, debido a que la actividad de este medicamento se centra en la reducción de la viscosidad sanguínea, lo que conlleva una mejora en el flujo de sangre y la oxigenación de los tejidos, mostrando durante más de 40 años un buen perfil de seguridad, además de que está asociado con un bajo costo (Castellanos-Esparza *et al.*, 2018).

Entre las múltiples aplicaciones que tiene PTX, diversos estudios han reportado que este fármaco es efectivo contra distintos tipos de cáncer; si bien no está del todo claro cuál es su mecanismo de acción preciso, se le ha atribuido a su capacidad de inhibir fosfodiesteras no específicas (Nidhyanandan *et al.*, 2015), ya que esta acción permite aumentar los niveles de AMPc, y consecuentemente conducir al bloqueo del ciclo celular en cáncer de mama (Goel *et al.*, 2015).

En líneas celulares de melanoma, se ha reportado que PTX es capaz de reducir su capacidad metastásica, posiblemente mediante la modulación de la expresión de integrinas y metaloproteinasas y la inhibición de la vía de señalización STAT3 (Dua y Gude, 2008; Kamran y Gude, 2012). Por otro lado, en cáncer cérvico uterino, han propuesto que el efecto antitumoral de PTX puede estar relacionado con la reducción de los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α y TGF- β 1, la inhibición de la actividad NF- κ B y Smad2/3/4, y la disminución de la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y la fibronectina en la línea celular Caski (Palafox-Mariscal *et al.*, 2023), mientras que en la línea celular SIHA, se ha reportado que PTX induce la sensibilización de las células resistentes al cisplatino mediante la activación de la actividad de la caspasa-9 y -3, reduciendo la fosforilación NF- κ B/p65 y aumentando la escisión de PARP-1. (Bravo-Cuellar *et al.*, 2020).

En cáncer de mama, también ha demostrado inhibir la migración y adhesión de células cancerosas mediante la regulación de vías de señalización como FAK y Rho GTPasa, así como la modulación del ciclo celular. Además, se han observado efectos sinérgicos cuando se combina con otros agentes anticancerígenos como

la simvastatina y la doxorrubicina (Castellanos-Esparza *et al.*, 2018; Goel y Gude, 2014).

Debido a que la estructura molecular de la PTX presenta similitudes con el AMP, el sustrato natural de CD73, en nuestro grupo de investigación se realizó un estudio *in silico* de acoplamiento molecular, donde se encontró que PTX presenta interacciones clave con el sitio activo de CD73, por lo que se determinó que este fármaco puede unirse a esta proteína e inhibir su capacidad enzimática (Marcial, 2023). Además, Tsiampali y colaboradores, en 2020, encontraron que CD73 regula y promueve la invasión de gliomas a través de la reprogramación de la EMT y esta actividad tumoral fue inhibida con el tratamiento de PTX mediante la reducción de CD73 y Zeb1.

Sin embargo, Lazarczyk y colaboradores en 2004 examinaron el efecto de PTX en el desarrollo de tumores metastásicos derivados de adenocarcinoma de colon y melanoma en los pulmones de ratones y encontraron que tiene una influencia diferencial en la metástasis según el tipo de tumor; por lo que su eficacia puede variar según el tipo de cáncer y la línea celular específica, ya que de igual manera se ha encontrado que en ensayos *in vivo* de adenocarcinoma de colon murino presenta un efecto opuesto e incluso una inhibición de la respuesta inmunológica al cáncer.

Es por ello que PTX muestra un potencial prometedor como agente terapéutico contra el cáncer, sin embargo, aún se requieren investigaciones más detalladas para comprender completamente su mecanismo de acción y su eficacia en diferentes tipos de cáncer y líneas celulares.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el cáncer de mama es un gran desafío para la salud pública debido a los múltiples factores que engloban esta enfermedad. En primer lugar, se caracteriza por una compleja heterogeneidad molecular, que contribuye al desarrollo de quimiorresistencia, lo que disminuye la efectividad de los tratamientos convencionales, favorece la recurrencia tumoral y, en consecuencia, se asocia con un peor pronóstico para los pacientes (Turashvili y Brogi, 2017). Además, a pesar de la disponibilidad de terapias estándar, estas presentan grandes limitaciones, como efectos secundarios severos, elevado costo de tratamientos y particularmente en el caso del subtipo triple negativo, limitadas opciones de tratamientos dirigidos. Estos problemas resaltan la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas más accesibles, eficaces y seguras (Goel y Gude, 2013; Bianchini *et al.*, 2017).

Dentro de las múltiples vías moleculares implicadas en el desarrollo del cáncer de mama, la vía adenosinérgica ha emergido como un mecanismo que promueve la progresión tumoral, en donde CD73, es clave entre otras cosas para la generación de ADO, por lo que ha sido identificada como un marcador relevante en varios tipos de cáncer, incluido el de mama (Huang *et al.*, 2019; Soleimani *et al.*, 2019).

Por todo esto, una estrategia prometedora es el reposicionamiento de medicamentos, ya que permite la identificación de nuevas aplicaciones para medicamentos existentes y clínicamente aprobados (Xia *et al.*, 2024). Este enfoque, reduce significativamente el tiempo y los costos del desarrollo tradicional de un fármaco, gracias al conocimiento existente sobre su seguridad, farmacología y mecanismos de acción, aumentando significativamente las probabilidades de éxito para su implementación clínica (Aggarwal *et al.*, 2021). En este contexto, PTX, un fármaco utilizado principalmente para tratar trastornos vasculares, ha mostrado potencial antitumoral en diversos tipos de cáncer, incluyendo el glioblastoma, donde su acción ha sido vinculada a la reducción de CD73 (Tsiampali *et al.*, 2020). Por ende, su potencial para modular esta vía y

contrarrestar la actividad tumorigénica del cáncer de mama podría ofrecer una alternativa terapéutica eficaz, segura y accesible, especialmente en subtipos agresivos y resistentes a las terapias actuales.

4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que PTX tiene efectos antiproliferativos y antimetastásicos en diversos tipos de cáncer; en glioblastoma, estos efectos están asociados a la reducción en la expresión de CD73. Por lo tanto, se espera que el tratamiento con PTX en líneas celulares humanas de cáncer de mama presente un efecto antiproliferativo y disminuya la expresión de CD73.

5. OBJETIVOS

General:

- Analizar el efecto de PTX sobre la proliferación celular, expresión de CD73 y moléculas asociadas a la EMT en cuatro líneas celulares de cáncer de mama (HCC-1806, HCC-70, MDA-MB-231 y MCF-7).

Específicos:

- Evaluar el efecto del tratamiento con PTX sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.
- Evaluar el efecto del tratamiento de PTX sobre la expresión del ARNm y proteína de CD73 en las células de cáncer de mama.
- Evaluar el efecto del tratamiento con PTX sobre la expresión del ARNm de genes de la EMT en células de cáncer de mama.

- Evaluar el efecto del tratamiento con PTX en la expresión de TGF- β 1 en las células de cáncer de mama.

6. METODOLOGÍA

6.1. Cultivo celular

Se utilizaron cuatro líneas de células tumorales humanas: HCC-1806 (carcinoma escamoso, TN), MDA-MB-231 (adenocarcinoma, TN), HCC-70 (carcinoma ductal, TN) y MCF-7 (carcinoma ductal infiltrante, LA). Estas células se mantuvieron en cultivo con medio completo, el cual estuvo compuesto por: RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Biowest, USA) al 10%, 100 IU/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina (Gibco BRL Life Technologies, USA), y se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad en una incubadora Forma Scientific a 37°C con 5% de CO₂, en un ambiente de humedad saturante.

6.2. Ensayo de proliferación

Se cultivaron por triplicado 5 x 10⁴ células de cada línea celular (HCC-1806, MDA-MB-231, HCC-70, MCF-7) en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Costar, USA), en volúmenes finales de 100 μ L durante 72 h (tiempo en el cual se observó una reducción visible de la proliferación celular). Posteriormente, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se agregaron 50 μ L de cristal violeta (Sigma-Aldrich, USA), se dejaron incubando durante 20 minutos y se realizaron 3 lavados con agua milli-Q®. Para su lectura, se añadieron 100 μ L de ácido acético (JT BAKER, México) al 10% y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en el lector de placas (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA).

6.3. Expresión de ARNm para CD73 y genes de EMT

Para analizar el efecto de PTX sobre la expresión de ARNm de CD73 y genes asociados a la EMT, se empleó la técnica de RT-PCR como paso inicial. Se cultivaron 2×10^5 células con una concentración de 1 mM de PTX durante 72 h, transcurrido el tiempo se despegaron las células con 1 mL de TRIzol (Invotrogen, Carlsbad, CA, USA) y se mezcló con 200 μ L de cloroformo para obtener el ARN a partir de la fase acuosa, posteriormente dicha fase se mezcló con 1 mL de isopropanol para aislarlo y se lavó con 1 mL de etanol 75%; una vez obtenido el ARN, se empleó un biofotómetro (Eppendorf, USA) para cuantificarlo de acuerdo a las instrucciones del manual de usuario de Thermo Fisher (2016).

Para llevar a cabo la retrotranscripción (RT) y obtener el ADNc, se utilizó el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, California, USA), mezclado con 2 μ L de ARN (calculado previamente) para un volumen final de 20 μ L. Posteriormente, la amplificación de los productos de ADNc se realizó mediante PCR de punto final para CD73 en todas las líneas celulares y mediante qPCR para los genes asociados a la EMT en HCC-1806 y MDA-MB-231.

