BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular

Comparación del papel de los receptores purinérgicos en la dinámica de calcio intracelular en células obtenidas de un tumor primario inducido en un ratón BALB/c y la línea LP07

Tesis que para obtener el grado de

LICENCIADA EN BIOMEDICINA

Presenta:

Itzel Toledo Bandala



Director:

D. C. Fabián Galindo Ramírez



Codirector:

M. C. Ricardo Martínez Zavala

H. Puebla de Zaragoza. Abril de 2026.

A mi papá†, que no podrá leer esto.
A mi mamá, que sí podrá hacerlo.

Agradecimientos

Al Dr. Fabián Galindo Ramírez, por recibirme en el laboratorio de 'Cáncer y Comunicación Intercelular', por su tutoría durante la realización de este trabajo y por apoyar la difusión de nuestros proyectos de investigación.

A la Dra. Laura Guadalupe, por compartir su conocimiento, su paciencia dentro del cuarto de cultivo y por ayudarnos a creer en nosotras mismas.

Al M. C. Ricardo Martínez, por su apoyo en la codirección de este trabajo, su compromiso durante la realización de la fase experimental y por responder amablemente a cada una de las innumerables preguntas que le realicé en los últimos años.

A mis compañeros del laboratorio por la compañía y el apoyo cuando fue necesario.

Índice

Abreviaturas 6

1. Resumen 9

2. Introducción 10

2.1 Cáncer 10

2.1.1 Etiología 10

2.1.2 Epidemiología 10

2.1.3 Progresión tumoral 10

2.1.4 Heterogeneidad celular 11

3. Antecedentes 13

3.1 Antecedentes generales 13

3.1.1 Cáncer de pulmón 13

3.1.1.2 Epidemiología 13

3.1.1.3 Factores de riesgo 13

3.1.1.4 Clasificación 14

3.1.2 Microambiente tumoral 15

3.1.3 El ATP como molécula de señalización 16

3.1.4 Receptores purinérgicos 17

3.1.4.1 Receptores purinérgicos P2 18

3.1.5 Calcio intracelular 21

3.2 Antecedentes específicos 23

3.2.1 Líneas celulares derivadas de tumores pulmonares 23

3.2.2 Línea celular LP07 25

3.2.2.1 P07 25

3.2.2.2 Histología 25

3.2.2.3 LP07 25

3.2.2.4 Características del cultivo *in vitro* y morfología 26

3.2.2.5 Comportamiento *in vivo* 26

3.2.3 ATP en el microambiente tumoral 27

4. Planteamiento del problema 28

5. Objetivos 29

5.1 Objetivo general 29

5.2 Objetivos particulares 29

6. Materiales y métodos 30

Ratones BALB/c 30

Adaptación de la línea celular LP07 30

Formación del tumor primario 30

Resección del tumor y cultivo primario 30

Mantenimiento de las líneas celulares 31

Medición de la señalización de calcio intracelular 31

Inmunofluorescencia 32

Análisis de datos 33

7. Resultados 34
Desarrollo y obtención de tumores singénicos murinos 34
Presencia de receptores P2X y P2Y en células de cáncer de pulmón murino LP07 y LP07-T 35
Dinámica de calcio en las células LP07 y células derivadas del tumor primario ante la presencia de agonistas purinérgicos 38
Efecto del bloqueo de receptores purinérgicos con un antagonista no específico en la dinámica de calcio en la línea LP07 y LP07-T 41
Registros de la señal de calcio tras la incubación con un antagonista no específico 43
8. Discusión 44
9. Conclusiones 49
10. Perspectivas 50
11. Bibliografía 51

Abreviaturas

INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CD24	Clúster de diferenciación 24, marcador de superficie celular
CD44	Clúster de diferenciación 44, marcador de superficie celular
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory (Observatorio Global de Cáncer)
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
SCLC	Small cell lung cancer (cancer de pulmón de células pequeñas)
NSCLC	Non-small cell lung cancer (cáncer de pulmón de células no pequeñas)
AT2	Alveolar type 2 cells (células alveolares de tipo 2)
MAT:	Microambiente tumoral
LLC	Carcinoma pulmonar de Lewis
MAD109	Línea celular de carcinoma pulmonar murino espontáneo
KLN-205	Línea celular de carcinoma de pulmón murino derivada de un ratón adulto
CMT	Carcinoma pulmonar alveogénico murino
MEM	Medio esencial mínimo
SFB	Suero fetal bovino
CO_2	Dióxido de carbono
ATP	Adenosín trifosfato
MEC	Matriz extracelular
DAMPs	Danger-Associated Moleuclar Patter (Patrones moleculares asociados al daño)
Ca^{2+}	Calcio
µM/L	Micromoles por litro
nmol/L	Nanomoles por litro
ATPe	Adenosín trifosfato extracelular
ADO	Adenosina
ATP	Adenosina 5’ trifosfato
UTP	Trifosfato de uridina
UDP	Difosfato de uridina

CD39	Ectonucleotidasa, convierte ATP en AMP
CD73	Ectonucleotidasa, desfosforila AMP en adenosina
VRAC	Volume-regulated anion channel (Canal de aniones regulado por volumen)
PKA	Proteína cinasa A
SOC	Store-operated calcium (entrada de calcio operada por reservas)
ROC	Receptor-operated calcium (entrada de calcio operada por receptores)
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de calcio intracelular
GLUT1	Glucose transporter 1 (transportador de glucosa tipo 1)
NFATcl	Nuclear factor of activated T-cells, citoplásmico 1 (factor nuclear de células T activadas, isoforma citoplásmica 1)
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ER	Retículo endoplásmico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
$[Ca^{2+}]_{cit}$	Concentración de calcio citoplásmico
mM	Milimolar
IP_3	1,4,5-trifosfato
GPCR	G protein coupled receptors (receptores acoplados a proteínas G)
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico/endoplásmico)
RyRs	Receptores de rianodina
UCM	Uniportador de Ca2+ mitocondrial
CaM	Calmodulina
CAMKII	Protein kinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CAMKIV	Protein kinasa IV dependiente de calcio/calmodulina
PMCAS	Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase (ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1 (canal aniónico dependiente de voltaje tipo 1)
HEPES	Ácido N-2-hydroxietilpiperazina-N´-2-etanosulfónico
PFA	Paraformaldehído

BSA	Albúmina de suero bovino
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
ABC	Área bajo la curva
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico

1. Resumen

La señalización de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$ regula varios procesos primordiales en la biología del cáncer, como la proliferación celular, la metástasis y la capacidad de evitar la muerte celular. En particular, se ha documentado que los receptores purinérgicos (P2) participan en la progresión de varios tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de pulmón. En este trabajo se comparó la dinámica de calcio mediada por receptores purinérgicos entre células obtenidas de un tumor primario de adenocarcinoma pulmonar inducido en ratones BALB/c y la línea celular LP07. Para comparar la dinámica de calcio entre ambas líneas se realizó un cultivo primario a partir de los tumores inducidos y se midieron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en ambos modelos mediante microscopía confocal tras la carga con el indicador fluorescente Fluo-4 FF AM. Las células fueron estimuladas con los agonistas purinérgicos ATP y UTP, y tratadas con el antagonista purinérgico no selectivo suramina. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba *U de Mann-Whitney* para muestras independientes. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en el área bajo la curva (ABC) y la respuesta máxima de fluorescencia al estimular con ATP y UTP. De igual forma, se obtuvieron diferencias no significativas ($p > 0.05$) en el área bajo la curva y la respuesta máxima al inhibir con suramina el tumor primario y la línea LP07. Los resultados sugieren que los receptores purinérgicos envueltos en la señalización de Ca^{2+} se conservan similarmente entre ambos modelos al ser estimulados con agonistas, sin embargo, al bloquear los receptores purinérgicos con un antagonista se observa una disminución en la intensidad de la respuesta obtenida.

2. Introducción

2.1 Cáncer

2.1.1 Etiología

El término cáncer proviene del latín *cancer*, *cancri* (cangrejo) y este del griego *Kárkinos,* "cangrejo", bautizado así por Hipócrates, ya que la progresión de la enfermedad le recordaba a un cangrejo en movimiento (1). A partir de esta raíz derivaron los términos carcinoma (tumor maligno) y cáncer (tumor maligno ulceroso). Posteriormente en el siglo XIX, el término cáncer fue definido como una neoplasia maligna (2). De acuerdo con Herrera-Gómez y colaboradores (3) este término se utiliza para nombrar un grupo de enfermedades distinguidas por el desarrollo de células que crecen descontroladamente, pueden invadir otros tejidos y destruir la arquitectura tisular.

2.1.2 Epidemiología

El cáncer es una enfermedad que se extiende a todas las regiones del planeta, siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial (4). La Organización Mundial de la Salud estima que en 2030 habrá 21.4 millones de casos nuevos en el mundo. Según el INEGI, este conjunto de enfermedades representa la tercera causa de muerte en nuestro país, antecedido por las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus, en primer y segundo lugar, respectivamente (5).

2.1.3 Progresión tumoral

La carcinogénesis consiste en tres etapas: inicio, promoción y progresión (6). Esta enfermedad es el resultado de un conjunto de alteraciones en el ADN que dan lugar a diversas mutaciones, si bien no todas las mutaciones dan lugar a cambios en el fenotipo celular; algunas pueden provocar cambios que provoquen la muerte celular, un crecimiento celular descontrolado, displasia o metaplasia celular (7). El fenotipo proliferativo hereda el material genético a su progenie, iniciando así un proceso de autorreplicación continua. Las células que han adquirido una ventaja proliferativa suelen invadir y colonizar el tejido en el que se encuentren. Con el paso del tiempo, pueden surgir subpoblaciones celulares dentro del mismo tumor con capacidades o ventajas aún mayores. En la mayoría de los casos, los tumores atraviesan una progresión de lesiones benignas a tumores *in situ* a neoplasias malignas invasivas (6). Este proceso continuo de selección de clones y subclones, llamado evolución

clonal, puede concluir en la aparición de un clon celular cuyo crecimiento altera la arquitectura tisular normal, manifestándose como una masa o proliferación visible al microscopio, denominado tumor (8,9).

Para describir a los tumores de bajo impacto, se emplea el término "benigno", el cual hace referencia a aquellos tumores que tienen bordes bien definidos y no invaden otras zonas del cuerpo (10). La expresión "tumor maligno" o "cáncer" se utiliza para describir una forma más compleja de una neoplasia, la cual se caracteriza por la invasión a tejidos continuos o distales, pudiendo desencadenar una patología sistémica y, finalmente, la muerte del hospedador (10).

El desarrollo del cáncer es promovido mediante procesos moleculares multifactoriales que engloban interacciones entre genes y el ambiente en el que se encuentra el organismo, mediante un proceso conocido como carcinogénesis, tumorigénesis u oncogénesis (11).

El trasfondo molecular del cáncer lo convierte en una patología con un amplio espectro de agentes causales, desde mutaciones genéticas, epimutaciones, disruptores celulares, exposición a ciertos virus y factores medioambientales (12). Esta patología puede desarrollarse en cualquier tipo de tejido u órgano dentro del cuerpo (13), convirtiéndola en una enfermedad peligrosa para la vida y representando un gran peso para los sistemas de salud.

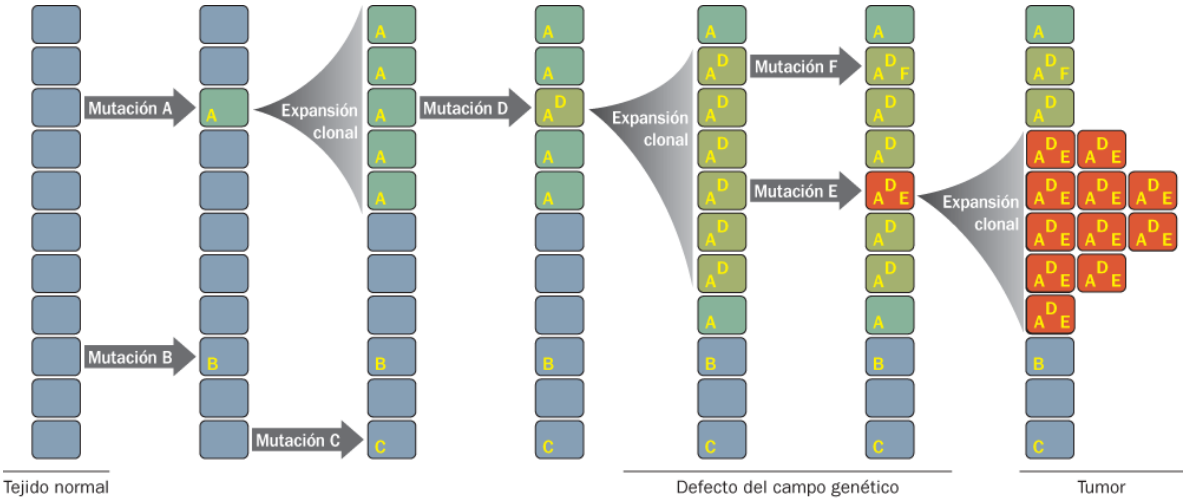
En los últimos años ha sido posible la caracterización de células tumorales antes de iniciar un tratamiento, lo cual confiere una ventaja al paciente al momento de seleccionar un tratamiento según las particularidades moleculares del tumor. Además, esto puede facilitar realizar análisis posteriores sobre el microambiente tumoral para mejorar las estrategias terapéuticas (3).

2.1.4 Heterogeneidad celular

Cada división celular tiene la posibilidad de originar alteraciones genómicas que pueden derivar en distintos escenarios fenotípicos (**figura 1**). Algunos genotipos pueden propiciar ventajas en la capacidad de proliferación, supervivencia u otras ventajas que permitan la expansión clonal (14). Las características adquiridas al inicio de la tumorigénesis abarcan mayores capacidades proliferativas y de supervivencia (9).

Un cáncer que ha sido caracterizado por ciclos continuos de proliferación a partir de líneas celulares en expansión da lugar a una heterogeneidad en la población celular tumoral mediante un cuello de botella que elimina, a medida que las células se dividen, la heterogeneidad entre las células que no se replicaron (2). Esta heterogeneidad celular añade cierta complejidad al momento de intentar caracterizarlas de manera molecular o histológica y puede influir en la eficacia del tratamiento (7).

Representación esquemática de la evolución clonal del cáncer



Fuente: Gary D. Hammer, Stephen J. McPhee:
Fisiopatología de la enfermedad: una introducción a la medicina clínica, 8e
Copyright © McGraw-Hill Education. Todos los derechos reservados.

Figura 1. Ciertas mutaciones pueden dar resultado un fenotipo proliferativo que puede formar un subclón. Mutaciones en este subclón pueden proporcionar una mayor capacidad proliferativa, entre otras ventajas. Las mutaciones que propician el crecimiento anormal fuera de los límites tisulares pueden llevar a la formación de un tumor con consecuencias morfológicas y patológicas. Tomado de: Hammer GD, McPhee SJ. *Fisiopatología de la enfermedad: una introducción a la medicina clínica* [Internet]. 8.ª ed. Ciudad de México: McGraw-Hill Education; 2019 [citado el 2 ago 2025]. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com (9)

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Cáncer de pulmón

3.1.1.2 Epidemiología

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más diagnosticadas y la principal causa de muerte por cáncer a nivel global (8,9). En 2022 fueron diagnosticados cerca de 2.5 millones de casos en todo el mundo. De acuerdo con la GLOBOCAN, es el tumor maligno más frecuente y la principal causa de muerte en hombres. En mujeres, esta enfermedad ocupa la tercera posición en incidencia y la segunda en mortalidad (15). La misma institución predice más de 35 millones de casos nuevos de este tipo de cáncer en 2050. Este tipo de patología tiene una elevada carga de morbilidad, representando el 12.4% de los casos nuevos de cáncer (16).

En nuestro país, la incidencia de cáncer de pulmón ha incrementado desde 1970. Este tipo de cáncer ocupa el quinto lugar en frecuencia y es la principal causa de muerte por cáncer. Según el sexo, en hombres representa el segundo lugar tanto en incidencia como en mortalidad, mientras que en mujeres se ubica en el séptimo lugar en incidencia y en el quinto lugar en mortalidad (4).

