



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuroendocrinología

“Efecto del ATP sobre la capacidad proliferativa y migratoria en la línea tumoral A549, proveniente de cáncer de pulmón de células no pequeñas”

TESIS

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

LBM. David Eduardo Pérez Calderas

Director de Tesis:

D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán

Revisores:

D.C. María del Rosario Guadalupe Vega y Sáenz de Miera

D.C. Amira del Rayo Flores Urbina

Noviembre, 2024

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	5
I. RESUMEN.....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	9
1. Cáncer.....	9
1.1 Generalidades.....	9
1.2 Epidemiología	10
2. Cáncer de Pulmón.....	11
2.1 Generalidades.....	11
2.2 Epidemiología	12
2.3 Factores de riesgo	12
2.4 Clasificación	14
2.5 Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).....	15
3. ATP y la señalización purinérgica	16
3.1 Receptores purinérgicos	18
3.1 Señalización purinérgica en el pulmón	22
4. Señalización purinérgica y cáncer	24
4.1 Receptores purinérgicos y cáncer.....	24
4.2 ATP en el microambiente tumoral	26
4.3 ATP en la proliferación y el crecimiento tumoral.....	27
4.4 ATP en la migración e invasión celular	29
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPOTESIS.....	34
V. OBJETIVOS	34
Objetivo general.....	34
Objetivos específicos	34
VI. METODOLOGÍA.....	35
Línea Celular A549	35
Cultivo celular.....	35
Ensayo de expresión génica (RT-PCR de punto final)	36
a) Extracción del ácido ribonucleico total (ARN _T)	36
b) Cuantificación de ARN.....	37
c) Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)	37

d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....	38
e) Separación electroforética de los productos de PCR.....	40
f) Densitometría	40
Ensayo de proliferación (Conteo celular).....	41
Ensayo de Migración.....	41
Análisis estadístico	42
VII. RESULTADOS.....	43
1. Las células A549 expresan el ARNm que codifica para diversos subtipos de receptores purinérgicos P ₂	43
2. El ATPe estimula la capacidad proliferativa de las células A549.....	44
3. El ATPe promueve un aumento de la capacidad migratoria de las células A549.....	49
VIII. DISCUSIÓN.....	53
IX. CONCLUSIONES.....	62
X. BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción de los receptores purinérgicos.	21
Tabla 2. Expresión de receptores P2 en diferentes líneas celulares de cáncer.....	24
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de PCR.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades, habilidades y características facilitadoras de células tumorales.....	9
Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial	11
Figura 3. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de pulmón	13
Figura 4. Clasificación del cáncer de pulmón	15
Figura 5. Señalización purinérgica.....	17
Figura 6. Vía de señalización inducida por la activación de los receptores P2X.	20
Figura 7. Vías de señalización intracelulares inducidas por la activación de los receptores P2Y.	21
Figura 8. El ATPe y sus efectos en células tumorales.....	26
Figura 9. Efecto del ATPe sobre la proliferación en células tumorales.	28

Figura 10. Efecto del ATPe sobre la proliferación de diferentes líneas celulares	29
Figura 11. Efecto del ATPe sobre la capacidad migratoria de diferentes líneas celulares..	30
Figura 12. Efecto del ATPe sobre la expresión de marcadores asociados a la transición epitelio-mesénquima en diferentes líneas celulares.....	31
Figura 13. Morfología de la línea celular A549	35
Figura 14. Protocolo de la reacción de retrotranscripción (RT)	37
Figura 15. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	38
Figura 16. Expresión del ARNm que codifica para los receptores P2 en células A549.....	43
Figura 17. Curva dosis-efecto del ATP sobre el número de células A549 viables.	45
Figura 18. Curso temporal del efecto de ATP sobre el número de células A549 viables ...	46
Figura 19. El ATP modifica la expresión del ARNm que codifica para proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis	47
Figura 20. El ATP modifica la expresión del ARNm que codifica para proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular.	48
Figura 21. El ATP favorece la capacidad migratoria de las células A549.	49
Figura 22. El ATP favorece el fenotipo mesenquimal de las células A549.	50
Figura 23. El ATP modifica la expresión del ARNm que codifica para los factores de transcripción asociados a la transición Epitelio-Mesénquima.....	51
Figura 24. El ATP no altera la expresión del ARNm que codifica para proteínas implicadas en la metástasis.....	52

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
ALK	Cinasa del linfoma anaplásico
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	AMP cíclico
APC	Complejo promotor de la anafase
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	Colección de tipos de cultivos americana
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATPe	ATP extracelular
BRAF	Homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-raf
BrEt	Bromuro de etidio
Ca²⁺	Calcio
CALMH1	Canal modulador de la homeostasis del calcio 1
CaMKII	Calcio calmodulina cinasa II
CD39	Ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa 1
CD73	Ecto-5'-nucleótidasa
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
cIAP2	IAP baculoviral que contiene 3 repeticiones
DAG	Diacilglicerol
DAMP	Patron molecular asociado a daño
dNTP	Desoxi-nucleótido trifosfato
E-5'-NT	Ecto-5'-nucleótidasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ENaC	Canal epitelial de sodio
E-NTPDasa	Ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa
ER	Retículo endoplásmico
ERBB2	Oncogén HER2/neu
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FTAEMT	Factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima
GLOBOCAN	Observatorio Global de Cáncer
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa
IAP	Inhibidor de la apoptosis
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IP₃	Fosfatidil inositol 1, 4, 5 – trifosfato

IP₃R	Receptor a IP ₃
K⁺	Potasio
KEAP	Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch
KRAS	Oncogén del sarcoma de rata de Kirsten
MAC	Canal maxi-aniónico
MAT	Microambiente tumoral
MDR1	Proteína de resistencia a múltiples fármacos 1
MET	Protooncogén
MMP	Metaloproteinasa
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
Na⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NF1	Neurofibromina 1
NF-kB	Factor nuclear kappa beta
NGR1	Neurregulina 1
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
NTRK	Receptor de tropomiosina cinasa A
OMS	Organización Mundial de la Salud
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PNX-1	Panexina 1
RB1	Proteína del retinoblastoma
RET	Protooncogén RET
ROS1	Protooncogén tirosina-proteína cinasa ROS
RT – PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SFB	Suero fetal bovino
STK11	Serina/treonina cinasa 11
SUR	Receptor a sulfonilurea
TAE	Tampón de tris, acetato y EDTA
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TP53	Proteína p53
TUNEL	Marcaje del final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
VRAC	Canales aniónico regulado por volumen
α-SMA	Actina de músculo liso alfa

I. RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por presentar una desregulación en la división celular, debido a la presencia de mutaciones, que, por un lado, favorecen la capacidad proliferativa, y por otro lado, reducen la capacidad apoptótica. El cáncer de pulmón, es uno de los tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial y nacional. Desde el punto de vista celular, se presenta cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, siendo este último el más común, representando hasta el 85% del total de casos de cáncer de pulmón. Un porcentaje importante de pacientes mueren en los primeros 5 años, después de haber sido diagnosticados con cáncer de pulmón, ya que, al ser una enfermedad con inicios asintomáticos, cuando es diagnosticada, el cáncer ya está en estado avanzado, incluso con metástasis. Una vez que se presenta la metástasis, el pronóstico y calidad de vida del paciente no es favorable. Por lo que numerosos grupos de investigación se han abocado a estudiar que señales o factores presentes en el microambiente tumoral, favorecen el desarrollo y progresión del cáncer, con el fin de identificar y proponer blancos farmacológicos, que puedan ser utilizados, para reducir al menos parcialmente, el crecimiento del tumor y la posibilidad de que las células cancerosas hagan metástasis, dando con esto, una mayor ventana de tiempo, para que las estrategias terapéuticas para su tratamiento, tales como cirugía, radio, quimio e inmunoterapia, puedan tener mejores resultados.

Recientemente, ha llamado poderosamente la atención la presencia de receptores purinérgicos en las células tumorales, específicamente de la familia P_2 , sin conocerse a detalle la relevancia funcional que pudieran llegar a tener. Por lo que el propósito del presente trabajo de tesis fue investigar si la activación de receptores P_2 (P_2X y P_2Y) por ATP extracelular (ATPe), es capaz de incidir sobre la capacidad proliferativa y migratoria en las células A549, provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los resultados obtenidos muestran que las células A549 expresan de manera diferencial el ARNm que codifica para diferentes receptores P_2X y P_2Y . La presencia de 100 μ M de ATPe induce un incremento en la densidad celular, obedeciendo este efecto, por un lado, a una reducción en la expresión de los marcadores moleculares relacionados con la tasa apoptótica de las células A549 (cIAP2), y por otro lado, a un aumento en la expresión de las ciclinas E1 y B1,

relacionadas con la progresión del ciclo celular. Igualmente, la presencia de ATP incide positivamente en la capacidad migratoria de las células A549, al favorecer el fenotipo mesenquimal en dichas células, observándose un incremento significativo en la expresión de Snail 1, factor de transcripción asociado a la transición epitelio-mesénquima, así como en los niveles de vimentina y α -SMA, marcadores moleculares del fenotipo mesenquimal.

Estos resultados revelan la significancia funcional de los receptores a purinérgicos sobre la progresión tumoral, por lo que pudieran ser considerados potencialmente, como blancos farmacológicos para un tratamiento más efectivo.

II. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

1.1 Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un término genérico que designa a un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células malignas que pueden aparecer en prácticamente cualquier lugar del cuerpo y que se extienden más allá de sus límites habituales, invadiendo tejidos adyacentes u otros órganos distantes, a través de un proceso conocido como metástasis (OMS, 2024).

El cáncer es un enfermedad de etiología diversa y multifactorial, que se origina a nivel celular con la transformación de células normales en células cancerígenas en un proceso progresivo, definido como carcinogénesis, iniciándose a partir de una lesión precancerosa hasta la formación de un tumor maligno (Bertram, 2000; OMS, 2024), debido a la sobreexpresión de protooncogenes mutados y al silenciamiento de genes supresores de tumores. Las mutaciones pueden deberse a errores en la replicación del ADN o por daño al ADN inducido por radicales libres, exposición a sustancias químicas o radiaciones ionizantes (Bertram, 2000; Hanahan, 2022). Además, cambios epigenéticos como la metilación del ADN, modificación de la cromatina y nucleosomas al igual que cambios en el



Figura 1. Capacidades, habilidades y características facilitadoras de células tumorales

La investigación respecto a la fisiología celular del cáncer ha sugerido una serie de capacidades presentes en las células de cáncer que facilitan el crecimiento tumoral. (Modificado de Hanahan, 2022).

perfil de expresión de diversos tipos de ARN no codificante contribuyen a la carcinogénesis y progresión del cáncer (Pendharkar, Ausekar, & Gupta, 2013).

Las células transformadas poseen y adquieren características diferenciales que les permiten sobrevivir, proliferar e invadir, estas capacidades se desarrollan como resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales; las principales vías alteradas en estas células incluyen las relacionadas al mantenimiento de la proliferación, la evasión de la apoptosis y regulación del ciclo celular, la evasión de la respuesta inmune, la reprogramación del metabolismo energético y la metástasis e invasión; de manera adicional se ha incluido el papel de la reprogramación epigenética no mutacional y se ha destacado al microambiente tumoral formado por una población celular heterogénea en constante interacción con la influencia del microbioma y la presencia de células senescentes tanto cancerígenas como propias del estroma, como agentes facilitadores de la progresión tumoral (Hanahan, 2022) (*Figura 1*).

1.2 Epidemiología

El Observatorio Global de Cáncer (GLOBOCAN) de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), para el año 2022 reportó más de 19.9 millones de nuevos casos de cáncer y más de 9.7 millones de muertes por esta causa, según los datos recabados de 186 países, para población de ambos sexos y de todos los grupos de edad. De igual forma, este organismo estima un aumento significativo en dichos números, se pronostica que para el año 2040, habrá 30.2 millones de nuevos casos de cáncer, y la muerte de 16.3 millones de personas a nivel mundial (IACR, 2022a, 2022b).

Entre los diferentes tipos de cáncer, los de mayor incidencia son el cáncer de pulmón (12.4%), el cáncer de mama (11.5%), colorrectal (9.6%), de próstata (7.3%) y de estómago (4.8%). En cuanto a la tasa de mortalidad, el cáncer de pulmón, ocupa igualmente, la primera posición, representando el 18.7% del total de fallecimientos, seguido del cáncer colorrectal (9.3%), el de hígado (7.8%), el de mama (6.8%) y el de estómago (6.8%) (*Figura 2*) (IACR, 2022b).

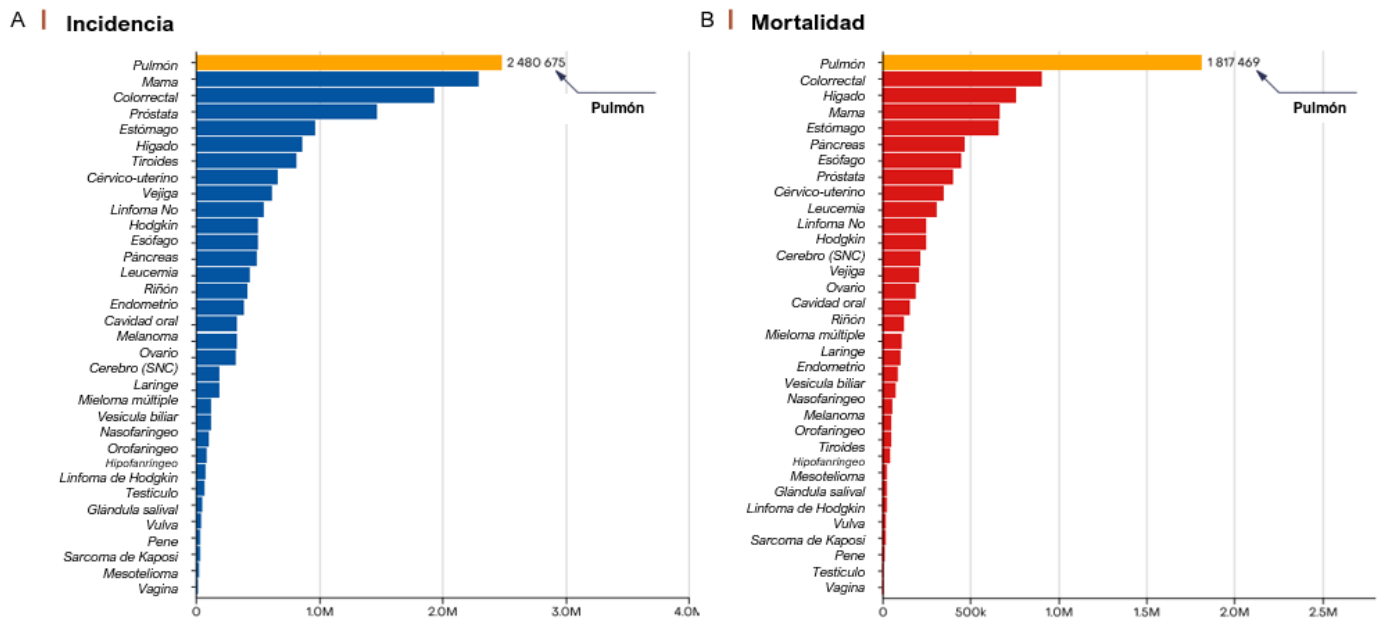


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial. El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor incidencia (A) y de mayor mortalidad (B) a nivel mundial en ambos sexos (Modificado de IARC, 2022).

2. Cáncer de Pulmón

2.1 Generalidades

El pulmón es un órgano complejo compuesto de múltiples tipos celulares cuya principal función es el intercambio gaseoso, que ocurre en el epitelio alveolar formado por los neumocitos tipo I que son células epiteliales simples y son el sitio principal del intercambio entre el oxígeno y el dióxido de carbono y los neumocitos tipo II que secretan el surfactante pulmonar manteniendo la humedad la superficie entre las células y el aire, y reduciendo la tensión superficial. Durante el proceso de difusión entre oxígeno y dióxido de carbono la vía aérea está en constante exposición a gases, contaminantes de partículas finas y agentes infecciosos, por lo que las partículas inhaladas se eliminan por acción de los cilios respiratorio, las células inmunitarias y los fagocitos apoyados de la producción de moco y la actividad de las células neuroendocrinas que se encargan del mantenimiento de esta función de intercambio gaseoso; por lo que durante este intercambio las células pueden someterse a una acumulación de adaptaciones celulares autónomas y microambientales

que modifican el equilibrio entre la proliferación y muerte células, evitando el reconocimiento del sistema inmune lo que da lugar al desarrollo de cáncer (Gridelli et al., 2015).

Por lo que el cáncer de pulmón se origina por el crecimiento anormal e incontrolado de las células del tejido pulmonar, que forman un tumor y este puede trasladarse a otras partes del organismo, generalmente se origina de las células que conforman el epitelio respiratorio, los alveolos, bronquios y/o los bronquiolos (IACR, 2022c).

2.2 Epidemiología

Entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia mundial con un estimado de 2.48 millones de casos nuevos por año, representando el 12.4% de los casos registrados en 2022 y también es la primera causa de muerte por cáncer a nivel global, causando aproximadamente 1.81 millones de muertes por año, lo que corresponde al 18.7% de las defunciones por cáncer reportadas a nivel general (*Figura 2*) (IACR, 2022b, 2022c). La tasa de supervivencia global estimada para pacientes con cáncer de pulmón es de 10-20% a los 5 años del diagnóstico (Bi et al., 2024; Thandra, Barsouk, Saginala, Aluru, & Barsouk, 2021) y de manera específica, la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas de grado metastásico es menor al 5% (Arbour & Riely, 2019).

A nivel nacional, de acuerdo a los datos del GLOBOCAN, el cáncer de pulmón ocupa el noveno lugar de incidencia y el tercer lugar de mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer (IACR, 2022a); dentro del grupo de hombres adultos de 60 años y más, esta enfermedad representa la segunda causa de muerte con 42.34 fallecimientos por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2024).

2.3 Factores de riesgo

Diversos factores ambientales y conductuales se han correlacionado con el desarrollo de cáncer de pulmón (Alduais, Zhang, Fan, Chen, & Chen, 2023), el tabaquismo se ha señalado como el principal factor de riesgo, tanto activo como pasivo, la exposición a sustancias químicas (solventes, pesticidas), contaminantes atmosféricos (metales pesados,

gas radón, asbesto, arsénico, cromo, berilio y níquel), aumentan el riesgo de cáncer de pulmón (Figura 3) (Alduais et al., 2023; Thandra et al., 2021).

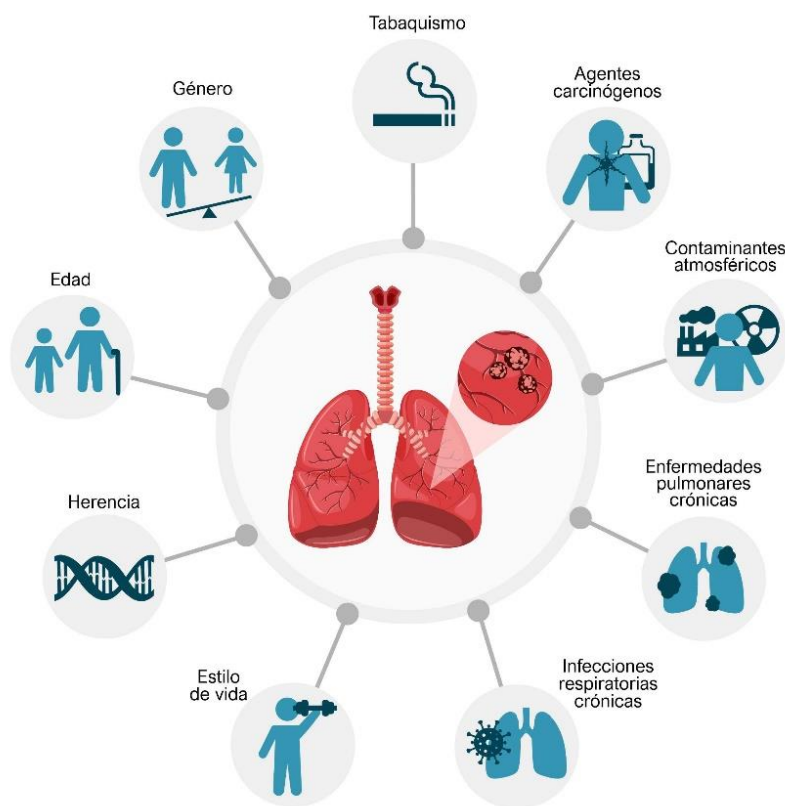


Figura 3. Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de pulmón (Modificado de (Alduais et al., 2023; Thandra et al., 2021).

Entre los factores de riesgo no modificables, la edad es uno de ellos, ya que la tumorigénesis pulmonar, se presenta décadas después de la exposición inicial a compuestos mutagénicos, lo que explica el retraso del curso de la enfermedad, igualmente con la edad, los telómeros se acortan, disminuyen los niveles del NAD^+ y disminuye la capacidad celular de la reparación al daño del ADN, favoreciendo la supervivencia de células atípicas. A nivel mundial, los hombres tienen el doble de probabilidad de ser diagnosticados y morir por cáncer de pulmón en relación con las mujeres, esta disparidad se le atribuye especialmente al hábito de fumar (Figura 3) (Alduais et al., 2023; Thandra et al., 2021).

En cuanto a la predisposición genética y hereditaria al cáncer, el estudio de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han relacionado diferentes regiones cromosómicas asociadas a un incremento del riesgo de cáncer de pulmón entre las que se encuentran: el locus 5p15, que incluye los genes para la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT), el locus 6p21, que regula la señalización mediada por proteínas G, y el loci 15q25–26, relacionado con un incremento a la dependencia a la nicotina y un aumento a susceptibilidad al cáncer de pulmón (*Figura 3*) (Thandra et al., 2021).