Para la PCR de punto final, cada muestra se mezcló con los primers correspondientes para CD73 y β -actina (Tabla 1), y se les añadió el kit Master Mix (Promega, USA) para un volumen total de 25 μ L; finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 2.5% y se observaron los resultados con ayuda de una lámpara de luz UV.

En el caso de la qPCR, se utilizó como control endógeno H6PD (Tabla 1), las muestras se mezclaron con el kit Master Mix SYBR Green/Rox (Thermo

Fisher Scientific, Lituania) y se amplificaron en el termociclador en tiempo real (Applied Biosystems, 7500) a 30 ciclos. Las condiciones de temperatura programadas fueron previamente estandarizadas para garantizar la amplificación simultánea de todos los primers:

Inicio:	95 °C 10:00	} 30 ciclos
Desnaturalización:	94 °C 00:45	
Alineación:	57 °C 00:45	
Elongación:	72 °C 00:50	
Final:	75 °C 05:00	

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación de genes

Marcador	Primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño de amplicón (pb)
β-actina	Left	GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	238
	Right	GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	
H6PD	Left	GCT ACG CTC GGA TCT TGT TC	60
	Right	CCC AGT GCT TTT CGC TCT	
CD73	Left	CCA GTC CAC TGG AGA GTT CC	111
	Right	CGA CAC TTG GCG CAA AGA AC	
Snail	Left	GCT GCA GGA CTC TAA TCC AGA	84
	Right	ATC TCC GGA GGT GGG ATG	
Slug	Left	GTA GGT GCC AGG GTG GAA AT	500
	Right	CTG TGG TCC TTG GAG GAG GT	
Zeb1	Left	TTC ACA GTG GAG AGA AGC CA	182
	Right	GCC TGG TGA TGC TGA AAG AG	

6.4. Detección de CD73 mediante citometría

Para analizar la expresión de CD73, se cultivaron 2×10^5 células en presencia de PTX (Sigma Aldrich, USA) 1 mM durante 72 h en placas de 6 pozos (Nest, USA). Una vez transcurrido el tiempo, se despegaron las células y se incubaron en oscuridad y a 4 °C durante 30 minutos en una solución de PBS-SFB 2% mezclado con anticuerpo monoclonal anti-CD73/PE (BD Pharmigen, USA) en una dilución 1:25. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS-SFB 2% y se fijaron con una solución de PBS con paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 4%. La lectura se realizó en un citómetro de flujo espectral Aurora (Cytel Biosciences, USA), contando un mínimo de 10,000 eventos, y los resultados se analizaron en el software FlowJo (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

6.5. Cuantificación de TGF- β 1 mediante ELISA

Se cuantificó la concentración de TGF- β 1 producido por células de CaMa mediante la técnica de ELISA. Para ello se cultivaron 2×10^5 células en placas de 6 pozos con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado al 10% con SFB, en presencia de PTX 1 mM en los pozos correspondientes durante 72 h. Transcurrido el tiempo, los sobrenadantes fueron recolectados y se evaluó el contenido de TGF- β 1 mediante un ELISA de acuerdo con el procedimiento establecido por el proveedor, Human TGF- β 1 DuoSet ELISA (R&D Systems). La lectura de las placas se realizó en el equipo Glomax Discover (Promega, USA) y el análisis de densidad óptica obtenidas de la placa de ELISA para generar datos cuantitativos que permitan determinar la concentración de la citocina en las muestras con el software GloMax Discover System Software and Firmware (Promega).

6.6. Análisis estadístico

Los datos numéricos fueron expresados como promedio $\pm$ desviación estándar en los ensayos realizados por triplicado. Se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis para los resultados de proliferación y un análisis de varianza mediante la prueba t de Welch para los resultados del ensayo de ELISA en el software GraphPad Prism versión 10 (La Jolla, CA, USA). Se consideraron como diferencias significativas aquellas con $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Pentoxifilina reduce la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama humano

El efecto de PTX sobre la proliferación celular en diferentes líneas celulares de cáncer de mama se evaluó mediante un ensayo de tinción con cristal violeta a las 72 h de tratamiento; para ello se aplicaron tres distintas concentraciones del fármaco: 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM. En las cuatro líneas celulares, se observó una disminución en la proliferación celular de manera dependiente de la concentración de PTX, en comparación con el control sin tratamiento. El mayor efecto inhibitor de la proliferación se observó a 1mM de PTX, por lo cual se optó por usar esta concentración en los ensayos posteriores (Figura 6).

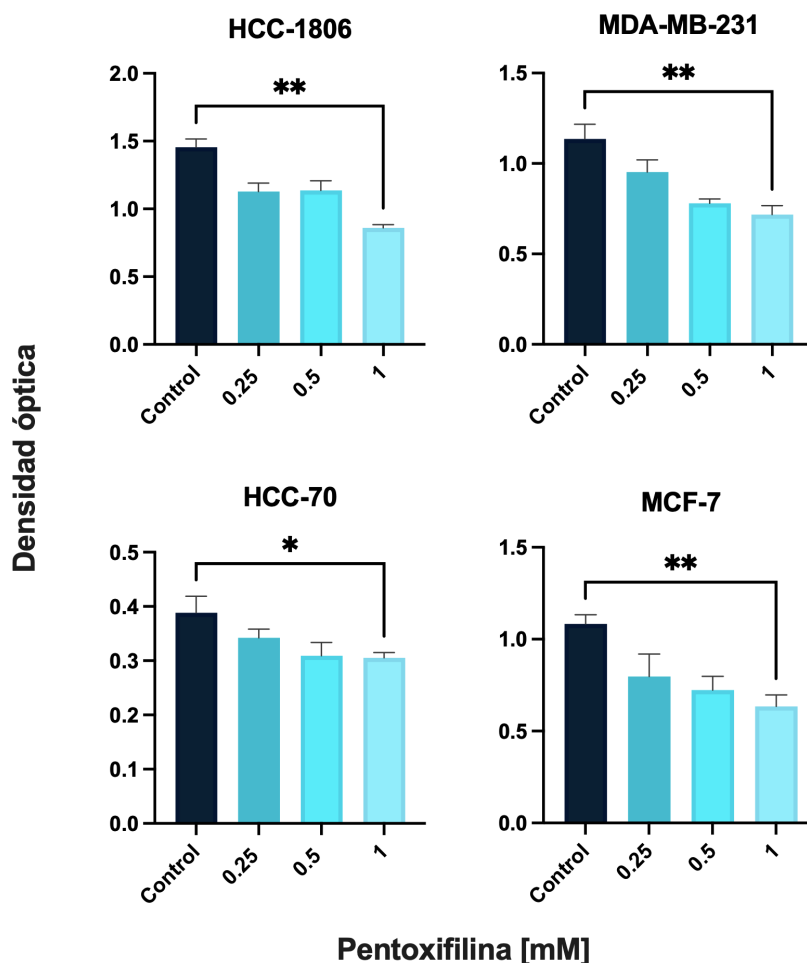


Figura 6. Efecto de PTX sobre la proliferación celular de líneas celulares de CaMa. Se cultivaron 5×10^4 células por triplicado y se les aplicó tres distintas dosis de PTX (0 (Control), 0.25, 0.5 y 1 mM) por 72 horas. Los datos se presentan como promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican como * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,005$), prueba de Kruskal-Wallis.

PTX indujo un incremento en la expresión de CD73 en las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC-1806

El efecto de PTX [1 mM] en la expresión de CD73 en las líneas celulares de CaMa fue analizado a nivel de ARNm mediante PCR punto final y de proteína mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que la línea celular MDA-MB-231 fue la que mostró, de manera basal, los niveles más altos de este gen en comparación con el resto de las líneas celulares analizadas.

El tratamiento de las líneas celulares con 1mM de PTX durante 72 h indujo incremento en la expresión de CD73 en las células MDA-MB-231 y HCC-1806. De hecho, en la línea celular HCC-1806, PTX incrementó en más del doble la expresión de CD73 (Figura 7B). Sin embargo, en las líneas MCF-7 y HCC-70 el tratamiento con PTX no indujo la expresión de CD73 (Figura 7A).

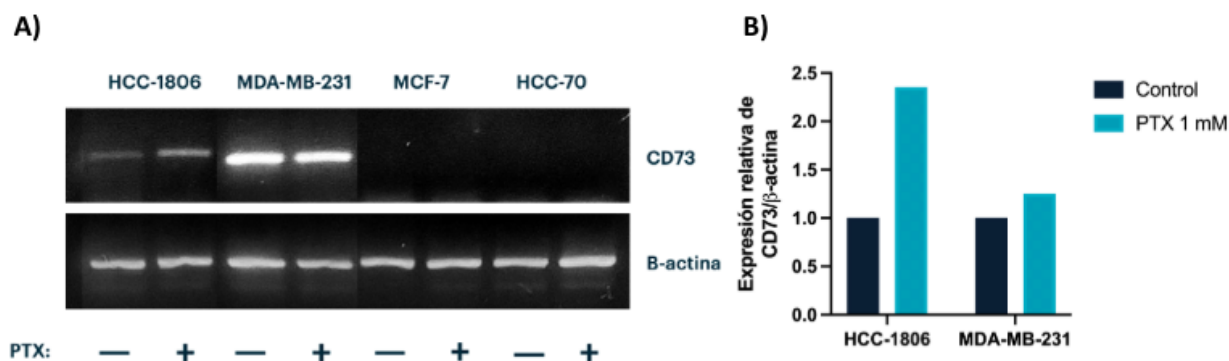


Figura 7. Efecto de PTX [1 mM] sobre los niveles de expresión de ARNm de CD73 en líneas celulares de CaMa. A) Se muestra la expresión de ARNm de CD73 en líneas celulares HCC-1806, MDA-MB-231, MCF-7 y HCC-70, en condiciones basales (-) y tratadas con 1 mM de PTX (+). La expresión de β-actina se utilizó como control de carga. (B) Se muestra la expresión relativa de CD73/β-actina de las líneas HCC-1806 y MDA-MB-231 cultivadas en condiciones basales (control), la cual fue normalizada a 1, y en presencia de 1mM de PTX.