3.1.1.3 Factores de riesgo

El surgimiento de cambios moleculares en células bronquiales o alveolares suele tener como raíz la exposición a carcinógenos como la contaminación o el tabaco, siendo este último considerado el mayor factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón, y el agente causal de hasta un tercio de los casos (4,17). Algunos otros factores de riesgo importantes son la exposición a ciertos materiales como el asbesto, la leña o los metales como el níquel, el arsénico, el cadmio o el radón (15).

Cada año incrementa la evidencia disponible que indica que la exposición a la contaminación del aire por partículas en suspensión, las cuales se clasifican según su diámetro, en gruesas (2.5-10 μm), finas (0.1-2.5 μm) y ultrafinas (≤0.1 μm) (18), son consideradas un riesgo ambiental significativo para el desarrollo de cáncer de pulmón (19), así como la práctica de estilos de vida no saludables, como el consumo de cigarrillos electrónicos, aumentan potencialmente el riesgo de carcinogénesis (20). Hay evidencia que

respalda que el uso de cigarrillos electrónicos promueve la transición epitelio-mesenquimal (TEM) e interfiere con los mecanismos de reparación del ADN, lo cual apoya el nexo entre el uso de cigarrillos electrónicos y la progresión del cáncer (21), aunque esta relación aún no está del todo establecida (22).

3.1.1.4 Clasificación

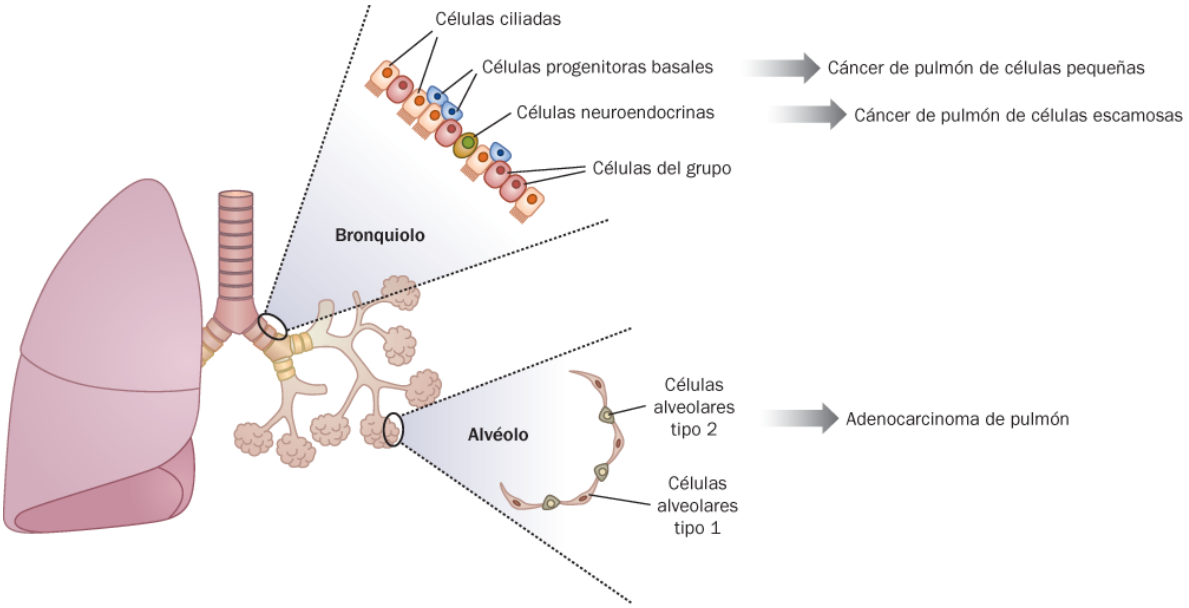
Existen diferentes tipos distintos de cáncer que se desarrollan en el pulmón, los cuales surgen de distintas células que se encuentran en el epitelio bronquial y alveolar (**figura 2**) (9). El cáncer de pulmón se divide en dos subtipos histológicos principales: 1) cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y 2) cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), siendo este último el más común, representando hasta el 85% de los diagnósticos totales (8).

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se clasifica histológicamente en tres categorías según su morfología y patrones de crecimiento: 1) adenocarcinoma pulmonar, 2) carcinoma pulmonar de células escamosas, derivado de células progenitoras basales que recubren el epitelio bronquiolar (9) y 3) carcinoma de células grandes, categoría que abarca los subtipos más raros (8).

Los casos de adenocarcinoma pulmonar suman hasta el 60 % de los casos totales de cáncer de pulmón. Este subtipo de cáncer de pulmón surge en la zona distal del pulmón a partir de células alveolares de tipo II (AT2) (23). Histopatológicamente, el adenocarcinoma de pulmón suele clasificarse en tres grupos: 1) lesiones de adenocarcinoma preinvasivo, que engloban las lesiones de hiperplasia adenomatosa atípica y el adenocarcinoma *in situ, 2)* adenocarcinoma mínimamente invasivo y 3) enfermedad extensamente invasiva (24,25). En cambio, el carcinoma de células escamosas suele desarrollarse en el área central, a partir de células basales epiteliales de las vías aéreas (17,26).

El NSCLC posee un trasfondo genético diverso; esto se debe a la existencia de distintas mutaciones o a la influencia de factores epigenéticos, los cuales pueden influir en la progresión de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento (27).

Poblaciones celulares del tracto respiratorio.



Fuente: Gary D. Hammer, Stephen J. McPhee:
Fisiopatología de la enfermedad: una introducción a la medicina clínica, 8e
Copyright © McGraw-Hill Education. Todos los derechos reservados.

Figura 2. Las células que recubren el sistema respiratorio son distintas en las vías respiratorias proximales y en los alvéolos distales. Los distintos tipos de cáncer de pulmón provienen de diferentes tipos celulares ubicados dentro del tracto respiratorio. Tomado de: Hammer GD, McPhee SJ. *Fisiopatología de la enfermedad: una introducción a la medicina clínica* [Internet]. 8.ª ed. Ciudad de México: McGraw-Hill Education; 2019 [citado el 2 ago 2025]. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com (9).

Actualmente existen diversas opciones para tratar el NSCLC que incluyen quimioterapia, radioterapia, cirugía mínimamente invasiva, terapia fotodinámica o terapia molecularmente dirigida (16,28). El tratamiento elegido depende de diversos factores como el estadio del cáncer, el estado del paciente y la respuesta a tratamientos previos. Los avances en estas opciones terapéuticas se han visto impulsados gracias al uso de modelos singénicos preclínicos, los cuales han sido fundamentales para poder evaluar la eficacia de nuevas opciones de tratamiento (20).

3.1.2 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral (MAT) hace referencia a un "nicho ecológico" que es capaz de estimular la progresión tumoral (29). Este concepto hace referencia a un ambiente celular dinámico y al sitio que rodea e interactúa con el tumor dentro del tejido hospedador. Este incluye vasos sanguíneos, células inmunes, la matriz extracelular, células endoteliales, células estromales y moléculas de señalización (30).

Las células inmunes presentes en el MAT pueden incluir macrófagos asociados a tumores con fenotipo M2, neutrófilos asociados a tumores con fenotipo N2, células

supresoras de origen mieloide, mastocitos y células asesinas naturales, las cuales producen una variedad de factores (quimiocinas, citocinas y enzimas) que actúan directa o indirectamente como factores proangiogénicos (31). Los vasos sanguíneos que se forman suelen ser defectuosos y con un funcionamiento deteriorado, lo cual conduce a la formación de un ambiente hipóxico, una característica importante dentro del MAT que afecta la plasticidad celular y la heterogeneidad tumoral (29). La composición del MAT influye en varios procesos de las células tumorales, incluidos el metabolismo, la proliferación, la motilidad, la capacidad metastásica y la respuesta al tratamiento (32).

En las últimas décadas, el concepto de microambiente tumoral (MAT) ha despertado interés dentro del campo de la biología celular del cáncer debido a su rol en fomentar o restringir el desarrollo del tumor (33). La composición del microambiente tumoral se ha vuelto un nuevo objetivo terapéutico. Una vez comenzada la tumorigénesis, las células tumorales y otras células que han sido invadidas por tumores son capaces de liberar grandes cantidades de ATP al medio extracelular, metabolitos que acidifican el MAT, enzimas que son capaces de degradar la matriz extracelular (MEC) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (34,35).

3.1.3 El ATP como molécula de señalización

En 1970, Burnstock y colaboradores publicaron que un nucleótido de purina, muy probablemente el ATP, participaba como neurotransmisor primario y se liberaba desde nervios inhibidores no adrenérgicos no colinérgicos presentes en el tracto gastrointestinal (36). Luego, en 1972, Burnstock formalizó su hipótesis purinérgica en la neurotransmisión, la cual introdujo el concepto de ATP como una molécula de señalización extracelular (34,37).

Esta hipótesis, si bien no fue del todo recibida por la comunidad científica en sus inicios, fue finalmente aceptada a principios de la década de los 90, cuando los primeros receptores de purinas y pirimidinas fueron clonados y caracterizados (38). Años después de la publicación de la hipótesis purinérgica, se creía que la fuente principal de ATP extracelular provenía de células dañadas o a punto de morir. Actualmente se conoce que las moléculas de ATP también son liberadas desde células no neuronales a través de vías específicas y no específicas (32,39).

El ATP tiene dos papeles importantes; uno de ellos es la transducción de energía y el otro es como molécula de señalización (40). Según Vultaggio-Pomma et al. (11), el ATP tiene

las características necesarias para ser un mensajero extracelular: se encuentra prácticamente ausente en el espacio extracelular (hasta 0.1 μM) (41), se almacena en grandes cantidades en el interior de las células, es soluble en agua, se degrada rápidamente mediante nucleotidasas extracelulares y se une específicamente a receptores membranales (32). Esta molécula puede donar grupos fosfato para activar diversos sustratos en reacciones metabólicas, es necesaria para la biosíntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y también funge como mensajero extracelular (42).

Existe evidencia que indica que las moléculas de ATP no pueden difundirse a través de la membrana plasmática (46). Hasta la fecha, no se ha demostrado la existencia de algún transportador presente en la membrana plasmática que sea específico para ATP, sin embargo, se han descrito cinco familias de canales que potencialmente podrían mediar varias formas de liberación de ATP al medio extracelular, estos son: hemicanales de conexinas, panexina 1, modulador de la homeóstasis del calcio 1, canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) y maxi-canales aniónicos (32,43). El ATP, mediante la activación de receptores purinérgicos, participa en conjunto con otras vías en la regulación de varios procesos celulares, como la proliferación celular, diferenciación y migración, apoptosis y otros procesos que son vitales para la supervivencia celular (30).

3.1.4 Receptores purinérgicos

Los nucleótidos de purinas o pirimidinas son moléculas de señalización con receptores específicos presentes en la membrana celular, llamados receptores purinérgicos (44). Este tipo de receptores se han visto involucrados en el desarrollo de diversas patologías, incluyendo procesos neurodegenerativos, enfermedades inmunes, trastornos inflamatorios y también tienen un papel significativo en la progresión y diseminación de distintas neoplasias (30,45).

Esta familia de receptores se clasifica en tres grupos. Los receptores purinérgicos P0, que responden a las moléculas de adenina, P1 (A1R, A2AR, A2BR y A3R), cuyo ligando es la adenosina; y los receptores purinérgicos P2, que son activados por nucleótidos extracelulares (46,47). Este trabajo de tesis se enfocó en los receptores purinérgicos P2.

3.1.4.1 Receptores purinérgicos P2

Los receptores purinérgicos P2 se clasifican en dos subfamilias: P2X y P2Y. El primer grupo, P2X, engloba siete tipos de receptores ionotrópicos no selectivos ($P2X_{1-7}$) formados por tres subunidades que pueden ser homotriméricas o heterotriméricas (48). Los dominios C-terminal y N-terminal se encuentran intracelularmente, los cuales permiten la entrada de Ca^{2+} (regulada por el segmento N-terminal) y Na^{+}, así como la salida de iones de K^{+} a través de la membrana plasmática, causando despolarización de la membrana (35).

El segundo grupo, P2Y, está conformado por ocho receptores acoplados a proteínas G. Dependiendo de la proteína G a la que se encuentre acoplado **(Tabla 1)**, se activarán distintas vías de señalización intracelular que dan como respuesta un cambio en la concentración citosólica de segundos mensajeros como el Ca^{2+} y el AMPc (34).

Los receptores acoplados a proteínas G_q estimulan la activación de la fosfolipasa C, creando un aumento en la concentración de IP_3, que moviliza Ca^{2+} proveniente del retículo endoplásmico (RE) (49), aumentando su concentración citosólica. Aquellos receptores acoplados a proteínas Gs o Gi relacionados con la actividad de la adenilato ciclasa, disminuyendo así los niveles de AMPc, lo cual modifica la actividad de la proteína cinasa A (PKA) (40).

Receptor	**Agonista**	**Vía de señalización**
$P2X_{1-7}$	ATP	Canal iónico activado por ligando
$P2Y_1$	ATP/ADP	Vía G_q PL-C-IP_3
$P2Y_2$	ATP/ADP/UTP/UDP	Vía G_q PL-C-IP_3
$P2Y_4$	UTP/UDP	Vía G_q PL-C-IP_3
$P2Y_6$	UTP/UDP	Vía G_q PL-C-IP_3
$P2Y_{11}$	ATP/ADP	Aumento de la AC mediada por proteínas G_s
$P2Y_{12}$	ATP/ADP	Inhibición de la AC mediada por proteínas G_i
$P2Y_{13}$	ATP/ADP	Inhibición de la AC mediada por proteínas G_i

$P2Y_{14}$	UDP-Glucosa UDP-Galactosa	Inhibición de la AC mediada por proteínas G_i

Tabla 1. Los nucleótidos actúan como agonistas en la señalización purinérgica, activando vías de señalización a través de canales iónicos activados por ligando o mediante cascadas de señalización acopladas a proteínas G (GPCR). Tabla modificada y adaptada de: Shukla S, Dalai P, Agrawal-Rajput R. Metabolic crosstalk: Extracellular ATP and the tumor microenvironment in cancer progression and therapy. Cell Signal. 2024 Sep 1;121 (45).

Dentro de las células pulmonares, se ha reportado la expresión (tanto de ARNm como de la proteína) de varios receptores purinérgicos P2 (**tabla 2**). Aunque numerosos subtipos de P2X y P2Y se encuentran ampliamente expresados en las células del pulmón distal, hasta el momento solo se han identificado funciones fisiológicas específicas y relevantes para algunas isoformas del receptor P2, principalmente en los receptores $P2X_4$, $P2X_7$ y $P2Y_2$ (50).

Tipo celular	**Receptor P2**	**Expresión**
ATII	$P2X_4$	mRNA ®, proteína ®
	$P2X_7$	mRNA ®, proteína ®
	$P2Y_2$	mRNA ®, proteína ®
	$P2Y_6$	mRNA ®, proteína ®

Tabla 2. Expresión de receptores P2 en células alveolares de tipo II en rata ®. (50). Tabla modificada y adaptada de: Wirsching E, Fauler M, Fois G, Frick M. P2 purinergic signaling in the distal lung in health and disease. Int J Mol Sci. 2020; 21:1–25 (50).

En 1980, se postuló que los receptores para ATP extracelular también se encontraban expresados en células tumorales (42), por lo que su papel en el desarrollo de esta enfermedad ha sido de interés particular desde entonces. Existen diversas condiciones relacionadas con el estrés o la muerte celular que pueden provocar que el ATP sea liberado al medio extracelular, como la hipoxia, la presencia de agentes citotóxicos, la autofagia o el daño membranal plasmático (42).

Dentro de la familia de los receptores iónicos, $P2X_7$ ha sido uno de los receptores más estudiados por su papel en el desarrollo de las neoplasias. Este receptor destaca por su capacidad de desencadenar diferentes respuestas, tanto fisiológicas como patológicas. Este tipo de receptor ocupa un papel importante en la transformación a un fenotipo tumoral de diferentes tipos celulares (40). Cuando las concentraciones de ATP son altas en el rango de micromolares, $P2X_7$ actúa como un canal iónico selectivo; en cambio, cuando se expone prolongadamente a concentraciones cercanas al rango milimolar, este receptor transiciona a un estado de poro no selectivo que permite la entrada de solutos hidrofílicos de hasta 900 Da

(51). En ambos escenarios, se observa un aumento considerable en los niveles citoplasmáticos de calcio libre (47). El receptor $P2X_7$ está en varias dimensiones de la progresión tumoral, incluyendo aspectos como el crecimiento, invasión y migración, a pesar de su actividad citotóxica activada por las altas concentraciones de ATPe en el microambiente tumoral (32).