La presencia de enfermedades no infecciosas pulmonares crónicas previas, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y fibrosis pulmonar aumentan el riesgo de desarrollo de cáncer de pulmón. De igual forma la inflamación y el daño celular asociado a infecciones respiratorias crónicas como la tuberculosis, neumonía por *Streptococcus pneumoniae* o *Chlamydia pneumoniae* y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana se han también implicado con la carcinogénesis pulmonar (*Figura 3*) (Alduais et al., 2023; IACR, 2022c; Thandra et al., 2021).

2.4 Clasificación

El cáncer de pulmón es una enfermedad heterogénea con características clínico-patológicas muy variadas. Considerando la célula de origen, su tamaño y características histopatológicas, el cáncer de pulmón se clasifica en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) (Ibodeng et al., 2023; Thandra et al., 2021). De acuerdo con la clasificación de tumores torácicos del año 2021 de la OMS, el cáncer de pulmón se subclasifica en tumores epiteliales, neoplasias neuroendocrinas pulmonares y tumores de tejidos. Los tumores epiteliales son los más comunes y pueden a su vez subclasificarse como adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, entre otros (Ibodeng et al., 2023; Nicholson et al., 2022).

El SCLC, corresponde al 15% del total de casos diagnosticados y el NSCLC al 85% (Thai, Solomon, Sequist, Gainor, & Heist, 2021; Travis et al., 2015), este último a su vez se divide en carcinoma de células escamosas (el 30% de los casos) y en carcinoma de células no escamosas (el 70% de los casos), el grupo de células no escamosas se subdivide en

adenocarcinoma (el subtipo más común con 90% de los casos) y carcinoma de células grandes (el 10% de los casos) (Figura 4) (Gridelli et al., 2015; Thai et al., 2021).

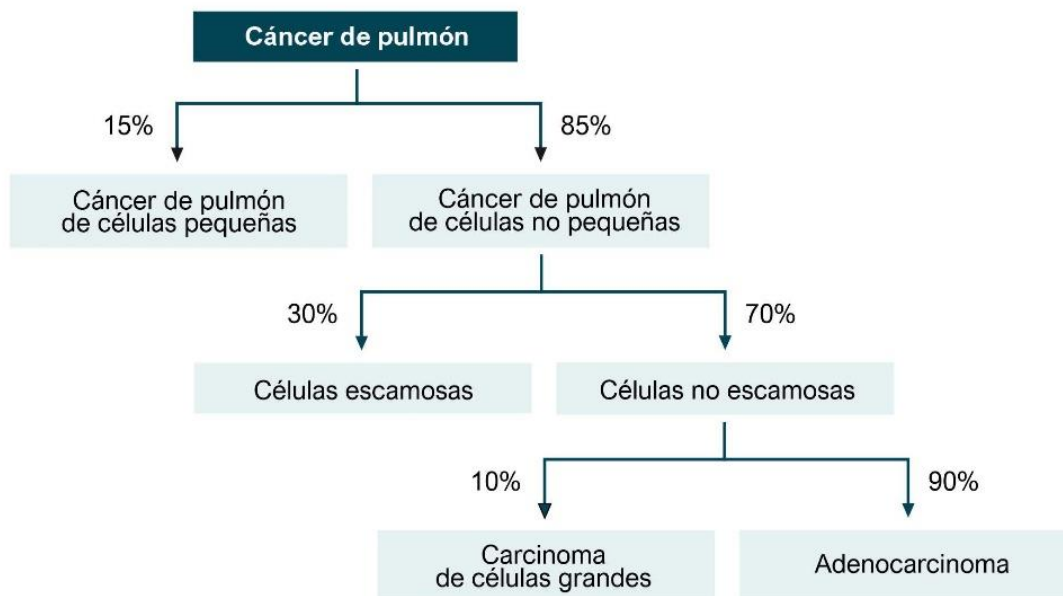


Figura 4. Clasificación del cáncer de pulmón (Modificado de (Gridelli et al., 2015; Thai et al., 2021).

2.5 Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

El cáncer de pulmón, al igual que diversos tipos de cáncer, está compuesto por diferentes subpoblaciones celulares o clonas con distintas características moleculares lo que resulta en una heterogeneidad intratumoral por lo que se han identificado diversos marcadores relacionados a la inducción y mantenimiento de la carcinogénesis presentes en todos los subtipos del NSCLC, la frecuencia de estas alteraciones son resultado de la suma de mutaciones somáticas, deleciones, traslocaciones, amplificaciones y de la regulación a la alta o a la baja de la expresión génica (Gridelli et al., 2015; Herbst, Morgensztern, & Boshoff, 2018; Pendharkar et al., 2013). Hay altas tasas de mutación somática y reordenamiento genómico en el NSCLC (Chevallier, Borgeaud, Addeo, & Friedlaender, 2021).

Los oncogenes más estudiados en el NSCLC y consideradas mutaciones conductoras (driver mutations), incluyen el gen *EGFR* (receptor del factor de crecimiento

epidérmico), el gen *ERBB2* y translocaciones del gen *KRAS* (sarcoma de rata de Kirsten), presentes principalmente en adenocarcinomas (10-60% de los casos) (Chevallier et al., 2021; Gridelli et al., 2015).

Las mutaciones en la proteína p53 (*TP53*) se observan con mayor frecuencia en tumores de pulmón de grado avanzado, así como las mutaciones en el gen supresor de tumores *RB1* (proteína del retinoblastoma) (Herbst et al., 2018). Otras mutaciones menos frecuentes se presentan en el gen *ALK* (cinasa del linfoma anaplásico), el protooncogén *ROS1*, en el gen *BRAF* (homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-raf), el protooncogén *MET*, el gen *PIK3CA*, el gen *RET*, el gen *NTRK1* (*receptor neurotrófico tirosin-cinasa 1*), el gen *NRG1* (neuregulina 1) y en los genes supresores de tumores: *KEAP1*, *STK11* y *NF1* (neurofibromina 1) (Chevallier et al., 2021; Gridelli et al., 2015; Herbst et al., 2018). Estas mutaciones, involucran componentes claves de vías relacionadas a la señalización mediada por receptores con actividad tirosin-cinasa, la señalización de la vía mTOR, la respuesta al estrés oxidativo, la proliferación y la progresión del ciclo celular (Herbst et al., 2018).

3. ATP y la señalización purinérgica

Las purinas y pirimidinas son moléculas ubicuas implicadas en la formación de los ácidos nucleicos, coenzimas, mediadores energéticos y de mensajeros intra y extracelulares (Burnstock, 2018); entre estos nucleótidos, la adenosina 5'-trifosfato (ATP) es esencial para el metabolismo energético y está formado por la unión covalente de una pentosa (desoxirribosa), una base nitrogenada (adenina) y tres grupos fosfato.

El ATP es producido y consumido en múltiples procesos celulares debido su capacidad de almacenar, en forma de energía química potencial, una gran cantidad de energía que se libera cuando sus grupos fosfato son hidrolizados; de manera adicional a su función clásica como fuente de energía intracelular, el ATP extracelular también actúa como una molécula de señalización (Burnstock, 2020; Campos-Contreras et al., 2020; Di Virgilio, Sarti, Falzoni, De Marchi, & Adinolfi, 2018).

En 1929, Drury y Szent-Györgyi propusieron que los compuestos de adenina podían actuar como moléculas de señalización en los vasos sanguíneos y el corazón, generando vasodilatación, inhibiendo la actividad espontánea del músculo liso y reduciendo la frecuencia cardíaca (Drury & Szent-Györgyi, 1929); pero el concepto de señalización purinérgica, fue propuesto hasta 1972, por Burnstock, al demostrar que el ATP actúa como el transmisor responsable de la señalización no adrenérgica y no colinérgica en el intestino y la vejiga, demostrándose la existencia de receptores específicos, transportadores y mecanismos de liberación de purinas extracelulares (Burnstock, 1972, 2020).

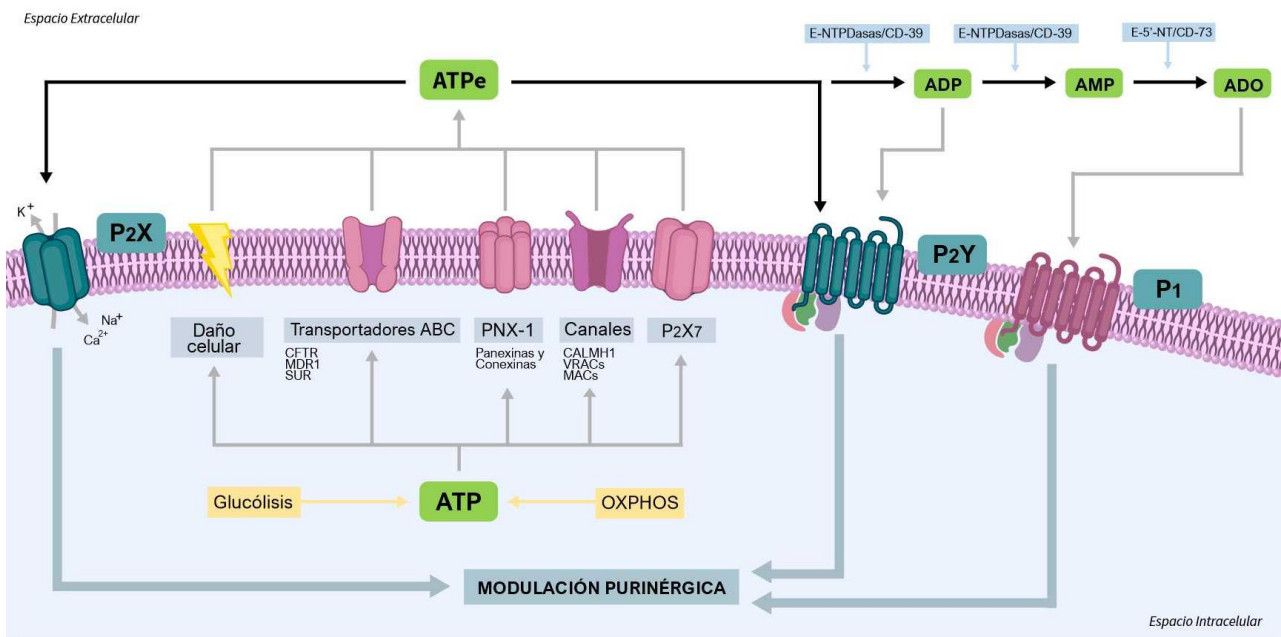


Figura 5. Señalización purinérgica. La glucólisis y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) producen ATP en la célula, que se libera a través de la lisis celular, exocitosis y/o es transportado por panexinas (PNX-1), hemicanales, transportadores ABC (CFTR, MDR1, SUR), canales (CALMH1, VRACs, MACs), P2X7, etc al espacio extracelular. Las membranas celulares tienen varias enzimas conocidas como ectonucleotidasas; las ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasas (ENTPDasas/CD39) y las ecto-5'-nucleotidasas (E-5'-NT/CD73). Las E-NTPdasas hidrolizan el ATP₃ (ATP extracelular) a ADP y también ADP a AMP. El ATPe activa a los receptores ionotrópicos P2X (canales de iones activados por ligando) y a receptores metabotrópicos P2Y (miembros de la superfamilia GPCR). El ATPe y el AMP se hidroliza a ADO (Adenosina) por E-5'-NT. CD39 y CD73 hidrolizan el ATPe a ADP y AMP a ADO en las células tumorales. ADP también activa a los receptores P2Y y ADO a los receptores P1 (miembros de la familia de GPCR). Modificado de (Campos-Contreras, Díaz-Muñoz, & Vázquez-Cuevas, 2020; Kaur & Dora, 2023; Shukla et al., 2024)

El sistema de señalización purinérgica emplea a las purinas, principalmente el ATP, y pirimidinas extracelulares como moléculas de señalización (Burnstock, 2020). El ATP es considerado un mensajero extracelular idóneo debido a las siguientes características: a) baja concentración en el espacio extracelular en condiciones fisiológicas (nmol/l); alta concentración a nivel intracelular (5-10 mmol/l); c) es soluble en agua, lo que le permite difundir rápidamente en el espacio extracelular; d) es degradado rápidamente por las enzimas ecto-nucleotidasas; y e) tiene alta afinidad por receptores de membrana específicos (*Figura 5*) (Di Virgilio et al., 2018; Vultaggio-Poma, Sarti, & Di Virgilio, 2020).

El ATP es liberado al medio extracelular por dos grandes mecanismos, uno inespecífico y otro específico regulado. El mecanismo inespecífico incluye, la liberación de ATP en respuesta a la deformación mecánica, lisis celular, daño a la membrana plasmática y cambios de la presión osmótica; mientras que el mecanismo específico regulado activamente, incluye la liberación vesicular a través de la exocitosis, participación de algunos transportadores de membrana (transportadores ABC, la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1) y el receptor a sulfonilurea (SUR); y canales de membrana, los cuales se encuentran formados por conexinas y panexinas, los canales moduladores de la homeostasis del calcio (CALHM1), los canales aniónicos regulados por volumen (VRACs) y canales maxi-aniónicos (MACs). De igual forma, el propio receptor P2X7, está involucrado en la difusión transmembrana del ATP (*Figura 5*) (Campos-Contreras et al., 2020; Cao et al., 2023; Di Virgilio et al., 2018; Tatur, Kreda, Lazarowski, & Grygorczyk, 2008).

En el medio extracelular, el ATP, por un lado, puede activar a diferentes tipos de receptores P2, y por otro lado, puede ser desfosforilado, generando metabolitos que actúan como ligandos específicos para otros receptores purinérgicos tipo P2 (*Figura 5*) (Campos-Contreras et al., 2020). El ATP, participa en diferentes respuestas celulares, actúa como molécula de señalización a corto plazo en la neurotransmisión, neuromodulación y neurosecreción y a largo plazo, influye sobre la proliferación, diferenciación, muerte celular, el desarrollo embrionario y regeneración tisular (Burnstock, 2020; Di Virgilio et al., 2018).

3.1 Receptores purinérgicos

La señalización purinérgica es un sistema evolutivo primitivo (Burnstock & Verkhratsky, 2009). Los receptores purinérgicos humanos se expresan en células

neuronales y no neuronales (Burnstock, 2020), son proteínas integrales de membrana y se han clasificado en dos familias: los receptores P1 selectivos para adenosina, la cual es producto de la degradación del ATP por las enzimas ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas/CD39) y las ecto-5'-nucleótidasas (E-5'-NT/CD73); y los receptores P2, sensibles a nucleótidos de adenina y uridina (*Figura 5*) (Burnstock, 2018; Di Virgilio et al., 2018; Shukla et al., 2024; Woods et al., 2021).

Los receptores P1 pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G similares a rodopsina con un extremo N-terminal corto intracelular y un extremo C-terminal largo intracelular (Burnstock, 2018), se han descrito cuatro tipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 y su activación se relaciona con la enzima adenilato ciclasa, la activación de los receptores A_{2A} y A_{2B} estimulan la producción de AMPc mientras que la activación de los receptores A_1 y A_3 tiene un efecto inhibitorio (Burnstock, 2018; Burnstock & Verkhratsky, 2009).

La familia de receptores P2 se divide en dos subgrupos: los receptores P_2X de tipo ionotrópico y los receptores P_2Y metabotrópicos. Existen siete tipos de receptores P_2X (denominados P_2X_{1-7}), estos son canales iónicos activados por ligando formados por tres subunidades de dos dominios transmembrana que forman complejos homotriméricos o heterotriméricos, comparten esta estructura con otros canales como los canales de sodio epiteliales y los canales iónicos sensibles a ácido, lo que sugiere la existencia de un antecesor común (Burnstock & Verkhratsky, 2009). El ATP es su ligando endógeno y en condiciones fisiológicas cuando son activados promueven la entrada de iones Ca^{2+} y Na^+ así como la salida de iones K^+ promoviendo la despolarización celular y un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (*Figura 6*) (Burnstock, 2020; Burnstock & Verkhratsky, 2009; Campos-Contreras et al., 2020).

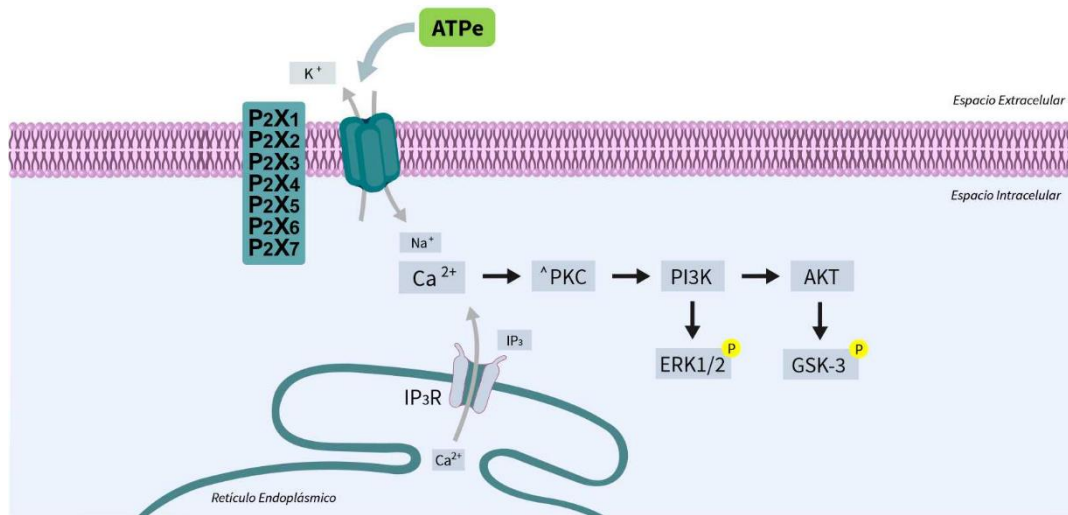


Figura 6. Vía de señalización inducida por la activación de los receptores P2X. La unión del ATPe a los diferentes subtipos de receptores P₂X (1,2,3,4,5,6,7) desencadena eventos de señalización celular. Funcionando como receptores ionotrópicos, estos receptores facilitan el influjo de iones de sodio y calcio al interior celular y la extrusión de potasio, dando lugar a un aumento de los niveles de calcio intracelular, la señalización celular subsecuente implica la activación de las moléculas PKC, PI3K, AKT y GSK3. Modificado de (Kaur & Dora, 2023; Shukla, Dalai, & Agrawal-Rajput, 2024; Woods, Forti, Shanbhag, Camden, & Weisman, 2021).

Para el caso de los receptores P₂Y, son receptores que pertenecen a la familia GPCR, conformados por siete segmentos transmembrana, el dominio N-terminal extracelular y el dominio C-terminal intracelular y están acoplados a diferentes proteínas G para la generación de segundos mensajeros (Ca²⁺, IP₃ y AMP_c). Se han identificado en células de mamífero, hasta ocho tipos de receptores funcionales (P₂Y₁, P₂Y₂, P₂Y₄, P₂Y₆, P₂Y₁₁, P₂Y₁₂, P₂Y₁₃, P₂Y₁₄). Los receptores P₂Y₂, P₂Y₄ y P₂Y₆ están acoplados a una proteína G_q que activa a la fosfolipasa C (PLC), los receptores P₂Y₁₂, P₂Y₁₃ y P₂Y₁₄ están acoplados a una proteína G_i que inhibe a la adenilato ciclasa (AC) y el receptor P₂Y₁₁ está acoplado tanto a una proteína G_q y a una G_s que estimula el aumento del AMP_c (Figura 7) (Burnstock, 2020; Campos-Contreras et al., 2020; Woods et al., 2021).

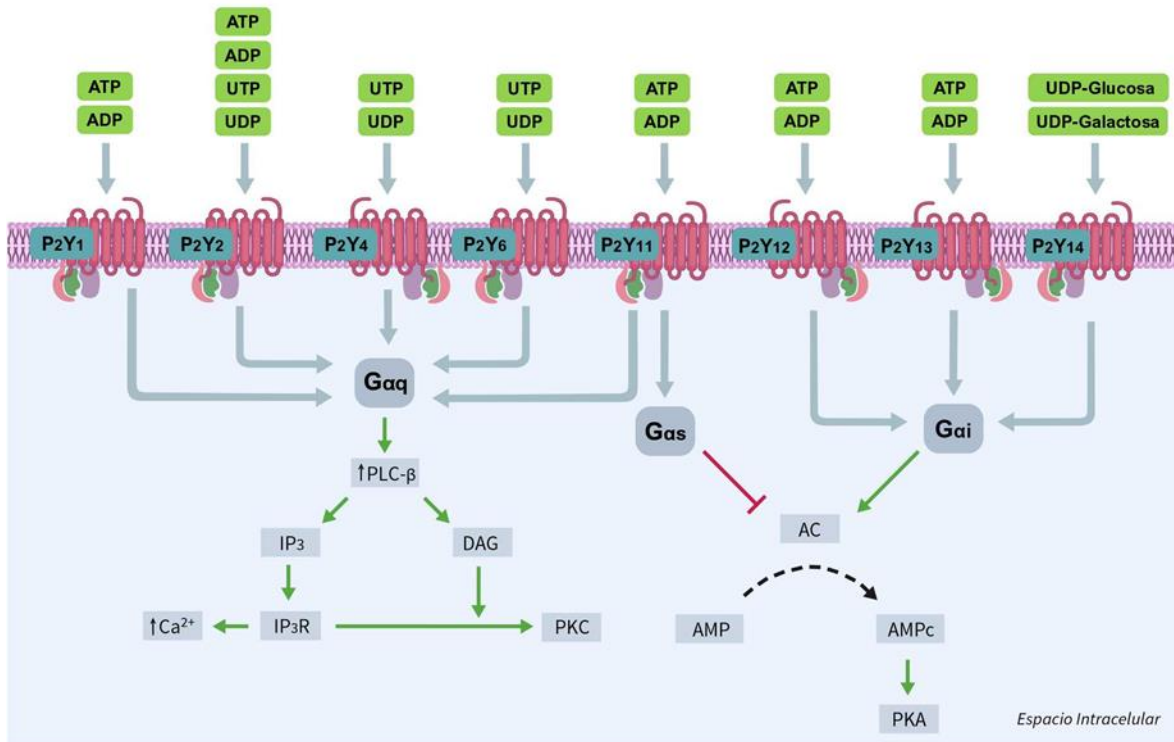


Figura 7. Vías de señalización intracelular inducidas por la activación de los receptores P₂Y. Diversos nucleótidos activan diferentes receptores P₂Y, cada uno desencadenando distintos eventos de señalización. La unión de las purinas a los receptores purinérgicos enciende/apaga diversas vías de señalización: la activación de los receptores P₂Y modula la actividad de la adenilato ciclasa (AC) o la fosfolipasa C β (PLC- β) a través de diferentes proteínas G (Gs, Gi, y Gq). Estas acciones modifican los niveles de segundos mensajeros como AMPc, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y Ca²⁺, el IP₃ se une a los receptores IP₃R en el retículo endoplasmático (ER), causando la liberación de Ca²⁺ desde el ER. Los segundos mensajeros regulan la activación de la proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa A (PKA), entre otras. Modificado de (Kaur & Dora, 2023; Shukla et al., 2024; Woods et al., 2021)

El mecanismo de acción asociado a la activación de los distintos receptores purinérgicos se presenta en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Mecanismo de acción de los receptores purinérgicos.