Por otro lado, la expresión basal de CD73 en las líneas celulares de CaMa, mediante citometría de flujo, se corroboró que las líneas celulares HCC-1806 y MDA-MB-231 fueron positivas a la expresión de CD73, mientras que las líneas MCF-7 y HCC-70 mostraron una expresión marginal (Figura 8).

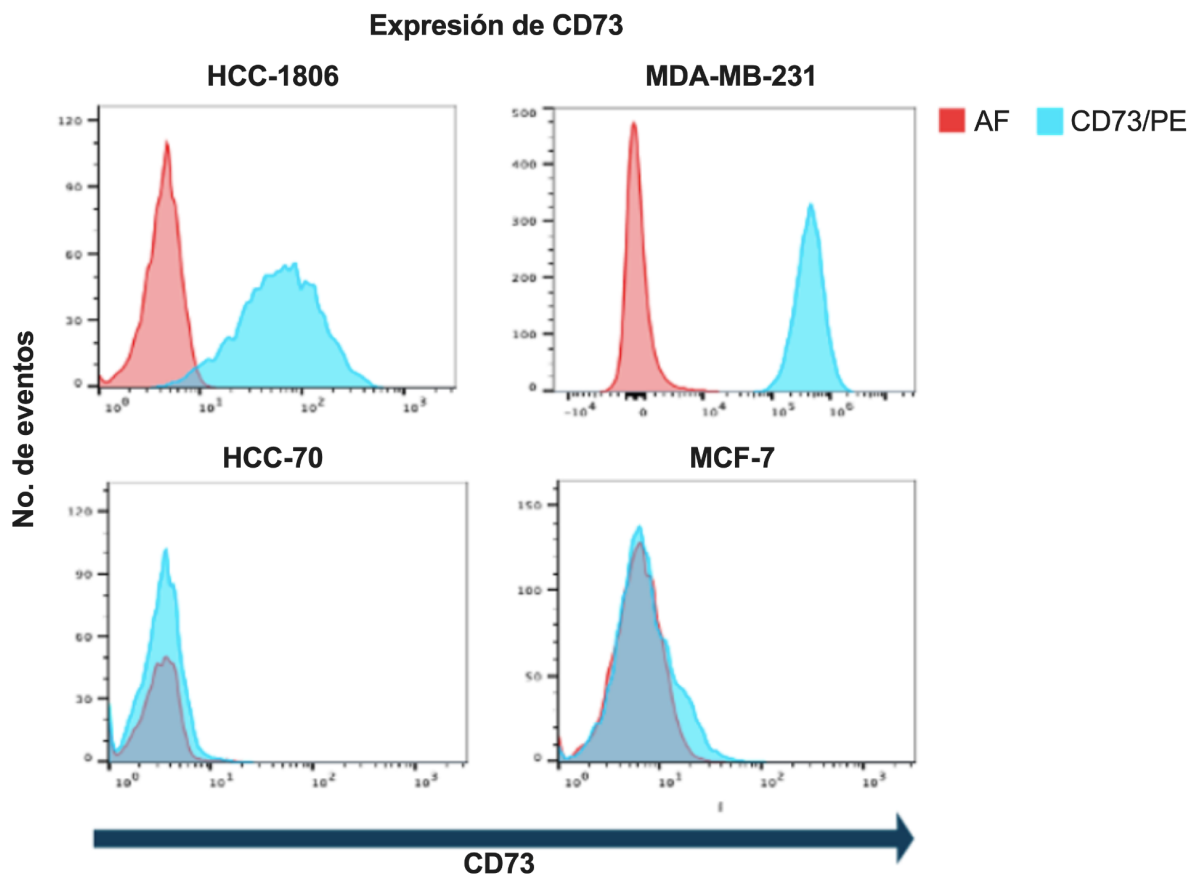


Figura 8. Expresión de CD73 en condiciones basales de las cuatro líneas de cáncer de mama evaluada mediante citometría de flujo. Histogramas representativos de la expresión de CD73 en las líneas celulares HCC-1806, MDA-MB-231, HCC-70 y MCF-7. La señal obtenida con el anticuerpo fluorescente anti-CD73/PE (en azul) se compara con la autofluorescencia (AF, en rojo).

Con base en estos resultados, el efecto de PTX en la expresión de CD73 se evaluó únicamente en las células HCC-1806 y MDA-MB-231. Para ello, también se utilizó EGF, un inductor conocido de la expresión de CD73, el cual fue utilizado como control positivo. El tratamiento de las líneas celulares HCC-1806 y MDA-MB-231 con PTX indujo incremento en la expresión de CD73 de manera similar al observado en las células tratadas con EGF, Figuras 9 y 10, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento combinado de PTX y EGF,

promovió fuertemente la expresión de CD73 únicamente en las células HCC-1806 (12.85 veces) (Figura 9).

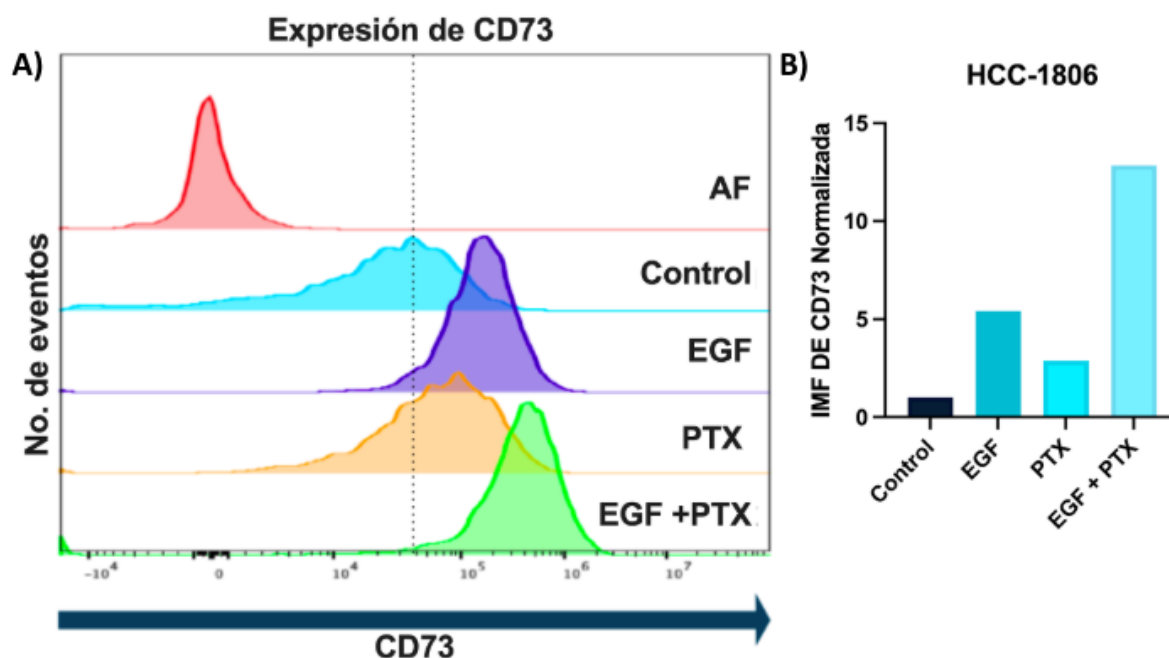


Figura 9. Efecto del tratamiento de EGF y PTX [1 mM] sobre la expresión de CD73 de HCC-1806. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD73 en HCC-1806 bajo condiciones basales (control) y tratadas con EGF (20 ng/mL), PTX (1 mM) o la combinación de ambos tratamientos (EGF + PTX). (B) Se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD73/PE donde la condición basal (control), fue normalizada a 1. Figura representativa de tres ensayos independientes.