Se han realizado estudios en líneas singénicas que expresan el receptor $P2X_7$, como el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC)(52). Se ha evidenciado que la activación de este receptor favorece la invasión y migración a través de la vía de señalización AKT (53). Una de las características más interesantes de este receptor es su capacidad para favorecer la supervivencia y el crecimiento celular en ausencia de suero bovino fetal en ciertas líneas celulares (51). La cascada de señalización activada por $P2X_7$ abarca cambios intracelulares en la concentración de Ca^{2+}, estimulación del metabolismo mitocondrial y la activación de NFATcl (un factor de crecimiento clave para la división linfocítica y el crecimiento tumoral), así como la capacidad de regular a la baja este receptor para evitar procesos apoptóticos (47). Los niveles altos de ATP presentes en el MAT podrían desencadenar una respuesta al estrés mediante los receptores P2X7, lo que podría provocar la muerte celular (54,55).

Otros miembros de la subfamilia P2X, como $P2X_1$, $P2X_3$, $P2X_5$, y $P2X_6$, también se encuentran expresados en diversos tumores como leucemias, cáncer de mama, cáncer renal y pulmonar; sin embargo, su papel en las neoplasias no está tan bien descrito como el receptor $P2X_7$. Se ha reportado que el receptor $P2X_1$ modula el metabolismo energético en la línea celular linfoblástica Jurkat (34). La presencia de $P2X_3$ se ha visto implicada en un pronóstico negativo en casos de carcinoma hepatocelular (49). Los receptores $P2X_4$ se encuentran sobreexpresados tanto en líneas celulares de glioblastoma múltiple como en carcinomas hepatobiliares; se considera que este receptor regula de manera indirecta la progresión tumoral a través de la regulación de la inflamación y de las células inmunes presentes en el microambiente (56). En el NSCLC, la regulación al alza de $P2X_4$ promueve la invasión tumoral y metástasis, mediando la inflamación y las células del sistema inmune (35). $P2X_5$, de igual forma, se sobreexpresa en ciertos tumores hematológicos; además, su sobreexpresión está ligada a un pronóstico desalentador en el cáncer de colon. $P2X_6$ se ha relacionado con cáncer renal y de mama, aunque la información disponible sobre el papel que juega en estos tipos de neoplasias no es extensa (56).

3.1.5 Calcio intracelular

Los receptores purinérgicos se caracterizan por generar un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, a través de la internalización de Ca^{2+} extracelular o mediante la movilización de Ca^{2+} almacenado en compartimentos intracelulares (57). Los iones de calcio funcionan como un segundo mensajero para la comunicación intracelular y extracelular. Las concentraciones de calcio libre en el citoplasma se encargan de regular varios procesos fisiológicos y patológicos, como la división celular, la contracción muscular, la transmisión sináptica, la liberación hormonal y respuestas del sistema inmune (58).

De acuerdo con Pierro et al. (59) estos procesos de señalización celular engloban variaciones en los niveles citoplasmáticos que forman distintos patrones que pueden variar en el espacio, tiempo y localización. Estas respuestas son reguladas por una red de canales, bombas e intercambiadores, que, en conjunto, permiten crear una homeostasis de Ca^{2+} que permite llevar a cabo estos procesos (60).

La concentración de $Ca^{2+}{}_i$ suele tener valores muy bajos (~0.1 μM), mientras que la $[Ca^{2+}]_e$ es ~1200 μM. Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ son producidos por la entrada de Ca^{2+} a través de canales ubicados en la membrana plasmática o mediante la liberación de Ca^{2+} proveniente de almacenes internos, mediante mecanismos de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o mediante la generación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) tras la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (**figura 5**) (58).

En las células, el almacén más importante de Ca^{2+} es el retículo endoplásmico (RE), siendo capaz de almacenar 100 y 800 μM Ca^{2+} (49). El RE captura el Ca^{2+} presente en el citosol a través de la bomba RE Ca^{2+}-ATPasa (SERCA). El Ca^{2+} es liberado del RE al espacio citosólico mediante dos familias de receptores: los receptores de rianodina (RyRs) y los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Los RyRs pueden ser activados por el Ca^{2+} mismo, provocando una liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (59).

La señalización de Ca^{2+} finaliza con la participación de bombas e intercambiadores, como las Ca^{2+}ATPasas (PMCAS), SERCAS, a través mecanismos de recaptación mitocondrial de Ca^{2+} mediante canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC1), el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (UCM), calmodulina (CaM) y sus efectores, CaMK, calcineurina y PKC, intercambiadores de Ca^{2+} en el aparato de Golgi y en los lisosomas, los

cuales expulsan al Ca^{2+} de la célula o vuelven a internalizarlo en los almacenes correspondientes (61,62).

Señalización de Ca^{2+} mediante receptores P2

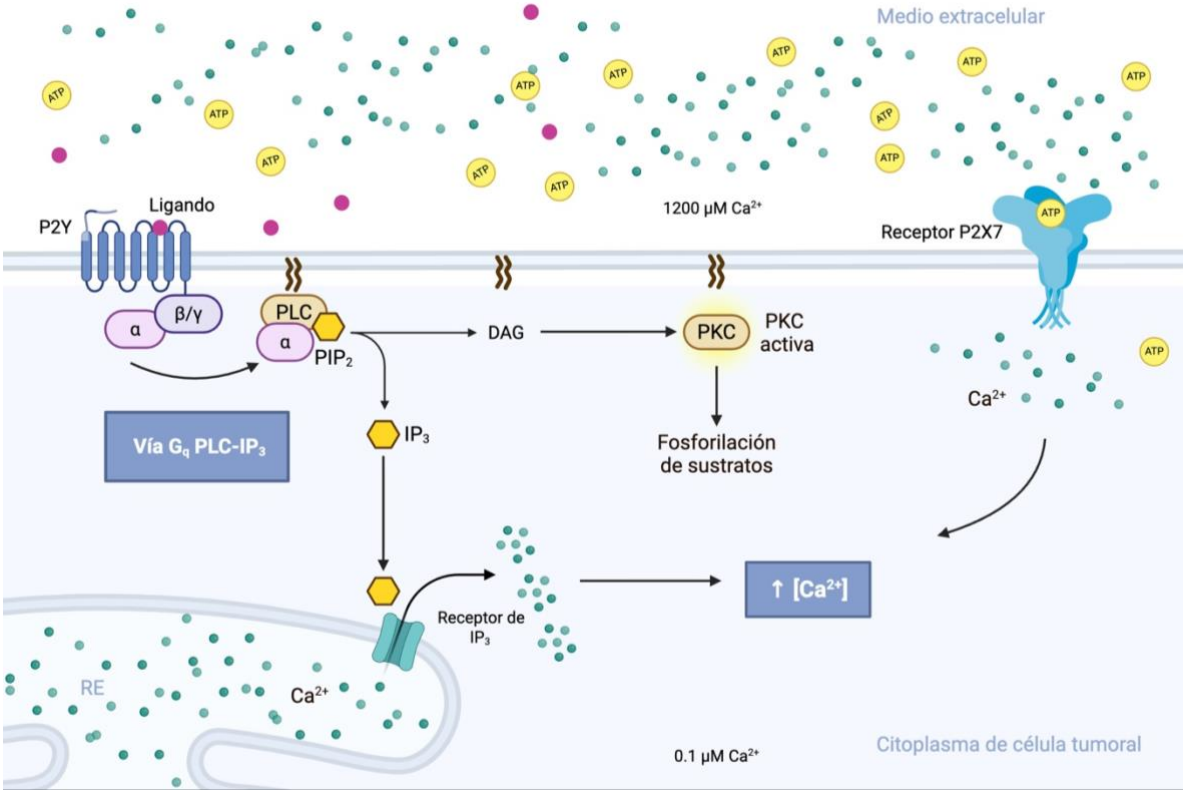


Figura 3. Los iones de calcio pueden ingresar al interior de la célula a través de los receptores purinérgicos P2X, los cuales se activan a través de distintos tipos de ligando, como el ATP, provocando un aumento inmediato en la concentración de Ca^{2+} intracelular, en comparación con los receptores P2Y, los cuales liberan iones de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares. Creado con Biorender.com.

Las ($[Ca^{2+}]_{cit}$) elevadas, como consecuencia de una mayor sobreexpresión de receptores purinérgicos, pueden alterar mecanismos mediante los cuales las células tumorales son capaces de evadir las defensas antitumorales y contribuyen a la desdiferenciación celular, inducción de la angiogénesis, aumento en la expresión de la telomerasa, un incremento en la motilidad y contribuyen a la resistencia a los tratamientos, lo cual convierte a la maquinaria involucrada en blancos potenciales para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas (63,64).

En la línea celular de cáncer de pulmón humano A549 se ha registrado que un incremento prolongado en la ($[Ca^{2+}]_{cit}$) inducido por ATPe puede ser regulado por la

sobreexpresión de receptores P2 (65). En esta línea celular se ha descrito la expresión de $P2X_3$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_6$, $P2X_7$, $P2Y_2$, $P2Y_6$, $P2Y_{12}$ y $P2Y_{14}$ (48). No obstante, la respuesta biológica producida por un cambio en las concentraciones de Ca^{2+} dependerá de la magnitud, la frecuencia y la localización celular en donde se registre este cambio (66). Se ha reportado que la unión de los ligandos ATP, UTP y UDP a los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ estimula la proliferación celular en esta línea celular (65). Los niveles mantenidos de ($[Ca^{2+}]_{cit}$) pueden inducir la muerte celular o alterar vías tumorigénicas dependientes de calcio (58).

En el tejido pulmonar, la concentración de $Ca^{2+}{}_{cit}$ se encuentra relacionada con el control de la secreción de surfactante pulmonar y el transporte de K^+ por las células alveolares de tipo II (57). La señal de Ca^{2+} inducida por ATP en las células alveolares de tipo II presenta al menos dos fases: primero se observa un pico breve e intenso, seguido de una fase de meseta. El pico es producto de la liberación de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares mediada por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), mientras que la fase de meseta depende de la entrada sostenida de Ca^{2+} a través de mecanismos que aún no han sido claramente definidos (50).

El papel del Ca^{2+} en la regulación de procesos como la proliferación y la apoptosis, los cuales representan dos procesos que se encuentran desregulados en células tumorales, nos indica que las terapias que modulan la señalización de Ca^{2+} en células tumorales podrían representar una opción terapéutica (58). Lo anterior, convierte la señalización de Ca^{2+} en una opción terapéutica atractiva para el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer (63).

3.2 Antecedentes específicos

3.2.1 Líneas celulares derivadas de tumores pulmonares

La mayoría de los experimentos en biología del cáncer se realizan utilizando tumores humanos o líneas celulares que se han establecido a partir de células tumorales humanas que han sido inoculadas en ratones inmunosuprimidos o de tumores que se han inducido mediante radiación o carcinógenos (23). El desarrollo de líneas celulares tumorales inmortales murinas comenzó en la década de 1950 (como se ilustra en la **figura 3**). Lo anterior ha permitido que hasta la fecha se hayan desarrollado diversas líneas celulares que surgieron a partir de tumores pulmonares espontáneos murinos, los cuales son considerados infrecuentes.

Existe el registro de más de 200 líneas celulares de NSCLC en la actualidad (26). Se trabaja principalmente con cuatro modelos singénicos que están disponibles para su compra y que son capaces de generar un tumor dentro del pulmón luego de su implantación o a través

de un proceso de metástasis en modelos subcutáneos xenógrafos (20); en 1951 se estableció la línea celular de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), luego en 1964 surgió la línea celular Madison (MAD109), posteriormente en 1971 se registró la línea celular KLN-205, más tarde se estableció la línea celular de carcinoma pulmonar alveogénico murino (CMT) 167 en 1976. Además, en 1998 se estableció una nueva línea celular de adenocarcinoma pulmonar derivada de un tumor espontáneo en un ratón hembra *BALB/c* llamada LP07 (67).

El uso de modelos subcutáneos proporciona una ventaja sobre el uso de modelos de tumores ortotópicos, los cuales generalmente tienen una variabilidad experimental más alta en comparación con los modelos subcutáneos (20). Estos modelos son una forma directa de establecer y monitorear tumores, puesto que su tiempo de evolución es breve y confiable, convirtiéndolos en modelos ventajosos para poder evaluar los efectos de nuevos fármacos en el crecimiento del tumor, su regresión o la respuesta al tratamiento, fungiendo como una herramienta importante para marcar la pauta de diversos tratamientos (68). Asimismo, permiten estudiar la evolución tumoral en la ausencia de algún tratamiento, algo que no es posible en la práctica clínica, e incluso permiten mejorar el entendimiento de la biología del cáncer, aunque su utilidad podría recaer en su capacidad de imitar el mismo comportamiento *in vivo* del tumor dentro de su hospedero (26).

Cronología de avances en modelos preclínicos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

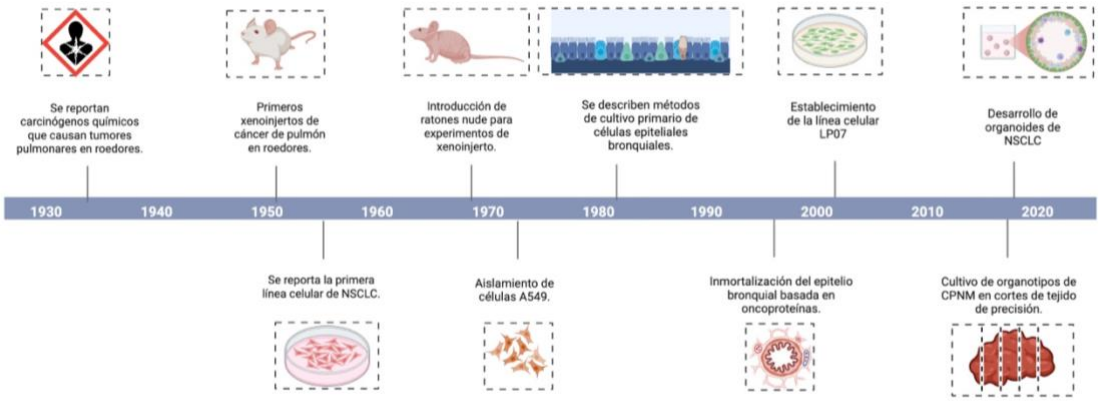


Figura 4. Adaptado de: Hynds RE, Frese KK, Pearce DR, Grönroos E, Dive C, Swanton C. Progress towards non-small-cell lung cancer models that represent clinical evolutionary trajectories. *Open Biol.* 2021;11(10):210086 (26). Creada en Biorender.com

3.2.2 Línea celular LP07

3.2.2.1 P07

En 1998 se reportó un tumor pulmonar murino, denominado P07, que surgió en una hembra de ratón *BALB/c* de doce meses de edad. Este tumor causó en su hospedador algunos de los síndromes paraneoplásicos encontrados con frecuencia en humanos, como leucocitosis, hipercalcemia y caquexia. Se reportó que el tumor, después de ser inoculado, crece en ratones singénicos de ambos sexos, desarrollando caquexia, metástasis pulmonar en el 100% de los casos, con capacidad de migración hacia los ganglios linfáticos y el hígado (69).

3.2.2.2 Histología

Este tumor presenta un patrón distintivo caracterizado por células uniformes con núcleos hipercromáticos, de forma redonda a ovalada y nucléolos discretos, mezclados en una arquitectura básica compuesta por cúmulos sólidos y estructuras semejantes a conductos. El tumor P07 es un adenocarcinoma pobre a moderadamente diferenciado, trasplantable mediante inyección subcutánea (67).

3.2.2.3 LP07

En 2001, Urtreger y colaboradores (67) obtuvieron una nueva línea celular derivada del tumor P07, la cual fue nombrada LP07. Esta línea se obtuvo mediante digestión enzimática de fragmentos del tumor P07. Las células viables se cultivaron en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina y 80 µl/ml de gentamicina, en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 (67).