Receptor(es)	Ligando(s) endógeno(s)	Tipo	Mecanismo de transducción
P ₂ X ₁₋₇	ATP	Ionotrópico	Canal selectivo a iones Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺
P ₂ Y ₁	ATP/ADP	Metabotrópico Acoplado a G _{q/11}	Activación de PLC y un incremento de IP ₃ /DAG
P ₂ Y ₂	ATP/ADP UTP/UDP	Metabotrópico Acoplado a G _{q/11} /G _o /G ₁₂	Activación de PLC y un incremento de IP ₃ /DAG/Activación de Rac/Activación de Rho

P ₂ Y ₄	UTP/UDP	Metabotrópico Acoplado a G _{q/11} /G _i	Activación de PLC y un incremento de IP ₃ /DAG/Inhibición de AC y una disminución de la síntesis de AMPc
P ₂ Y ₆	UTP/UDP	Metabotrópico Acoplado a G _{q/11} /G _{12/13}	Activación de PLC y un incremento de IP ₃ /DAG/Activación de Rho
P ₂ Y ₁₁	ATP/ADP	Metabotrópico Acoplado a G _{q/11} /G _s	Activación de PLC y un incremento de IP ₃ /DAG/Activación de AC y un aumento del AMPc
P ₂ Y ₁₂	ATP/ADP	Metabotrópico Acoplado a G _i	Inhibición de AC y una disminución de la síntesis de AMPc
P ₂ Y ₁₃	ATP/ADP	Metabotrópico Acoplado a G _i	Inhibición de AC y una disminución de la síntesis de AMPc
P ₂ Y ₁₄	UDP-Glucosa UDP-Galactosa	Metabotrópico Acoplado a G _i	Inhibición de AC y una disminución de la síntesis de AMPc
A ₁	ADO	Metabotrópico Acoplado a G _i	Inhibición de AC y una disminución de la síntesis de AMPc
A _{2A}	ADO	Metabotrópico Acoplado a G _s	Activación de AC y un aumento del AMPc
A _{2B}	ADO	Metabotrópico Acoplado a G _s	Activación de AC y un aumento del AMPc
A ₃	ADO/Inosina	Metabotrópico Acoplado a G _i	Inhibición de AC y una disminución de la síntesis de AMPc

Abreviaturas: PLC: fosfolipasa C; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; AC: adenilato ciclasa; AMPc: AMP cíclico; ADO: adenosina. Modificado de (Di Virgilio et al., 2018; Shukla et al., 2024; Woods et al., 2021).

Diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, son modulados mediante la señalización purinérgica, entre los que se encuentran la interacción neurona-glia, la transmisión sensorial, alteraciones del sistema nervioso central, enfermedades cardiovasculares, la secreción hormonal, la respuesta inmune y el cáncer (Burnstock, 2020; Di Virgilio et al., 2018; Vultaggio-Poma et al., 2020).

3.1 Señalización purinérgica en el pulmón

Al interior del pulmón, en la vía aérea, la señalización purinérgica se ha relacionado con la secreción y la actividad ciliar, el control nervioso, la vasculatura pulmonar y enfermedades específicas de las vías respiratorias (Burnstock, Brouns, Adriaensen, & Timmermans, 2012). Se ha identificado la expresión de los receptores P₂X₄, P₂X₇, P₂Y₂, P₂Y₄ y P₂Y₆ (Reyna-Jeldes, Díaz-Muñoz, Madariaga, Coddou, & Vázquez-Cuevas, 2021). El ATP es liberado constitutivamente durante la respiración por la células epiteliales de las vía respiratoria, las células epiteliales alveolares y las células de musculo liso respiratorias, pero

también en respuesta a estímulos químicos como la presencia de compuestos tóxicos y a estímulos mecánicos y/o lesiones, estímulos osmóticos o bajo la condición de hipoxia. La liberación de nucleótidos es un mecanismo importante, para asegurar el mantenimiento de la homeostasis de la interface aire-líquido (Lazarowski, Sesma, Seminario, Esther, & Kreda, 2011; Satoru, Kishio, Masahiro, & Yoshinori, 2016).

En el epitelio alveolar, la secreción del surfactante por los neumocitos tipo II puede ser estimulada por un aumento en el cociente ATP/ADP; y/o un incremento del $[Ca^{2+}]_i$, mediado por la actividad de los receptores P_2Y . El ATP luminal, estimula además, la síntesis de la proteína A del surfactante, y la activación de los receptores P_2Y , que favorecen la secreción de K^+ en estas células, igualmente, la activación de los receptores P_2X_7 , incrementa la secreción de surfactante. Los neumocitos tipo I son mecanosensores y la estimulación paracrina por estas células, también interviene en la regulación de la secreción de surfactante: la deformación celular generada por la fuerza de tensión superficial en la interfaz aire-líquido causa la exocitosis de ATP mediada por Ca^{2+} , a través de este mecanismo se puede detectar un bajo contenido de líquido o surfactante dando lugar a la secreción compensatoria de fluido, mucina y surfactante mediada por ATP. El ATP a su vez, ejerce una acción de regulación parácrina en la absorción de NaCl al inhibir los canales epiteliales de Na^+ (ENaC) mediante un incremento de Ca^{2+} dependiente de la activación los receptores P_2Y ; sobre el músculo liso, el ATP produce contracción de segmentos bronquiales al modular la concentración de Ca^{2+} generando una respuesta contráctil transitoria por activación de P_2Y_2 , P_2Y_4 y P_2X_4 (Burnstock et al., 2012; Lazarowski et al., 2011; Satoru et al., 2016).

El ATP liberado por acción mecánica del epitelio respiratorio tiene una acción estimuladora sobre la células ciliadas presentes en la mucosa respiratoria como parte del mecanismo de defensa primaria para remover polvo y microorganismos de los pulmones en el proceso de aclaramiento mucociliar; la liberación de mucina por las células caliciformes es estimulada por la relación ATP/UTP, por la activación en la membrana apical de los receptores P_2Y_2 y P_2Y_4 vía fosfolipasa C; por otro lado, en los cuerpos neuroepiteliales, la condición de hipoxia y el ATP, inducen la liberación de serotonina (5-HT) implicada en la regulación autónoma de la respiración y la producción apical de peróxido de hidrógeno, encontrada en la exhalación y producido por el epitelio de la vía respiratoria, es estimulada por ATP pero no por ADP (Burnstock et al., 2012; Lazarowski et al., 2011).

En cuanto a la regulación del sistema inmune en la vía respiratoria, el ATP sirve como una señal de daño para alertar a las células inmunes del daño tisular; los nucleótidos de adenina estimulan el estallido respiratorio de los macrófagos alveolares, caracterizado por la producción de superóxido; el ATP por activación de los receptores P₂X, estimula la liberación de citocinas y quimiocinas como IL-1β e IL-6 por estos macrófagos; el ATP extracelular atrae a monocitos y eosinófilos y desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno por activación del receptor P₂Y₂, así como la liberación de histamina por mastocitos vía el receptor P₂Y₁ y P₂Y₂ (Burnstock et al., 2012; Lazarowski et al., 2011). Un aumento en la concentración de ATP extracelular se relaciona con una “señal de peligro” o “patrón molecular asociado al peligro (DAMP)” presente en la fisiopatología de enfermedades pulmonares, entre ellas el cáncer de pulmón (Satoru et al., 2016).

4. Señalización purinérgica y cáncer

4.1 Receptores purinérgicos y cáncer

La señalización purinérgica ha sido estudiada en diferentes tipos de cáncer: melanoma, colorectal, esofágica, pulmón, próstata, cerebro, cervical, mama, ovario, endometrio, leucemia, estómago, etc. (Burnstock & Di Virgilio, 2013; Martínez-Ramírez, Díaz-Muñoz, Butanda-Ochoa, & Vázquez-Cuevas, 2017). El empleo de técnicas moleculares ha permitido identificar la expresión de los receptores purinérgicos P₂ en diferentes tipos de cáncer, así como sus probables efectos fisiológicos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Expresión de receptores P₂ en diferentes líneas celulares de cáncer

Tipo de cáncer	Línea celular	ARNm	Proteína	Segundo mensajero y/o respuesta funcional
Melanoma	A375	P ₂ X ₇ P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂ , P ₂ Y ₄ , P ₂ Y ₆	P ₂ X ₇ P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂ , P ₂ Y ₄ , P ₂ Y ₆	Caspasa 3/7 [Ca ²⁺] _i (vía PLC)
Piel (Carcinoma de células escamosas)	A431	----	P ₂ X ₅ , P ₂ X ₇ P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂	Caspasa 3/TUNEL PCNA
Colorectal	HT29 HCT8 CaCo-2	P ₂ X ₁ , P ₂ X ₄ , P ₂ X ₅ , P ₂ X ₇ P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂ , P ₂ Y ₄ , P ₂ Y ₆	P ₂ X ₁ , P ₂ X ₄ , P ₂ X ₇ P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂	[Ca ²⁺] _i Muerte celular

Esofágico	Kyse-140	P ₂ X ₄ , P ₂ X ₅ P ₂ Y ₂	P ₂ Y ₂	Caspasa 3/7 [Ca ²⁺] _i (vía PLC)
Pulmón	A549	P ₂ X ₇ P ₂ Y ₂ , P ₂ Y ₆	P ₂ X ₇ P ₂ Y ₂ , P ₂ Y ₆	[Ca ²⁺] _i CaMK _{II} , NF-κB
Próstata	PC-3 DU145	P ₂ X ₄ , P ₂ X ₅ , P ₂ X ₇ P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂ , P ₂ Y ₆ , P ₂ Y ₁₁	P ₂ X ₄ , P ₂ X ₅ , P ₂ X ₇ P ₂ Y ₂	[Ca ²⁺] _i (vía PLC) TUNEL
Cerebro	1321N1/C6 U-251MG U-138MG U-87MG	P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₁₂	P ₂ Y ₁	Caspasa 3 ERK [Ca ²⁺] _i (vía PLC) AC (vía Gi)
Cervical	CaSki	----	P ₂ X ₄ , P ₂ X ₇ P ₂ Y ₂	Caspasa 9/TUNEL
Mama	MCF-7 Hs578T SK-Br3 T47-D MDA-MB- 231	P ₂ X ₇ P ₂ Y ₂	P ₂ X ₇ P ₂ Y ₂	[Ca ²⁺] _i [K ⁺] _i
Ovario	OVCAR EFO-21/27	P ₂ Y ₂	----	[Ca ²⁺] _i
Endometrio	HEC-1A	P ₂ Y ₂	----	[Ca ²⁺] _i (vía PLC)
Tiroides	ARO	P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₂	----	[Ca ²⁺] _i (vía PLC)

Abreviaturas: AC: adenilato ciclasa; CaMK_{II}: calcio calmodulina cinasa II; ERK: cinasa regulada por señales extracelulares; NF-κB: factor nuclear kappa B; PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular; PLC: fosfolipasa C. Modificado de (Burnstock & Di Virgilio, 2013; Martínez-Ramírez, Díaz-Muñoz, Butanda-Ochoa, & Vázquez-Cuevas, 2017; Shukla et al., 2024).

La comunicación autocrina y/o paracrina mediada por los receptores purinérgicos contribuye a la regulación de múltiples procesos involucrados en la progresión del cáncer, entre los que se incluyen el efecto Warburg, proliferación, muerte celular, inmunomodulación, angiogénesis, transición epitelio-mesénquima, migración celular, invasión, metástasis y quimiorresistencia (*Figura 8*) (Kaur & Dora, 2023).

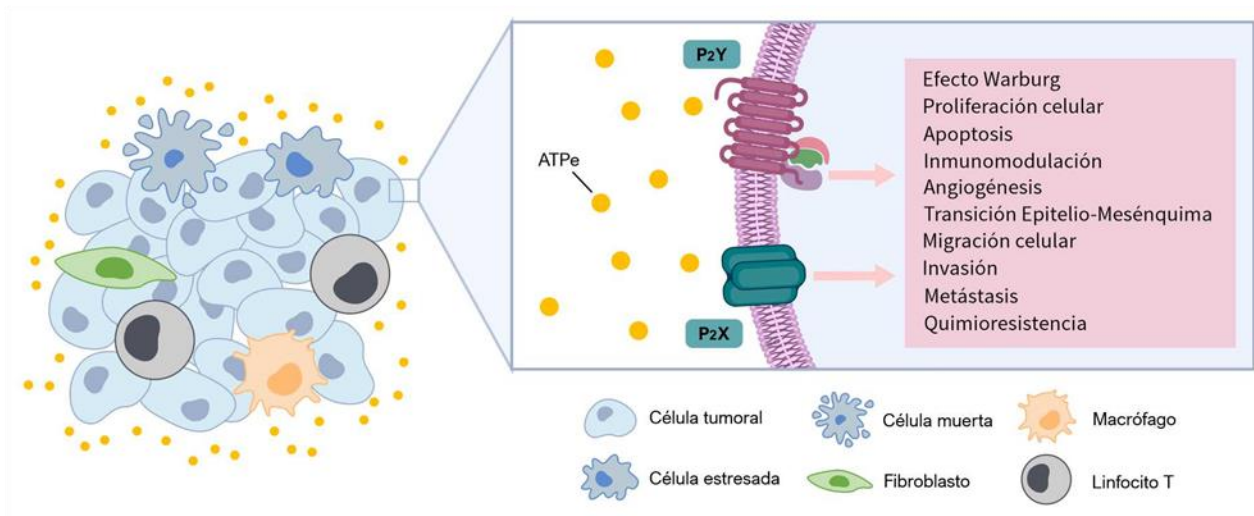


Figura 8. El ATPe y sus efectos en células tumorales. Las células que conforman el microambiente tumoral liberan ATPe que estimula de manera autocrina y paracrina la progresión tumoral. Modificado de (Cao et al., 2023; Kaur & Dora, 2023).

4.2 ATP en el microambiente tumoral

El crecimiento tumoral, la invasión y metástasis dependen de la comunicación recíproca entre las células y el microambiente tumoral (MAT) (Cao et al., 2023). El MAT se conforma de tanto componentes celulares que incluyen a las células tumorales y células estromales: fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune, como de componentes no celulares propios de la matriz extracelular como la laminina, fibronectina, colágeno y ácido hialurónico: La conjunción de los elementos celulares y acelulares del MAT, son esenciales para la formación y el mantenimiento tumoral. Las interacciones celulares en el MAT incluyen a los contactos célula-célula, célula-matriz extracelular y a los mensajeros químicos secretados: moléculas solubles, factores y vesículas que permiten la comunicación celular (Baghban et al., 2020; Shukla et al., 2024; Wood, Pernemalm, Crosbie, & Whetton, 2014).

El ATP es uno de los principales componentes del MAT, por ejemplo, en el intersticio tumoral, la concentración se encuentra en el rango de cientos de micromolar (100-700 μM),

lo que corresponde a 1000 o 10,000 veces más elevado en comparación a la concentración presente en el tejido normal, que va de 10 a 100 nM. El ATP presente en el MAT proviene tanto de la liberación regulada por las propias células cancerígenas como de aquellas en proceso de muerte celular y de los otros tipos celulares que también conforman el MAT (Cao et al., 2023; Pellegatti et al., 2008; Shukla et al., 2024; Vultaggio-Poma et al., 2020; Wood et al., 2014).

4.3 ATP en la proliferación y el crecimiento tumoral

El efecto del ATP sobre el crecimiento celular depende de la concentración, duración del tratamiento y del modelo celular bajo experimentación (Burnstock & Di Virgilio, 2013). Por ejemplo, en células de adenocarcinoma ductal pancreático (MIA PaCa-2 y HPCA), la presencia de 100 μ M de ATP por 24 horas, favorece la proliferación celular, debido a que se reduce la proporción de células en la fase G₀/G₁ y aumenta la proporción de células en las fases S y G₂/M del ciclo celular (*Figura 9A*) (Choi et al., 2018); en este mismo tipo de cáncer, pero en las células Panc-1 y BxPC-3, la estimulación crónica por 60 horas de una concentración creciente de 100 μ M a 5 mM de ATP, provoca una disminución de la proliferación celular dependiente de la concentración, ya que altas concentraciones de ATP, inducen muerte celular (Giannuzzo et al., 2015).

En las células AGS y HGC-27, provenientes de adenocarcinoma gástrico, la estimulación con ATP a una concentración de 100 μ M por 24 horas promueve la proliferación celular (*Figura 9B y 9C*) (Dong et al., 2022; Hevia et al., 2019), mientras que en las células HT-29, provenientes de adenocarcinoma colorectal, el tratamiento prolongado con la misma concentración de ATP por 96 hora, se observa un efecto antiproliferativo (Höpfner et al., 2001); pero en las células SW620 y HCT166, también provenientes de carcinoma colorrectal, la estimulación por 24 horas con 100 μ M de ATP aumenta la viabilidad celular, y al incrementar el tratamiento, hasta 72 horas, se incrementa la proliferación celular y la capacidad de formación de colonias (W. Zhang et al., 2021). En las células de carcinoma nasofaríngeo, 5-8F y CNE-2, el ATP ejerce un efecto negativo sobre la proliferación, al emplear una concentración creciente de ATP de 20 a 100 μ M por 72 horas, aumenta la tasa apoptótica, disminuyendo la expresión de la proteína Bcl2 e

incrementando la expresión de la proteína Bax y la forma escindida de la caspasa 3 (Yang et al., 2014).

Para el carcinoma hepatocelular, en las células HepG2 y BEL-7404, la estimulación con ATP 20 μ M durante 72 horas incrementa la proliferación y viabilidad celular (Figura 9D) (Xie et al., 2014).

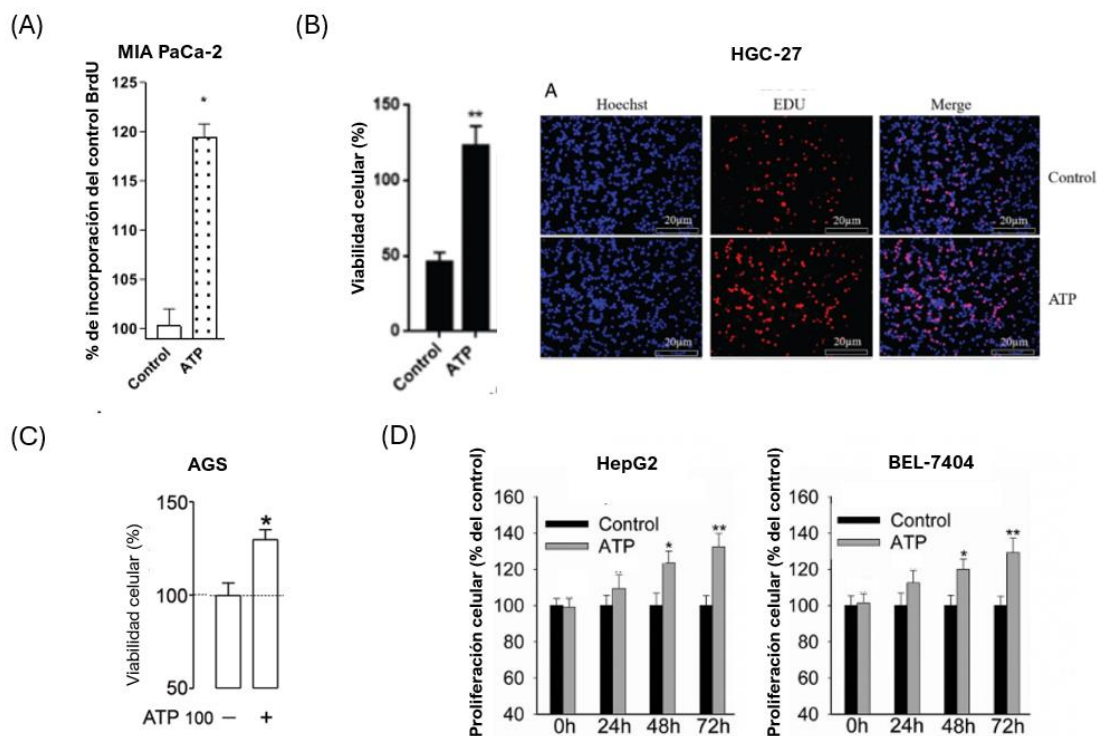


Figura 9. Efecto del ATPe sobre la proliferación en células tumorales. (A) (Choi et al., 2018); (B) (Dong et al., 2022); (C) (Hevia et al., 2019); (D) (Xie et al., 2014).