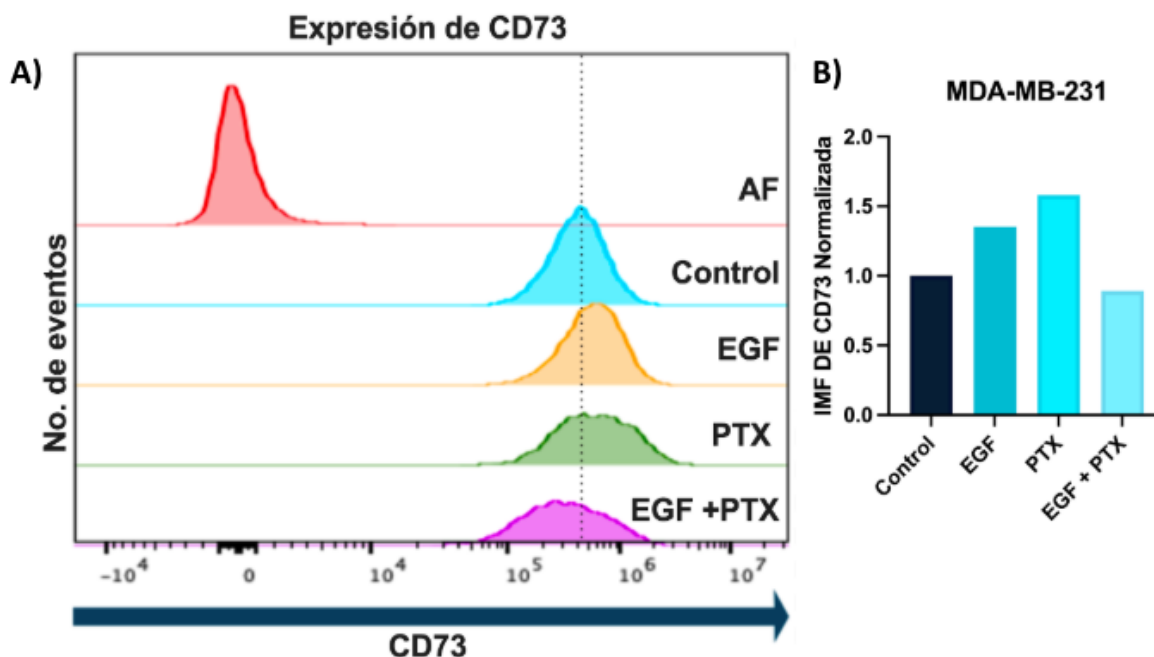


Figura 10. Efecto del tratamiento de EGF y PTX [1 mM] sobre la expresión de CD73 de MDA-MB-231. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD73 en MDA-MB-231 bajo condiciones control y tratadas con EGF (20 ng/mL), PTX (1 mM) o la combinación de ambos tratamientos (EGF + PTX). (B) Se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD73/PE donde la condición basal (control), fue normalizada a 1. Figura representativa de tres ensayos independientes.

PTX reduce la expresión de ARNm de Snail en HCC-1806 y MDA-MB-231

Considerando la relación entre CD73 y el desarrollo de la EMT (Hasmim *et al.*, 2022), se procedió a analizar el efecto del aumento de CD73 promovido por PTX sobre tres de los principales factores de transcripción involucrados en dicho proceso: Snail, Slug y Zeb1; para lo cual, 2×10^5 células de HCC-1806 y MDA-MB-231, fueron incubadas durante 72 h en presencia del fármaco, seguido de la extracción de ARN y la realización de ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Los resultados mostraron un incremento en la expresión de Slug y Zeb1; en MDA-MB-231, Slug aumentó aproximadamente 72%, mientras que Zeb1 incrementó su expresión en un 117%. Por otro lado, en HCC-1806, Slug mostró un incremento del 309%, mientras que Zeb1 aumentó un 152%. En línea con estos resultados, el aumento de CD73 se confirmó en ambas líneas celulares, con un incremento del 57% en MDA-MB-231 y de 109% en HCC-1806. En contraste, se observó una reducción en la expresión de Snail. En MDA-MB-231, Snail disminuyó un 43%, mientras que en HCC-1806, la disminución fue 25% (Figura 11 y 12).

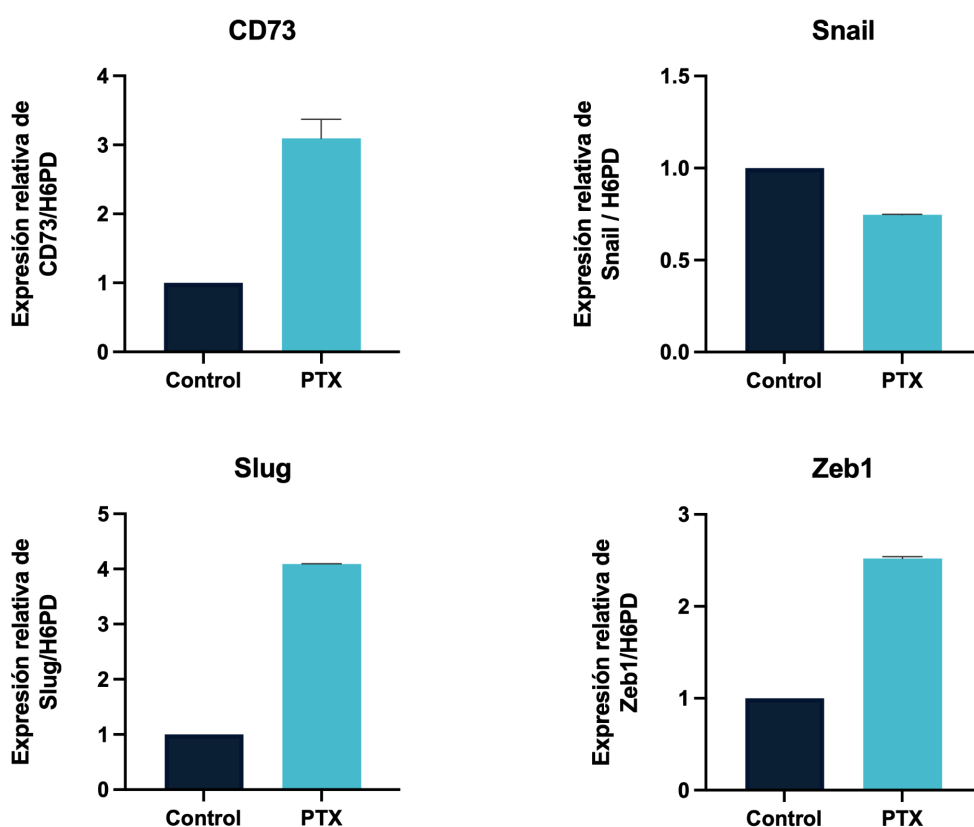


Figura 11. Efecto de PTX [1 mM] sobre la expresión de ARNm de genes de la transición epitelial-mesenquimal en HCC-1806. La expresión de CD73, Snail, Slug y Zeb1 se evaluó mediante qPCR en células HCC-1806 (2×10^5) tratadas con PTX en comparación con el control. El tratamiento con PTX indujo un aumento en la expresión de CD73, Slug y Zeb1, y una disminución en Snail. Figuras representativas de tres ensayos independientes.

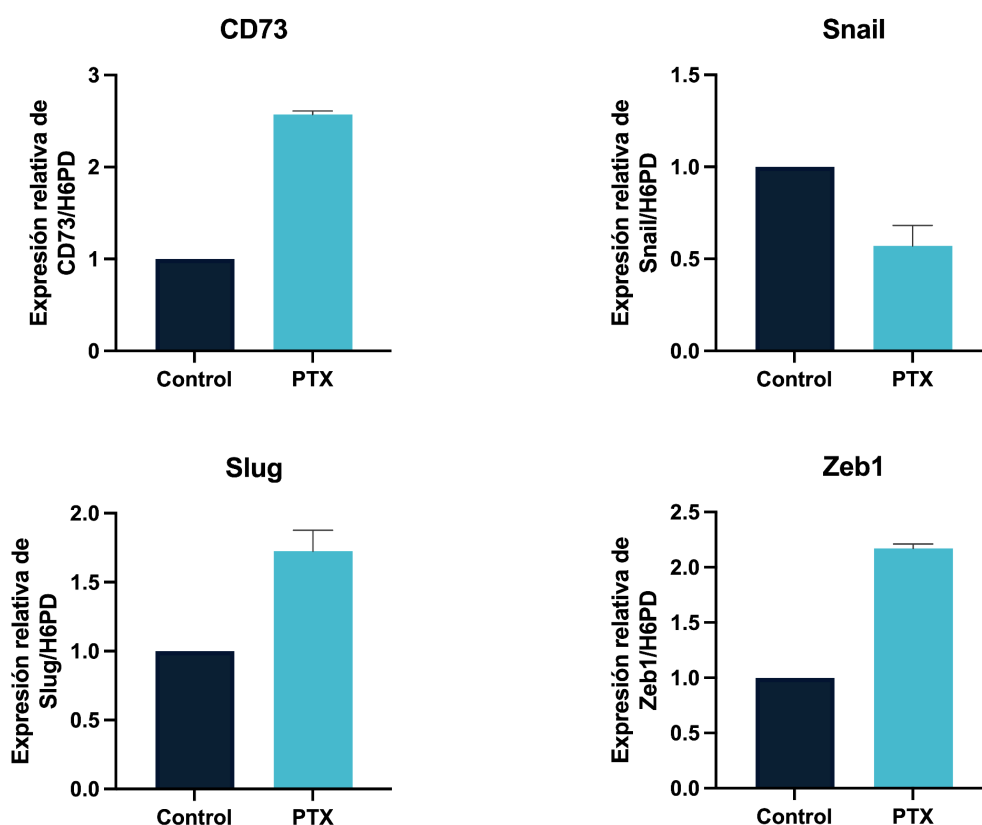


Figura 12. Efecto de PTX [1 mM] sobre la expresión de ARNm de genes de la transición epitelial-mesenquimal en MDA-MB-231. La expresión de CD73, Snail, Slug y Zeb1 se evaluó mediante qPCR en células MDA-MB-231 (2×10^5) tratadas con PTX en comparación con el control. El tratamiento con PTX indujo un aumento en la expresión de CD73, Slug y Zeb1, y una reducción de Snail. Figuras representativas de tres ensayos independientes.

PTX promueve un aumento significativo en la secreción de TGF- β 1 en MDA-MB-231.

Se ha informado que TGF- β 1 es una de las principales citocinas reguladoras de la expresión de CD73, además de estar involucrada en diversos procesos que promueven el desarrollo del cáncer (Baghbani *et al.*, 2021; García-Rocha *et al.*, 2019), por lo que mediante un ensayo de ELISA, se cuantificó la concentración de

TGF- β 1 presentes en los sobrenadantes tras el tratamiento de PTX en ambas líneas celulares después de 72 horas.