3.2.2.4 Características del cultivo *in vitro* y morfología

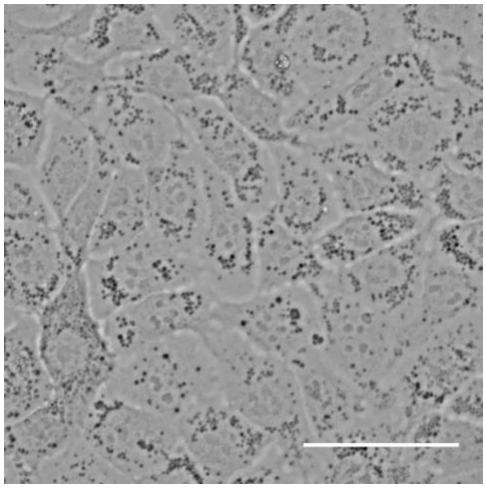


Figura 5. Micrografía en campo claro que muestra la morfología de la línea celular LP07. Objetivo 20x.

La línea celular LP07 crece en monocapa, compuesta mayormente por células epiteliales poliédricas altamente heterogéneas en tamaño y forma citoplasmática y nuclear. Se observan abundantes gránulos intracelulares con localización perinuclear en el citoplasma. La morfología celular no cambia a lo largo de los pasajes *in vitro*, ni tras su congelamiento con nitrógeno y posterior descongelación (67). Su crecimiento *in vitro* requiere medio MEM suplementado con 10% SFB. No se desprenden fácilmente de la superficie al momento de la tripsinización, y tienden a agruparse en cúmulos al desprenderse. La viabilidad celular supera el 95% tras ser subcultivada (67).

3.2.2.5 Comportamiento *in vivo*

La línea celular LP07 es capaz de generar tumores subcutáneos en ratones en el 100% de los intentos. Tras la inoculación subcutánea, las células se desarrollan en adenocarcinoma pobremente diferenciado. LP07 tiene la capacidad de metastatizar en el pulmón. En los modelos que han sido inoculados con LP07 se observa leucocitosis, hipercalcemia y una pérdida de peso sustancial (67).

Debido a sus características morfológicas y a su capacidad para generar tumores subcutáneos, la línea celular LP07 constituye un modelo preclínico de gran utilidad para el estudio del adenocarcinoma pulmonar y sus mecanismos de progresión en biomodelos inmunocompetentes. Se ha propuesto que este modelo celular puede ser útil para el estudio de la biología del cáncer del pulmón y, a su vez, para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas, lo cual podría dar lugar a la generación de conocimiento que pueda permitir nuevos avances clínicos en el tratamiento del cáncer de pulmón.

3.2.3 ATP en el microambiente tumoral

Se ha establecido que el ATP tiene un rango de concentración en el microambiente tumoral de 100-500 μM (34), en comparación con las condiciones fisiológicas normales extracelulares que se sitúan entre 0.01–0.1 μM (32). La concentración de ATP intracelular fisiológica varía entre 1 y 10 μM (45). Las concentraciones de ATP en el microambiente tumoral son consecuencia de los procesos de muerte celular, inflamación y liberación continua, convirtiendo al MAT en un ambiente rico en ATP extracelular (ATPe) y adenosina (ADO), que es el producto de la degradación del ATP por ectonucleidasas (por ejemplo, CD39 y CD73) presentes en el MAT (70).

El ATP presente en el medio extracelular puede regular la proliferación, migración, invasión o muerte celular mediante la activación de los receptores purinérgicos presentes en las membranas de las células tumorales y en células sanas (35).

4. Planteamiento del problema

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) representa una de las principales causas de muerte a nivel global, por lo que es necesario seguir desarrollando nuevas opciones terapéuticas que reduzcan la mortalidad de este tipo de enfermedad. Para lograrlo, el uso de modelos preclínicos que repliquen el comportamiento tumoral rodeado por el microambiente tumoral es de gran utilidad.

No obstante, se desconoce si las líneas celulares cultivadas in vitro, como lo es la línea celular LP07, mantienen los mismos patrones de señalización de calcio al ser expuestas a las condiciones fisiológicas del microambiente tumoral (hipoxia, acidez, hipertensión intersticial, entre otras). El microambiente tumoral tiene un impacto significativo en procesos celulares y posiblemente en la expresión de receptores en la membrana celular. No se ha establecido si esta dinámica de calcio se ve alterada o conservada en las células LP07 una vez que han sido expuestas a las condiciones del microambiente tumoral en un organismo vivo. La evidencia disponible sobre si los patrones de señalización de calcio inducidos por la presencia de moléculas purinérgicas observados en un cultivo celular se conservan después de la exposición al microambiente tumoral es insuficiente.

Debido a lo anterior, determinar si existen diferencias entre la señalización de calcio mediada por receptores purinérgicos entre ambos modelos celulares podrá calificar la utilidad de la línea LP07 como modelo preclínico en el estudio de adenocarcinoma de pulmón. Por lo tanto, se vuelve necesaria la existencia de un estudio comparativo que contribuya al conocimiento y validación de los modelos utilizados para el cáncer de pulmón.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Comparar la presencia de receptores purinérgicos y la dinámica de calcio intracelular entre la línea celular de adenocarcinoma pulmonar murino LP07 y células obtenidas de un tumor primario inducido en un ratón BALB/c.

5.2 Objetivos particulares

1. Generar un tumor primario en un ratón inmunocompetente BALB/c a partir de la línea celular de adenocarcinoma pulmonar LP07.

2. Comparar la presencia de receptores P2X y P2Y en células de cáncer de pulmón murino LP07 y en las células obtenidas de un tumor primario inducido en un ratón BALB/c. mediante inmunofluorescencia.

3. Evaluar y comparar los cambios en los niveles intracelulares de calcio secundarios a la activación de receptores purinérgicos en ambos cultivos celulares.

4. Determinar el efecto del bloqueo de receptores purinérgicos con antagonistas en la dinámica de calcio en ambos cultivos celulares.

7. Materiales y métodos

Ratones BALB/c

Se utilizaron dos ratones BALB/c machos de entre 2 y 4 meses de edad provenientes del bioterio "Claude Bernard" de la BUAP. Se mantuvieron bajo las condiciones estándar del bioterio con alimentación e hidratación *ad libitum.*

Adaptación de la línea celular LP07

Para realizar el cultivo de la línea celular LP07, el criovial se descongeló en un baño María. El contenido celular se resuspendió en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de SBF y 2X de penicilina/estreptomicina. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se desechó y el sedimento se disolvió con medio fresco suplementado y se colocó en un frasco T-25. El cultivo se mantuvo en condiciones estándar.

Formación del tumor primario

Los ratones fueron inoculados en el flanco izquierdo con $2.5x10^5$ células LP07 en 0.2 ml de medio MEM. Ambos biomodelos receptores se monitorearon a lo largo de tres semanas. Se registraron las medidas de los diámetros perpendiculares más grandes y se calculó el volumen del tumor que sea observable mediante la fórmula: volumen del tumor (mm^3): $L\ x\ W^2\ x\ \frac{1}{2}$, en donde L y W representan la longitud y ancho del tumor en mm. Los volúmenes de los tumores se registraron en los días 15, 18 y 21. Se realizó el sacrificio de los ratones mediante dislocación cervical en el día 21; se obtuvieron los tumores y los órganos (bazo, pulmón, hígado y cerebro) fueron lavados para eliminar restos de sangre y otros tejidos y se preservaron en PFA al 4% diluido en PBS a 4°C para su posterior análisis histopatológico e inmunofluorescencia.

Resección del tumor y cultivo primario

El tumor primario se disecó del flanco izquierdo circundante y luego fue desintegrado mecánicamente con un bisturí y los fragmentos del tumor se filtraron a través de un filtro de malla de 100µm (Starsted). El producto filtrado se mantuvo en medio mínimo esencial (MEM) (Gibco, 11095080) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 3X penicilina/estreptomicina en una placa para cultivo de seis pozos. El cultivo fue monitoreado diariamente, los lavados y el cambio de medio serán a demanda. Cuando el cultivo alcanzó

el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron y se sembraron en un frasco T-25 para mantener el cultivo.

Mantenimiento de las líneas celulares

Las células LP07 y las células obtenidas a partir del tumor generado por la inoculación subcutánea de células LP07 se denominaron LP07-T, fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1X de penicilina/estreptomicina. Ambos cultivos se mantuvieron en frascos T25 en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 a 37°C. Ambas líneas celulares serán subcultivadas al alcanzar el 85 % de confluencia.

Los experimentos se realizaron en solución extracelular (expresada en mM), con la siguiente composición: NaCl, 144; KCl, 5.4; $MgCl_2$, 1; $CaCl_2$, 2.0; ácido N-2-hydroxietilpiperazina-N´-2-etanosulfónico (HEPES), 5; D-glucosa, con un pH ajustado a 7.4 con NaOH 1M.

Medición de la señalización de calcio intracelular

Para evaluar los cambios en los niveles de calcio intracelular, se realizó el análisis fluorométrico en las células LP07 y LP07-T. Ambos tipos celulares se incubaron con el indicador fluorescente Fluo-4FF AM (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) en solución extracelular durante 60 minutos a 37°C. Después de la incubación, se lavaron con solución extracelular para eliminar el exceso de Fluo-4 AM Ester y se mantuvieron en la solución previamente mencionada durante 20 minutos para permitir la hidrólisis del éster. La fluorescencia se midió mediante un microscopio Nikon Eclipse Ti-U (Nikon, Japón), acoplado a un sistema C2+ (Nikon, Japón). La excitación del fluoróforo se realizó a 488 nm y la emisión se registró a 516 nm. Las imágenes fueron adquiridas a intervalos de dos segundos durante cinco minutos utilizando el software NIS-Elements (Nikon, Japón).

Para evaluar la respuesta de los receptores purinérgicos, se añadió ATP (551.14 g/mol) (100uM) o UTP (586.12 g/mol) (100uM) a los 30 segundos de iniciar la medición mediante microinyección. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se analizaron seleccionando un área de interés (ROI, en inglés). Los datos de fluorescencia promedio correspondientes a cada célula se analizaron utilizando el software ImageJ (Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W., 2012), normalizando los cambios en los valores de intensidad de fluorescencia (ΔF) con respecto a los niveles basales de la fluorescencia durante los primeros

30 segundos del registro (F0) a lo largo del tiempo. Se calculó el área bajo la curva de la respuesta mediante el software GraphPad Prism 10. El área obtenida representa la respuesta de las células al estímulo que provoca el agonista, o la respuesta del agonista en presencia del antagonista, durante un tiempo específico.

Los parámetros que se registraron dentro de los experimentos de dinámica de calcio intracelular en los distintos protocolos fueron:

Fluorescencia basal: representa la media de los valores de fluorescencia previos a la aplicación del agonista, calculada dentro del intervalo que abarca desde el momento 0 hasta la aplicación del agonista (aproximadamente 30 segundos después de iniciar el experimento)

Amplitud: diferencia entre el valor máximo de fluorescencia después de la aplicación del agonista y el valor previo a la estimulación.

Área bajo la curva: representa el área que se encuentra por debajo de una función que se ha graficado, en este trabajo, representa la intensidad de fluorescencia obtenida desde la aplicación del agonista hasta los 300 segundos de iniciado el experimento. Se obtuvo calculando la integral de la función.

Inmunofluorescencia

Los cubreobjetos que contenían las células de ambas poblaciones se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 %. El bloqueo inespecífico se realizó con DPBS con 0.3 % de Tritón X-100 disuelto en albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron expuestas a anticuerpos primarios específicos: (i) receptor anti-P2X4 [1:50], (ii) receptor anti-P2X7 [1:100] y (iii) receptor anti-P2Y2 [1:100] diluidos en BSA al 1 % durante la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las muestras se incubaron durante 2 h en oscuridad a temperatura ambiente con un cóctel que contenía el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Finalmente, se realizó la tinción de los núcleos con DAPI (Abcam Limited, Cambridge, UK, ab104139) y el citoesqueleto con Faloidina-iFluor 647 (Abcam Limited, Cambridge, UK, ab176759). Los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos y se sellaron, almacenándose en una caja opaca a 4° C hasta su análisis con microscopía confocal. Anticuerpos primarios utilizados: P2X4 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA, ab2736294, conejo, policlonal), P2X7 (Invitrogen, ab2736300, conejo, policlonal), P2Y2 (Invitrogen, ab2547587, conejo,

policlonal). Anticuerpo secundario utilizado: Cabra anti-conejo AF-488 (Abcam Limited, ab150077).

Análisis de datos

Para obtener los niveles de intensidad de fluorescencia y elaborar las gráficas, se emplearon los programas ImageJ (Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W., 2012) y Prism 10 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts EE. UU.).

Para observar las diferencias entre los grupos experimentales, se normalizaron los resultados de intensidad de fluorescencia con la fórmula F/F0, donde F es el valor de la fluorescencia y F0 equivale al valor de fluorescencia en condiciones basales, previo a la aplicación del agonista.

Las pruebas estadísticas serán realizadas en el software GraphPad Prism 10. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

En función del resultado, se seleccionó el método de comparación entre los grupos experimentales. Si los datos mostraron una distribución paramétrica (normal), se aplicó una prueba *t* de Student para muestras independientes. Si los datos no cumplen con la suposición de normalidad (datos no paramétricos), se usó la prueba U de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. Resultados

Desarrollo y obtención de tumores singénicos murinos

Con el objetivo de evaluar la capacidad tumorigénica de la línea de adenocarcinoma pulmonar murino LP07, se realizó la inoculación en ratones BALB/c. Tras la inoculación s.c. en el flanco izquierdo, se monitoreó el desarrollo tumoral a partir del día 11, cada 3 días hasta el día 17, obteniendo los diámetros visibles de los tumores con ayuda de un vernier caliper.

Como se muestra en la **Figura 6ª**, el volumen tumoral se triplicó entre el día 14 y el día 17, mostrando una alta tasa proliferativa. El ensayo concluyó el día 22, procediendo con la eutanasia y la obtención de los tumores en ambos ratones. Tras la resección se obtuvieron dos tumores sólidos, con consistencia firme y con vascularización superficial visible (**Figura 6B**). Los tumores extraídos tuvieron una medida de: 19.35 x 9.13 mm y 15.02 x 11.02 mm, con un peso de: 1.34 g y 1.653 g, respectivamente.

Posterior al registro morfométrico, las muestras fueron procesadas según su análisis subsecuente: uno de los tumores fue tratado mediante disgregación mecánica para el establecimiento de un cultivo primario, mientras que el segundo tumor obtenido fue sumergido en DBPS para su posterior procesamiento histológico (resultados descritos posteriormente).

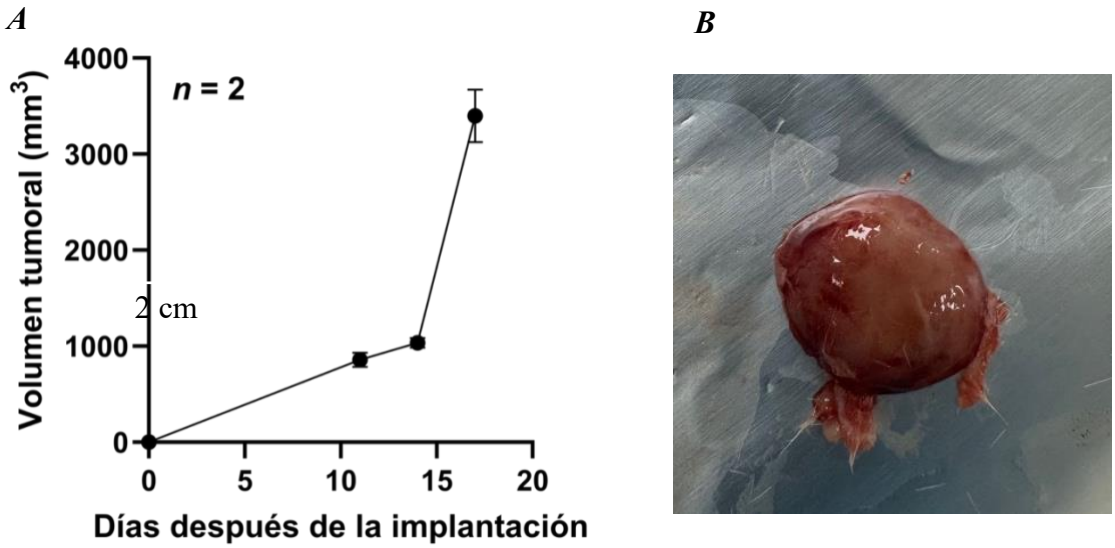


Figura 6. **Progresión del volumen tumoral *in vivo* tras la inoculación en ratones BALB/c y morfología macroscópica.** A) Curva de progresión del volumen tumoral (mm^3) a lo largo de 17 días posteriores a la inoculación s.c. Los datos representan la media. N = 2. B) Imagen representativa *ex vivo* del tumor sólido obtenido en el día 22.