El tratamiento con ATP (100-500 μ M) por 72 horas en células Kyse-140, provenientes de cáncer de esófago, disminuye el número de células en función de la concentración (Maaser et al., 2002), pero al reducir el tratamiento a 24 horas con 100 μ M de ATP, se observa el efecto contrario, es decir, un incremento en la proliferación celular (Figura 10A), y la exposición prolongada aumenta la capacidad de formación de colonias de las células OE-33 (Zaparte et al., 2021); bajo estas mismas condiciones experimentales, el ATP incrementa la viabilidad celular y la capacidad clonogénica de las células de carcinoma oral escamoso CAL-27 y SCC-15 (Zhou et al., 2022).

El ATP a una baja concentración (5 μM) por 72 horas, incrementa la densidad poblacional de las células MCF-7, provenientes de cáncer de mama (*Figura 10B*) (Bilbao et al., 2010); en este mismo modelo celular, la exposición prolongada por 120 horas tiene un efecto diferencial sobre la viabilidad celular en relación a la concentración de ATP extracelular: una concentración menor de 30 μM de ATP, aumenta la proliferación celular y una concentración mayor de 300 μM , la disminuye (*Figura 10C*) (Chadet et al., 2014). Por su parte, en las células MDA-MB-231, también provenientes de cáncer de mama, el tratamiento por 24 horas con ATP 100 μM incrementa la proliferación celular (*Figura 10D*) (Jin et al., 2014) y aumenta la expresión del ARNm para la ciclina D1 tanto en estas células como en las células MCF-7 (*Figura 10E*) (J. L. Zhang et al., 2017).

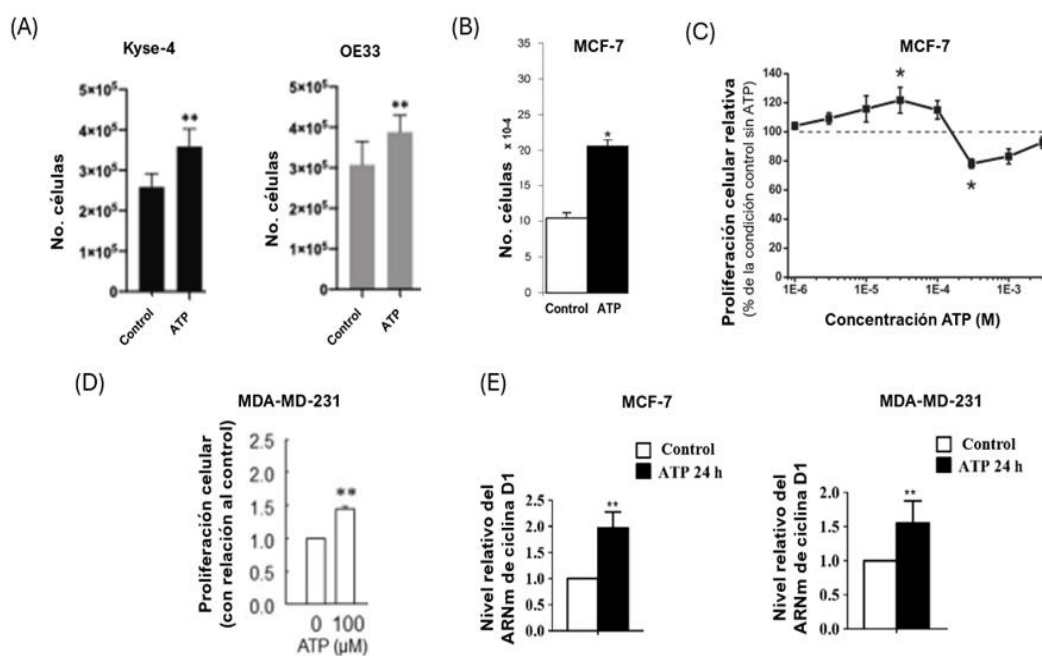


Figura 10. Efecto del ATPe sobre la proliferación de diferentes líneas celulares. (A) (Zaparte et al., 2021); (B) (Bilbao et al., 2010); (C) (Chadet et al., 2014); (D) (Jin et al., 2014); (E) (J. L. Zhang et al., 2017).

4.4 ATP en la migración e invasión celular

Uno de los procesos iniciales de la metástasis, es la denominada transición epitelio-mesénquima (TEM), donde las células tumorales de origen epitelial, pierden dicho fenotipo, para adquirir un fenotipo mesenquimal, el cual les permite desarrollar su capacidad

migratoria e invasiva, en respuesta a señales extracelulares presentes en el MAT como citocinas y factores de crecimiento. Esta transición, involucra cambios morfológicos y celulares, debido a la expresión génica de un grupo de factores de transcripción y microARNs asociados a la TEM, tales como *Zeb*, *Snail* y *Twist*. Diversas líneas celulares de carcinomas, incluido el carcinoma de pulmón, presentan un estado epitelial/mesenquimal 'híbrido', que es reflejo de la complejidad de este proceso de transición, lo que les confiere a estas células una gran capacidad de migración e invasión (Cao et al., 2023; Lu & Kang, 2019; Shukla et al., 2024).

El ATPe a bajas concentraciones, exagera la capacidad migratoria de diversas líneas tumorales, por ejemplo: a) células de carcinoma pancreático Panc-1 (Figura 11A) (Giannuzzo et al., 2015); b) células DU-145 de cáncer de próstata (Li et al., 2013; Zhang et al., 2010); c) células de carcinoma mamario de ratón 4T1 (Liu et al., 2018) y humano MCF-7 y Hs578T (Qiu et al., 2018; Sharma et al., 2021; Zhang et al., 2017); d) células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (Figura 11B) (Zhang et al., 2017); e) células de carcinoma oral CAL-27/SCC-15 (Figura 11C) (Zhou et al., 2022); f) células de carcinoma colorrectal SW620 y HTX166 (Zhang et al., 2021); g) células de hepatocarcinoma Hep-G2 y

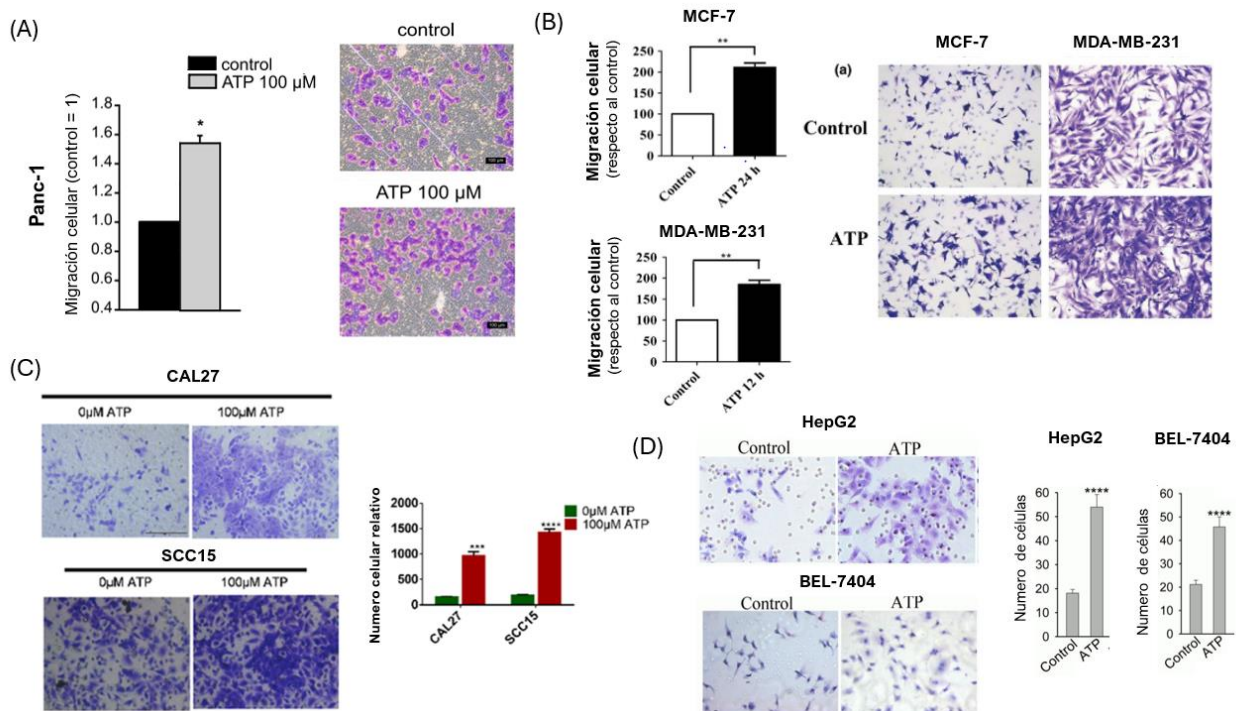


Figura 11. Efecto del ATPe sobre la capacidad migratoria de diferentes líneas celulares. (A) (Giannuzzo et al., 2015); (B) (Zhang et al., 2017); (C) (Zhou et al., 2022); (D) (Xie et al., 2014).

BEL-7404 (*Figura 11D*) (Xie et al., 2014); h) células IMR de neuroblastoma (Sharma et al., 2021).

La estimulación de la capacidad migratoria mediada por ATPe, involucra cambios en los niveles de expresión de factores de transcripción asociados a la TEM, por ejemplo, la expresión de Snail-1 se ve incrementada a nivel de ARNm y proteína por el tratamiento con 100 μ M de ATP en las células 1E8, 2B4 y DU-145 (*Figura 12A*) (Li et al., 2013; Qiu et al., 2014); células MCF-7 y Hs578T (*Figura 12B*) (Qiu et al., 2018); células CAL-27/SCC-15 (*Figura 12C*) (Zhou et al., 2022) y en células SW620 (W. Zhang et al., 2021). El marcador epitelial E-Cadherina a nivel de ARNm y proteína se ve disminuido tras la estimulación por ATP en estas mismas líneas celulares (*Figura 12*) y en las células T47D (Xia, Yu, Tang, Li, & He, 2015). También en las células 1E8 y 2B4 se detectó una disminución de Claudina-1 a nivel de proteína (Ying Qiu et al., 2014) y en las células AGS, aumento del marcador mesenquimal vimentina a nivel de ARNm y proteína (Dong et al., 2022), aumento de Fibronectina a nivel de ARNm y proteína en las células SW620 (W. Zhang et al., 2021) y un aumento de β -catenina también a nivel de ARNm y proteína en las células SW620 (W. Zhang et al., 2021) MDA-MB-231 y MCF-7 (J. L. Zhang et al., 2017).

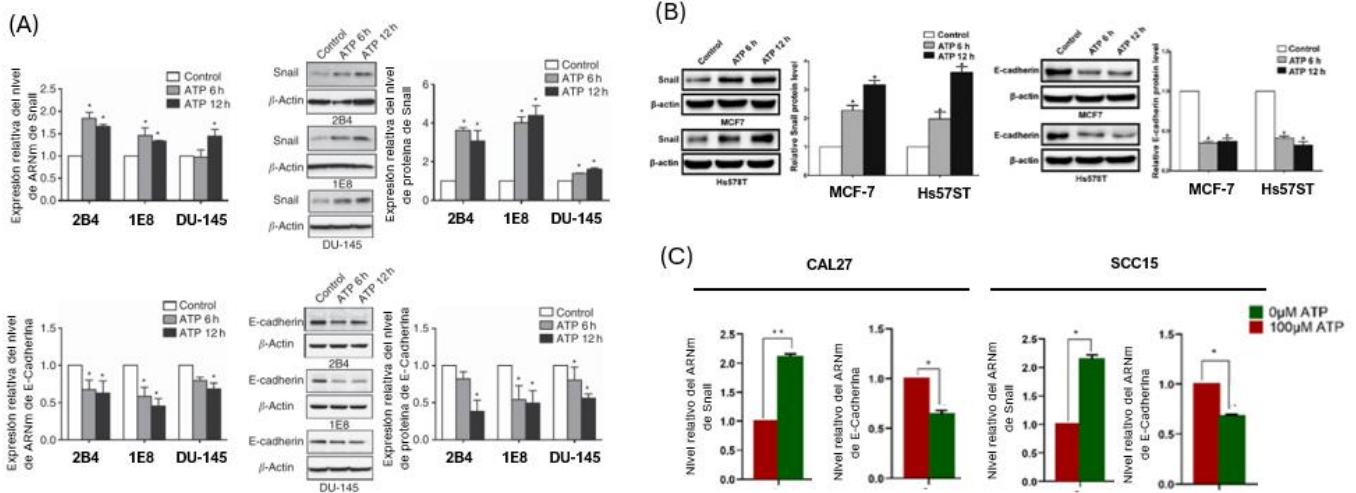


Figura 12. Efecto del ATPe sobre la expresión de marcadores asociados a la transición epitelio-mesénquima en diferentes líneas celulares. (A) (Li et al., 2013); **(B)** (Qiu et al., 2018); **(C)** (Zhou et al., 2022).

La capacidad invasiva de las células tumorales, se ve incrementada por efecto del ATPe, tal es el caso de las células: MDA-MB-231(Jin et al., 2014), T47D (Xia et al., 2015), MCF-7, He-La, IMR (Sharma et al., 2021), CAL-27, SCC-15 (Zhou et al., 2022) 1E8, 2B4 y DU-145 (Ying Qiu et al., 2014; Y. Zhang et al., 2010). La invasividad de las células, se asocia con su capacidad para degradar la matriz extracelular, mediante la expresión de metaloproteinasas (MMPs) (Lu & Kang, 2019). El ATPe estimula la expresión de la MMP-2 en las células CAL-27, SCC-15, IMR y HELA (Zhou et al., 2022; Sharma et al., 2021); de la MMP-3 y MMP-13 en las células 1E8, 2B4, MCF-7 y DU-145 (Zhang et al., 2010; Qiu et al., 2014; Xia et al., 2015); y promueve la actividad de la MMP-9 en las células MDA-MB-231 (Jin et al., 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor incidencia mundial y la primera causa de muerte por esta enfermedad, generalmente es diagnosticado en una etapa avanzada o metastásica, lo que incide directamente en su baja tasa de supervivencia y la baja efectividad de los tratamientos clínicos. Particularmente, el cáncer de pulmón, es una enfermedad molecularmente heterogénea, por lo que resulta de sumo interés, conocer las señales químicas y los mecanismos moleculares involucrado en el desarrollo y la progresión del tumor, con el fin de identificar y proponer blancos farmacológicos para un tratamiento más eficiente para mejorar el pronóstico y calidad de vida de los pacientes.

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), es el subtipo más común, representando el 85% de los casos totales diagnosticados. Aunque se ha avanzado de manera importante en el conocimiento de su biología molecular, se desconoce a detalle, como las señales químicas extracelulares presentes en el microambiente tumoral pueden inducir, exacerbar y/o mantener el potencial metastásico de las células tumorales. Diversos trabajos han propuesto al ATP, que esta presente en altas concentraciones en el microambiente tumoral, como una molécula de señalización importante para el desarrollo y progresión tumoral, ya que se ha puesto en relieve su participación en el metabolismo, crecimiento, proliferación y migración de las células cancerígenas, pero desconociéndose aún el mecanismo molecular involucrado. Por lo que el propósito del presente trabajo es determinar el efecto que ejerce el ATP extracelular sobre dos propiedades fundamentales de las células tumorales, que son su capacidad proliferativa y su capacidad migratoria, esto en un modelo celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas, con la finalidad de identificar y proponer blancos farmacológicos que ayuden a reducir el desarrollo y la progresión del tumoral en beneficio del paciente.

IV. HIPOTESIS

La presencia de ATP extracelular exacerba la capacidad proliferativa y migratoria de las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549).

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la presencia de ATP extracelular incide sobre la capacidad proliferativa y migratoria de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549).

Objetivos específicos

1. Identificar los subtipos del receptor purinérgico P_2X y P_2Y expresados en la línea celular de cáncer de pulmón A549.
2. Determinar si el ATP extracelular regula la capacidad proliferativa de las células A549.
3. Investigar si la capacidad migratoria de las células A549 es alterada por la presencia de ATP extracelular.

VI. METODOLOGÍA

Línea Celular A549

La línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549, fue establecida en 1972 por D.J. Giard et al, a través de un cultivo de un explante de tejido pulmonar carcinomatoso proveniente de un varón caucásico de 58 años. Corresponde a células basales alveolares triploides con un número cromosómico modal de 66 que se encuentra en el 24% de las células; in vitro las células crecen como una monocapa adherente con morfología epitelial (**Figura 13**). Esta línea celular es utilizada principalmente como modelo de modelo de células epiteliales pulmonares tipo II y para la investigación del cáncer, inmunología y toxicología (ATCC, 2024; Giard et al., 1973).

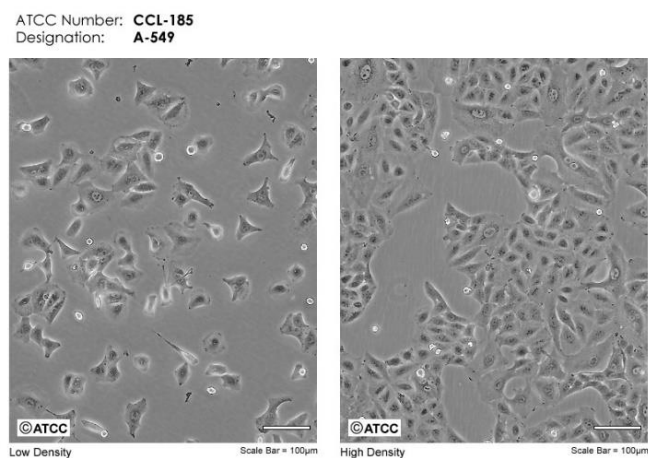


Figura 13. Morfología de la línea celular A549 (ATCC)

Cultivo celular

Las células A549 se sembraron en matraces planos de poliestireno de 25 cm² de superficie en medio de cultivo Advanced-DMEM (Gibco®, EUA) suplementado al 4% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y al 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (10,000 µg/ml de estreptomicina, 10,000 unidades/ml de penicilina y 25µg/ml de anfotericina B). Se mantuvieron en incubación a 37° C, en una atmosfera húmeda y una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire.

Cada 3 días el cultivo madre se sometió a un proceso de tripsinización que consistió en: a) se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS 1x, b) se adicionaron 2 mL de una solución salina Tripsina-EDTA al 0.25% (*SIGMA-Aldrich*) por 5 minutos y posteriormente se agregaron 4 mL de medio completo, c) las células se despegaron mecánicamente y las suspensión celular se centrifugo a 1,500 rpm durante 5 minutos, d) la suspensión celular obtenida se utilizó para regenerar el cultivo madre en un nuevo matraz plano y para para sembrar placas de 6 pozos y cajas Petri de 35 mm para los ensayos de proliferación, migración y de expresión génica.