Los resultados mostraron que el fármaco indujo un aumento significativo en la secreción de esta citocina en la línea celular MDA-MB-231 ($p=0.0034$), mientras que en HCC-1806 se observó un ligero incremento, el cual no fue estadísticamente significativo ($p=0.3678$) (Figura 13).

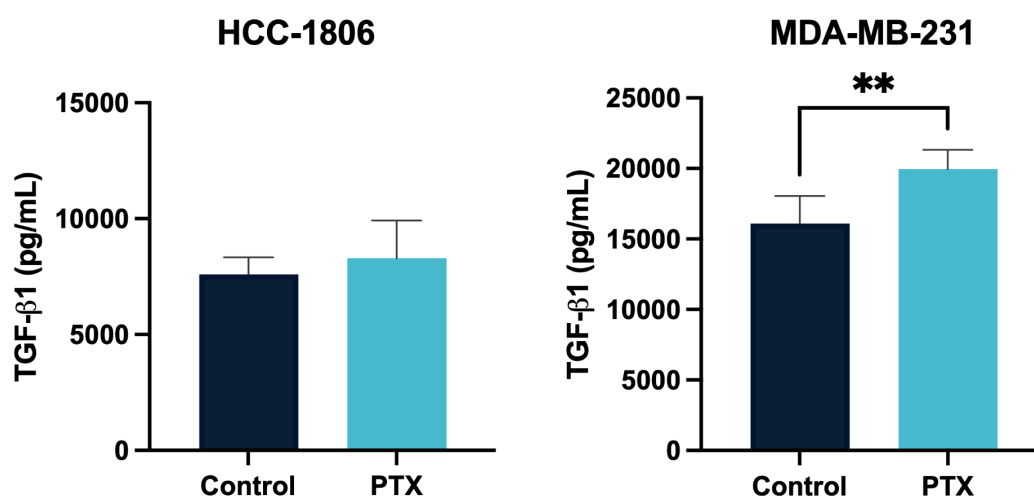


Figura 13. Efecto de PTX sobre los niveles de secreción de TGF- β 1 en HCC-1806 y MDA-MB-231. Se cultivaron 2×10^5 células HCC-1806 y MDA-MB-231 con tratamiento de PTX [1 mM] durante 72 h y los niveles de TGF- β 1 fueron evaluados en los sobrenadantes de ambas líneas celulares mediante un ensayo de ELISA; los datos son representativos de tres experimentos independientes, y se muestran los promedios $\pm$ DE. Las diferencias significativas se indican como **($p < 0,005$).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer de mama engloba un conjunto de enfermedades con una compleja y dinámica diversidad molecular, influenciada por factores tanto intrínsecos como extrínsecos que colectivamente afectan el comportamiento clínico y la resistencia a fármacos; por ello, la identificación de marcadores específicos es importante para una selección de tratamiento más precisa y la aplicación de terapias optimizadas (Nolan *et al.*, 2023). En los últimos años, la vía adenosinérgica ha cobrado una mayor relevancia como un mecanismo importante en la progresión

del cáncer, donde la enzima CD73 juega un papel clave al catalizar la hidrólisis del AMP para generar adenosina, un nucleósido con efectos protumorales que influyen directamente en el entorno tumoral. Este mecanismo hace de CD73 un importante mediador funcional que contribuye directamente a la agresividad del cáncer (Chen *et al.*, 2020). Por ejemplo, se sabe que esta vía está implicada en la estimulación de la angiogénesis, necesaria para el suministro de nutrientes y oxígeno al tumor, y en la remodelación del microambiente tumoral para favorecer la invasión y metástasis (Samanta *et al.*, 2018). Además se ha observado que la sobreexpresión de CD73 está asociada con un peor pronóstico en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Azambuja *et al.*, 2019). Por estas razones, se buscan fármacos que sean capaces de inhibir esta proteína y de esta manera reducir la actividad tumorigénica del cáncer de mama.

En este contexto, los resultados obtenidos de esta investigación demostraron que PTX reduce la proliferación celular *in vitro* después de 72 horas de tratamiento en cuatro líneas de cáncer de mama, incluso en las pertenecientes al subtipo triple negativo. Goel y Gude (2011), demostraron que en la línea celular MDA-MB-231, PTX reduce la proliferación mediante la detención del ciclo celular en G0-G1 y la inducción de apoptosis. Sin embargo, de igual manera hay reportes donde se destaca que PTX además de generar muerte por apoptosis también es capaz de inducir autofagia en esta misma línea celular (Castellanos-Esparza *et al.*, 2018), por lo que es importante mencionar que dicha característica puede promover cierta resistencia al cáncer y funcionar como un factor que favorezca la supervivencia (Mele *et al.*, 2020).

En cuanto a los ensayos realizados para evaluar CD73, los resultados demostraron que en condiciones basales, HCC-1806 y MDA-MB-231 expresan niveles altos de esta enzima, tanto de ARNm, como a nivel de proteína membranar en comparación con HCC-70 y MCF-7. Esta variación en la expresión de CD73 con respecto a las otras líneas celulares, destaca y reafirma la diversidad molecular que caracteriza esta patología; Loi y colaboradores (2013), reportaron

que la expresión génica de CD73 es significativamente mayor en CMTN, lo que coincide con lo encontrado en esta investigación, a excepción de la línea celular HCC-70, que a pesar de también ser del subtipo triple negativo, se correlacionó negativamente con esta proteína, lo cual también habla de naturaleza inherentemente heterogénea de este subtipo, por lo que proporciona una población celular más diversa y susceptible a desarrollar quimiorresistencia, sin embargo su tasa de proliferación es considerablemente más bajo que el resto de líneas celulares analizadas (Turner *et al.*, 2021). Por otro lado, MCF-7, clasificada como Luminal A, tiene la presencia del receptor de estrógeno, cuya presencia regula negativamente el gen de CD73 (Allard *et al.*, 2014).

Contrario a lo planteado en la hipótesis, el tratamiento con PTX [1 mM] durante 72 h, no solo no condujo a una disminución de CD73, sino que aumentó su expresión en las líneas celulares HCC-1806 y MDA-MB-231. De acuerdo con Loi y colaboradores (2013) el incremento en los niveles de CD73 particularmente en CMTN, se asocia con la quimiorresistencia, la metástasis y un pronóstico limitado para los pacientes.

Esta respuesta posiblemente esté relacionada a la capacidad de PTX para inhibir fosfodiesterasas (PDE) de manera no selectiva. Las PDE son un grupo de enzimas que regulan múltiples procesos fisiológicos y patológicos al catalizar la hidrólisis del AMPc, un segundo mensajero clave derivado del ATP mediante la acción de la enzima adenilato ciclasa (AC), convirtiéndolo en su derivado biológicamente inactivo, el AMP. Por lo tanto, la concentración de AMPc intracelular depende del equilibrio relativo entre las adenilil ciclasas y las fosfodiesterasas (Peng *et al.*, 2018).

PTX al inhibir esta clase de enzimas, promueve una acumulación de AMPc, capaz de activar la proteína quinasa A (PKA). PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C), que normalmente permanecen en forma inactiva, sin embargo cuando aumentan los

niveles de AMPc, estas moléculas se unen a las subunidades R, por lo que se disocian las subunidades C de la PKA y migran hacia el núcleo para fosforilar distintas proteínas, entre ellas la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB), la cual funciona como un cofactor que desencadena una variedad de cascadas transcripcionales mediante la activación de genes con elementos sensibles al AMPc (conocidos como CRE) ubicados en sus promotores (Catalano *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2016). Diversos estudios sugieren que esta proteína es capaz de regular positivamente la expresión de CD73, ya que se ha demostrado que en la región promotora central del gen de CD73 (NT5E) existe un elemento de respuesta cAMP (CRE) (Che *et al.*, 2018; Cappelli *et al.*, 2020; Nedeljkovic, 2019), por lo tanto es posible que el aumento de CD73 sea por medio de la vía AMPc/PKA/CREB (Figura 14).

Además, los resultados observados podrían estar relacionados a la presencia de la proteína PTEN en este tipo de cáncer, dado que esta proteína puede actuar como un inhibidor directo en la fosforilación de CREB. Se ha reportado que la deficiencia de PTEN es común en el cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2024), y particularmente se ha identificado una ausencia basal de esta proteína en la línea MDA-MB-231 (Hohensee *et al.*, 2017).

En relación a lo anterior, en un estudio hecho por Loi y colaboradores (2013) encontró que también aumentan los niveles y actividad de CD73 tras el tratamiento de doxorrubicina, principalmente en líneas celulares de CMTN y HER2+, el cual plantean que posiblemente sea un mecanismo de contrapeso a la muerte celular generada, relacionado a la acción de CREB, ya que cuando se aplicó doxorrubicina en combinación con Naftol AS-E (un inhibidor de esta proteína), no existió un aumento significativo de CD73 en MDA-MB-231.

Por otro lado, Bullen y colaboradores (2016) reportaron que la PKA también aumenta la estabilidad de uno de los principales inductores de CD73, HIF-1 α , mediante fosforilaciones en la treonina 63 y la serina 692 de dicha proteína en

células HeLa. De igual manera, en su investigación, demostraron que con la adición de forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, aumentan significativamente los niveles del gen NT5E en condiciones hipóxicas por medio de la activación de PKA y la estabilización de HIF-1 α . Considerando estos resultados, se puede sugerir otro posible mecanismo de acción de PTX en cáncer de mama similar a la forskolina, relacionado a la interacción entre PKA y HIF-1 α , puesto que igualmente se observa un aumento en los niveles de CD73 (Figura 14).