Presencia de receptores P2X y P2Y en células de cáncer de pulmón murino LP07 y LP07-T

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la presencia de los receptores purinérgicos de la familia P2, como $P2X_4$, $P2X_7$ y $P2Y_2$. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal confirman la presencia de cada uno de los receptores ya mencionados. El receptor $P2X_4$ se muestra en el núcleo, en la zona perinuclear y distribuido ampliamente en el citoplasma tanto en LP07 (**Figura 7)** como en LP07-T (**Figura 10)**. El receptor $P2X_7$ muestra una señal intensa en la zona nuclear y en el citoplasma en LP07 (**Figura 8)**, mientras que en las células LP07-T (**Figura 11)** se observa un marcaje más intenso en las zonas perinucleares junto a una señal presente en el citoplasma. La presencia de $P2Y_2$ en LP07 (**Figura 9)** es observable de manera intensa en el núcleo de cada célula y también se encuentra presente en el citoplasma, de igual forma en LP07-T (**Figura 12)**, este receptor se encuentra muy marcado en el núcleo y en el citoplasma.

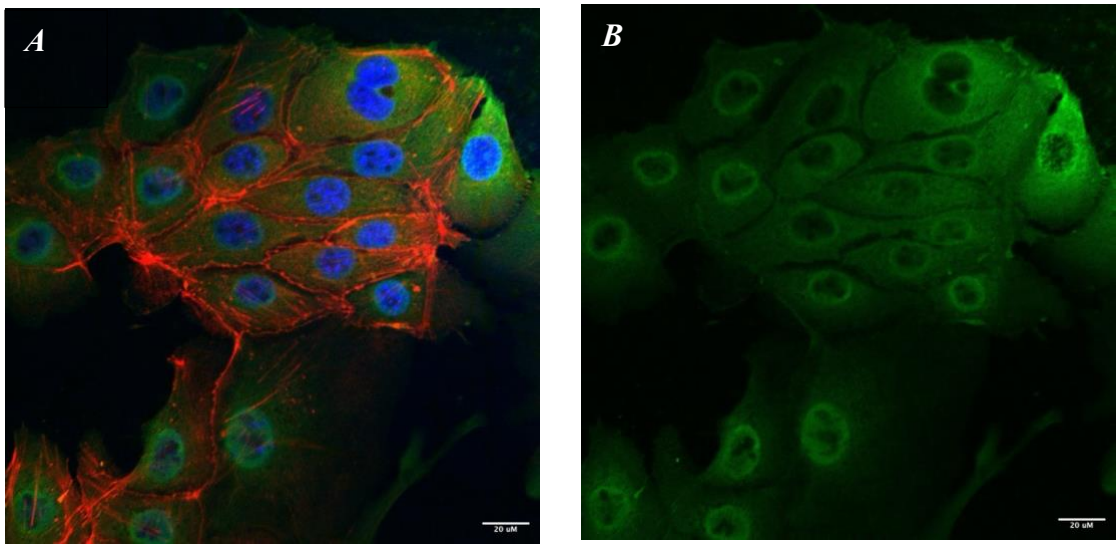


Figura 7. Distribución de la presencia del receptor $P2X_4$ en la línea LP07. A) Expresión de $P2X_4$ (verde) muestra señal citoplasmática con una marcada presencia en la periferia nuclear y en el citoplasma. B) Imagen compuesta (merge): Faloidina (rojo) y los núcleos se muestran teñidos con DAPI (azul). Las flechas blancas son representativas de la presencia de $P2X_4$. Barra de escala= 20 µM.

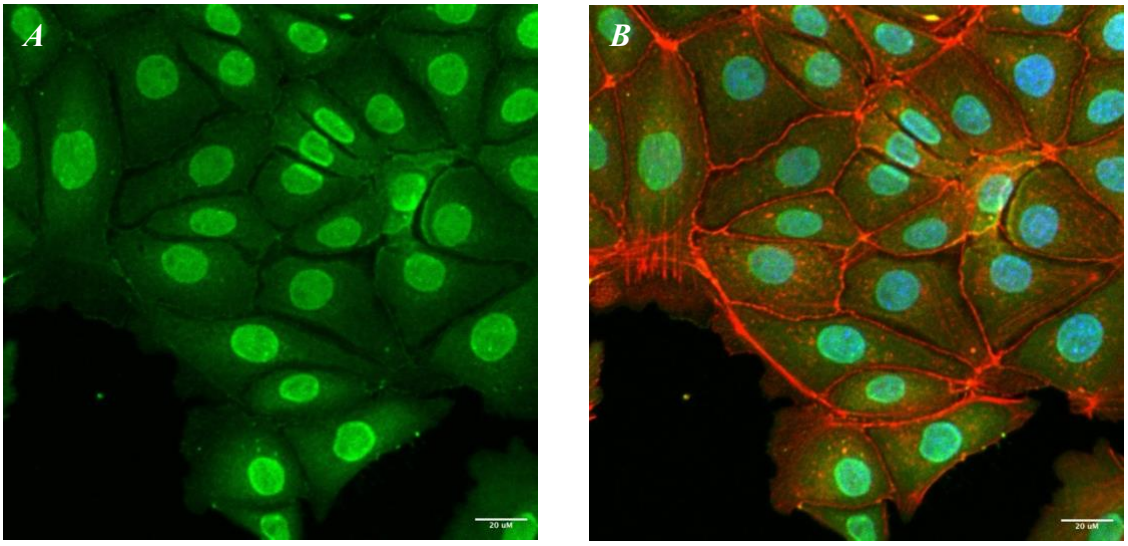


Figura 8. Distribución celular del receptor $P2X_7$ en células LP07. A) Se observa un marcaje homogéneo de P2X7 en el citoplasma e intenso en el compartimento nuclear; se evidencia presencia difusa en el citoplasma y en la membrana plasmática. B) Imagen compuesta (merge): Inmunofluorescencia representativa de la expresión de P2X7 (verde), actina (rojo, faloidina) y núcleos (azul, DAPI). Las flechas blancas son representativas de la presencia de P2X7. Barra de escala= 20 µM.

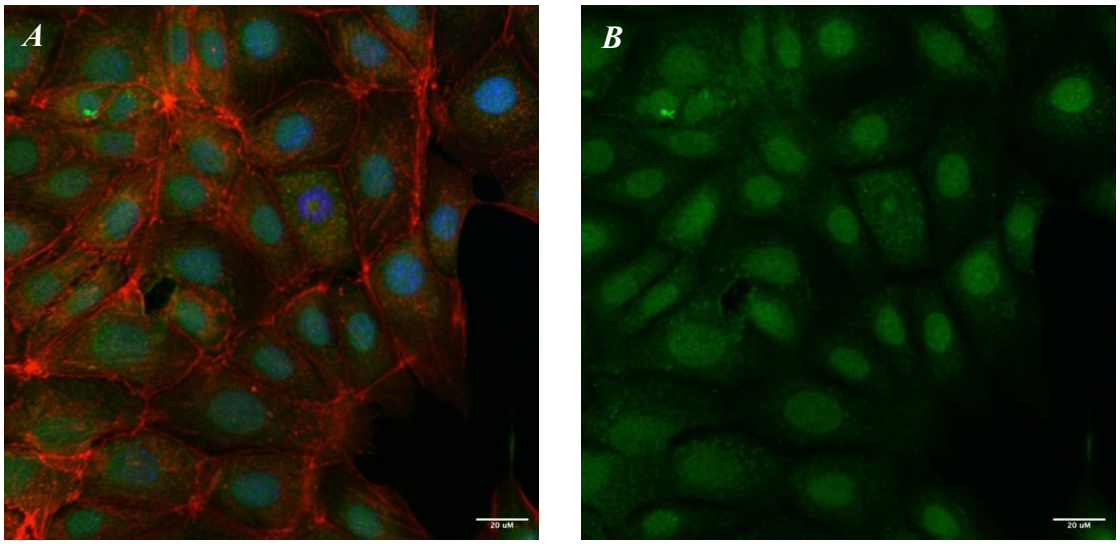


Figura 9. Inmunolocalización del receptor $P2Y_2$ en LP07 en la línea celular LP07. A) El marcaje para P2Y2 (verde) revela presencia en el núcleo y un patrón de distribución citoplasmático difuso. Las flechas blancas son representativas e indican regiones con presencia de señal citoplasmática y nuclear. B) Imagen compuesta (merge): Inmunofluorescencia representativa de la expresión de P2Y2 (verde), actina (rojo, faloidina) y núcleos (azul, DAPI). Las flechas blancas son representativas de la presencia de P2Y2. Barra de escala= 20 µM.

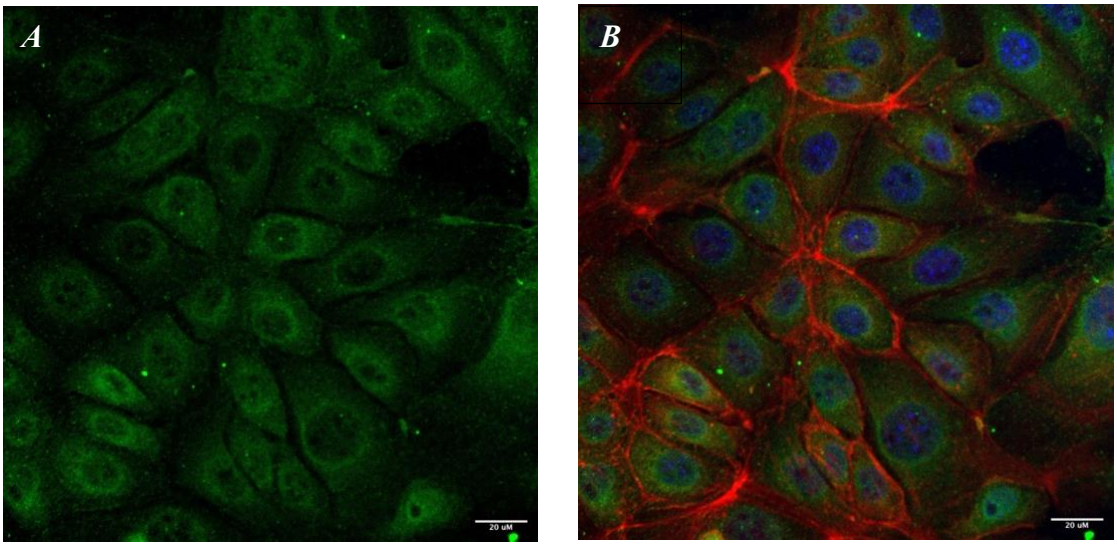


Figura 10. **Expresión del receptor $P2X_4$ en células LP07-T.** A) Se observa un marcaje débil y difuso para $P2X_4$ (verde) en citoplasma, membrana, nuclear y perinuclearmente en células LP07-T. B) Imagen compuesta (merge): Inmunofluorescencia representativa de la expresión de P2X4 (verde), actina (rojo, faloidina) y núcleos (azul, DAPI). Las flechas blancas son representativas de la presencia de $P2X_4$. Barra de escala= 20 µM.

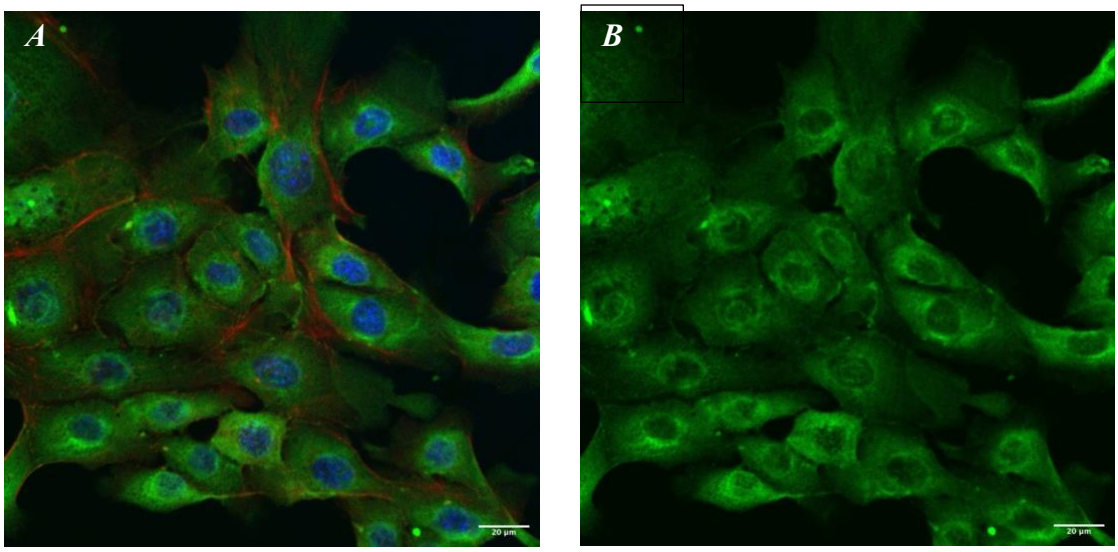


Figura 11. **Inmunofluorescencia mostrando la presencia y distribución del receptor $P2X_7$ en células LP07-T. A)** Se observa la presencia de $P2X_7$ (verde) en el citoplasma y perinuclearmente. Existe una señal difusa y débil en el núcleo. B) Imagen compuesta (merge): Expresión de $P2X_7$ (verde), actina (rojo, faloidina) y núcleos (azul, DAPI). Las flechas blancas son representativas de la presencia de $P2X_7$. Barra de escala= 20 µM.

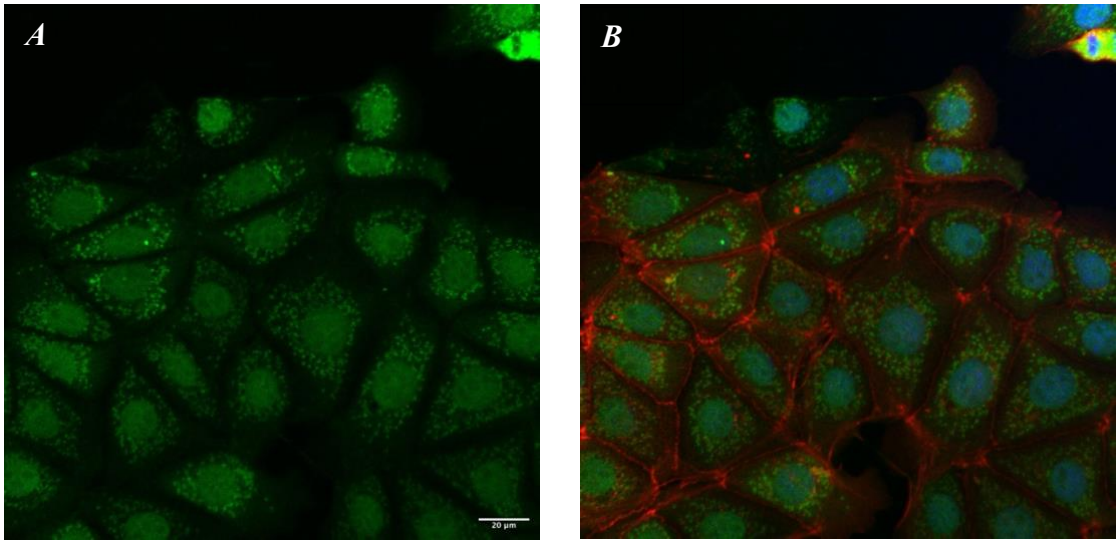


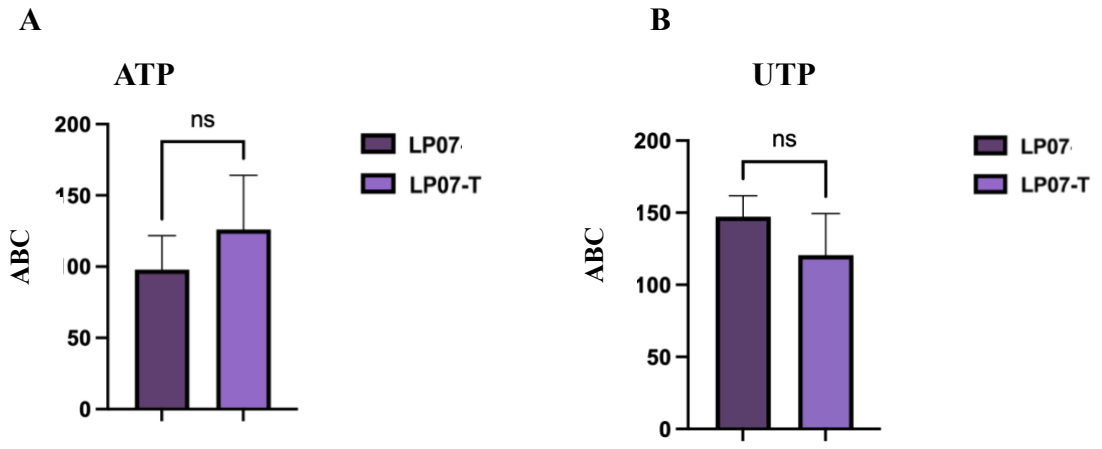
Figura 12. Inmunofluorescencia mostrando la presencia y distribución del receptor $P2Y_2$ en células LP07-T. A) Se observa la señal del anticuerpo para $P2Y_2$ en los núcleos celulares y señal difusa a lo largo del citoplasma. B) Imagen compuesta (merge): Expresión de $P2Y_2$ (verde), actina (rojo, faloidina) y núcleos (azul, DAPI). Las flechas blancas son representativas de la presencia de $P2Y_2$. Barra de escala= 20 µM.