Ensayo de expresión génica (RT-PCR de punto final)

a) Extracción del ácido ribonucleico total (ARN_T)

Una vez que las células sembradas en las placas de 6 pozos alcanzaron la confluencia deseada, se les recambio el medio y se inició el tratamiento correspondiente con un recambio de medio cada 24 horas. Finalizado el tiempo de tratamiento se procedió a la extracción del ARN total empleando el kit comercial *FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini (Favorgene, Biotech Corp., China)* siguiendo las instrucciones del fabricante, que se resumen a continuación: se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS 1X, y las células fueron cosechadas empleando 500 µL de Tripsina-EDTA al 0.25% inactivada a los 5 minutos con 750 µL de medio completo y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos; se les retiro el medio de cultivo sobrante y se adicionaron 350 µL de buffer de lisis suplementado al 1% de β- mercaptoetanol, se suspendió con una micropipeta y se transfirió el homogenado celular a la columna FARB que contiene el filtro blanco, se centrifugo a 12,000 rpm por 2 minutos y se desechó la columna FARB; posteriormente el contenido del tubo colector fue adicionado con 350 µL de etanol frio al 70%, y se transfirió a la columna FARB con filtro rojo y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado adicionando el buffer de lavado 1 y dos lavados consecutivos adicionando el buffer de lavado 2, después de cada lavado la muestra fue centrifugada a 12000 rpm durante 2 min; y por último, la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril, para la elución del ARN total se

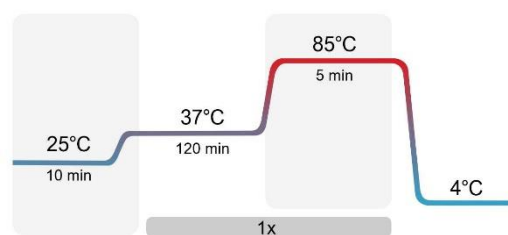
agregaron 30 μL de agua libre de ARNasas, pasados 3 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos.

b) *Cuantificación de ARN*

Concluida la extracción se determinó mediante espectrofotometría la calidad y concentración total del ARN aislado. Se realizó una dilución con 4 μL de la muestra de ARN en 196 μL de agua inyectable estéril obteniendo un volumen total de 200 μL . La evaluación de la concentración de ARN se realizó a una longitud de onda de 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}), considerándose como una muestra de buena calidad a las que se ubicaron en el rango de 1.8-2.0.

c) *Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)*

Para la síntesis de la cadena de ADNc, se utilizó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystem*, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparo un 'Master Mix' como se muestra en la siguiente tabla del cual se agregaron 6 μL para cada microtubo de reacción:



Reactivo	Volumen
<i>Buffer de RT</i>	4.0 μL
<i>Random (Iniciadores aleatorios)</i>	0.5 μL
<i>dNTP's</i>	1.0 μL
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i>	0.5 μL

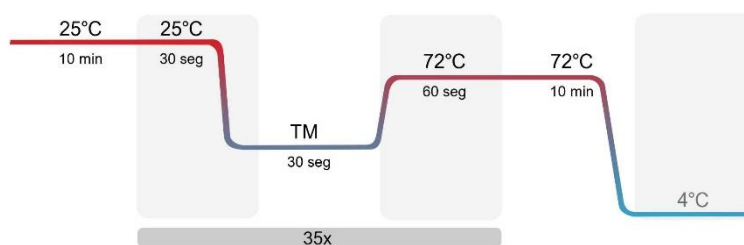
Figura 14. Protocolo de la reacción de retrotranscripción (RT)

Se agregó el ARN a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se ajustó cada tubo a un volumen final de 20 μL con agua libre de ARNasas. Se empleo un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) para realizar la retrotranscripción mediante el

siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C para ser almacenados en congelación.

d) *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final*

A partir del ADNc obtenido por la retrotranscripción, se realizó la PCR empleando el Kit comercial *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermo Scientific, EUA). Se preparo un 'Master Mix' como se muestra en la siguiente tabla obteniendo un volumen final de 20 µL:



Reactivo	Volumen
<i>Green Dream Taq</i>	10.0 µL
<i>Primer Foward</i>	1.0 µL
<i>Primer Reverse</i>	1.0 µL
<i>Agua libre de ARNasas</i>	6.0 µL
<i>ADNc</i>	2.0 µL

Figura 15. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se empleo un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) con el siguiente protocolo: 5 minutos a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura media (TM) del oligonucleótido utilizado y 1 minuto a 72°C, posteriormente un periodo de 10 minutos a 72°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C para ser almacenados en congelación. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para la PCR punto final se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de PCR

Primer	Dirección	Secuencia	Temperatura media (°C)	Tamaño amplicón (pb)
α-SMA	Foward	CTCAGCAGTAGTAACGAAGGAATAG	61.6	421 pb
	Reverse	GACCCTGAAGTACCCGATAGA	62.3	
β-actina	Foward	CAAGAGATGGCCACGGCT	73.1	234 pb
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCTGGCA	72.7	
Bax	Foward	GGGCTGGACATTGGACTTCC	68.2	201 pb
	Reverse	AGATGGTGAGTGAGGCGGTG	68.1	
Bcl2	Foward	GCTTTCACCTCCAGGATCTATT	62.7	315 pb
	Reverse	CCCAATACAGGTTCTTCATACC	63.5	
BIRC3	Foward	CACTCATTACTCCGGGTACAG	62.7	420 pb
	Reverse	AACACTAGAGGGCCAGTTAAAG	60.7	
Ciclina B1	Foward	TTGGTGCTACTGCCATGTTT	64.6	314 pb
	Reverse	TAAGCAAAAAGCTCCTGCTG	62.6	
Ciclina E1	Foward	AGGCAGTCAACATCCAGGAC	64.5	259 pb
	Reverse	ATCCTCCAAAGTTGCACCAG	64.5	
E-Cadherina	Foward	TTCCCTCGACACATTCAAAGT	63.8	488 pb
	Reverse	AGCTGTTGCTGTTGTGCTTAACCC	69.4	
Ki-67	Foward	AGTACCAGGAGGTGAGGATAA	61.5	415 pb
	Reverse	CTGCACTGGAGTCCCATAAA	62.3	
MMP-2	Foward	GGCCCTGTCACTCCTGAGAT	66.0	457 pb
	Reverse	GGCATCCAGGTTATCGGGGA	70.3	
MMP-7	Foward	CACATCTACCCACTGCAAGTATAG	64.9	355 pb
	Reverse	GGGACATTCTCTGATCCTAATG	60.9	
P2X1	Foward	GCTCAGTAGATACGTGTGGTTAG	54.6	266 pb
	Reverse	CGAGGACGGCACTTCTTAAA	54.9	
P2X4	Foward	CCCATCAAAGAACAGAGAGGAG	54.9	363 pb
	Reverse	CCGCATAAAGTGCTTGAACAG	54.6	
P2X5	Foward	GGGTGGCGTGATAGGAATTA	54.4	253 pb
	Reverse	TACCAGGTCGCAGAAGAAAG	54.4	
P2X7	Foward	CGTGGAGAATGGAGTGAAGAAG	64.9	355 pb
	Reverse	CAGGATGTTTCTCGTGGTGTAG	63.4	
P2Y1	Foward	GATTCTGGGCTGTTACGGATTA	54.6	382 pb
	Reverse	GAGGGTCATGTCTTCACTCTTG	55.1	
P2Y2	Foward	GTGCTGGGATTACAGGTATGA	55.0	470 pb
	Reverse	CCAGGAAGTGATGTCAGGTTA	54.9	
P2Y4	Foward	AGAGGTGAGGGAACCCAATA	55.1	307 pb
	Reverse	TCTGGTCTGGGTAGAGAAACA	54.9	
P2Y6	Foward	TAACCGCACTGTCTGCTATG	54.7	450pb
	Reverse	TTGGCTGTGAGTTTCTGTAGG	54.7	

P2Y11	Foward	AGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGT	78.3	369 pb
	Reverse	ACGGTTTAGGGGCGGCTGTGGCATT	78.6	
Snail-1	Foward	GCTCGAAAGGCCTTCAACTGCAAA	60.4	531 pb
	Reverse	AGGCAGAGGACACAGAACCAGAAA	60.1	
Snail-2 (Slug)	Foward	GCAACACATTTGCAGACAGGT	60.3	236 pb
	Reverse	AACAATGGCAACCAGACAACCGAC	60.2	
Vimentina	Foward	AGAACCTGCAGGAGGCAGAAGAAT	64.5	201 pb
	Reverse	CTTCATTTACGCATCTGGCGTT	73.6	
Zeb-1	Foward	TTCAGCATCACCAGGCAGTC	66.6	736 pb
	Reverse	TTCAGCATCACCAGGCAGTC	66.6	

e) *Separación electroforética de los productos de PCR*

A partir de los productos de PCR, se realizó una separación electroforética mediante un gel de agarosa al 1.2% tenido con bromuro de etidio (BrEt). El gel se prepara disolviendo 60 mg de agarosa en 50 mL de TAE 1x, se calentó la solución en intervalos de 30 segundos hasta que se disolvió la agarosa, se adicione con 4 μ L de BrEt y se gelificó durante 30 minutos en la cámara de electroforesis a temperatura ambiente.

Se cargaron 9 μ L de cada muestra y 5 μ L del marcador de peso molecular comercial *Gene Ruler 100 pb DNA Laddery* (Thermo Scientific, EUA). La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1x a 65 Voltios, 400 mA durante 90 minutos. Por último, se reveló el gel por medio de la aplicación de una radiación UV 302 y obtuvieron tres fotografías en el fotodocumentador *Gel Documentation System Bc AXYGEN* para su posterior análisis.

f) *Densitometría*

La densitometría de las bandas se realizó mediante el software de libre acceso *Image J* perteneciente al Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH, por sus siglas en inglés).

Ensayo de proliferación (Conteo celular)

El conteo celular se realizó empleando el cultivo de células bajo las condiciones anteriormente descritas hasta llegar a la confluencia requerida y de manera posterior al tratamiento con ATP a una concentración de 10 μ M a 500 μ M durante 48 horas, se prepararon a las células para realizar el conteo celular empleando un hematocitómetro (cámara de Neubauer) siguiendo el siguiente procedimiento: a) se retiró el medio de cultivo, b) se lavaron las células dos veces con PBS 1x, c) se agregó a cada pozo 500 μ L de Tripsina-EDTA 0.25% y se dejó incubar por 5 minutos, posteriormente se añadieron 750 μ L de medio de cultivo, e) la suspensión celular se transfirió a tubo Eppendorf y se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos, d) el sedimento celular fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo, e) se realizó una dilución de 10 μ L de la suspensión celular con 40 μ L de azul de tripano (como colorante vital), f) la dilución celular fue resuspendida varias veces y se colocaron 10 μ l en cada una de las cámaras de Neubauer, posteriormente se procedió a realizar el conteo de las células mediante el método de exclusión con azul tripano en un microscopio de campo claro. El conteo celular se expresó como el número de células/ml y los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al valor control.

Ensayo de Migración

Para evaluar la capacidad migratoria de las células A549 se utilizaron Soportes Permeables *Transwell*® con poros de 8 μ m de diámetro (*Corning Incorporated*, EUA). Se sembraron células bajo las condiciones antes descritas hasta llegar a la confluencia requerida y se trataron con ATP a una concentración de 100 μ M durante 48 horas; terminado el periodo de incubación se realizó una suspensión celular con un número conocido de células utilizando el conteo con la cámara de Neubauer. Se sembró la misma cantidad de células (25,000 células) en el inserto superior de la cámara en medio Advance-DMEM libre de SFB, mientras que en el compartimento inferior de la cámara se colocó el tratamiento con ATP disuelto en medio de cultivo Advance-DMEM suplementado con SFB como agente químico atrayente.

Al concluir el periodo de incubación (16 horas) se retiró el medio de cultivo de los dos compartimentos y las células que lograron migrar a través de los poros de la membrana, fueron fijadas con una solución de metanol - acetona y teñidas con cristal violeta.

Finalmente se obtuvieron microfotografías de 4 campos aleatorios con un microscopio de campo claro Laica DM1000 utilizando el objetivo 4X, una cámara Jenoptik Jena modelo ProgRes10 plus y el programa ProgRes CapturePro 2.1 para la realización del conteo celular con ayuda del software *ImageJ*. Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al valor control.

Análisis estadístico

El análisis estadístico y gráficos se realizaron con el software SigmaPlot 12.5 (*Jandel Corporation*, EUA). Se aplicó la prueba t de Student, para muestras independiente con distribución normal y varianza homogénea, para evaluar la diferencia entre las medias de los datos obtenidos para cada grupo experimental y se determinó como parámetro de significación un valor p menor a 0.05 ($p < 0.05$, *); las gráficas muestran el valor promedio \pm error estándar.

VII. RESULTADOS

1. Las células A549 expresan el ARNm que codifica para diversos subtipos de receptores purinérgicos P₂.

El ATP como molécula de señalización extracelular, actúa mediante la activación directa o indirecta de los receptores purinérgicos P₂, los cuales se subdividen en P₂X y P₂Y, siendo los primeros inotrópicos, y los segundos, metabotrópicos. Inicialmente, se decidió investigar qué, receptores purinérgicos P₂ estaban presentes en nuestro modelo experimental, para lo cual se evaluó por RT-PCR de punto final, el nivel de expresión del ARNm que codifica para los diferentes subtipos de receptores P₂. Las células de adenocarcinoma pulmonar A549, expresan una amplia variabilidad de receptores P₂X (P₂X₁, P₂X₄, P₂X₅ y P₂X₇) y receptores P₂Y (P₂Y₁, P₂Y₂, P₂Y₄, P₂Y₆ y P₂Y₁₁), tal y como se muestra en el apartado A y B de la Figura 16, respectivamente. Los receptores P₂X detectados, tienen como ligando

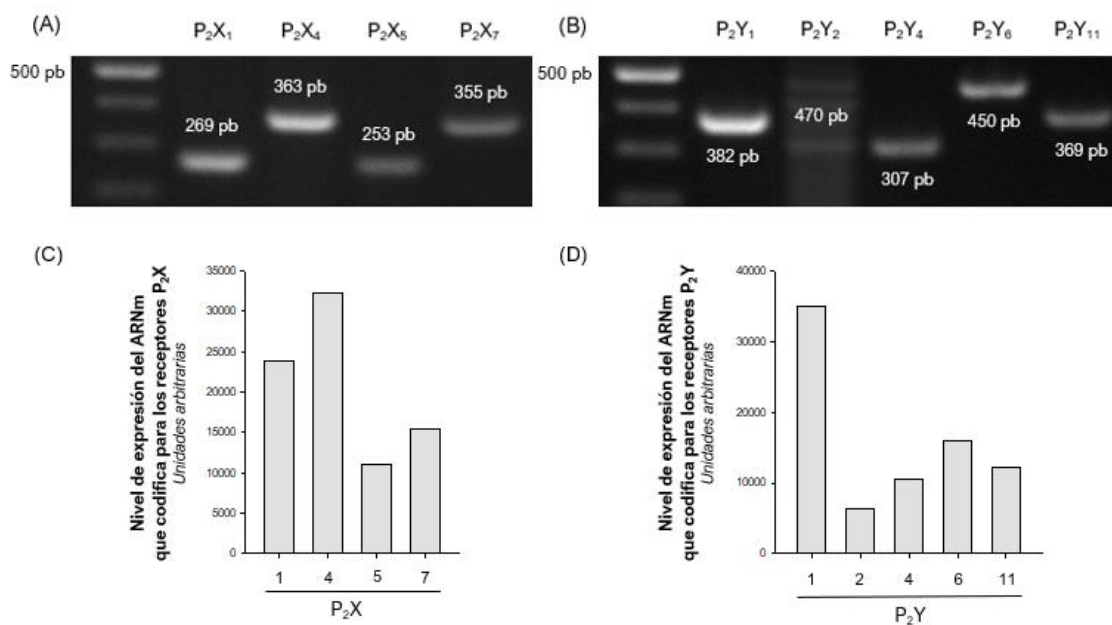


Figura 16. Expresión del ARNm que codifica para los receptores P₂ en células A549. Fotografía de un gel de agarosa que muestra el nivel de expresión del ARNm que codifica para los receptores P₂X (A) y receptores P₂Y (B). El análisis densitométrico de los productos de PCR refleja la expresión diferencial de los receptores P₂X (C) y receptores P₂Y (D) evaluados y expresados en unidades arbitrarias.

principal al ATP, mientras que los receptores P₂Y, pueden ser activados por diferentes ligandos, por ejemplo, el receptor P₂Y₁ por ATP/ADP; el receptor P₂Y₂ por ATP/ADP/UTP/UDP; los receptores P₂Y₄ y P₂Y₆ por UTP/UDP y, por último, el receptor P₂Y₁₁ por ATP/ADP. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la electroforesis, revela la expresión diferencial del ARNm que codifica para los diferentes receptores purinérgicos, observándose la siguiente relación de expresión para los receptores P₂X: P₂X₄>P₂X₁>P₂X₇>P₂X₅ (Figura 16C), y para los receptores P₂Y: P₂Y₁>P₂Y₆, >P₂Y₁₁>P₂Y₄ (Figura 16D).

2. El ATPe estimula la capacidad proliferativa de las células A549.

Diversas publicaciones, han mostrado que el ATP influye de manera significativa sobre la capacidad proliferativa en diferentes células tumorales, siendo que el efecto observado depende de la concentración de ATP presente en el medio de cultivo, por ejemplo, bajas concentraciones de ATP (< 200 µM) estimulan la capacidad proliferativa de las células, mientras que, altas concentraciones de ATP (> 200 µM) la reducen. Se decidió evaluar, el efecto que ejerce el ATP extracelular a diferentes concentraciones sobre la capacidad proliferativa de las células A549. Las células fueron sembradas en cajas Petri en condiciones de cultivo estándar, y una vez que alcanzo el 70% de confluencia, se inició el tratamiento con ATP (de 10 µM hasta 500 µM) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se realizó el conteo de células vivas mediante el uso de un hematocitómetro o cámara de Neubauer. La Figura 17, ilustra que existe un aumento en el número de células vivas debido a la presencia de diferentes concentraciones de ATP, para 10 µM y 50 µM, hay un incremento del 18.9% y del 36.9%, sin ser estadísticamente significativo. A una concentración de 100 µM de ATP, se observa un aumento estadísticamente significativo del 66.7% con respecto a la condición control. A la mayor concentración empleada de ATP (500 µM), se presenta una ligera disminución del 17.9% con respecto a la condición control, sin ser estadísticamente significativa.

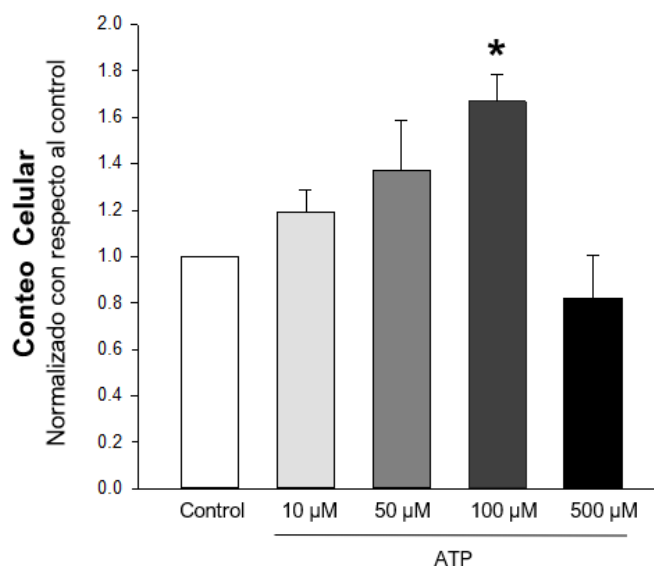


Figura 17. Curva dosis-efecto del ATP sobre el número de células A549 viables. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de diferentes concentraciones de ATP (10-500 μ M) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se realizó el conteo de células viables, empleando el colorante vital azul de tripano, en un hematocitómetro. Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de cuatro ensayos independientes graficados con respecto al control. n=4. $p^* < 0.05$

Basado en este resultado, y con la finalidad de evaluar si la estimulación de la capacidad proliferativa en las células A549 inducida por 100 μ M de ATP, depende de la duración del tratamiento, las células A549 fueron tratadas por 24, 48 y 72 horas, y al finalizar cada uno de estos periodos se realizó, el conteo celular. El tratamiento con ATP a las 48 horas presenta un aumento significativo del 90% en el número de células viables con respecto a la condición control, mientras que, a los tiempos de 24 y 72 horas, no se observa un cambio significativo (Figura 18). Con base a estos resultados, los experimentos subsiguientes se realizaron usando una concentración de 100 μ M de ATP por 48 horas de tratamiento.

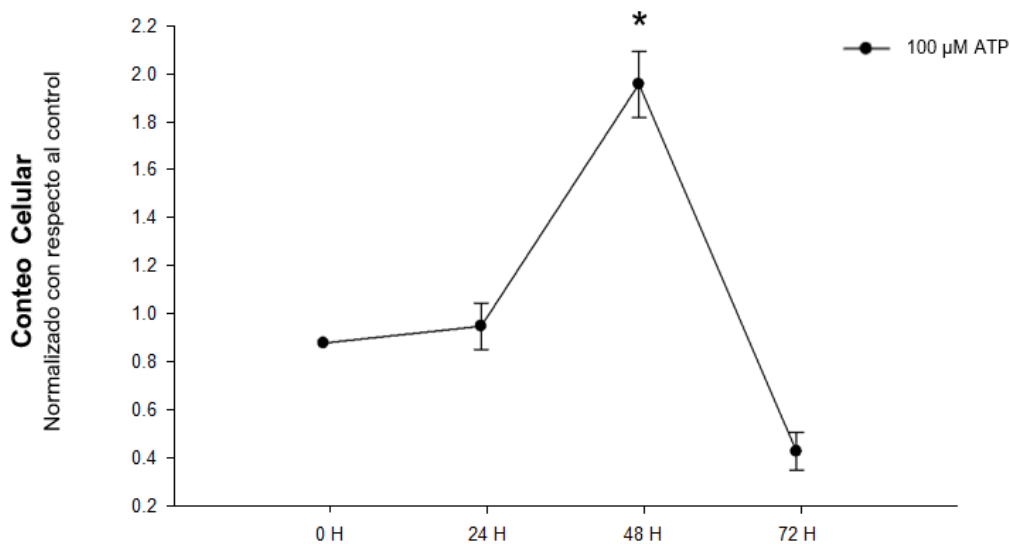


Figura 18. Curso temporal del efecto de ATP sobre el número de células A549 viables. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μM de ATP a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Al finalizar el tratamiento, se realizó el conteo de células viables, empleando el colorante vital azul de tripano, en un hematocitómetro. Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. $n=3$. $p^* < 0.05$.

Los cambios observados en el número de células viables por acción del ATP, pueden ser explicados por dos factores, uno de ellos, a una reducción en la tasa apoptótica de las células, lo cual implicaría, un mayor periodo de supervivencia para duplicarse más veces; y el segundo factor, un incremento en la tasa proliferativa, lo cual llevaría a una reducción en la duración del ciclo celular. Para poner a prueba estas posibilidades, decidimos evaluar el nivel de expresión del ARNm que codifica tanto para proteínas involucradas en la evasión de la apoptosis, así como de proteínas relacionadas en la regulación del ciclo celular.

Con respecto a las proteínas implicadas en el control de la apoptosis, evaluamos los niveles de expresión del ARNm que codifica para Bcl2 (proteína antiapoptótica), Bax (proteína apoptótica) y cIAP2 (proteína que inhibe la actividad de las caspasas, enzimas involucradas en la apoptosis). La presencia de 100 μM de ATP por 48 horas, no modifica de manera significativa la expresión de Bcl2 con respecto a la condición control (Figura 19A). Para el caso de la proteína Bax, se observa un ligero incremento de 16%, sin alcanzar a ser estadísticamente significativo (Figura 19B).

