



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuroendocrinología



**Tesis profesional**

*Efecto de adenosina sobre la proteína antiapoptótica BIRC3 en la línea celular de Glioblastoma U87MG.*

Tesis que para obtener el grado de:

**Licenciada en Biomedicina**

Presenta

**Selene Cruz Cantero**

Director de tesis:

**Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán**

**Puebla de Zaragoza, noviembre 2019.**

## CONTENIDO

---

ABREVIATURAS .....	4
ANTECEDENTES GENERALES.....	8
ESTADISTICAS SOBRE EL CANCER A NIVEL MUNDIAL .....	8
CELULAS GLIALES .....	10
ASTROGLIA.....	12
ASTROCITOS.....	12
FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS.....	12
ANTECEDENTES ESPECIFICOS .....	14
GLIOMAS .....	14
GLIOBLASTOMA .....	15
EPIDEMIOLOGIA.....	15
FACTORES DE RIESGO PARA TUMORES CEREBRALES PRIMARIOS.....	16
Radiación ionizante .....	16
Susceptibilidad Genética .....	16
Alergias y relaciones inmuno-mediadas.....	17
FACTORES DE RIESGO PARA TUMORES CEREBRALES SECUNDARIOS.....	17
ADENOSINA .....	17
Metabolismo de la adenosina.....	18
Receptores de adenosina .....	19
Estructura molecular .....	20
Distribución, efectos fisiológicos y transducción de señales.....	20
ADENOSINA Y CANCER .....	22
APOPTOSIS.....	23
Vía extrínseca de la apoptosis.....	24
Vía intrínseca de la apoptosis .....	25
Vía común de la apoptosis.....	27
APOPTOSIS Y CARCINOGENESIS.....	27
PROTEINAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS (IAP) .....	28
ESTRUCTURA DE LAS IAP .....	29
Dominio BIR .....	29

Dominio RING .....	31
PROTEINAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS Y CANCER .....	31
BIRC 3 .....	32
JUSTIFICACION .....	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
HIPOTESIS.....	35
OBJETIVOS .....	35
Objetivo general .....	35
Objetivos particulares .....	35
MATERIAL Y METODOS .....	36
Cultivo celular .....	36
Extracción del Ácido Ribonucleico Total .....	37
Cuantificación de RNA.....	37
Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario.....	38
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles).....	39
Separación electroforética de los productos de PCR.....	40
Densitometría .....	41
Ensayo de viabilidad celular mediante MTT .....	41
Análisis de datos .....	41
RESULTADOS.....	42
DISCUSION.....	53
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA .....	59