Dinámica de calcio en las células LP07 y células derivadas del tumor primario ante la presencia de agonistas purinérgicos

Para evaluar la funcionalidad de los receptores purinérgicos en ambas líneas celulares, se realizaron experimentos de dinámica de calcio donde se administró el agonista (ATP o UTP) y se midieron los cambios en la fluorescencia (pico máximo de fluorescencia y área bajo la curva).

En la figura **13** se muestran los valores de área bajo la curva (ABC) obtenidos tras la estimulación con ATP 100 µM (**Figura 13 A)** (LP07: 97.80 ± 23.78 vs LP07-T: 126.1 ± 38.01) y UTP 100 µM (**Figura 13 B**) (LP07: 147.2 ± 14.57 vs LP07-T: 120.6 ± 28.79) en las células LP07 y LP07-T. No se encontraron diferencias significativas en los valores obtenidos para el área bajo la curva (ABC) tras la estimulación con los agonistas seleccionados entre ambos modelos experimentales. De igual forma, en los valores de fluorescencia máxima tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos modelos y tras utilizar ATP 100 µM (**Figura 13 C**) (LP07: 1.457 ± 0.3393 vs LP07-T: 1.720 ± 0.3832) y UTP 100 µM (**Figura 13 D**) (LP07: 1.876 ± 0.1634 vs LP07-T: 1.848 ± 0.2426).

Área bajo la curva (ABC)



Fluorescencia máxima

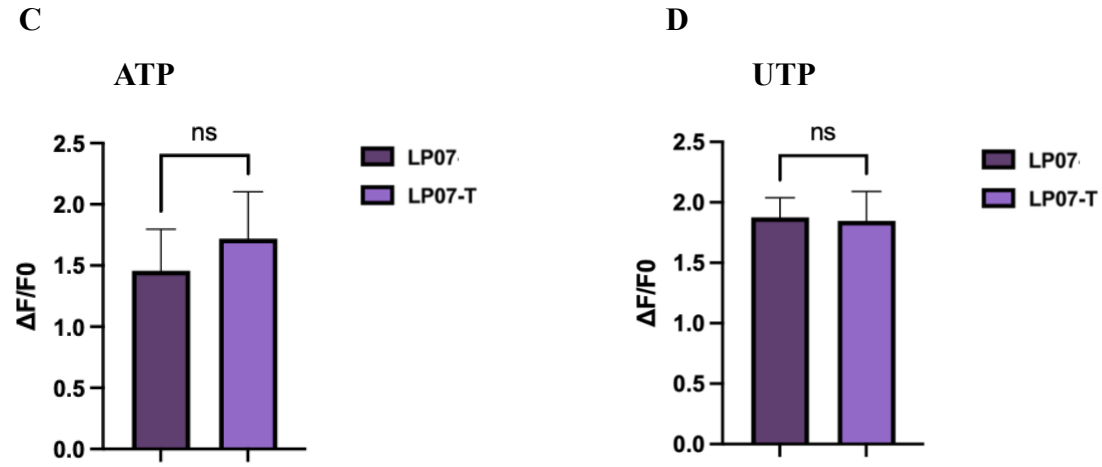


Figura 13. Área bajo la curva y fluorescencia máxima de la señal de Ca^{2+} intracelular tras la adición de agonistas purinérgicos en ambos modelos experimentales. Experimentos que muestran el área bajo la curva y los niveles de fluorescencia máxima al añadir agonistas purinérgicos (ATP o UTP) (100 µM) en las líneas celulares LP07 y LP07-T. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba *U de Mann-Whitney* (*n*=3 por grupo experimental). Arriba de cada barra la media ± error estándar de la media (SEM). Diferencia significativa * = $p<0.05$, ns = resultados no significativos, unidades arbitrarias (UA).

Registros de la señal de Ca^{2+}

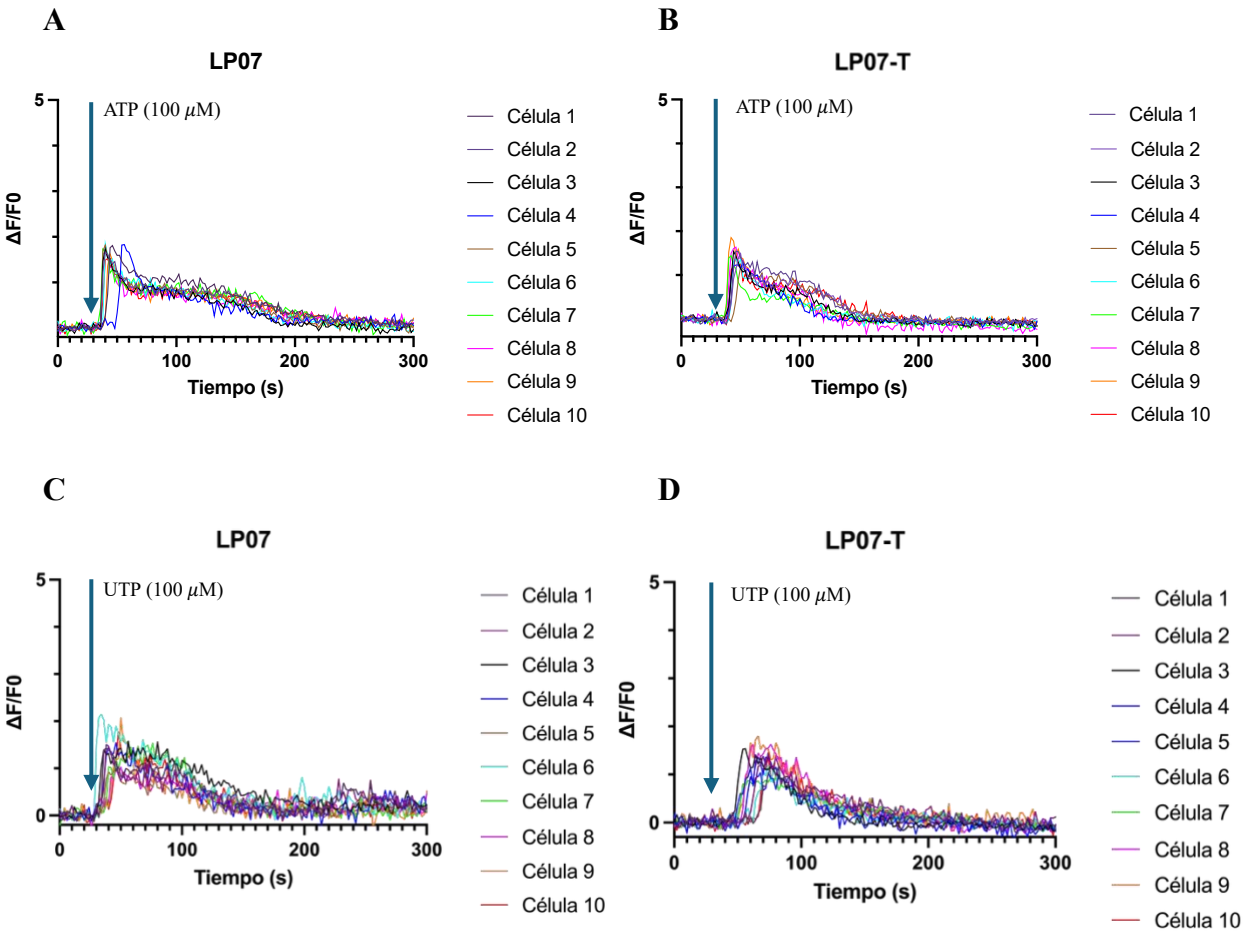


Figura 14. Efectos del ATP en la señal de calcio intracelular. Registros de la señal de Ca^{2+} a lo largo del tiempo (300 s) provocada por ATP (100 µM) (**Imagen A y B**) y UTP (100 µM) (**Imagen C y D**) en presencia de Ca^{2+} extracelular en células LP07 y LP07-T. Los registros fueron normalizados mediante ΔF/F0. Las flechas representan la adición del agonista purinérgico mediante microinyección.

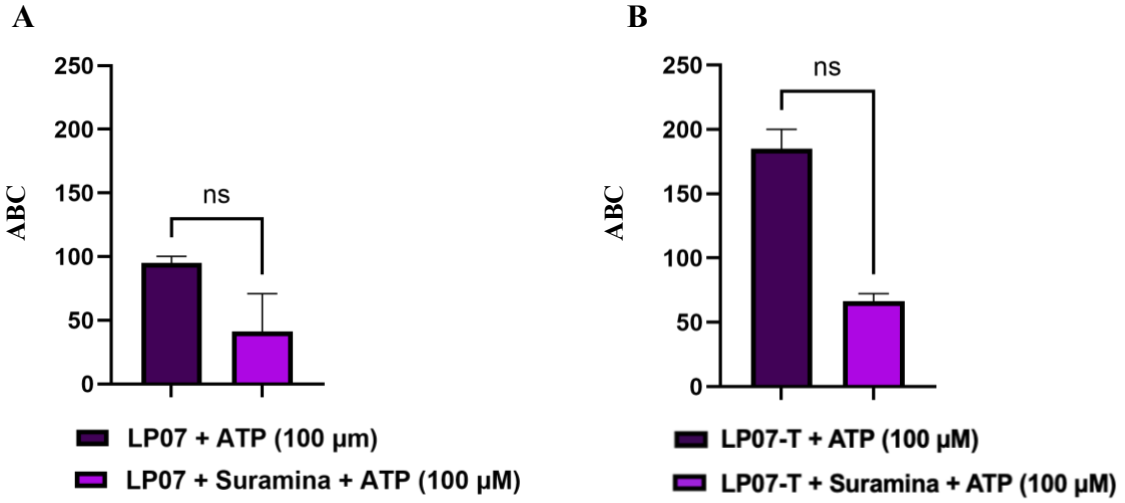
En la **Figura 14** se muestran los trazos representativos de la señal de Fluo-4 que representan los transientes de Ca^{2+} registrados en células LP07 (**Imagen 14 A**) y LP07-T (**Imagen 14 B**) en respuesta a la aplicación del agonista ATP (100 µM) en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Estos datos nos muestran los patrones de Ca^{2+} generados por la presencia del agonista, generando un pico y una fase de declive lento de la respuesta a lo largo del tiempo.

Efecto del bloqueo de receptores purinérgicos con un antagonista no específico en la dinámica de calcio en la línea LP07 y LP07-T

Se realizó la evaluación del antagonista no específico suramina sódica (S2671, Sigma) en presencia de ATP (100 µM) en ambos modelos celulares. En la **Figura 15** se muestran los resultados de área bajo la curva obtenidos tras analizar los registros de la señal de Ca^{2+} causada por la estimulación con ATP (100 uM) tras ser incubadas las células con suramina (**100 µM**). En la **Figura 15 A**, se muestra la comparación entre LP07 (95.1193 ± 8.9942) y LP07 tratada con suramina (41.1760 ± 51.5862), sin presentar una diferencia estadísticamente significativa en el ABC, de igual forma, la comparación entre LP07-T (184.793 ± 26.6372) y LP07 + Suramina (66.3786 ± 10.4635) no arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos **(Figura 15 B)**.

En los resultados obtenidos para la fluorescencia máxima, como se muestra en la (**Figura 15 C y D)** tampoco se observa una diferencia significativa entre el grupo LP07 estimulado con ATP (100 µM) (1.51 ± 0.07) y el grupo LP07 incubado con suramina (100 µM) previo a la estimulación con ATP (100 µM) (0.42 ± 0.33), al analizar los datos obtenidos para LP07-T, no se obtuvo una significativa entre el grupo LP07-T estimulado con ATP (100 µM) (3.19 ± 0.16) (**Figura 15 C)** y el grupo LP07-T incubado con suramina (100 uM) previo a la estimulación con ATP (100 uM) (0.98 ± 0.21) (**Figura 15 D**).

Área bajo la curva



Fluorescencia máxima

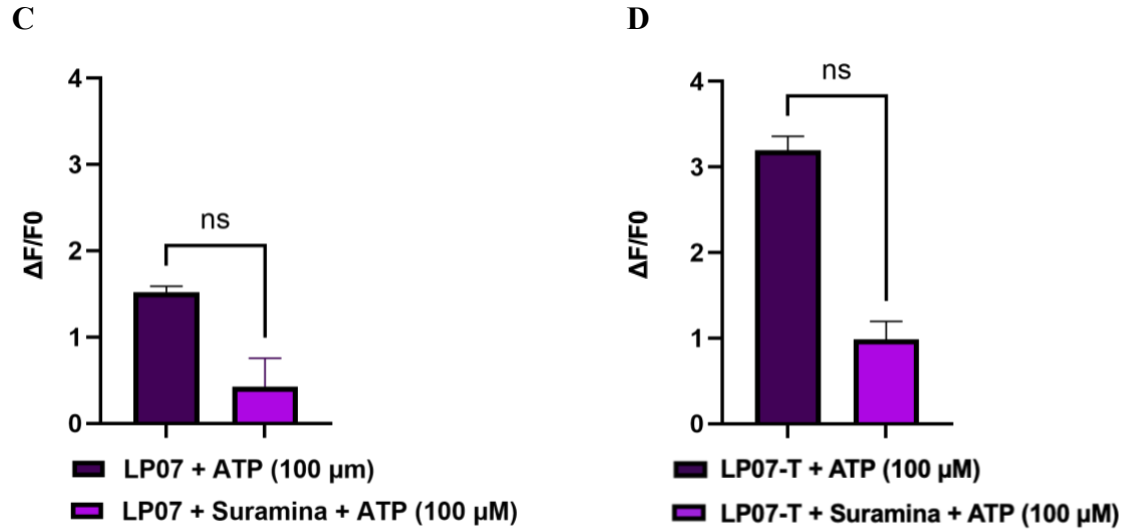


Figura 15. Área bajo la curva y fluorescencia máxima de la señal de Ca^{2+} intracelular al añadir ATP tras la incubación con suramina. Para poder comparar los transientes de calcio intracelulares, los registros se normalizaron mediante ΔF/F0. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba *U de Mann-Whitney* (*n*=3 por grupo experimental). Las barras representan la media ± error estándar de la media (SEM). Diferencia significativa * = $p<0.05$, ns = resultados no significativos, unidades arbitrarias (UA).

Registros de la señal de calcio tras la incubación con un antagonista no específico

En la **Figura 16** se muestran los trazos representativos de la señal de Fluo-4 que representan los transientes de Ca^{2+} registrados en células LP07 (**Imagen 16 A**) y LP07-T (**Imagen 16 B**) en respuesta a la aplicación del agonista ATP (100 μM) en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular tras la incubación durante 30 minutos previamente con suramina. Las gráficas obtenidas nos muestran los patrones de Ca^{2+} generados por la presencia del agonista, generando un pico y una fase de declive lento de la respuesta a lo largo del tiempo (300 s).