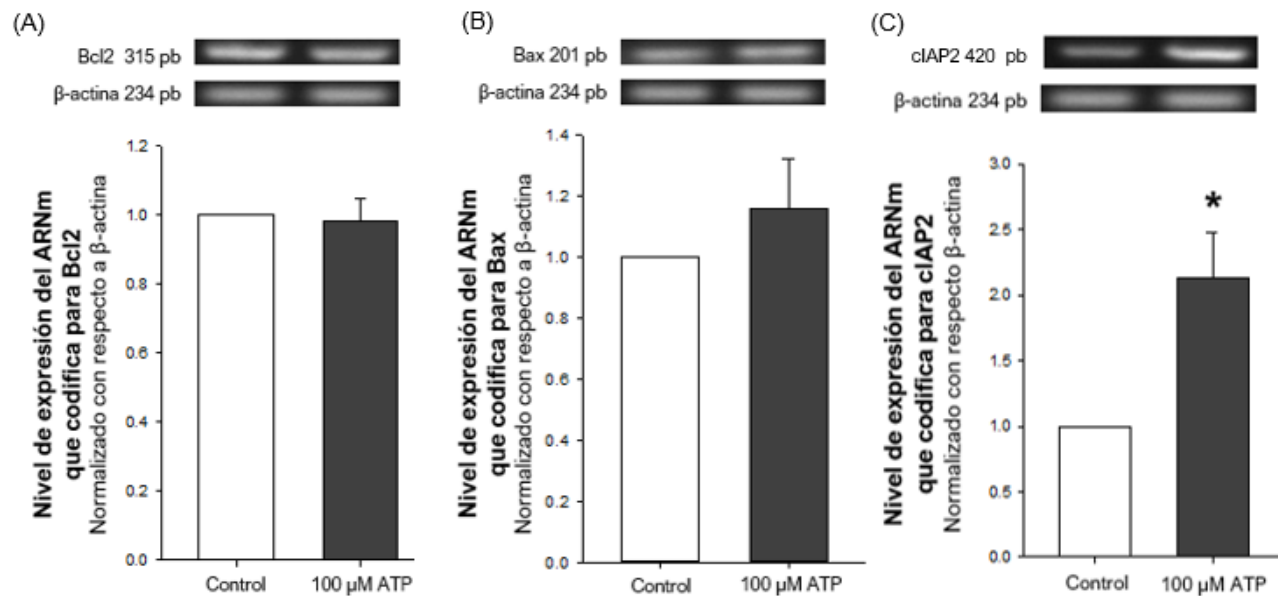


Figura 19. El ATP modifica la expresión del ARNm que codifica para proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μM de ATP por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARNm y por ensayo de expresión génica se determinó el nivel de expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 (A), Bax (B) y cIAP2 (C). Los resultados obtenidos se presentan como la media ± el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto a β-actina. n=3. $p^* < 0.05$.

Por otro lado, el nivel de expresión del ARNm que codifica para la proteína cIAP, se ve incrementado más de un 100% con respecto a la condición control (Figura 19C). Estos resultados sugieren, que el tratamiento con 100 μM de ATP reduce la tasa apoptótica de las células A549, aumentando con ello su tiempo de vida y, por ende, el número de veces que se duplican.

Adicionalmente, investigamos si la presencia de ATP modifica la duración del ciclo celular, para lo cual evaluamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para proteínas relacionadas en la transición de las fases del ciclo celular: Ki-67 (marcador nuclear de proliferación celular, fase S), ciclina E1 (favorece la transición de la fase G1 a la fase S), y la ciclina B1 (impulsa la transición de la fase S a la fase G2/M). La Figura 20C muestra que el nivel de expresión de Ki-67 no resulta afectado por el tratamiento con 100 μM de ATP por 48 horas, a diferencia de lo que se observa en la expresión de la ciclina E1 (Figura 20A) y la ciclina B1, (Figura 20B), un aumento significativo en el ARNm que codifica para ambas ciclinas del 89.9% y del 72.5% respectivamente, esto con respecto a la condición control.

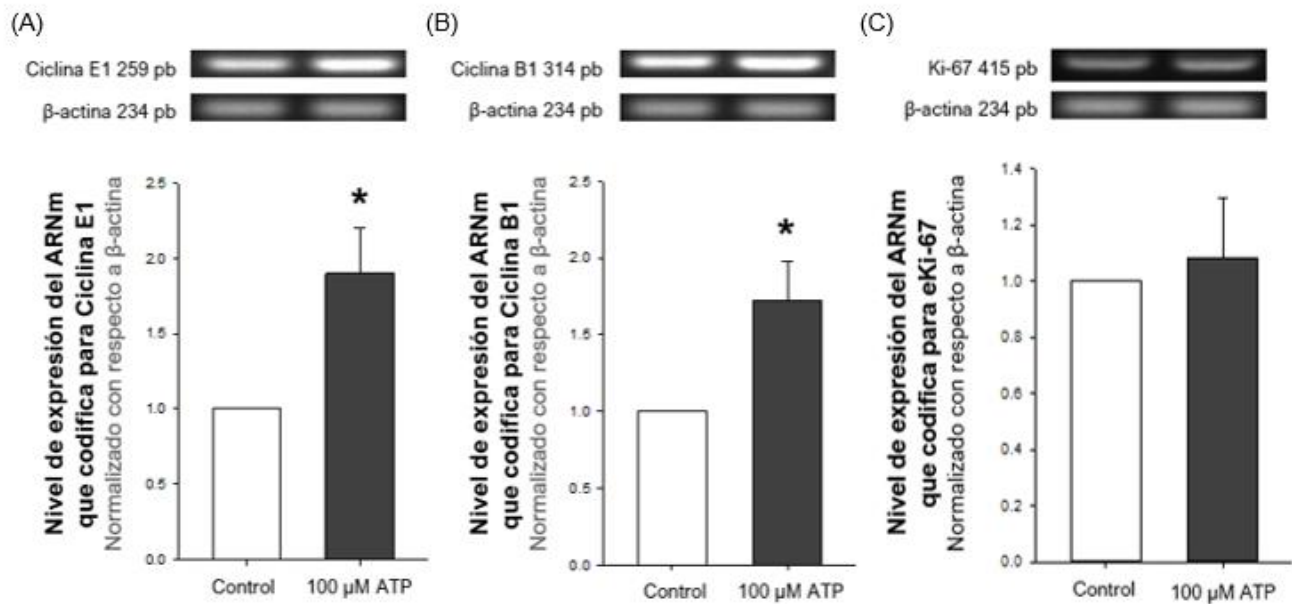


Figura 20. El ATP modifica la expresión del ARNm que codifica para proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μ M de ATP por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARNm y por ensayo de expresión génica se determinó el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ciclina E1 (A), Ciclina B1 (B) y Ki-67 (C). Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto a β -actina. $n=3$. $p^* < 0.05$.

Estos resultados en su conjunto sugieren que el incremento observado en la densidad celular de la línea tumoral A549, cuando son estimuladas con ATP extracelular, se por un lado, a un aumento en la progresión del ciclo celular, acortando su duración, e incrementado su tasa proliferativa, y por otro lado, reduciendo su capacidad apoptótica, incrementado con ello la supervivencia celular.

3. El ATP promueve un aumento de la capacidad migratoria de las células A549

Una vez que evaluamos el efecto que ejerce el ATP sobre la densidad celular en la línea tumoral A549, se decidió explorar, si el ATP, también era capaz de influir en su capacidad migratoria. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μM de ATP por 48 horas, al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas, contadas y sembradas en los insertos de las cámaras transwell, para poder llevar a cabo el ensayo de migración. Las microfotografías ilustradas en la Figura 21A, muestran con claridad que la presencia de ATP favorece la capacidad migratoria de las células A549, al realizar el conteo celular en cada una de las condiciones experimentales, empleando el software Image J, se observa en el gráfico de la Figura 21B, que el ATP induce un incremento significativo del 30.1% en el número de células que logran atravesar la membrana del inserto de la cámara transwell.

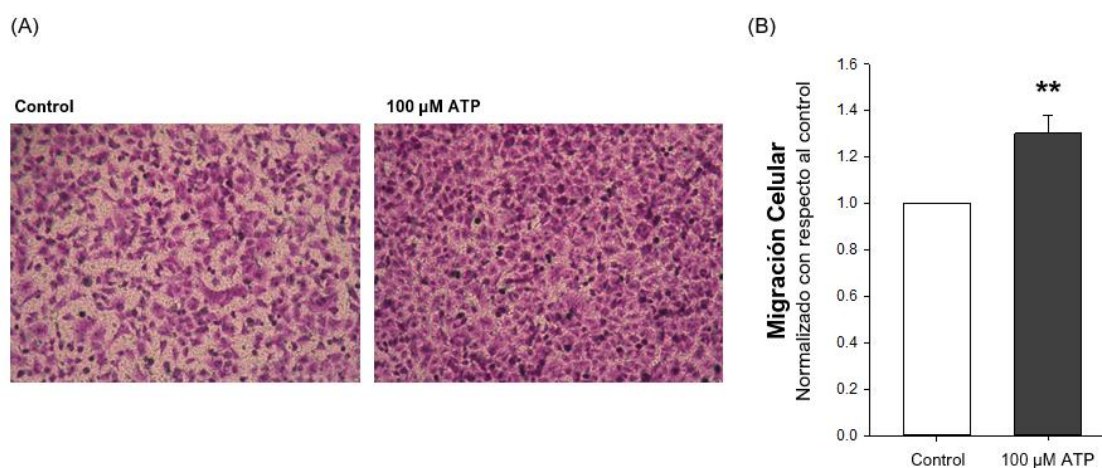


Figura 21. El ATP favorece la capacidad migratoria de las células A549. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μM de ATP por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas y sembradas en los insertos de las cámaras transwell para el ensayo de migración.

(A) Microfotografías obtenidas en un microscopio de campo claro de células teñidas con cristal violeta.

(B) Gráfico del conteo celular de cada condición experimental empleando el software *Image J*. Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. $n=3$. $p^{**} < 0.01$

La capacidad migratoria de una célula depende de su fenotipo, si el fenotipo es epitelial, la capacidad migratoria será mínima, mientras que, si presenta un fenotipo mesenquimal, esta será alta. Las células tumorales de origen epitelial, durante el desarrollo y progresión tumoral, transitan del fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal, incrementando con ello su potencial de hacer metástasis. Con base a estos antecedentes, se decidió investigar si la presencia de ATP en el medio de cultivo favorece la transición epitelio-mesénquima de las células A549, para lo cual evaluamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para E-cadherina (marcador molecular del fenotipo epitelial), vimentina y α -SMA (marcadores moleculares del fenotipo mesenquimal). La Figura 22A muestra que el tratamiento con ATP no altera el nivel de expresión del ARNm de E-cadherina, pero si, incrementa de manera significativa, los niveles de expresión del ARNm que codifica para vimentina (26.6%) (Figura 22B) y α -SMA (65.9%) (Figura 22C), con respecto a la condición control, favoreciendo con ello el fenotipo mesenquimal de las células A549.

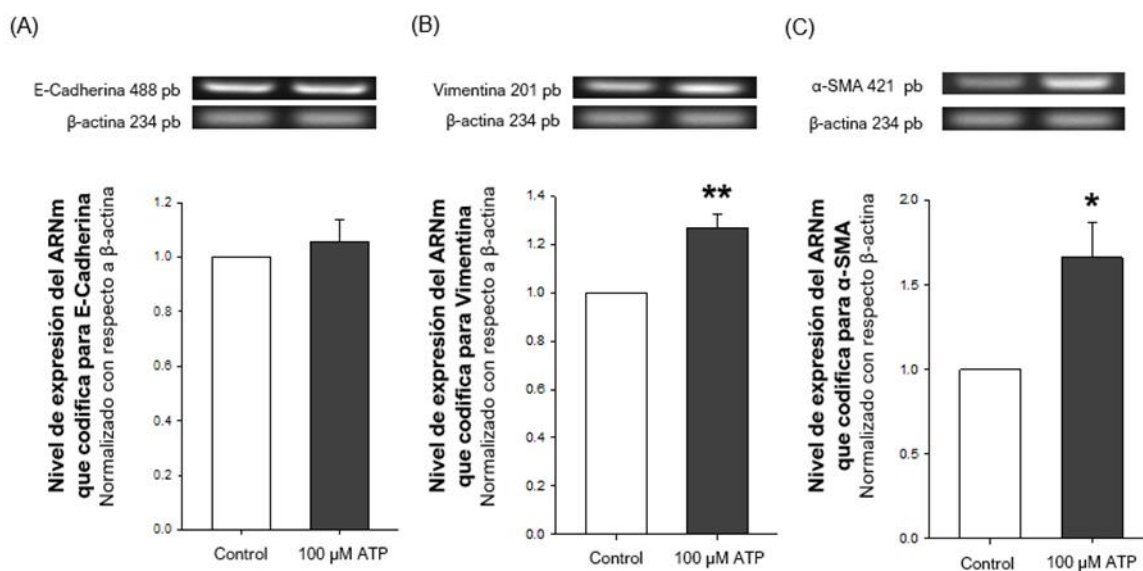


Figura 22. El ATP favorece el fenotipo mesenquimal de las células A549. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μ M de ATP por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARNm y por ensayo de expresión génica se determinó el nivel de expresión del ARNm que codifica para E-cadherina (A), Vimentina (B) y α -SMA (C). Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto a β -actina. n=3. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$

Los cambios moleculares que contribuyen a la transición del fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal dependen de la expresión y actividad de un grupo de proteínas, llamado genéricamente, factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima (FTAEMT). Por esta razón, evaluamos los niveles de expresión del ARNm que codifica para tres factores de estos factores de transcripción: Snail 1, Snail 2 y Zeb 1. De igual manera, las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μ M de ATP por 48 horas, al finalizar el tratamiento fueron sometidas a ensayos de expresión génica. La Figura 24, muestra que el ATP no induce un cambio significativo en el nivel de expresión del ARNm que codifica para Zeb 1 (Figura 23A) y Snail 2 (Figura 23B), pero si, induce un aumento significativo en la expresión de Snail 1 (93.2%) con respecto a la condición control (Figura 23C). La expresión de Snail 1, reprime directamente la expresión de E-cherina, e indirectamente, favorece la expresión de Vimentina y α -SMA, asegurando con ello, el fenotipo mesenquimal de las células, y con ello, su capacidad metastásica. o mesenquimal de las células tumorales.

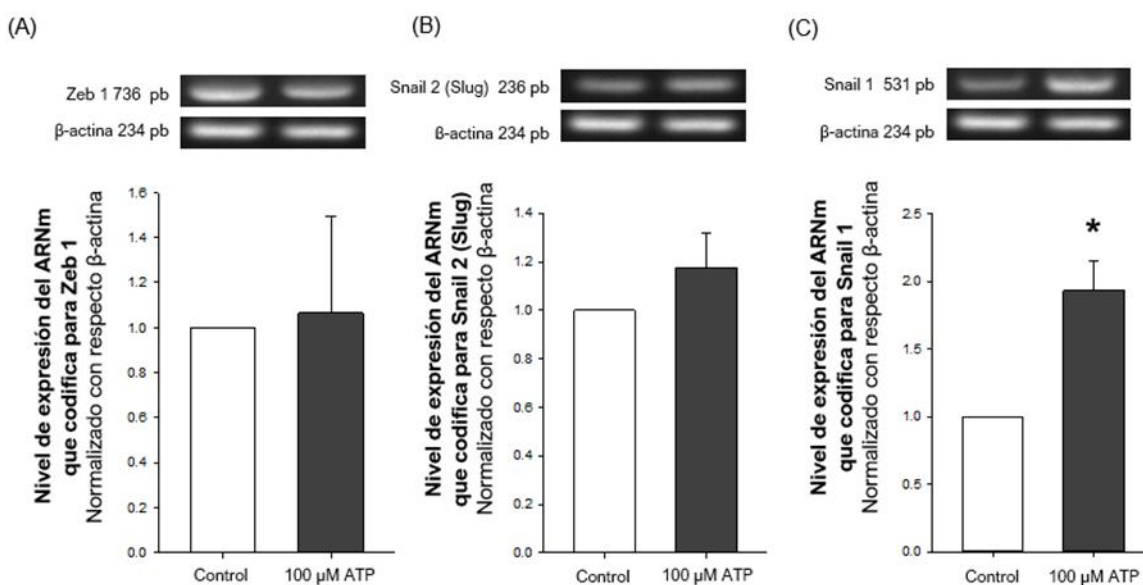


Figura 23. El ATP modifica la expresión del ARNm que codifica para los factores de transcripción asociados a la transición Epitelio-Mesénquima. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μ M de ATP por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARNm y por ensayo de expresión génica se determinó el nivel de expresión del ARNm que codifica para Zeb1 (A), Snail 2 (B) y Snail 1 (C). Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto a β -actina. n=3. $p^* < 0.05$.

El potencial metastásico de las células tumorales, no solo depende de su capacidad migratoria, sino también de su capacidad invasiva, la cual involucra, la expresión y secreción de enzimas metaloproteinasas al espacio extracelular, para degradar la lámina basal y elementos de la matriz extracelular, con el fin de facilitar el movimiento de las células tumorales, hacia vasos sanguíneos o linfáticos, para su diseminación a otros tejidos y órganos, completándose de esta manera, el proceso de metástasis. De manera preliminar, evaluamos si el tratamiento con 100 μ M de ATP por 48 horas, modifica la expresión del ARNm que codifica para la metaloproteinasa tipo 7 (MMP-7) y metaloproteinasa tipo 2 (MMP-2). La Figura 24 muestra que el ATP no afecta el nivel de expresión de la MMP-2 y la MMP-7, con respecto a la condición control, será necesario evaluar posteriormente, a través de una zimografía, si el ATP es capaz de modificar la actividad proteolítica de estas enzimas.

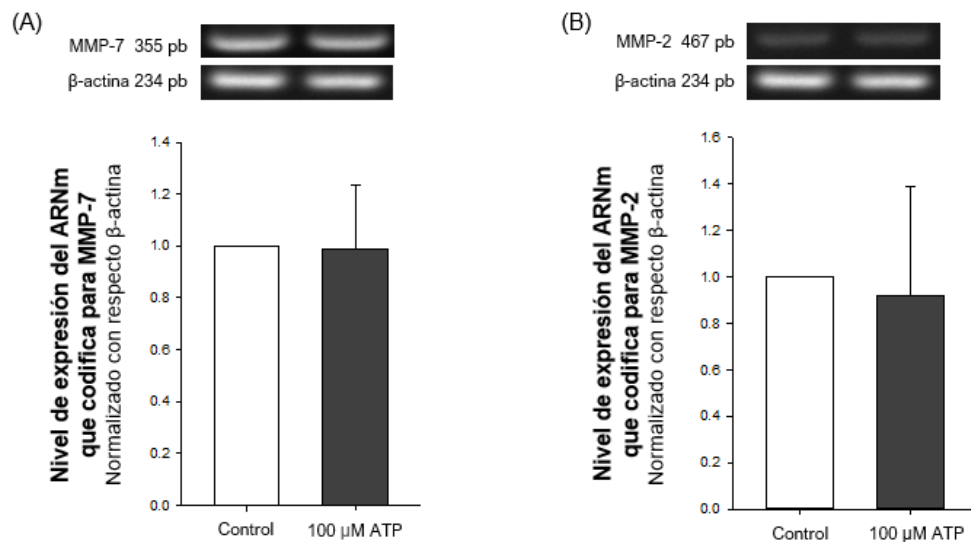


Figura 24. El ATP no altera la expresión del ARNm que codifica para proteínas implicadas en la metástasis. Las células A549 fueron mantenidas en presencia de 100 μ M de ATP por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se aisló el ARNm y por ensayo de expresión génica se determinó el nivel de expresión del ARNm que codifica para la MMP-7 (A) y la MMP-2 (B). Los resultados obtenidos se presentan como la media \pm el error estándar de tres ensayos independientes graficados con respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto a β -actina. n=3. $p^* < 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

Ente los diversos tipos de cáncer, el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia y la primera causa de muerte por cáncer reportada en 2022 de manera global (IACR, 2022b) y se estima un aumento continuo en su incidencia para el 2035, por lo que representa un desafío de salud pública a nivel mundial (Luo et al., 2023). El desarrollo del cáncer involucra la adquisición de mutaciones que le confieren a la célula una ventaja de crecimiento selectivo (Mitrus, Bryndza, Sochanik, & Szala, 2012; Vogelstein & Kinzler, 2004), así como la desregulación en la expresión de genes de estabilidad, oncogenes y supresores tumorales (Wang, Wu, Rajasekaran, & Shin, 2018) y se relaciona positivamente con la presencia de señales regulatorias presentes y generadas por las células que conforman el microambiente tumoral (Y. Cao et al., 2023). La señalización proliferativa sostenida es una característica fundamental de las células tumorales durante carcinogénesis y la progresión de diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón (D. Hanahan & Weinberg, 2011). El crecimiento y la metástasis son la principal causa de muerte por cáncer, por tanto, es relevante el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología del cáncer de pulmón (Wood et al., 2014).

El ATP es considerado la fuente principal de energía intracelular, se genera durante la respiración celular y es utilizado en una amplia gama de procesos que requieren energía como la síntesis de macromoléculas, la señalización, el transporte activo, etc. sin embargo, se ha destacado su importancia como molécula de señalización (Alvarez, Troncoso, & Espelt, 2022; Di Virgilio et al., 2018; Shukla et al., 2024); el ATPe actúa a corto plazo en procesos como la neurotransmisión, la neuromodulación y la neurosecreción, pero también tiene una función potente a largo plazo sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular durante el desarrollo y la regeneración tisular (Burnstock, 2020).