Asimismo, en un estudio realizado por Samanta y Colaboradores (2018) demostraron la amplia asociación que existe entre las distintas isoformas de HIF y la inducción de CD73, puesto que encontraron que en la línea celular MDA-MB-231 tratada con diversos quimioterapéuticos (carboplatino, paclitaxel y doxorubicina), inducen la transcripción genética de CD47, PDL1 y CD73 mediada por HIF-1 α y HIF-2 α .

Por ende, se ha descrito que dependiendo del tipo celular y el entorno específico, la acumulación de cAMP y la consecuente activación de PKA pueden tener un papel dual o paradójico en diversos tipos de cáncer, incluido el de mama (Zhang *et al.*, 2024). Esto se debe a que PKA es capaz de activar tanto oncogenes como genes supresores de tumores, por ejemplo, en 2018, Feng y colaboradores informaron que el cAMP induce la expresión de CREB3L1 mediante la vía PKA/p38 MAPK y a pesar de que su papel no está completamente dilucidado, se ha observado que en cáncer de mama triple negativo, este factor de transcripción promueve la metástasis; mientras que, mediante la vía AMPc/PKA inducida por IL-24, se estimula la activación de p38 MAPK y se regulan positivamente factores apoptóticos extrínsecos de la vía de señalización Fas/FasL en línea celular MDA-MB-231 (Persaud *et al.*, 2018).

Incluso el efecto de la activación de PKA en la proliferación puede estar determinado por la proporción de sus subtipos, ya que se ha encontrado que la PKA tipo I promueve la proliferación, mientras que el tipo II, la disminuye mediante

la fosforilación de Raf-1 en la serina 259 y la posterior desactivación de ERK (Narayanan *et al.*, 2024; Dhillon *et al.*, 2002).

En cuanto a la implicación de los hallazgos obtenidos en relación con la EMT, se sabe que la regulación de los factores de transcripción involucrados en este proceso es altamente compleja, ya que depende de múltiples vías de señalización intracelular. Sin embargo, se ha descrito que la expresión y actividad de CD73 está estrechamente asociada con el desarrollo de un fenotipo similar a la EMT en cáncer de mama (Iser *et al.*, 2022). En este estudio, al evaluar los cambios en la expresión de los genes implicados en el desarrollo de este mecanismo, se observó que los niveles tanto de Slug, como de Zeb1 aumentaron tras el tratamiento de PTX en ambas líneas celulares, lo que refuerza la conexión entre la expresión de CD73 y el desarrollo del fenotipo mesenquimal.

Uno de los principales inductores de estos factores es el TGF- β 1, el cual se observó en este trabajo que aumentan sus niveles en la línea celular MDA-MB-231 con el tratamiento de PTX, lo que coincide con lo descrito previamente por nuestro grupo de investigación en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (García-Rocha *et al.*, 2019), donde se menciona que existe un bucle de retroalimentación positiva entre la expresión de CD73 y la secreción de TGF- β 1.

Por otro lado, a pesar de que se ha reportado que la regulación positiva de SNAIL depende de CD73 en cáncer de mama triple negativo (Hasmim *et al.*, 2022), se observó en el presente estudio, una reducción en los niveles de expresión de este gen. Este efecto podría estar relacionado con la capacidad de PTX para inhibir al factor de transcripción NF- κ B, la cual se ha descrito en distintos tipos de cáncer, como el de mama, cérvico-uterino y leucemia (Castellanos-Esparza *et al.*, 2018; Bravo-Cuellar *et al.*, 2020; Napolitano *et al.*, 2018). Si bien, no es del todo claro su mecanismo, se ha propuesto que una de las vías implicadas en este proceso es la elevación del cAMP y activación de PKA mediante la acción del fármaco, con lo cual se evita la ubiquitinización y degradación de I κ B, una proteína unida al

heterodímero de NF- κ B encargada de inhibir su translocación al núcleo (Donate-Correa *et al.*, 2022). Por lo tanto, dado que la activación de NF- κ B favorece la estabilización y transcripción de SNAIL (Wang *et al.*, 2013), su inhibición podría explicar la reducción observada en este factor de transcripción en esta investigación.

En general, los hallazgos de esta investigación sugieren que, si bien PTX tiene un potencial antiproliferativo, su capacidad para aumentar la expresión de CD73 y modular vías relacionadas con la EMT podría limitar su eficacia como tratamiento; por lo que la quimioterapia combinada podría representar una alternativa más eficaz para su uso en el cáncer de mama, con el objetivo de evitar los efectos adversos observados aprovechando distintos mecanismos de acción. Nidhyanandan y colaboradores (2015) destacan que los inhibidores de PDEs presentan una eficacia limitada cuando se administran solos. Por ende, considerando los mecanismos de acción de PTX propuestos en este trabajo, sería interesante aplicar simultáneamente este fármaco con inhibidores de CREB o de HIF-1 α para evitar el incremento de CD73.

Sin embargo, otra estrategia de terapia combinada podría fundamentarse en el aprovechamiento del aumento de la enzima, ya que a pesar de que este fenómeno es comúnmente asociado a la progresión del tumor no necesariamente implica un desarrollo del mismo, puesto que se ha descrito que cuando la adenosina generada por esta nucleotidasa no es regulada, su acumulación en concentraciones muy elevadas resulta ser citotóxica (Monroy-Mora *et al.*, 2022). Este efecto ocurre debido a la inducción de muerte celular por medio de apoptosis, tanto por vías extrínsecas, como intrínsecas en distintos tipos de cáncer como el de colon, cervix y mama (Bahreyni *et al.*, 2018; Nakajima *et al.*, 2015). No obstante, este efecto depende en gran parte de la presencia y actividad de la enzima ADA, que degrada la adenosina a inosina como un mecanismo de evasión de muerte celular. Por lo tanto, también sería relevante administrar un tratamiento

combinado que incluya un inhibidor de ADA para potenciar los efectos citotóxicos derivados de la acumulación de adenosina.

Finalmente, es importante mencionar que los estudios donde demuestran el potencial antimetastásico de la PTX se realizaron los ensayos tras 24 horas de tratamiento (Goel y Gude, 2011; Goel y Gude, 2013); asimismo, Gołuński y colaboradores (2018) destacan que es importante evaluar la eficacia de la PTX a largo plazo, por lo que es necesario considerar si la concentración y los tiempos de exposición a PTX fueron apropiados para inducir la respuesta que se buscaba, ya que concentraciones más bajas o tiempos de tratamiento más largos o más cortos podrían dar lugar a la reducción de CD73.

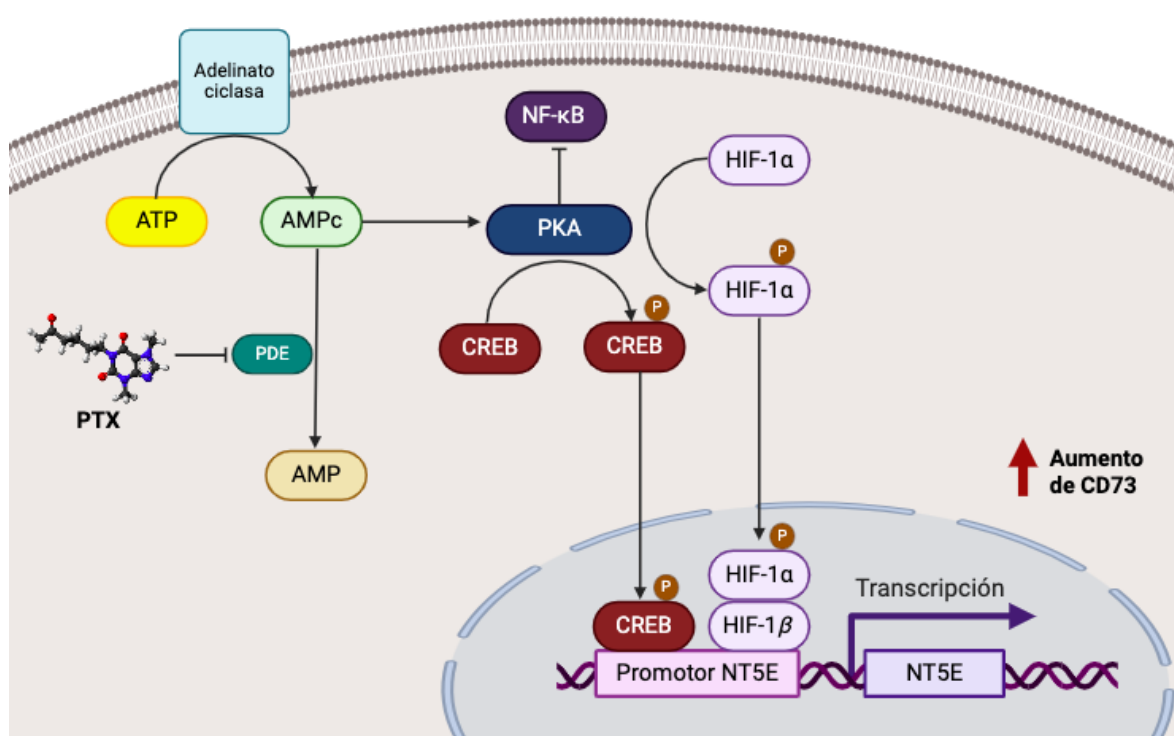


Figura 14. Resumen gráfico del mecanismo de acción propuesto de PTX en células de CaMa. PTX inhibe la actividad de PDEs, lo que resulta en un aumento de los niveles de AMPc. Esto activa la proteína quinasa A (PKA), que a su vez fosforila a los factores de transcripción CREB y HIF-1α. Estos factores se unen al promotor del gen NT5E, promoviendo su transcripción y conduciendo al incremento en la expresión de CD73. Imagen creada en Biorender.com