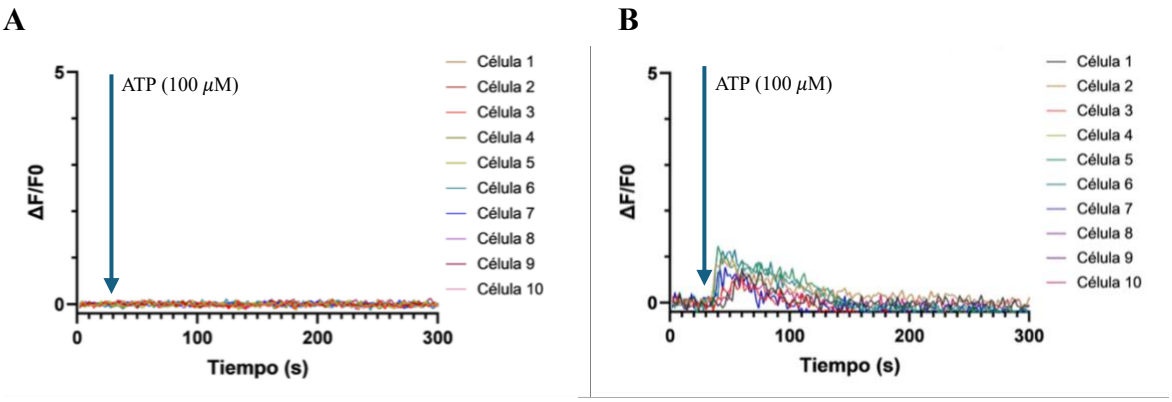


Figura 16. Efectos del ATP en la señal de calcio intracelular tras el bloqueo con suramina. Registros de la señal de Ca^{2+} a lo largo del tiempo (300 s) provocada por ATP (100 µM) en presencia de Ca^{2+} extracelular en células LP07 (**Figura A)** y LP07-T (**Figura B**) tras la incubación con suramina (100 µM). Los registros fueron normalizados mediante la fluorescencia basal. Las flechas representan la adición del agonista purinérgico mediante microinyección.

8. Discusión

El cáncer de pulmón es el tipo de neoplasia con mayor prevalencia a nivel mundial, con más de 2 millones de casos y cerca de 1.8 millones de muertes relacionadas a este tipo de cáncer anualmente (48). Los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados con esta enfermedad en estadios avanzados (cerca del 70%), contando solo con una tasa de supervivencia a cinco años menor al 5% (71) .

Desde que los primeros reportes sobre lesiones proliferativas en tejido pulmonar fueron publicados, los factores de riesgo comenzaron a ser identificados; hoy en día, el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón continúa siendo el humo de nicotina (72).

El microambiente tumoral incluye moléculas de señalización solubles como el ATP que modelan el fenotipo canceroso. Las características del MAT, como la hipoxia, promueven la acumulación de ATPe, en rangos de cientos de μM, provocando la activación de receptores purinérgicos de la familia P2 (73). La familia de receptores P2 se divide en dos subfamilias: P2X y P2Y (71).

Los receptores P2X y P2Y responden al ATP y a otros nucleótidos presentes de manera extracelular, así como a pirimidinas como el UTP (73). Estos receptores pertenecientes a la familia de receptores purinérgicos se encuentran presentes en tejidos pulmonares, sobre todo en los alvéolos, donde su expresión se encuentra desregulada en procesos patológicos (48).

Dentro del tejido pulmonar alveolar, ambas subfamilias de receptores se encuentran presentes, las células epiteliales de las vías respiratorias muestran una alta expresión de $P2Y_2$ y una moderada expresión de $P2Y_1$, $P2Y_{11}$, $P2X_4$ y $P2X_7$ (74). La activación de estos receptores provoca un aumento en la concentración intracelular de calcio (35). El cáncer es caracterizado por defectos en los mecanismos encargados de regular la proliferación celular y la migración, procesos en los que los iones de calcio poseen un papel central, actuando como agentes de señalización manteniendo una localización espacial, una magnitud y temporalidad, fungiendo, así como determinantes del destino de la célula (60).

Este trabajo muestra los transientes de calcio generados por la estimulación de receptores purinérgicos con ATP, UTP y suramina en la línea celular LP07, así como la conservación de esta respuesta en un modelo celular derivado de tejido tumoral. A

continuación, se discuten los hallazgos relativos al establecimiento del cultivo y la conservación de su respuesta fisiológica.

Como primer resultado, se logró establecer el modelo celular LP07-T a partir de la inoculación de células LP07 en el biomodelo utilizado. La obtención de cultivos primarios representa un desafío técnico considerable debido a la posibilidad de contaminación del cultivo o a errores durante la realización del cultivo primario. El éxito en la obtención y estabilización de este modelo celular es un resultado del protocolo utilizado, el cual corresponde con la obtención de modelos celulares derivados de un tumor a partir de la inoculación de células tumorales como lo reportado por De Marchi y colaboradores en 2019 (75).

Respecto a la señalización de calcio, el hallazgo más relevante en este trabajo es la comparación de la dinámica de calcio intracelular entre las líneas celulares utilizadas. Para caracterizar detalladamente la dinámica de calcio, se evaluaron dos parámetros: la amplitud máxima de la respuesta (fluorescencia máxima) y el área bajo la curva (ABC).

Cuando se estimularon ambas líneas celulares con agonistas purinérgicos (ATP y UTP) (Figura 13), se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de fluorescencia máxima entre ambas líneas celulares, lo cual sugiere que la funcionalidad de los receptores purinérgicos y la liberación de Ca^{2+} proveniente de los depósitos internos; el retículo endoplásmico permanece inalterado tras el mantenimiento del cultivo *in vivo*. Lo anterior sugiere que la capacidad de respuesta de las células en ambas líneas celulares ante estímulos extracelulares, como lo es la estimulación con ATP y UTP es un rasgo fenotípico estable.

La liberación de Ca^{2+} proveniente del RE mediante la activación de los receptores IP_3 o RyR como consecuencia de la estimulación de receptores acoplados a proteínas G_q (como $P2Y_2$) provoca un aumento en la $[Ca^{2+}]$ que puede controlar algunas funciones celulares como la proliferación o la muerte celular (76). El tipo de patrón observado durante el incremento en las concentraciones de ($[Ca^{2+}]_{cit}$) **(Figura 14)** al estimular los receptores purinérgicos con los agonistas descritos previamente en ambas líneas celulares concuerda con las oscilaciones de Ca^{2+} que controlan eventos decisivos para las células descritos en la literatura, otorgando ventajas en el contexto de la carcinogénesis; un ejemplo de esto es un aumento en la expresión de los canales ORAI1(implicados en un aumento en los niveles de proliferación) en algunas líneas celulares de cáncer colorrectal (77), resultando en una ventaja

competitiva para el destino de las células tumorales la prevalencia de estos receptores que provocan un aumento sostenido en ($[Ca^{2+}]_{cit}$) proveniente del RE mediante receptores IP_3. Otro estudio (78) demuestra que los receptores IP3 pueden regular la amplitud de los transientes de ($[Ca^{2+}]_{cit}$) en células HeLa tras la estimulación con ATP. Zaho y Sheng (79) señalan que la alteración en el transporte de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria tiene un impacto sobre el progreso de la neoplasia, por lo que resulta fundamental para las células tumorales resguardar la capacidad de liberación de Ca^{2+} por parte del RE.

Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en el área bajo la curva muestra que los mecanismos de regulación homeostática operan con la misma eficiencia en ambas líneas. El mantenimiento del área bajo la curva entre ambas líneas celulares sugiere que los mecanismos de aclaramiento citosólico de Ca^{2+}, los cuales son vitales para evitar toxicidad por niveles altos de este ion, se mantienen totalmente funcionales, aunque posiblemente presenten una capacidad reducida, dado que las células cancerosas poseen una menor capacidad para recapturar el calcio en los almacenes correspondientes, según lo señalado por Bong y Monteith (80), esto al observar que al aplicar electroporación de calcio en el lugar del tumor, las células mantienen niveles sostenidos de ($[Ca^{2+}]_{cit}$) en comparación con tejido sano. De acuerdo con lo anteriormente señalado, la línea LP07-T no ha modificado sus mecanismos de regulación de Ca^{2+} para adaptarse a las condiciones de estrés a las que fue expuesta en el microambiente tumoral. Estos resultados sugieren que la señalización de calcio se conserva en la línea LP07-T.

Lo anterior sugiere que el proceso de adaptación de la línea celular LP07-T a las condiciones de cultivo *in vitro* no alteró la expresión funcional de los receptores purinérgicos revisados en este trabajo, reforzando la idea de que el aumento en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación con ATP se debe a la presencia de receptores P2, como lo reportado en la línea A549 (65).

La conservación de esta respuesta sugiere que la señalización de Ca^{2+} mediada por estos receptores otorga una ventaja selectiva para la supervivencia y mantenimiento en ambas líneas celulares, un fenómeno que evita que su expresión disminuya durante el crecimiento *in vitro*. Se ha documentado en diversas líneas celulares establecidas a partir de tumores primarios que estas conservan la expresión funcional de receptores clave para su supervivencia. Por ejemplo, en 2006, Helfrich et al. (81) obtuvieron resultados similares al inhibir el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en varias líneas tumorales,

entre ellas A549, y en xenoinjertos tumorales, resaltando la conservación de EGFR *in vitro* e *in vivo*, resaltando que las células tumorales mantendrán la funcionalidad y expresión de los receptores que son útiles para su proliferación y mantenimiento.

Al estimular ambas líneas celulares con UTP **(Figura 13 B y D**) se observó un aumento en los niveles de calcio intracelular siendo este nucleótido el principal agonista de $P2Y_2$, provocando la liberación de Ca^{2+} proveniente del retículo sarcoplásmico a través de la vía PLC/IP_3 (73). El resultado es un pico instantáneo en los niveles intracelulares de calcio proveniente de almacenes internos, seguido de un influjo de calcio proveniente del espacio extracelular, provocando una segunda fase más sostenida de la señalización de acuerdo con lo descrito por Charlton y Vauquelin (82). La respuesta intracelular de Ca^{2+} ante la presencia de UTP fue muy similar a la producida por la estimulación con ATP, como lo reportado por Henningsen et al. (2022) en células de cáncer de mama, siendo un patrón provocado predominantemente por receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ en dichas células (83). Se ha reportado anteriormente que la estimulación a corto plazo de los receptores $P2Y_2$, los cuales son activados por UTP, puede inducir la movilización de iones de calcio en líneas celulares de cáncer de colon (84).

Posteriormente, el análisis mediante inmunofluorescencia indirecta confirmó la expresión constitutiva de los receptores purinérgicos $P2X_4$, $P2X_7$ y $P2Y_2$ en ambas líneas celulares. La presencia de estos subtipos específicos apoya la idea de que las respuestas observadas son mediadas por la presencia de los subtipos purinérgicos mencionados presentes en la membrana de ambas líneas celulares. La presencia membranal de estos receptores en ambas líneas celulares, principalmente de $P2X_7$ y $P2Y_2$ resulta crucial en el desarrollo del cáncer de pulmón (81). Una de las características de la presencia de $P2X_7$ es su capacidad de promover el crecimiento y al mismo tiempo promover la capacidad de invasión de acuerdo con resultados *in vitro* expuestos por Adinolfi et al. (55), mientras que $P2Y_2$ pueden regular la progresión de la enfermedad (84). La presencia de estos marcadores y su conservación tras el paso *in vivo* de las células LP07-T remarca la idea de la participación de los receptores purinérgicos como un componente integral del fenotipo canceroso de ambos modelos y no un resultado de la presión selectiva al exponerse a las condiciones del cultivo celular.

Adicionalmente, el análisis de inmunofluorescencia en ambos modelos celulares mostró un marcaje tenue para $P2X_4$, en comparación con los demás receptores, con un patrón

de tinción mixto que incluye estructuras punteadas presentes en el citoplasma. Dicho patrón es consistente con lo reportado en la literatura en donde se describe que el receptor $P2X_4$ se encuentra mayoritariamente en endosomas tardíos, y lisosomas, presentando una menor densidad en la membrana plasmática (85).

Para confirmar la naturaleza purinérgica de las oscilaciones de calcio, se utilizó suramina, el cual es un antagonista de amplio espectro de los receptores P2. El análisis posterior de la fluorescencia máxima reveló que no existe una inhibición estadísticamente significativa de la respuesta en ambas líneas celulares tras el tratamiento (**Figura 15 C, D)** con dicho antagonista, sin embargo, se puede observar una disminución clara en la respuesta, apoyando la idea de que la movilización de calcio depende de la activación de receptores presentes en la superficie membranal y no de fenómenos inespecíficos.

No obstante, es notable que el bloqueo no fue total, observándose actividad de calcio en presencia del antagonista. Lo anterior concuerda con lo publicado por North (86); a diferencia de los subtipos $P2Y_2$ y $P2X_7$, los cuales son sensibles a la suramina, el receptor $P2X_4$ se caracteriza por su relativa insensibilidad a este antagonista.

Por lo tanto, se sugiere que la reducción del pico de fluorescencia máxima corresponde al bloqueo de la población de receptores sensibles ($P2X_7$/$P2Y_2$) (87), mientras que la actividad presentada podría atribuirse a la entrada de Ca^{2+} por parte de $P2X_4$. Adicionalmente, el hecho de que el área bajo la curva no mostrara una reducción estadísticamente significativa (**Figura 15 A, B)** podría reflejar esta contribución sostenida de los receptores insensibles, o bien indicar variabilidad en los mecanismos de aclaramiento de Ca^{2+} bajo condiciones de bloqueo parcial.

En conjunto, la integración de los hallazgos expuestos permite dar respuesta al objetivo central de este trabajo. Los resultados indican que el paso por un hospedero inmunocompetente no altera el fenotipo purinérgico de las células de adenocarcinoma pulmonar LP07. Esto sugiere que los receptores involucrados en la señalización purinérgica son preservados activamente incluso bajo la presión selectiva del microambiente tumoral *in vivo (88).*

9. Conclusiones

1. Se logró generar exitosamente tumores primarios en ratones inmunocompetentes BALB/c y establecer la línea celular derivada (LP07-T).
2. El análisis de inmunofluorescencia confirmó la expresión constitutiva y conservada de los receptores purinérgicos $P2X_4$, $P2X_7$ y $P2Y_2$ en ambas líneas celulares.
3. La estimulación con agonistas purinérgicos (ATP y UTP) produjo un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en ambos modelos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la amplitud máxima ni en el área bajo la curva entre la línea parenteral y la derivada del tumor, evidenciando una conservación funcional de la maquinaria purinérgica de señalización de calcio en la línea LP07-T.
4. El bloqueo con suramina inhibió significativamente el pico de fluorescencia máximo en ambas líneas, confirmando la participación de los receptores purinérgicos en esta respuesta.
5. Los hallazgos de este estudio demuestran que el paso de las células de adenocarcinoma LP07 por un microambiente tumoral *in vivo* y su exposición a la presión selectiva del sistema inmunológico murino no alteran el fenotipo purinérgico.

10. Perspectivas

1. Cuantificar mediante técnicas de biología molecular (Western Blot) la expresión membranal de $P2X_4$, $P2X_7$ y $P2Y_2$ en la línea celular LP07-T.
2. Comparar la expresión de los receptores purinérgicos $P2X_4$, $P2X_7$ y $P2Y_2$ mediante Western Blot entre la línea celular LP07-T y un cultivo primario de neumocitos provenientes de un ratón inmunocompetente BALB/c
3. Evaluar la participación individual de los receptores $P2X_7$, $P2X_4$ y $P2Y_2$ en la dinámica de calcio intracelular en la línea LP07-T.
4. Caracterizar las subpoblaciones celulares dentro de la línea celular LP07-T.