El ATP tiene un rol importante en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos en casi todos los tipos de tejidos (Shukla et al., 2024); de manera específica en el pulmón está implicado en la homeostasis de la vía respiratoria regulando la respuesta de defensa contra infecciones, el aclaramiento mucociliar epitelial, la secreción de cloruro, el transporte de K^+ , el control de la secreción de surfactante por las células alveolares y un aumento en las concentraciones de ATPe se ha implicado como un patrón molecular asociado al peligro

(DAMP) (Clunes & Kemp, 1996; Grygorczyk et al., 2019; Lazarowski et al., 2011; Satoru et al., 2016). De manera específica, se ha demostrado que la liberación de ATPe puede ser inducida por estiramiento o por estrés hipotónico en las células A549 y Calu-3 (Grygorczyk et al., 2019), la liberación también puede ser dependiente del aumento de calcio intracelular, en las células Calu-3 (Kreda et al., 2007) o estimulada por factores de crecimiento como TGF- β 1, en las células H292 (Takai, Tsukimoto, Harada, & Kojima, 2014) y la inflamación también puede participar en la liberación de este nucleótido (Okada et al., 2013). Por lo que la señalización mediada por el ATPe se le ha implicado en la patogénesis de diversas enfermedades respiratorias entre las que se encuentran la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma, la fibrosis y el cáncer de pulmón (Satoru et al., 2016).

Existe un creciente interés en la participación de la señalización purinérgica implicada en la progresión y su posible potencial terapéutico en el cáncer (Burnstock & Di Virgilio, 2013); el ATPe se acumula en el microambiente tumoral proveniente del daño la membrana celular, durante condiciones de estrés celular como la hipoxia y la inflamación e inclusive en respuesta a la radiación gamma o por un eflujo a través de alguna de las vías específicas de liberación regulada por lo que, la concentración final de ATPe depende tanto del proceso de liberación y como del proceso de degradación (Di Virgilio, 2012; Shukla et al., 2024; Wood et al., 2014).

Los receptores purinérgicos P₂X y P₂Y son receptores del ATPe, y estos se expresan ampliamente en múltiples tipos de células, incluidas las células tumorales; que el aumento en la concentración de ATPe sea beneficiosa o perjudicial para la progresión tumoral dependerá de la concentración y del perfil de receptores P₂ expresado en la superficie de las células tumorales (Di Virgilio, 2012; Vultaggio-Poma et al., 2020; Woods et al., 2021)

En este trabajo evaluamos la expresión, a nivel de ARNm, de algunos de los receptores pertenecientes a la familia P₂, tanto P₂X y P₂Y. Se extrajo el ARN total de las células A549 y se examinó la expresión genética mediante RT-PCR de punto final. Nuestro modelo celular expresa de manera diferencial a los receptores P₂: en relación con la subfamilia P₂X, las células A549 expresaron el ARNm de los receptores P₂X₁, P₂X₄, P₂X₆ y P₂X₇ siendo el receptor P₂X₄ el mayormente expresado en condiciones de cultivo estándar, este resultado concuerda con lo previamente reportado por Takai *et al.* en este mismo

modelo celular siendo el ARNm de P₂X₄ el de mayor nivel de expresión en comparación con los otros 6 subtipos (Takai et al., 2012); de manera específica la expresión y activación de P₂X₄ se ha implicado en promover el estado metastásico y la transición epitelio mesénquima en otros modelos celulares como en las células 4T1 (Chadet et al., 2022) y en las células AGS y MKN-45 derivadas de adenocarcinoma gástrico (Reyna-Jeldes, De la Fuente-Ortega, et al., 2021). En el estudio comparativo de la expresión de los receptores P₂ entre de dos líneas celulares de adenocarcinoma humano, A549 y H23, y células epiteliales de las vías respiratorias humana BEAS-2B realizado por Song *et al.* se muestra un incremento en la expresión del ARNm de los receptores P₂X₃, P₂X₄ y P₂X₅ en las células provenientes de cáncer pulmonar (Song et al., 2016).

Para el caso de los receptores de la subfamilia P₂Y, las células A549 expresaron el ARNm de los receptores P₂Y₁, P₂Y₂, P₂Y₄ y P₂Y₁₁ siendo el receptor P₂Y₁ el de mayor nivel de expresión y el receptor P₂Y₂ el de menor nivel de expresión en condiciones de cultivo estándar; la expresión de estos receptores concuerda con el trabajo de Takai del 2012 pero contrasta con reportado Schäfer *et. al* en 2003 que evaluaron de igual forma la expresión del ARNm de los receptores P₂Y donde sólo se detectó el ARNm específico para el receptor P₂Y₂ y P₂Y₆ mientras que no se pudo encontrar ningún transcrito para el receptor P₂Y₁ o P₂Y₄ (Schäfer, Sedehizade, Welte, & Reiser, 2003; Takai et al., 2012); el trabajo más reciente de Song *et. al*, al igual que nuestro trabajo, reporta la presencia de transcritos para los receptores P₂Y₁, P₂Y₂, P₂Y₄ y P₂Y₁₁ en las células A549 y H23, así como que su expresión se encuentra aumentada en relación con las células epiteliales pulmonares (Song *et al.*, 2016). Estos resultados confirman el perfil diferencial de expresión de estos receptores P₂X y P₂Y en este modelo celular de adenocarcinoma pulmonar.

El ATPe es una molécula clave en la aparición y desarrollo tumoral ejerciendo un efecto opuesto sobre la proliferación celular, el crecimiento tumoral, la apoptosis la migración, invasión y la metástasis (Burnstock & Di Virgilio, 2013; Y. Cao et al., 2023); algunos estudios reportan que el ATPe induce la proliferación de varios tipos de células humanas, como por ejemplo en las células de adenocarcinoma de colon Caco-2 (Buzzi, Boland, & Russo de Boland, 2010; Shatat, Mahgoup, Rashed, Saleh, & Akool, 2024), de adenocarcinoma gástrico AGS y HGC-27 (Dong et al., 2022), de adenocarcinoma pancreático MIA PaCa-2 (Choi et al., 2018), de hepatocarcinoma HepG2 y BEL-7404 (Xie et al., 2014), de carcinoma ovárico SKOV-3 (Vázquez-Cuevas et al., 2014) entre otras; por el

contrario, otros estudios informan que el ATPe suprime la proliferación de las células glioblastoma U87 (Ledur et al., 2012), de carcinoma colorectal HT-29 (Höpfner et al., 2001) y las células de carcinoma nasofaríngeo 5-8F y CNE-2 (G. Yang et al., 2014), etc.; estos efectos opuestos informados podrían resultar del uso de diferentes tipos/líneas celulares de cáncer o de diferentes escalas de tiempo de estimulación con nucleótidos.

La proliferación descontrolada es una característica distintiva del crecimiento de tumores malignos (Douglas Hanahan, 2022; D. Hanahan & Weinberg, 2011). Inicialmente evaluamos el efecto del ATPe sobre la proliferación de las células A549 tratando a las células por 48 horas con concentraciones crecientes de ATP en el rango de 10-500 μM ; encontramos que el ATPe estimuló un aumento de la población celular dependiente de la concentración en el rango de los 10-100 μM teniendo un efecto máximo significativo a los 100 μM y una disminución con la concentración más alta utilizada (500 μM). El efecto estimulador a la concentración 100 μM coincide con lo reportado en modelos celulares de diversos adenocarcinomas (Choi et al., 2018; Dong et al., 2022; Hevia et al., 2019) y en modelos celulares tumorales provenientes de pulmón (Schäfer et al., 2003); y el efecto bifásico del ATPe sobre la proliferación también ha sido reportado en las células de neuroblastoma ACN en donde hay un aumento de la proliferación celular estimulada por ATP en rango de concentración 50-500 μM y una disminución en la condición de 1 mM (Raffaghello, Chiozzi, Falzoni, Di Virgilio, & Pistoia, 2006) y en las células MCF-7 tratadas en el rango de concentración micromolar, donde en la condición de 100 μM se observó un aumento máximo y una disminución máxima a una concentración mayor en la condición de 100 μM (Chadet et al., 2014); sugiriendo que una baja concentración de ATP, en comparación a concentraciones mayores, ejerce efecto positivo sobre la proliferación celular. Al evaluar si el efecto estimulador del ATPe sobre la proliferación a la concentración de 100 μM es dependiente de la duración del tratamiento realizamos un curso temporal que confirmó un máximo efecto a las 48 horas y una disminución del efecto proliferativo en el tratamiento de 72 horas, en las células Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal no se observaron cambios en la viabilidad celular a las 24 horas de tratamiento con 100 μM de ATP pero sí un aumento significativo a las 48 horas de tratamiento (Shatat et al., 2024). El efecto negativo de la exposición más prolongada ha sido reportada en otros modelos celulares, como en las células Panc-1 y BxPC-3 (Giannuzzo et al., 2015), sugiriendo que la estimulación crónica con ATPe influye sobre la homeostasis del calcio cuya

desregulación índice en el daño y muerte celular (Zheng, Zychlinsky, Liu, Ojcius, & Young, 1991).

La evasión y regulación de la tasa apoptótica es una estrategia que las células cancerígenas desarrollan para mantener el crecimiento tumoral (D. Hanahan & Weinberg, 2011); una forma de evaluarlo es a través de la relación entre en nivel de expresión las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas y proapoptóticas que determinan si las células sobreviven o mueren regulando la apoptosis por la vía intrínseca; bajo nuestra condición experimental no encontramos un cambio significativo en el ARNm que codifica para la proteína Bcl-2 proapoptótica y para la proteína Bax antiapoptótica tras la estimulación de ATP 100 μ M por 48 horas, este resultado es contrario con lo reportado por Song *et. al* en las células H23 y A549 donde observaron un aumento de la relación Bcl-2/Bax a nivel de proteína que promueve la supervivencia celular tras la estimulación con ATPe (Song et al., 2016) y estas diferencias podrían deberse principalmente a la diferencia de ATP concentración utilizada, duración del tratamiento y al método experimental utilizado para evaluar el nivel de expresión de estos elemento. Hay muchas formas en las que una célula puede adquirir la capacidad de la evasión de la apoptosis, aparte del desequilibrio entre las proteínas pro y antiapoptóticas otra estrategia es el aumento en la expresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) (Wong, 2011); al evaluar si el ATP inducía cambios en los niveles de ARNm para la proteína cIAP2 encontramos un aumento significativo con relación a la condición control, por lo que el ATPe podría influir en la expresión de este grupo de proteínas reguladoras, entre las cuales XIAP y survivina NSCLC se han reportado incrementadas a nivel de ARNm y proteína en muestras clínicas de pacientes con NSCLC (Krepela et al., 2009).

La tasa proliferativa es un marcador pronóstico en algunos tumores, Ki-67 es un marcador de antígeno nuclear, una proteína de unión al ADN, que se asocia a la proliferación ya que es expresado en células en replicación durante todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M) pero no expresado en células quiescentes (G0) (Sun & Kaufman, 2018; Tabata et al., 2014), se encuentran en las células que están en el ciclo de crecimiento y de manera general una tasa positiva más alta indica una mayor proporción de células tumorales en la fase de crecimiento y un crecimiento tumoral más rápido (Sun & Kaufman, 2018). Diversos trabajos han correlacionado la expresión de Ki67 de muestras de NSCLS con la supervivencia y el pronóstico siendo los resultados diversos: asociándose con un índice de

riesgo de muerte más alto de muerte y mayor recurrencia (Grant et al., 2018) y en otros casos como un factor de mejor pronóstico para la supervivencia (Martin et al., 2004). Al evaluar si el tratamiento con ATPe induce cambios en la expresión de este marcador a nivel del mensajero en las células A549 no encontramos cambios en relación con el control por lo que su expresión no estaría influenciada por la estimulación con ATPe.

Respecto a la progresión del ciclo celular, las señales y mutaciones asociadas al cáncer perturban el control del ciclo celular permitiendo la división celular sostenida (Douglas Hanahan, 2022; Matthews, Bertoli, & de Bruin, 2022); el regulador clave de los procesos del ciclo celular es la actividad de complejos ciclina/CDK: las cinasas dependientes de ciclina (CDK) forman complejos con sus subunidades reguladoras, conocidas como ciclinas y estos los complejos regulan una progresión de los eventos celulares desde un estado de quiescente, la fase de crecimiento celular, la replicación del ADN y finalmente a la división celular; las ciclinas se acumulan de manera específica y diferencial en las distintas etapas del ciclo celular, y esta interdependencia garantiza que la progresión del ciclo celular sea secuencial y unidireccional (Casimiro, Crosariol, Loro, Li, & Pestell, 2012; Matthews et al., 2022). El ATPe incrementa la expresión de la ciclina A2 en las células de fibroblastos ER-1-2 (J. J. Yang & Krauss, 1997) y en las células Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal vía la activación de los receptores P₂Y (Shatat et al., 2024) y promueve la expresión de la ciclina D1 en las células de músculo liso vascular (I. T. Lee et al., 2013), en astrocitos (Neary, Kang, & Shi, 2005) y en las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MD-231 vía P₂Y₂-β-catenina (J. L. Zhang et al., 2017).

En las células A549 mostramos que el tratamiento con ATPe genera un incremento significativo en la expresión del ARNm de la ciclina B1 y ciclina E1; la progresión del ciclo celular en el cáncer está impulsada por la acumulación de actividad de los complejos ciclina/CDK durante la interfase y la fase M: el complejo ciclina E1/CDK impulsa la transición del ciclo celular de la fase G₀ a la fase S, activando la transcripción dependiente de E2F de la propia ciclina E y ciclina A favoreciendo el inicio de la transcripción y de la fase S, y la subsecuente acumulación de la actividad de ciclina B/CD1 impulsa la entrada a la fase mitótica y permite la activación del APC/Cdc20, que es necesario para la salida mitótica, la degradación de ciclinas y para completar el ciclo celular (Matthews et al., 2022); por tanto la regulación a la alza en la expresión de estas ciclinas contribuye al efecto proliferativo positivo inducido por el ATPe en las células A549.

La migración celular es un paso primordial en el proceso metastásico (Paul, Mistrionis, & Konstantopoulos, 2017), múltiples factores pueden impulsar, dirigir y regular la motilidad de las células tumorales y se ha reportado que el ATPe puede incidir sobre la capacidad migratoria en diferentes líneas celulares (Liu et al., 2018; Sharma et al., 2021; J. L. Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2022); al realizar el ensayo de migración en cámara Transwell encontramos que el tratamiento con 100 μ M de ATP por 48 horas potencia la capacidad migratoria de las células A549, este resultado coincide con el efecto reportado previamente por Cao *et. al* en 2019 y Bai *et. al* en 2023 en este mismo modelo celular en ensayos realizados con una diferencia de tratamiento de 16-24 horas (Bai et al., 2023) así como en otros modelos de NSCLC, las células H1299 y Hop-92 (Yanyang Cao et al., 2019).

En el proceso de metástasis tumoral intervienen muchos factores, pero la transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso clave durante el desarrollo tumoral y su progresión y está estrechamente relacionada con los procesos de migración e invasión en el NSCLC; el ATPe actúa como un mensajero que puede activar señales inductoras de la TEM: al modificar los niveles de proteínas asociadas a la TEM e inducir cambios en la morfología y motilidad de las células de cáncer de pulmón (Alvarez et al., 2022; Bai et al., 2023; Y. Cao et al., 2023; Wood et al., 2014); Los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y la activación del fenotipo mesenquimal involucran reguladores maestros: los factores de transcripción Snail, Twist y Zeb, su expresión se activa en las primeras etapas de la TEM y a menudo los mismos factores de transcripción dirigen tanto el proceso de la represión como la activación de genes epiteliales y mesenquimales (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Por lo que inicialmente evaluamos la expresión del ARNm para diferentes factores de transcripción principales en este proceso: Snail 1, Snail 2 y Zeb 1: el tratamiento con ATPe no modifico la expresión del ARNm que codifica para Zeb 1 con relación a la condición control pero si mostro un aumento en la tendencia en la expresión del ARNm para Snail 2 y un aumento significativo en el ARNm para Snail 1; los factores Snail regulan una gran variedad de elementos esenciales de la TEM directamente reprime directamente marcadores epiteliales como la E-cadherina y las claudinas pero también regula positivamente marcadores del fenotipo mesenquimal, que incluyen vimentina y fibronectina e incide sobre la expresión de correpresores como el caso de Zeb 1 (Kaufhold & Bonavida, 2014; Lamouille et al., 2014); se ha demostrado que el ATPe

también incrementa la expresión de Snail 1 en otros tipos de carcinomas (Li et al., 2013; Y. Qiu et al., 2018; Zhou et al., 2022).

Con este resultado y dado que los niveles de expresión de muchos de los genes blanco de los factores Snail son utilizados como indicadores de pronóstico, los cambios en los niveles de marcadores epiteliales y mesenquimales se utilizan de manera común para indicar la aparición de la TEM (Bai et al., 2023; Kaufhold & Bonavida, 2014), evaluamos los cambios de marcadores tanto epiteliales como mesenquimales después de la estimulación con 100 μ M de ATP por 48 horas; el ATPe no modifico la expresión del ARNm que codifica para E-Cadherina sin embargo si modifico a la alta la expresión del ARNm que codifica para vimentina y la actina de músculo liso alfa (α -SMA) de manera significativa; Snail1 regula positivamente la vimentina durante la TEM, en la que las células epiteliales, que normalmente expresan filamentos intermedios de queratina, comienzan a expresar vimentina (Kaufhold & Bonavida, 2014; Lamouille et al., 2014) y la sobreexpresión de vimentina es evidente en el cáncer de mama y próstata, entre otros y esta se correlaciona con una mayor invasividad y capacidad migratoria (Gilles et al., 2003; Zhao, Yan, Long, Chen, & Wang, 2008); el aumento en la expresión de vimentina fue también reportado por Cao *et al.* en 2019 a nivel de proteína posterior al tratamiento con ATP 0.5 mM por 24 horas en las células A549, por Bai *et al.*, 2023 detectado en tejidos provenientes de tumores trasplantados en un modelo de xenoinjerto administrados periódicamente con 300 μ M de ATP (Bai et al., 2023) y en muestras de tejido proveniente de adenocarcinoma pulmonar con metástasis de ganglios linfáticos (Du, Chen, Zhou, Han, & Che, 2014); La α -SMA es considerada un marcador mesenquimal, contribuye a la migración e invasión de células tumorales principalmente mediante la supresión de la expresión de E-cadherina, se ha demostrado un aumento en su expresión en células de cáncer de mama MCF-7 resistentes a tamoxifeno (Kim et al., 2019), en células SCC-25 (El-Kammar, Afifi, & AbdulKhalik, 2019) y muestras de tejido de carcinoma oral de células escamosas (Ding et al., 2014), y de manera específica en el pulmón, muestras de adenocarcinoma pulmonar muestran un aumento en la expresión de α -SMA en comparación al tejido pulmonar adyacente (Du et al., 2014; H. W. Lee et al., 2013), la expresión de α -SMA en NSCLC se ha asociado con la metástasis al cerebro (Lee et al., 2012). Concluyendo que el ATPe favorece la migración y el fenotipo mesenquimal en las células A549 incrementando la expresión de α -SMA y vimentina.

Los factores de transcripción de la TEM regulan la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP), estas son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc cuya función es escindir proteínas de la matriz extracelular (colágeno, laminina, etc) y su sobreexpresión de las MMP está fuertemente asociada con la invasión de células de cáncer (Douglas Hanahan, 2022; Kelley et al., 2019). Finalmente, al evaluar si el ATPe incide sobre la expresión de ARNm que codifica para MMP-2 y MMP-7 no encontramos cambios comparados con la condición control, en el estudio de Cao *et al.*, 2019 se reporta un aumento del ARNm para MMP-7 y MM-P9 en las células A549 pero a una concentración mayor de ATP 0.5-1 mM, pero sin incidir sobre el nivel de expresión de MMP-13 con el tratamiento con ATP 0.5 mM (Yanyang Cao et al., 2019) por lo que probablemente bajas concentraciones de ATPe no modifiquen los niveles de expresión del ARNm para diferentes MMP's en las células A549.