## ABREVIATURAS

---

**AC:** Adenilato ciclasa

**ADA:** Adenosina desaminasa

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**Ado:** Adenosina

**AK:** Cinasa de Adenosina

**AMP:** Adenosin monofosfato

**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosin Trifosfato

**BIR:** Repetición IAP de Baculovirus

**BIRC3:** Proteína que contiene 3 repeticiones IAP baculoviral.

**C:** Cinasa

**Caf:** Cafeína

**DAG:** Diacilglicerol

**DISC:** Complejo de Señalización Inductora de Muerte

**DD:** Dominio de Muerte

**ETN:** Transportador de equilibrio de nucleótido

**EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.

**Fsk:** Forskolina

**GBM:** Glioblastoma Multiforme

**GFAP:** Proteína Ácida Fibrilar Glial.

**GPCR:** Receptor acoplado a proteína G

**HER2:** Factor de crecimiento Epidérmico Humano 2

**IAP:** Proteína Inhibidora de Apoptosis

**IBM:** Dominio de unión a IAP

**IP3:** Inositol Trifosfato

**MG:** Glioma Maligno

**PKA:** Proteína Cinasa A

**PKC:** Proteína Cinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**PBS:** Solución salina de fosfatos

**PMA:** Acetato de Forbol Miristato

**RA:** Receptores a Adenosina

**RT:** Transcriptasa Reversa

**SAH:** S- Adenosil L-Homocisteína

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico

**Smac:** Segundo Activador Derivado de las Caspasas

**TNF1:** Factor de Necrosis Tumoral 1

## RESUMEN

---

Cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células malignas, las cuales se extienden más allá de sus límites normales y pueden invadir sitios adyacentes o diseminarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis. El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más común en adultos y uno de los cánceres más agresivos en el hombre. A pesar de los avances tecnológicos en el tratamiento quirúrgico, los regímenes combinados de radioterapia con quimioterapia de nueva generación, la supervivencia media de estos pacientes es de tan solo 14,6 meses. Esto se debe en gran medida a un genoma tumoral altamente desregulado con delección oportunista de genes supresores de tumores, amplificación y/o hiperactivación mutacional de receptores de tirosina quinasa receptora. El resultado neto de estos cambios genéticos son las vías de supervivencia y proliferación aumentadas, así como los defectos sistemáticos en la maquinaria de señalización de apoptosis, esta última es un sello distintivo de todos los tipos de cáncer y es considerada como una de las ocho alteraciones esenciales por la cual una célula normal se transforma y se convierte en un tumor maligno. Varias proteínas se han relacionado con la muerte celular programada desregulada, una de ellas son las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) quienes regulan negativamente a las caspasas y que se ha vinculado su alta expresión con diferentes tipos de cáncer, como por ejemplo BIRC3 en glioblastoma grado IV. Por otra parte Adenosina, es considerada como una señal inductora de proliferación, diferenciación, angiogénesis y metástasis en diferentes tipos de cáncer como el de mama, colon y pulmón, y este efecto se ve mediado por la activación de sus receptores de superficie A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. Considerando la relevancia de los antecedentes nos propusimos en el presente trabajo, evaluar el efecto que Adenosina ejerce sobre la proteína antiapoptótica BIRC3 y describir el posible mecanismo molecular por el cual lo hace. Encontramos que las células de glioblastoma U87 de manera basal expresan el RNAm que codifica para los cuatro tipos de receptores a adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. El tratamiento con Ado aumenta el nivel de expresión del RNAm que codifica para la proteína antiapoptótica BIRC3, y el cotratamiento de adenosina con PMA potencia el nivel de expresión de esta IAP, también encontramos que PMA aumenta la supervivencia celular así como el RNAm que codifica para Ki-67 y BIRC3, en las células U87MG, mientras que cafeína inhibe el efecto que adenosina tiene sobre la expresión del RNAm que codifica para

BIRC3, sin embargo la presencia simultánea de Ado y PMA no potencia la capacidad de supervivencia de las células U87.

## INTRODUCCION

---

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células malignas, las cuales se extienden más allá de sus límites normales y pueden invadir sitios adyacentes o diseminarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis (OMS, 2015).

Ahora se sabe que el proceso mediante el cual las células normales se transforman progresivamente en malignas requiere de la adquisición secuencial de mutaciones que surgen como consecuencia del daño al genoma. Este daño puede ser resultado de procesos endógenos tales como; errores en la replicación del ADN, la inestabilidad química intrínseca de ciertas bases del ADN o del ataque de radicales libres generados durante el metabolismo. El daño en el ADN también puede ser resultado de interacciones con agentes exógenos, como, la radiación ionizante, radiación UV y carcinógenos químicos. Las células han desarrollado medios para reparar dichos daños, pero por diversas razones, se producen errores y se introducen cambios permanentes en el genoma y mutaciones (Bertram, 2000) que si llegan afectar a genes que controlan la proliferación inactivando genes supresores de tumores o bien activando oncogenes que estimulan la proliferación o la protección contra la muerte celular tienen el potencial de convertirse en una célula maligna. Finalmente, al superar los controles normales sobre la supervivencia y la muerte celular, una célula cancerosa, enfrenta dos nuevos desafíos: superar la senescencia replicativa, y obtener un suministro adecuado de nutrientes y oxígeno para mantener su alta tasa proliferativa (Sever & Brugge, 2015).