11. Bibliografía

1. Galassi FM, Varotto E, Vaccarezza M, Martini M, Papa V. A historical and palaeopathological perspective on cancer. J Prev Med Hyg. 2024 Apr 1;65(1):E93–7.
2. Hajdu SI. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. Vol. 117, Cancer. 2011. p. 1097–102.
3. Gómez ÁH, Hernández RAS, González TV. El cáncer. In: Gómez AH, León Takahashi AM, Lino Silva LS, Salcedo Hernández RA, editors. Manual de Oncología, 7e [Internet]. New York, NY: McGraw Hill Education; 2023. Available from: accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?aid=1201958912
4. Noverón NR, Betancourt AM. Epidemiología del cáncer. In: Gómez AH, León Takahashi AM, Lino Silva LS, Salcedo Hernández RA, editors. Manual de Oncología, 7e [Internet]. New York, NY: McGraw Hill Education; 2023. Available from: accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?aid=1201958981
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas de defunciones registradas (EDR), Comunicado 117/25 [Internet]. 2025 Dec [cited 2025 Aug 8]. Available from: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2025/edr/EDR2024_CP_ene-dic.pdf
6. III WEC, Meric-Bernstam F, Pollock RE. Oncología. In: Brunicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Kao LS, Hunter JG, et al., editors. Schwartz Principios de Cirugía, 11e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020. Available from: accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?aid=1175154036
7. Diori Karidio I, Sanlier SH. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. Vol. 33, Journal of the Egyptian National Cancer Institute. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021.
8. Hendriks LEL, Remon J, Faivre-Finn C, Garassino MC, Heymach J V., Kerr KM, et al. Non-small-cell lung cancer. Vol. 10, Nature reviews. Disease primers. 2024. p. 71.
9. Moasser MM, Ai WZ. Neoplasia. In: Hammer GD, McPhee SJ, editors. Fisiopatología de la enfermedad, 8e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015. Available from: accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?aid=1166891849
10. National Cancer Institute. SEER Training Modules. [cited 2025 Aug 17]. Cancer Terms. Available from: https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/terms.html
11. Liu J, Huang B, Ding F, Li Y. Environment factors, DNA methylation, and cancer. Vol. 45, Environmental Geochemistry and Health. Springer Science and Business Media B.V.; 2023. p. 7543–68.
12. Fu EX, Singh AD. Cancer etiology.
13. Ma Q, Zhang W, Wu K, Shi L. The roles of KRAS in cancer metabolism, tumor microenvironment and clinical therapy. Mol Cancer [Internet]. 2025 Jan 13;24(1):14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39806421
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, Cell. 2011. p. 646–74.
15. Vázquez DH, Barrón FB, Cruz JFC, Magos FM, Salas AA, de la Garza Salazar J, et al. Cáncer de pulmón de células no pequeñas. In: Gómez AH, León Takahashi AM, Lino Silva LS, Salcedo Hernández RA, editors. Manual de Oncología, 7e [Internet].

New York, NY: McGraw Hill Education; 2023. Available from: accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?aid=1201991606
16. Zhou J, Xu Y, Liu J, Feng L, Yu J, Chen D. Global burden of lung cancer in 2022 and projections to 2050: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. Cancer Epidemiol [Internet]. 2024 Dec;93:102693. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782124001723
17. Mazzilli SA, Rahal Z, Rouhani MJ, Janes SM, Kadara H, Dubinett SM, et al. Translating premalignant biology to accelerate non-small-cell lung cancer interception. Nature Reviews Cancer. Nature Research; 2025.
18. Ji X, Huang J, Teng L, Li S, Li X, Cai W, et al. Advances in particulate matter filtration: Materials, performance, and application. Vol. 8, Green Energy and Environment. KeAi Publishing Communications Ltd.; 2023. p. 673–97.
19. Shehata SA, Toraih EA, Ismail EA, Hagras AM, Elmorsy E, Fawzy MS. Vaping, Environmental Toxicants Exposure, and Lung Cancer Risk. Vol. 15, Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
20. Knott EP, Kim EY, Kim EQ, Freire R, Medina JA, Wang Y, et al. Orthotopic Models Using New, Murine Lung Adenocarcinoma Cell Lines Simulate Human Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immunotherapy. Cells. 2024 Jul 1;13(13).
21. Sahu R, Shah K, Malviya R, Paliwal D, Sagar S, Singh S, et al. E-Cigarettes and Associated Health Risks: An Update on Cancer Potential. Vol. 91, Advances in Respiratory Medicine. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. p. 516–31.
22. Schaal CM, Bora-Singhal N, Kumar DM, Chellappan SP. Regulation of Sox2 and stemness by nicotine and electronic-cigarettes in non-small cell lung cancer. Mol Cancer. 2018 Oct 15;17(1).
23. Moghaddam SJ, Savai R, Salehi-Rad R, Sengupta S, Kammer MN, Massion P, et al. AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS Premalignant Progression in the Lung: Knowledge Gaps and Novel Opportunities for Interception of Non-Small Cell Lung Cancer An Official American Thoracic Society Research Statement. 2024.
24. Mori M, Rao SK, Popper HH, Cagle PT, Fraire AE. Atypical Adenomatous Hyperplasia of the Lung: A Probable Forerunner in the Development of Adenocarcinoma of the Lung. 2001.
25. Moore DA, Sereno M, Das M, Baena Acevedo JD, Sinnadurai S, Smith C, et al. In situ growth in early lung adenocarcinoma may represent precursor growth or invasive clone outgrowth—a clinically relevant distinction. Modern Pathology. 2019 Jul 1;32(8):1095–105.
26. Hynds RE, Frese KK, Pearce DR, Grönroos E, Dive C, Swanton C. Progress towards non-small-cell lung cancer models that represent clinical evolutionary trajectories. 2021;
27. Massion PP, Lehman JM. LUNG CANCER: MOLECULAR BIOLOGY AND TARGETS.
28. Verma SK, Pandey M, Khare R, Singh D. A review on non-small cell lung cancer. Vol. 25, Vacunas. Ediciones Doyma, S.L.; 2024. p. 239–53.
29. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor microenvironment as a "game changer" in cancer radiotherapy. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.

30. Manoharan V, Adegbayi OO, Maynard JP. P2 purinergic receptor expression and function in tumor-related immune cells. Purinergic Signalling. Springer Science and Business Media B.V.; 2024.
31. Feng LL, Cai YQ, Zhu MC, Xing LJ, Wang X. The yin and yang functions of extracellular ATP and adenosine in tumor immunity. Cancer Cell Int. 2020 Apr 7;20(1).
32. Vultaggio-Poma V, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular ATP: A feasible target for cancer therapy. Cells. 2020 Nov 1;9(11):1–22.
33. Laplane L, Duluc D, Bikfalvi A, Larmonier N, Pradeu T. Beyond the tumour microenvironment. Vol. 145, International Journal of Cancer. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 2611–8.
34. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. Vol. 18, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2018. p. 601–18.
35. Zhang WJ. Effect of P2X purinergic receptors in tumor progression and as a potential target for anti-tumor therapy. Available from: https://doi.org/10.1007/s11302-020-09761-8
36. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. Vol. 40, Br. J. Pharmac. 1970.
37. Illes P, Di Virgilio F, Tang Y. Editorial - Purinergic signalling: 50 years. Vol. 245, Neuropharmacology. Elsevier Ltd; 2024.
38. Burnstock G. Purinergic signalling: From discovery to current developments. Exp Physiol. 2014;99(1):16–34.
39. Verkhratsky A, Zimmermann H, Abbracchio MP, Illes P, DiVirgilio F. In Memoriam Geoffrey Burnstock: Creator of Purinergic Signaling. Function. 2020 Jan 1;1(1).
40. Deli T, Csernoch L. Extracellular ATP and cancer - An overview with special reference to P2 purinergic receptors. Vol. 14, Pathology and Oncology Research. 2008. p. 219–31.
41. Di Virgilio F, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Giuliani AL. Extracellular ATP: A powerful inflammatory mediator in the central nervous system. Vol. 224, Neuropharmacology. Elsevier Ltd; 2023.
42. Vultaggio-Poma V, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular ATP: A feasible target for cancer therapy. Cells. 2020 Nov 1;9(11):1–22.
43. Qian Y, Wang X, Liu Y, Li Y, Colvin RA, Tong L, et al. Extracellular ATP is internalized by macropinocytosis and induces intracellular ATP increase and drug resistance in cancer cells. Cancer Lett. 2014 Sep 1;351(2):242–51.
44. Jiang LH. P2X receptor-mediated ATP purinergic signaling in health and disease. Vol. 4, Cell Health and Cytoskeleton. 2012. p. 83–101.
45. Shukla S, Dalai P, Agrawal-Rajput R. Metabolic crosstalk: Extracellular ATP and the tumor microenvironment in cancer progression and therapy. Cell Signal. 2024 Sep 1;121.
46. Aria H, Rezaei M, Nazem S, Daraei A, Nikfar G, Mansoori B, et al. Purinergic receptors are a key bottleneck in tumor metabolic reprogramming: The prime suspect in cancer therapeutic resistance. Vol. 13, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2022.

47. Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgio C, Cavagna D, et al. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca2+ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2009 Apr 10;284(15):10120–8.
48. Hreich SJD, Benzaquen J, Hofman P, Vouret-Craviari V. The Purinergic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer. Vol. 14, Cancers. MDPI; 2022.
49. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, et al. Various aspects of calcium signaling in the regulation of apoptosis, autophagy, cell proliferation, and cancer. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–27.
50. Wirsching E, Fauler M, Fois G, Frick M. P2 purinergic signaling in the distal lung in health and disease. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020. p. 1–25.
51. Adinolfi E, Giulia Callegari M, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, et al. Basal Activation of the P2X 7 ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-independent Growth. Mol Biol Cell [Internet]. 16. Available from: http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E04
52. Zou Y ting, Li J yuan, Chai J yi, Hu Y shan, Zhang W jun, Zhang Q. The impact of the P2X7 receptor on the tumor immune microenvironment and its effects on tumor progression. Vol. 707, Biochemical and Biophysical Research Communications. Elsevier B.V.; 2024.
53. Yu Q, Peng X, Xu G, Bai X, Cao Y, Du Y, et al. Overexpression or knockdown of the P2X7 receptor regulates the progression of non-small cell lung cancer, involving GSK-3β and JNK signaling pathways. Eur J Pharmacol. 2025 May 15;995.
54. Boldrini L, Giordano M, Alì G, Servadio A, Pelliccioni S, Niccoli C, et al. P2X7 protein expression and polymorphism in non-small cell lung cancer (NSCLC). J Negat Results Biomed. 2014 Sep 1;13(1).
55. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. Cancer Res. 2012 Jun 15;72(12):2957–69.
56. Di Virgilio F, Vultaggio-Poma V, Sarti AC. P2X receptors in cancer growth and progression. Vol. 187, Biochemical Pharmacology. Elsevier Inc.; 2021.
57. Clunes MT, Kemp PJ. P, purinoceptor modulation of in Y racellular Ca*+ in a human lung adenocarcinoma cell line: down-regulation of Ca*+ influx by protein kinase C. Vol. 20, Research Cell Calcium. Pearson Professional Ltd; 1996.
58. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: Targeting Ca2+ transport. Vol. 7, Nature Reviews Cancer. 2007. p. 519–30.
59. Pierro C, Sneyers F, Bultynck G, Roderick HL. ER Ca2+ release and store-operated Ca2+ entry – partners in crime or independent actors in oncogenic transformation? Cell Calcium. 2019 Sep 1;82:102061.
60. Wu L, Lian W, Zhao L. Calcium signaling in cancer progression and therapy. Vol. 288, FEBS Journal. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 6187–205.
61. Roderick HL, Cook SJ. Ca2+ signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca 2+ for cancer cell proliferation and survival. Vol. 8, Nature Reviews Cancer. 2008. p. 361–75.

62. Vecellio Reane D, Serna JDC, Raffaello A. Unravelling the complexity of the mitochondrial Ca2+ uniporter: regulation, tissue specificity, and physiological implications. Vol. 121, Cell Calcium. Elsevier Ltd; 2024.
63. Marchi S, Giorgi C, Galluzzi L, Pinton P. Ca2+ Fluxes and Cancer. Vol. 78, Molecular Cell. Cell Press; 2020. p. 1055–69.
64. Hoorelbeke D, Decrock E, Van Haver V, De Bock M, Leybaert L. Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2018 Nov;1865(11):1805–14.
65. Song S, Jacobson KN, McDermott KM, Reddy SP, Cress AE, Tang H, et al. ATP promotes cell survival via regulation of cytosolic [Ca 2] and Bcl-2/Bax ratio in lung cancer cells. Am J Physiol Cell Physiol [Internet]. 2016;310:99–114. Available from: www.ajpcell.org
66. Zheng S, Wang X, Zhao D, Liu H, Hu Y. Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications. Vol. 33, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2023. p. 312–23.
67. Urtreger AJ, Diament MJ, Ranuncolo SM, Vidal MDC, Puricelli LI, Klein SM, et al. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. Vol. 18, INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY. 2001.
68. Stribbling SM, Beach C, Ryan AJ. Orthotopic and metastatic tumour models in preclinical cancer research. Vol. 257, Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Inc.; 2024.
69. Diament MJ, Garcia C, Stillitani I, Saavedra VM, Vauthay L, Klein S. Spontaneous murine lung adenocarcinoma (P07): a new experimental model to study paraneoplastic syndromes of lung cancer. Vol. 2, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE. 1998.
70. Zanoni M, Pegoraro A, Adinolfi E, De Marchi E. Emerging roles of purinergic signaling in anti-cancer therapy resistance. Vol. 10, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media S.A.; 2022.
71. Bai X, Li Q, Peng X, Li X, Qiao C, Tang Y, et al. P2X7 receptor promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells through the PI3K/Akt pathways. Purinergic Signal. 2023 Dec 1;19(4):685–97.
72. Smolarz B, Łukasiewicz H, Samulak D, Piekarska E, Kołaciński R, Romanowicz H. Lung Cancer—Epidemiology, Pathogenesis, Treatment and Molecular Aspect (Review of Literature). Vol. 26, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025.
73. Nuñez-Rios JD, Ulrich H, Díaz-Muñoz M, Lameu C, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic system in cancer stem cells. Vol. 21, Purinergic Signalling. Springer Science and Business Media B.V.; 2025. p. 23–38.
74. Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. Journal of Clinical Investigation. 2013 Jul 1;123(7):3025–36.
75. De Marchi E, Orioli E, Pegoraro A, Sangaletti S, Portararo P, Curti A, et al. The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. Oncogene. 2019 May 9;38(19):3636–50.

76. Csordás G, Weaver D, Hajnóczky G. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. Vol. 28, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2018. p. 523–40.
77. Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium-cancer signalling nexus. Vol. 17, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2017. p. 367–80.
78. Hamada K, Terauchi A, Nakamura K, Li Y, Zhang J, Li J, et al. Long-range gating regulation by leaflet and autoinhibitory domains in mouse type 1 IP3 receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2025 Jun 20;766.
79. Zhao W Bin, Sheng R. The correlation between mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) and Ca2+ transport in the pathogenesis of diseases. Vol. 46, Acta Pharmacologica Sinica. Springer Nature; 2025. p. 271–91.
80. Bong AHL, Monteith GR. Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells. Vol. 1865, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. Elsevier B.V.; 2018. p. 1786–94.
81. Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, et al. Antitumor activity of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. Clinical Cancer Research. 2006 Dec 1;12(23):7117–25.
82. Charlton SJ, Vauquelin G. Themed Section: Analytical Receptor Pharmacology in Drug Discovery Elusive equilibrium: the challenge of interpreting receptor pharmacology using calcium assays. 1250 British Journal of Pharmacology [Internet]. 2010;161–1250. Available from: www.brjpharmacol.org
83. Henningsen MB, McWhan K, Dam VS, Mele M, Hauerslev KR, Voss NCS, et al. Amplified Ca2+ dynamics and accelerated cell proliferation in breast cancer tissue during purinergic stimulation. Int J Cancer. 2022 Oct 1;151(7):1150–65.
84. Zhang WJ, Zhang LP, Lin SJ, Wang CY, Le YG. P2 purinergic receptors regulate the progression of colorectal cancer. Vol. 21, Purinergic Signalling. Springer Science and Business Media B.V.; 2025. p. 767–80.
85. Murrell-Lagnado RD, Frick M. P2X4 and lysosome fusion. Vol. 47, Current Opinion in Pharmacology. Elsevier Ltd; 2019. p. 126–32.
86. North RA. Molecular Physiology of P2X Receptors. 2002; Available from: www.prv.org
87. von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. Pharmacol Ther [Internet]. 2006;110(3):415–32. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725805002044
88. Urtreger AJ, Diament MJ, Ranuncolo SM, Vidal MDC, Puricelli LI, Klein SM, et al. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. Vol. 18, INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY. 2001.