IX. CONCLUSIONES

- Las células A549 expresan de manera diferencial el ARNm de los receptores purinérgicos de la familia P₂: P₂X₁, P₂X₄, P₂X₅, P₂X₇, P₂Y₁, P₂Y₄, P₂Y₆ y P₂Y₁₁.
- La presencia de ATPe exagera la capacidad proliferativa de la línea celular A549 incidiendo positivamente en el nivel de expresión del ARNm que codifica para la proteína anti-apoptótica cIAP2 y para las ciclinas E1 y B1.
- La capacidad migratoria de las células A549 es estimulada por el ATPe, incrementando la expresión del ARNm de los elementos asociados a la transición epitelio-mesénquima: Snail-1, vimentina y α -SMA.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alduais, Y., Zhang, H., Fan, F., Chen, J., & Chen, B. (2023). Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)*, 102(8), e32899. doi:10.1097/md.00000000000032899
- Alvarez, C. L., Troncoso, M. F., & Espelt, M. V. (2022). Extracellular ATP and adenosine in tumor microenvironment: Roles in epithelial–mesenchymal transition, cell migration, and invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 389-400. doi:<https://doi.org/10.1002/jcp.30580>
- Arbour, K. C., & Riely, G. J. (2019). Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *Jama*, 322(8), 764-774. doi:10.1001/jama.2019.11058
- ATCC. (2024). A549 CCL-185 Product Sheet. ATCC. Retrieved from <https://www.atcc.org/products/ccl-185#detailed-product-images>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., . . . Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*, 18(1), 59. doi:10.1186/s12964-020-0530-4
- Bai, X., Li, Q., Peng, X., Li, X., Qiao, C., Tang, Y., & Zhao, R. (2023). P2X7 receptor promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells through the PI3K/Akt pathways. *Purinergic Signal*, 19(4), 685-697. doi:10.1007/s11302-023-09928-z
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, 21(6), 167-223. doi:10.1016/s0098-2997(00)00007-8
- Bi, J. H., Tuo, J. Y., Xiao, Y. X., Tang, D. D., Zhou, X. H., Jiang, Y. F., . . . Xiang, Y. B. (2024). Observed and relative survival trends of lung cancer: A systematic review of population-based cancer registration data. *Thorac Cancer*, 15(2), 142-151. doi:10.1111/1759-7714.15170
- Bilbao, P. S., Santillán, G., & Boland, R. (2010). ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*, 499(1-2), 40-48. doi:10.1016/j.abb.2010.05.001
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24(3), 509-581.
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv*, 2, 2398212818817494. doi:10.1177/2398212818817494
- Burnstock, G. (2020). Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol Biol*, 2041, 1-15. doi:10.1007/978-1-4939-9717-6_1
- Burnstock, G., Brouns, I., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2012). Purinergic signaling in the airways. *Pharmacol Rev*, 64(4), 834-868. doi:10.1124/pr.111.005389
- Burnstock, G., & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*, 9(4), 491-540. doi:10.1007/s11302-013-9372-5
- Burnstock, G., & Verkhatsky, A. (2009). Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiologica*, 195(4), 415-447. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x>
- Buzzi, N., Boland, R., & Russo de Boland, A. (2010). Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1800(9), 946-955. doi:10.1016/j.bbagen.2010.05.009

- Campos-Contreras, A. d. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells*, 9(7), 1612. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1612>
- Cao, Y., Chen, E., Wang, X., Song, J., Zhang, H., & Chen, X. (2023). An emerging master inducer and regulator for epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis: extracellular and intracellular ATP and its molecular functions and therapeutic potential. *Cancer Cell Int*, 23(1), 20. doi:10.1186/s12935-023-02859-0
- Cao, Y., Wang, X., Li, Y., Evers, M., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Extracellular and macropinocytosis internalized ATP work together to induce epithelial–mesenchymal transition and other early metastatic activities in lung cancer. *Cancer Cell International*, 19(1), 254. doi:10.1186/s12935-019-0973-0
- Casimiro, M. C., Crosariol, M., Loro, E., Li, Z., & Pestell, R. G. (2012). Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer*, 3(11-12), 649-657. doi:10.1177/1947601913479022
- Chadet, S., Allard, J., Brisson, L., Lopez-Charcas, O., Lemoine, R., Heraud, A., . . . Roger, S. (2022). P2x4 receptor promotes mammary cancer progression by sustaining autophagy and associated mesenchymal transition. *Oncogene*, 41(21), 2920-2931. doi:10.1038/s41388-022-02297-8
- Chadet, S., Jelassi, B., Wannous, R., Angoulvant, D., Chevalier, S., Besson, P., & Roger, S. (2014). The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Carcinogenesis*, 35(6), 1238-1247. doi:10.1093/carcin/bgt493
- Chevallier, M., Borgeaud, M., Addeo, A., & Friedlaender, A. (2021). Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol*, 12(4), 217-237. doi:10.5306/wjco.v12.i4.217
- Choi, J. H., Ji, Y. G., Ko, J. J., Cho, H. J., & Lee, D. H. (2018). Activating P2X7 Receptors Increases Proliferation of Human Pancreatic Cancer Cells via ERK1/2 and JNK. *Pancreas*, 47(5), 643-651. doi:10.1097/mpa.0000000000001055
- Clunes, M. T., & Kemp, P. J. (1996). P2u purinoceptor modulation of intracellular Ca²⁺ in a human lung adenocarcinoma cell line: down-regulation of Ca²⁺ influx by protein kinase C. *Cell Calcium*, 20(4), 339-346. doi:10.1016/s0143-4160(96)90039-1
- Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*, 72(21), 5441-5447. doi:10.1158/0008-5472.Can-12-1600
- Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., & Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 18(10), 601-618. doi:10.1038/s41568-018-0037-0
- Ding, L., Zhang, Z., Shang, D., Cheng, J., Yuan, H., Wu, Y., . . . Jiang, H. (2014). α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 43(5), 335-343. doi:10.1111/jop.12143
- Dong, C.-R., Hu, D.-X., Liu, S.-C., Luo, H.-L., & Zhang, W.-J. (2022). AKT/GSK-3 β /VEGF signaling is involved in P2RY2 activation-induced the proliferation and metastasis of gastric cancer. *Carcinogenesis*, 44(1), 65-79. doi:10.1093/carcin/bgac095
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68(3), 213-237. doi:10.1113/jphysiol.1929.sp002608

- Du, H., Chen, D., Zhou, Y., Han, Z., & Che, G. (2014). Fibroblast phenotypes in different lung diseases. *J Cardiothorac Surg*, 9, 147. doi:10.1186/s13019-014-0147-z
- El-Kammar, H., Afifi, N. S., & AbdulKhalik, D. (2019). Role of Alpha Smooth Muscle Actin in Oral Squamous Cell Carcinoma Progression. *Egyptian Dental Journal*, 65(Issue 3 - July (Oral Medicine, X-Ray, Oral Biology & Oral Pathology)), 2387-2396. doi:10.21608/edj.2019.72277
- Giannuzzo, A., Pedersen, S. F., & Novak, I. (2015). The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer*, 14(1), 203. doi:10.1186/s12943-015-0472-4
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5), 1417-1423. doi:10.1093/jnci/51.5.1417
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P., & Foidart, J. M. (2003). Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 63(10), 2658-2664.
- Grant, L., Banerji, S., Murphy, L., Dawe, D. E., Harlos, C., Myal, Y., . . . Pitz, M. W. (2018). Androgen Receptor and Ki67 Expression and Survival Outcomes in Non-small Cell Lung Cancer. *Hormones and Cancer*, 9(4), 288-294. doi:10.1007/s12672-018-0336-7
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., . . . Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15009. doi:10.1038/nrdp.2015.9
- Grygorczyk, R., Boudreault, F., Tan, J. J., Ponomarchuk, O., Sokabe, M., & Furuya, K. (2019). Mechanosensitive ATP release in the lungs: New insights from real-time luminescence imaging studies. *Curr Top Membr*, 83, 45-76. doi:10.1016/bs.ctm.2019.02.001
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059 %J Cancer Discovery
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454. doi:10.1038/nature25183
- Hevia, M. J., Castro, P., Pinto, K., Reyna-Jeldes, M., Rodríguez-Tirado, F., Robles-Planells, C., . . . Coddou, C. (2019). Differential Effects of Purinergic Signaling in Gastric Cancer-Derived Cells Through P2Y and P2X Receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi:10.3389/fphar.2019.00612
- Höpfner, M., Maaser, K., Barthel, B., von Lampe, B., Hanski, C., Riecken, E. O., . . . Scherübl, H. (2001). Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *International Journal of Colorectal Disease*, 16(3), 154-166. doi:10.1007/s003840100302
- IACR. (2022a). Cancer Mexico. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- IACR. (2022b). Cancer Today Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
- IACR. (2022c). Lung Cancer. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>

- Ibodeng, G. O., Uche, I. N., Moku, R., Galo, M., Odigwe, B., Galeas, J. N., & Dasgupta, S. (2023). A snapshot of lung cancer: where are we now?-a narrative review. *Ann Transl Med*, 11(6), 261. doi:10.21037/atm-22-4479
- INEGI. (2024). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer [Press release]. Retrieved from https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_CANCER_24.pdf
- Jin, H., Eun, S. Y., Lee, J. S., Park, S. W., Lee, J. H., Chang, K. C., & Kim, H. J. (2014). P2Y2receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Research*, 16(5), R77. doi:10.1186/bcr3694
- Kaufhold, S., & Bonavida, B. (2014). Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 62. doi:10.1186/s13046-014-0062-0
- Kaur, J., & Dora, S. (2023). Purinergic signaling: Diverse effects and therapeutic potential in cancer. *Front Oncol*, 13, 1058371. doi:10.3389/fonc.2023.1058371
- Kelley, L. C., Chi, Q., Cáceres, R., Hastie, E., Schindler, A. J., Jiang, Y., . . . Sherwood, D. R. (2019). Adaptive F-Actin Polymerization and Localized ATP Production Drive Basement Membrane Invasion in the Absence of MMPs. *Developmental Cell*, 48(3), 313-328.e318. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.018>
- Kim, S., You, D., Jeong, Y., Yu, J., Kim, S. W., Nam, S. J., & Lee, J. E. (2019). TP53 upregulates α -smooth muscle actin expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncol Rep*, 41(2), 1075-1082. doi:10.3892/or.2018.6910
- Kreda, S. M., Okada, S. F., van Heusden, C. A., O'Neal, W., Gabriel, S., Abdullah, L., . . . Lazarowski, E. R. (2007). Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells. *J Physiol*, 584(Pt 1), 245-259. doi:10.1113/jphysiol.2007.139840
- Krepela, E., Dankova, P., Moravcikova, E., Krepelova, A., Prochazka, J., Cermak, J., . . . Benkova, K. (2009). Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol*, 35(6), 1449-1462. doi:10.3892/ijo_00000464
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Lazarowski, E. R., Sesma, J. I., Seminario, L., Esther, C. R., Jr., & Kreda, S. M. (2011). Nucleotide release by airway epithelia. *Subcell Biochem*, 55, 1-15. doi:10.1007/978-94-007-1217-1_1
- Ledur, P. F., Villodre, E. S., Paulus, R., Cruz, L. A., Flores, D. G., & Lenz, G. (2012). Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signal*, 8(1), 39-48. doi:10.1007/s11302-011-9252-9
- Lee, H. W., Park, Y. M., Lee, S. J., Cho, H. J., Kim, D. H., Lee, J. I., . . . Joo, K. M. (2013). Alpha-smooth muscle actin (ACTA2) is required for metastatic potential of human lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 19(21), 5879-5889. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-13-1181
- Lee, H. W., Seol, H. J., Choi, Y. L., Ju, H. J., Joo, K. M., Ko, Y. H., . . . Nam, D. H. (2012). Genomic copy number alterations associated with the early brain metastasis of non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*, 41(6), 2013-2020. doi:10.3892/ijo.2012.1663

- Lee, I. T., Lin, C.-C., Wang, C.-H., Cherng, W.-J., Wang, J.-S., & Yang, C.-M. (2013). ATP stimulates PGE2/cyclin D1-dependent VSMCs proliferation via STAT3 activation: Role of PKCs-dependent NADPH oxidase/ROS generation. *Biochemical Pharmacology*, *85*(7), 954-964. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.016>
- Li, W. H., Qiu, Y., Zhang, H. Q., Liu, Y., You, J. F., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2013). P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, *109*(6), 1666-1675. doi:10.1038/bjc.2013.484
- Liu, Y., Geng, Y. H., Yang, H., Yang, H., Zhou, Y. T., Zhang, H. Q., . . . Fang, W. G. (2018). Extracellular ATP drives breast cancer cell migration and metastasis via S100A4 production by cancer cells and fibroblasts. *Cancer Lett*, *430*, 1-10. doi:10.1016/j.canlet.2018.04.043
- Lu, W., & Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental Cell*, *49*(3), 361-374. doi:10.1016/j.devcel.2019.04.010
- Luo, G., Zhang, Y., Etxeberria, J., Arnold, M., Cai, X., Hao, Y., & Zou, H. (2023). Projections of Lung Cancer Incidence by 2035 in 40 Countries Worldwide: Population-Based Study. *JMIR Public Health Surveill*, *9*, e43651. doi:10.2196/43651
- Maaser, K., Höpfner, M., Kap, H., Sutter, A. P., Barthel, B., von Lampe, B., . . . Scherübl, H. (2002). Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y2-receptors. *British Journal of Cancer*, *86*(4), 636-644. doi:10.1038/sj.bjc.6600100
- Martin, B., Paesmans, M., Mascaux, C., Berghmans, T., Lothaire, P., Meert, A. P., . . . Sculier, J. P. (2004). Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*, *91*(12), 2018-2025. doi:10.1038/sj.bjc.6602233
- Martínez-Ramírez, A. S., Díaz-Muñoz, M., Butanda-Ochoa, A., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2017). Nucleotides and nucleoside signaling in the regulation of the epithelium to mesenchymal transition (EMT). *Purinergic Signal*, *13*(1), 1-12. doi:10.1007/s11302-016-9550-3
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 74-88. doi:10.1038/s41580-021-00404-3
- Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biol*, *33*(4), 911-917. doi:10.1007/s13277-012-0389-0
- Neary, J. T., Kang, Y., & Shi, Y. F. (2005). Cell cycle regulation of astrocytes by extracellular nucleotides and fibroblast growth factor-2. *Purinergic Signal*, *1*(4), 329-336. doi:10.1007/s11302-005-8075-y
- Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., . . . Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol*, *17*(3), 362-387. doi:10.1016/j.jtho.2021.11.003
- Okada, S. F., Ribeiro, C. M., Sesma, J. I., Seminario-Vidal, L., Abdullah, L. H., van Heusden, C., . . . Boucher, R. C. (2013). Inflammation promotes airway epithelial ATP release via calcium-dependent vesicular pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *49*(5), 814-820. doi:10.1165/rcmb.2012-0493OC
- OMS. (2024, 30 marzo 2023). Cancer. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>
- Paul, C. D., Mistriotis, P., & Konstantopoulos, K. (2017). Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. *Nature Reviews Cancer*, *17*(2), 131-140. doi:10.1038/nrc.2016.123

- Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., & Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*, *3*(7), e2599. doi:10.1371/journal.pone.0002599
- Pendharkar, D., Ausekar, B. V., & Gupta, S. (2013). Molecular biology of lung cancer-a review. *Indian J Surg Oncol*, *4*(2), 120-124. doi:10.1007/s13193-013-0213-3
- Qiu, Y., Li, W.-h., Zhang, H.-q., Liu, Y., Tian, X.-X., & Fang, W.-G. (2014). P2X7 Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells. *PLoS One*, *9*(12), e114371. doi:10.1371/journal.pone.0114371
- Qiu, Y., Liu, Y., Li, W. H., Zhang, H. Q., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2018). P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin. *Oncol Rep*, *39*(1), 138-150. doi:10.3892/or.2017.6081
- Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F., & Pistoia, V. (2006). The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res*, *66*(2), 907-914. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-3185
- Reyna-Jeldes, M., De la Fuente-Ortega, E., Cerda, D., Velázquez-Miranda, E., Pinto, K., Vázquez-Cuevas, F. G., & Coddou, C. (2021). Purinergic P2Y2 and P2X4 Receptors Are Involved in the Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastatic Potential of Gastric Cancer Derived Cell Lines. *Pharmaceutics*, *13*(8). doi:10.3390/pharmaceutics13081234
- Reyna-Jeldes, M., Díaz-Muñoz, M., Madariaga, J. A., Coddou, C., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2021). Autocrine and paracrine purinergic signaling in the most lethal types of cancer. *Purinergic Signal*, *17*(3), 345-370. doi:10.1007/s11302-021-09785-8
- Satoru, I., Kishio, F., Masahiro, S., & Yoshinori, H. (2016). Cellular ATP release in the lung and airway. *AIMS Biophysics*, *3*(4), 571-584. doi:10.3934/biophy.2016.4.571
- Schäfer, R., Sedehizade, F., Welte, T., & Reiser, G. (2003). ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(2), L376-L385. doi:10.1152/ajplung.00447.2002
- Sharma, S., Kalra, H., & Akundi, R. S. (2021). Extracellular ATP Mediates Cancer Cell Migration and Invasion Through Increased Expression of Cyclooxygenase 2. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. doi:10.3389/fphar.2020.617211
- Shatat, A.-A. S., Mahgoup, E. M., Rashed, M. H., Saleh, I. G., & Akool, E.-S. (2024). Molecular mechanisms of extracellular-ATP-mediated colorectal cancer progression: Implication of purinergic receptors-mediated nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Purinergic Signalling*. doi:10.1007/s11302-024-10021-2
- Shukla, S., Dalai, P., & Agrawal-Rajput, R. (2024). Metabolic crosstalk: Extracellular ATP and the tumor microenvironment in cancer progression and therapy. *Cell Signal*, *121*, 111281. doi:10.1016/j.cellsig.2024.111281
- Song, S., Jacobson, K. N., McDermott, K. M., Reddy, S. P., Cress, A. E., Tang, H., . . . Yuan, J. X. (2016). ATP promotes cell survival via regulation of cytosolic [Ca²⁺] and Bcl-2/Bax ratio in lung cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *310*(2), C99-114. doi:10.1152/ajpcell.00092.2015
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, *127*(2), 175-186. doi:10.1007/s00412-018-0659-8
- Tabata, K., Tanaka, T., Hayashi, T., Hori, T., Nunomura, S., Yonezawa, S., & Fukuoka, J. (2014). Ki-67 is a strong prognostic marker of non-small cell lung cancer when

- tissue heterogeneity is considered. *BMC Clin Pathol*, 14, 23. doi:10.1186/1472-6890-14-23
- Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., & Kojima, S. (2014). Autocrine signaling via release of ATP and activation of P2X7 receptor influences motile activity of human lung cancer cells. *Purinergic Signalling*, 10(3), 487-497. doi:10.1007/s11302-014-9411-x
- Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y., & Kojima, S. (2012). Autocrine regulation of TGF- β 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, 125(21), 5051-5060. doi:10.1242/jcs.104976
- Tatur, S., Kreda, S., Lazarowski, E., & Grygorczyk, R. (2008). Calcium-dependent release of adenosine and uridine nucleotides from A549 cells. *Purinergic Signalling*, 4(2), 139-146. doi:10.1007/s11302-007-9059-x
- Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535-554. doi:10.1016/S0140-6736(21)00312-3
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 25(1), 45-52. doi:10.5114/wo.2021.103829
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., . . . Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 10(9), 1243-1260. doi:10.1097/jto.0000000000000630
- Vázquez-Cuevas, F. G., Martínez-Ramírez, A. S., Robles-Martínez, L., Garay, E., García-Carrancá, A., Pérez-Montiel, D., . . . Arellano, R. O. (2014). Paracrine stimulation of P2X7 receptor by ATP activates a proliferative pathway in ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem*, 115(11), 1955-1966. doi:10.1002/jcb.24867
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10(8), 789-799. doi:10.1038/nm1087
- Vultaggio-Poma, V., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2020). Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells*, 9(11), 2496. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/11/2496>
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*, 51(6), 2647-2693. doi:10.1159/000495956
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30(1), 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A., & Whetton, A. D. (2014). The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. *Cancer Treat Rev*, 40(4), 558-566. doi:10.1016/j.ctrv.2013.10.001
- Woods, L. T., Forti, K. M., Shanbhag, V. C., Camden, J. M., & Weisman, G. A. (2021). P2Y receptors for extracellular nucleotides: Contributions to cancer progression and therapeutic implications. *Biochem Pharmacol*, 187, 114406. doi:10.1016/j.bcp.2021.114406
- Xia, J., Yu, X., Tang, L., Li, G., & He, T. (2015). P2X7 receptor stimulates breast cancer cell invasion and migration via the AKT pathway. *Oncol Rep*, 34(1), 103-110. doi:10.3892/or.2015.3979
- Xie, R., Xu, J., Wen, G., Jin, H., Liu, X., Yang, Y., . . . Tuo, B. (2014). The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular

- carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem*, 289(27), 19137-19149.
doi:10.1074/jbc.M113.540047
- Yang, G., Zhang, S., Zhang, Y., Zhou, Q., Peng, S., Zhang, T., . . . Zhang, F. (2014). The inhibitory effects of extracellular ATP on the growth of nasopharyngeal carcinoma cells via P2Y2 receptor and osteopontin. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 53. doi:10.1186/1756-9966-33-53
- Yang, J. J., & Krauss, R. S. (1997). Extracellular ATP induces anchorage-independent expression of cyclin A and rescues the transformed phenotype of a ras-resistant mutant cell line. *J Biol Chem*, 272(5), 3103-3108. doi:10.1074/jbc.272.5.3103
- Zaparte, A., Cappellari, A. R., Brandão, C. A., de Souza, J. B., Borges, T. J., Kist, L. W., . . . Morrone, F. B. (2021). P2Y2 receptor activation promotes esophageal cancer cells proliferation via ERK1/2 pathway. *European Journal of Pharmacology*, 891, 173687. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173687>
- Zhang, J. L., Liu, Y., Yang, H., Zhang, H. Q., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2017). ATP-P2Y2- β -catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. *Cancer Sci*, 108(7), 1318-1327. doi:10.1111/cas.13273
- Zhang, W., Luo, C., Huang, C., Pu, F.-q., Zhu, J.-f., & Zhu, Z.-m. (2021). PI3K/Akt/GSK-3 β signal pathway is involved in P2X7 receptor-induced proliferation and EMT of colorectal cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 899, 174041. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174041>
- Zhang, Y., Gong, L. H., Zhang, H. Q., Du, Q., You, J. F., Tian, X. X., & Fang, W. G. (2010). Extracellular ATP enhances in vitro invasion of prostate cancer cells by activating Rho GTPase and upregulating MMPs expression. *Cancer Lett*, 293(2), 189-197. doi:10.1016/j.canlet.2010.01.010
- Zhao, Y., Yan, Q., Long, X., Chen, X., & Wang, Y. (2008). Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct*, 26(5), 571-577. doi:10.1002/cbf.1478
- Zheng, L. M., Zychlinsky, A., Liu, C. C., Ojcius, D. M., & Young, J. D. (1991). Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol*, 112(2), 279-288. doi:10.1083/jcb.112.2.279
- Zhou, Q., Liu, S., Kou, Y., Yang, P., Liu, H., Hasegawa, T., . . . Li, M. (2022). ATP Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Invasion and Migration by Activating the PI3K/AKT Pathway via the P2Y2-Src-EGFR Axis. *ACS Omega*, 7(44), 39760-39771. doi:10.1021/acsomega.2c03727