9. CONCLUSIONES

PTX es capaz de reducir la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama; sin embargo, en MDA-MB-231 y en HCC-1806, a las 72 h de tratamiento, se induce un aumento en la expresión de CD73, acompañado de un incremento de factores vinculados con la EMT. Este efecto ocurre posiblemente como un mecanismo relacionado a la capacidad de PTX para inhibir fosfodiesterasas. Por lo cual, se necesita comprender mejor los mecanismos subyacentes de los efectos observados en la expresión de CD73 y otros genes asociados.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de PTX sobre CD73 a distintos tiempos de tratamiento.
- Analizar el efecto de PTX en la concentración intracelular de AMPc.
- Evaluar la efectividad de terapia combinada en la reducción de CD73.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Admoun C, & Mayrovitz HN. (2022). The Etiology of Breast Cancer. In H. N. Mayrovitz (Ed.), Breast cancer. Exon Publications. 21-30.
2. Aggarwal, S., Verma, S. S., Aggarwal, S., & Gupta, S. C. (2021, January). Drug repurposing for breast cancer therapy: Old weapon for new battle. In Seminars in cancer biology (Vol. 68, pp. 8-20). Academic Press.
3. Ahmed, M. B., Alghamdi, A. A., Islam, S. U., Lee, J. S., & Lee, Y. S. (2022). cAMP signaling in cancer: a PKA-CREB and EPAC-centric approach. Cells, 11(13), 2020.
4. Allard, B., Allard, D., Buisseret, L., & Stagg, J. (2020). The adenosine pathway in immuno-oncology. Nature Reviews Clinical Oncology, 17(10), 611-629.

5. Allard, B., Turcotte, M., & Stagg, J. (2014). Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(8), 863-881.
6. Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Del Tacca, M., & Blandizzi, C. (2008). Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacology & therapeutics*, 120(3), 233-253.
7. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 842-857.
8. Antonioli, L., Novitskiy, S. V., Sachsenmeier, K. F., Fornai, M., Blandizzi, C., & Haskó, G. (2017). Switching off CD73: a way to boost the activity of conventional and targeted antineoplastic therapies. *Drug discovery today*, 22(11), 1686-1696.
9. Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., ... & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15-23.
10. Azambuja, J. H., Ludwig, N., Braganhol, E., & Whiteside, T. L. (2019). Inhibition of the adenosinergic pathway in cancer rejuvenates innate and adaptive immunity. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5698.
11. Baghbani, E., Noorolyai, S., Shanehbandi, D., Mokhtarzadeh, A., Aghebati-Maleki, L., Shahgoli, V. K., & Baradaran, B. (2021). Regulation of immune responses through CD39 and CD73 in cancer: Novel checkpoints. *Life Sciences*, 282, 119826.
12. Bahreyni, A., Samani, S. S., Rahmani, F., Behnam-Rassouli, R., Khazaei, M., Ryzhikov, M., ... & Hassanian, S. M. (2018). Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 1836-1843.
13. Bhatia, S., Wang, P., Toh, A., & Thompson, E. W. (2020). New insights into the role of phenotypic plasticity and EMT in driving cancer progression. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 71.

14. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(11), 674-690.
15. Blanco, O. V., Xilotl, E. V., & Garcés, H. (2018). Cáncer: naturaleza, cultura y complejidad: Elementos para un enfoque transdisciplinario de la enfermedad (Vol. 1). Coplt ArXives.
16. Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine metabolism: emerging concepts for cancer therapy. *Cancer cell*, 36(6), 582-596.
17. Brabletz, T. (2012). To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 12(6), 425-436.
18. Bravo-Cuellar, A., Ortiz-Lazareno, P. C., Sierra-Diaz, E., Solorzano-Ibarra, F., Méndez-Clemente, A. S., Aguilar-Lemarroy, A., ... & Hernández-Flores, G. (2020). Pentoxifylline sensitizes cisplatin-resistant human cervical cancer cells to cisplatin treatment: involvement of mitochondrial and NF-Kappa B pathways. *Frontiers in oncology*, 10, 592706.
19. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
20. Bullen, J. W., Tchernyshyov, I., Holewinski, R. J., DeVine, L., Wu, F., Venkatraman, V., ... & Semenza, G. L. (2016). Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Science signaling*, 9(430), ra56-ra56.
21. Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic signaling in the hallmarks of cancer. *Cells*, 9(7), 1612.
22. Castellanos-Esparza, Y. C., Wu, S., Huang, L., Buquet, C., Shen, R., Sanchez-Gonzalez, B., ... & Lu, H. (2018). Synergistic promoting effects of pentoxifylline and simvastatin on the apoptosis of triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *International journal of oncology*, 52(4), 1246-1254.

23. Cappelli, C., Tellez, A., Jara, C., Alarcón, S., Torres, A., Mendoza, P., ... & San Martín, R. (2020). The TGF- β profibrotic cascade targets ecto-5'-nucleotidase gene in proximal tubule epithelial cells and is a traceable marker of progressive diabetic kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(7), 165796.
24. Catalano, S., Campana, A., Giordano, C., Györfy, B., Tarallo, R., Rinaldi, A., ... & Barone, I. (2016). Expression and function of phosphodiesterase type 5 in human breast cancer cell lines and tissues: implications for targeted therapy. *Clinical cancer research*, 22(9), 2271-2282.
25. Che, X., Liu, P., Wu, C., Song, W., An, N., Yu, L., ... & Yang, J. (2018). Potential role of the ecto-5'-nucleotidase in morphine-induced uridine release and neurobehavioral changes. *Neuropharmacology*, 141, 1-10.
26. Chen, X., Wu, C., Zhong, J., Shen, Y., & Zu, X. (2020). Tumorigenesis and progression as a consequence of hypoxic TME: a prospective view upon breast cancer therapeutic targets. *Experimental Cell Research*, 395(2), 112192.
27. Cuthrell, K. M., & Tzenios, N. (2023). Breast Cancer: Updated and Deep Insights. *International Research Journal of Oncology*, 6(1), 104-118.
28. Dhillon, A. S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H., & Kolch, W. (2002). Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Molecular and cellular biology*, 22(10), 3237-3246.
29. Dua, P., & Gude, R. P. (2008). Pentoxifylline impedes migration in B16F10 melanoma by modulating Rho GTPase activity and actin organisation. *European Journal of Cancer*, 44(11), 1587-1595.
30. Donate-Correa, J., Sanchez-Niño, M. D., González-Luis, A., Ferri, C., Martín-Olivera, A., Martín-Núñez, E., ... & Navarro-González, J. F. (2022). Repurposing drugs for highly prevalent diseases: pentoxifylline, an old drug and a new opportunity for diabetic kidney disease. *Clinical Kidney Journal*, 15(12), 2200-2213.

31. Feng, Y. X., Jin, D. X., Sokol, E. S., Reinhardt, F., Miller, D. H., & Gupta, P. B. (2017). Cancer-specific PERK signaling drives invasion and metastasis through CREB3L1. *Nature communications*, 8(1), 1079.
32. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
33. Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016.
34. García-Rocha, R., Monroy-García, A., Hernández-Montes, J., Weiss-Steider, B., Gutiérrez-Serrano, V., del Carmen Fuentes-Castañeda, M., ... & de Lourdes Mora-García, M. (2019). Cervical cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine*, 118, 71-79.
35. Georgakopoulos-Soares, I., Chartoumpekis, D. V., Kyriazopoulou, V., & Zaravinos, A. (2020). EMT factors and metabolic pathways in cancer. *Frontiers in oncology*, 10, 499.
36. Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., & Borea, P. A. (2011). Adenosine receptors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(5), 1400-1412.
37. Goel, P. N., & Gude, R. P. (2011). Unravelling the antimetastatic potential of pentoxifylline, a methylxanthine derivative in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 358, 141-151.
38. Goel, P. N., & Gude, R. P. (2013). Curbing the focal adhesion kinase and its associated signaling events by pentoxifylline in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *European journal of pharmacology*, 714(1-3), 432-441.
39. Goel, P. N., & Gude, R. P. (2014). Delineating the anti-metastatic potential of pentoxifylline in combination with liposomal doxorubicin against breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(2), 191-200.
40. Goel, P. N., Singh, S. P., Murali Krishna, C., & Gude, R. P. (2015). Investigating the effects of Pentoxifylline on human breast cancer cells using

- Raman spectroscopy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 8(02), 1550004.
41. Golunski, G., Woziwodzka, A., & Piosik, J. (2018). Potential use of pentoxifylline in cancer therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 19(3), 206-216.
 42. Gon, C., Sanchotena, V., Maldonado, M. C., Horton, G., Garbovesky, C., & Flaks, D. (2017). Cáncer de mama Triple Negativo: evaluación de características clínico-patológicas y factores pronósticos. *Revista Argentina de Mastología*, 36(130).
 43. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
 44. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
 45. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
 46. Hasmim, M., Berchem, G., & Janji, B. (2022). A role for EMT in CD73 regulation in breast cancer. *Oncoimmunology*, 11(1), 2152636.
 47. Hasmim, M., Xiao, M., Van Moer, K., Kumar, A., Oniga, A., Mittelbronn, M., ... & Janji, B. (2022). SNAI1-dependent upregulation of CD73 increases extracellular adenosine release to mediate immune suppression in TNBC. *Frontiers in Immunology*, 13, 982821.
 48. Henry, N. L., Shah, P. D., Haider, I., Freer, P. E., Jagsi, R., & Sabel, M. S. (2020). Cancer of the breast. In *Abeloff's Clinical Oncology* (pp. 1560-1603). Elsevier.
 49. Hohensee, I., Chuang, H. N., Grottke, A., Werner, S., Schulte, A., Horn, S., ... & Wikman, H. (2017). PTEN mediates the cross talk between breast and glial cells in brain metastases leading to rapid disease progression. *Oncotarget*, 8(4), 6155.
 50. Huang, Y., Gu, Z., Fan, Y., Zhai, G., Zhao, X., Sun, Q., ... & Lin, G. (2019). Inhibition of the adenosinergic pathway: the indispensable part of oncological therapy in the future. *Purinergic Signalling*, 15, 53-67.

51. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2023). Estadísticas a propósito del Día Internacional de la Lucha contra el Cáncer de Mama (Datos Nacionales).
52. Iser, I. C., Vedovatto, S., Oliveira, F. D., Beckenkamp, L. R., Lenz, G., & Wink, M. R. (2022). The crossroads of adenosinergic pathway and epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 86, pp. 202-213). Academic Press.
53. Kamran, M. Z., & Gude, R. P. (2012). Preclinical evaluation of the antimetastatic efficacy of Pentoxifylline on A375 human melanoma cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 66(8), 617-626.
54. Kang, E., Seo, J., Yoon, H., & Cho, S. (2021). The post-translational regulation of epithelial–mesenchymal transition-inducing transcription factors in cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3591.
55. Lazarczyk, M., Grzela, T., Niderla, J., Lazarczyk, M. A., Milewski, L., Dziunycz, P., ... & Golab, J. (2004). Differential influence of pentoxifylline on murine colon adenocarcinoma-and melanoma-derived metastatic tumor development in lungs. *Oncology reports*, 11(5), 1121-1125.
56. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750-2767.
57. Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., Smyth, M. J., & Stagg, J. (2013). 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*, 110(27), 11091–11096. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222251110>
58. Lucena, M. A., González, C. J. R., de Reyes Lartategui, S., Aragón, T. G., Barrón, M. T. S., Rubio, J. G., & Poyatos, P. T. (2021). Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. *Cirugía Andaluza*, 32(2), 155-159.

59. Luque, G., Walbaum, B., Camus, M., Domínguez, F., Merino, T., Acevedo, F., & Sánchez, C. (2021). Cáncer de mama triple negativo: terapias sistémicas actuales y experiencia local. *Revista de cirugía*, 73(2), 188-196.
60. Marcial-Arriaga, C. (2023). Análisis de la capacidad de la pentoxifilina para inhibir a la ectonucleótidas CD73 en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino [Tesis de licenciatura]. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
61. Masuda, T., Tsuruda, Y., Matsumoto, Y., Uchida, H., Nakayama, K. I., & Mimori, K. (2020). Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. *Cancer science*, 111(4), 1039-1046.
62. Mele, L., Del Vecchio, V., Liccardo, D., Prisco, C., Schwerdtfeger, M., Robinson, N., ... & La Noce, M. (2020). The role of autophagy in resistance to targeted therapies. *Cancer Treatment Reviews*, 88, 102043.
63. Monroy-Mora, A., de Lourdes Mora-García, M., Mora, K. A. M., Hernández-Montes, J., García-Rocha, R., Don-López, C. A., ... & Monroy-García, A. (2022). Inhibition of adenosine deaminase activity reverses resistance to the cytotoxic effect of high adenosine levels in cervical cancer cells. *Cytokine*, 158, 155977.
64. Nakajima, Y., Kanno, T., Nagaya, T., Kuribayashi, K., Nakano, T., Gotoh, A., & Nishizaki, T. (2015). Adenosine deaminase inhibitor EHNA exhibits a potent anticancer effect against malignant pleural mesothelioma. *Cellular physiology and biochemistry*, 35(1), 51-60.
65. Napolitano, R., De Matteis, S., Lucchesi, A., Carloni, S., Cangini, D., Musuraca, G., ... & Fattori, P. P. (2018). Pentoxifylline-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia: new insights into molecular mechanism. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(3), 287-294.
66. Narayanan, S. P., Wedn, A. M., Shah, O. S., Chen, J., Brown, D. D., McAuliffe, P. F., ... & Lee, A. V. (2024). Transcriptomic analysis identifies enrichment of cAMP/PKA/CREB signaling in invasive lobular breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 26, 149.

67. Nedeljkovic, N. (2019). Complex regulation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and A2AR-mediated adenosine signaling at neurovascular unit: A link between acute and chronic neuroinflammation. *Pharmacological research*, 144, 99-115.
68. Nidhyanandan, S., Boreddy, T. S., Chandrasekhar, K. B., Reddy, N. D., Kulkarni, N. M., & Narayanan, S. (2015). Phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline enhances anticancer activity of histone deacetylase inhibitor, MS-275 in human breast cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 764, 508-519.
69. Nolan, E., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2023). Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*.
70. Palafox-Mariscal, L. A., Ortiz-Lazareno, P. C., Jave-Suárez, L. F., Aguilar-Lemarroy, A., Villaseñor-García, M. M., Cruz-Lozano, J. R., ... & Hernández-Flores, G. (2023). Pentoxifylline Inhibits TNF- α /TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Suppressing the NF- κ B Pathway and SERPINE1 Expression in CaSki Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10592.
71. Persaud, L., Mighty, J., Zhong, X., Francis, A., Mendez, M., Muharam, H., ... & Sauane, M. (2018). IL-24 promotes apoptosis through cAMP-dependent PKA pathways in human breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3561.
72. Peng, T., Gong, J., Jin, Y., Zhou, Y., Tong, R., Wei, X., ... & Shi, J. (2018). Inhibitors of phosphodiesterase as cancer therapeutics. *European journal of medicinal chemistry*, 150, 742-756.
73. Puisieux, A., Brabletz, T., & Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature cell biology*, 16(6), 488-494.
74. Ramos Águila, Y.C., Marimón Torres, E.R., Crespo González, C., Junco Sena, B., & Valiente Morejón, W. (2015). Cáncer de mama, su caracterización epidemiológica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 19(4), 619-629.

75. Reilly, R. (2007). Breast cancer, in: S.J. Enna, D.B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, New York, pp. 1–9.
76. Samanta, D., Park, Y., Ni, X., Li, H., Zahnow, C. A., Gabrielson, E., ... & Semenza, G. L. (2018). Chemotherapy induces enrichment of CD47+/CD73+/PDL1+ immune evasive triple-negative breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6), E1239-E1248.
77. Sgroi, D. C. (2010). Preinvasive breast cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 193-221.
78. Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast cancer—epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers*, 14(10), 2569.
79. Soleimani, A., Taghizadeh, E., Shahsavari, S., Amini, Y., Rashidpour, H., Azadian, E., ... & Jaafari, M. R. (2019). CD73; a key ectonucleotidase in the development of breast cancer: Recent advances and perspectives. *Journal of cellular physiology*, 234(9), 14622-14632.
80. Sterneck, E., Poria, D. K., & Balamurugan, K. (2020). Slug and E-cadherin: stealth accomplices?. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 554454.
81. Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H. K., ... & Colgan, S. P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of clinical investigation*, 110(7), 993-1002.
82. Szymiczek, A., Lone, A., & Akbari, M. R. (2021). Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical genetics*, 99(5), 613-637.
83. Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell biochemistry and biophysics*, 72(2), 333-338.
84. Teeuwssen, M., & Fodde, R. (2019). Cell heterogeneity and phenotypic plasticity in metastasis formation: The case of colon cancer. *Cancers*, 11(9), 1368.

85. Thermo Fisher, Scientific (2016). TRIzol Reagent User Guide—Pub. No. MAN0001271—Rev. A. 0. User Guide, 15596018, 1-6.
86. Tsang, J. Y., & Gary, M. T. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.
87. Tsiampali, J., Neumann, S., Giesen, B., Koch, K., Maciaczyk, D., Janiak, C., ... & Maciaczyk, J. (2020). Enzymatic activity of CD73 modulates invasion of gliomas via epithelial–mesenchymal transition-like reprogramming. *Pharmaceutics*, 13(11), 378.
88. Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor heterogeneity in breast cancer. *Frontiers in medicine*, 4, 227.
89. Turner, K. M., Yeo, S. K., Holm, T. M., Shaughnessy, E., & Guan, J. L. (2021). Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *American journal of physiology. Cell physiology*, 321(2), C343–C354.
90. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & P Zhou, B. (2013). The role of snail in EMT and tumorigenesis. *Current cancer drug targets*, 13(9), 963-972.
91. Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. *International journal of oncology*, 57(6), 1245-1261.
92. Xia, C., Yin, S., To, K. K., & Fu, L. (2023). CD39/CD73/A2AR pathway and cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 22(1), 1-17.
93. Xia, Y., Sun, M., Huang, H., & Jin, W. L. (2024). Drug repurposing for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 92.
94. Zhang, H., Kong, Q., Wang, J., Jiang, Y., & Hua, H. (2020). Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer. *Experimental hematology & oncology*, 9, 1-13.
95. Zhang, H., Liu, Y., Liu, J., Chen, J., Wang, J., Hua, H., & Jiang, Y. (2024). cAMP-PKA/EPAC signaling and cancer: the interplay in tumor microenvironment. *Journal of Hematology & Oncology*, 17(1), 5.
96. Zhi, X., Chen, S., Zhou, P., Shao, Z., Wang, L., Ou, Z., & Yin, L. (2007). RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast

cancer cell growth and invasion. Clinical & experimental metastasis, 24, 439-448.