## ANTECEDENTES GENERALES

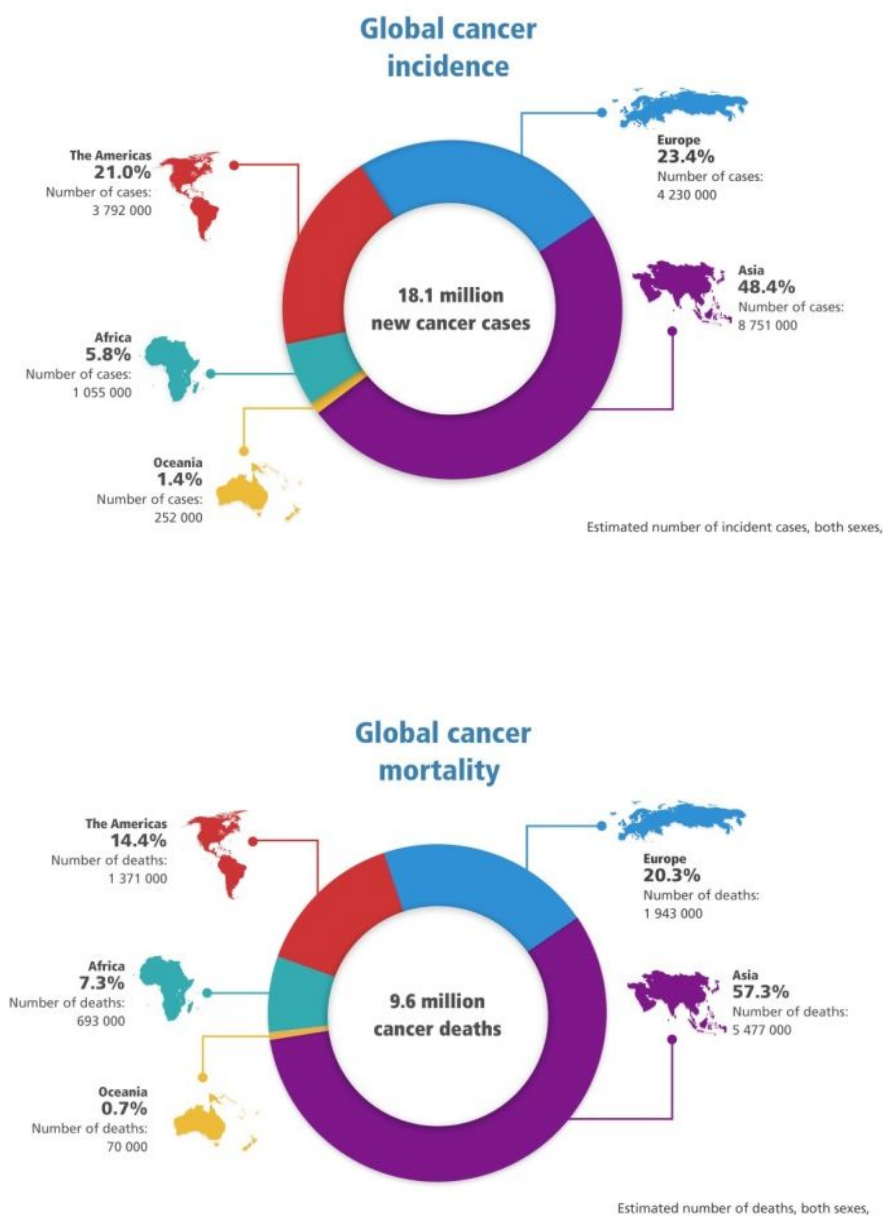
---

### ESTADISTICAS SOBRE EL CANCER A NIVEL MUNDIAL

En el año 2018, GLOBOCAN reportó 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y 9.6 millones de muertes ocasionadas por este padecimiento, observándose un incremento significativo en los países en desarrollo (GLOBOCAN 2018). Por su parte, la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) ha estimado que, para ese mismo



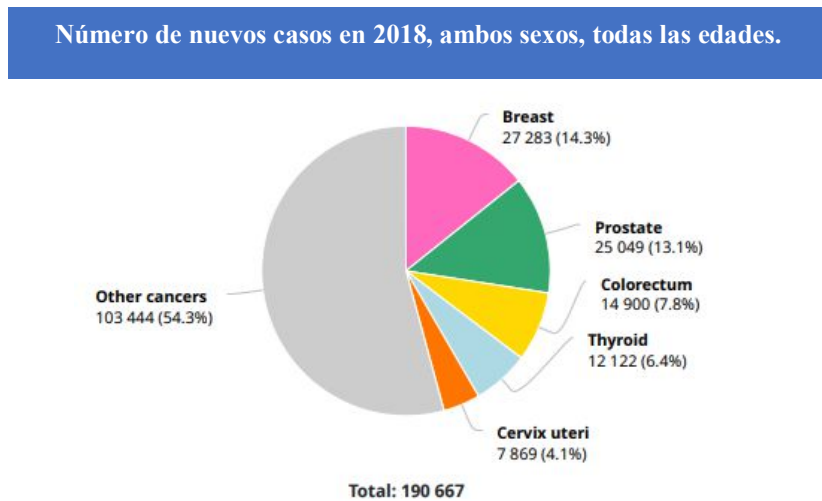
año, uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres serán diagnosticados con cáncer, y uno de cada ocho hombres y una de cada diez mujeres morirán por esa misma causa. Las predicciones sugieren que para el año 2030, 13 millones de personas morirán de cáncer, donde el 75% de las muertes se presentarán en países en vías de desarrollo (WHO; IARC, 2018).



**Figura 1| Estadística a nivel mundial de nuevos casos y muertes por cáncer.** Las imágenes muestran la incidencia y mortalidad de cáncer global dividida por continentes. Estimaciones por cada 100 000 habitantes. (Tomada de IARC, 2018).

En México por su parte, la magnitud de los efectos del cáncer en la salud no es muy diferente al panorama mundial, ya que de acuerdo a los datos mostrados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el año 2014, el cáncer representó el 12.2% de las defunciones, únicamente por debajo de las enfermedades cardiacas (19.2%) y de la diabetes mellitus (14.8%) (INEGI, 2014). En el año 2018, el número de nuevos casos de cáncer en nuestro país fue de alrededor de 190,667 personas, mientras que el número de muertes durante ese año fue de 83,476.

El cáncer de sistema nervioso y cerebro representa el 1.8% de todos los tipos de cáncer en el país, donde el número de nuevos casos durante el año pasado se estima que fue de 3,451 personas y de 2,663 muertes por año, observándose que es uno de los tipos de cáncer más agresivos y letales (IARC, 2018).



**Figura 2| Estadística del cáncer en México.** (Datos de cáncer de sistema nervioso y de cerebro). Los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población mexicana en ambos sexos es: cáncer de mama (14.3%), cáncer de próstata (13.1%), cáncer colorectal (7.8%), cáncer de tiroides (6.4%), cáncer cervical (6.4%) y otros tipos de cáncer (54.3%). Estimaciones por cada 100 000 habitantes. (Tomada y modificada de IARC, 2018).

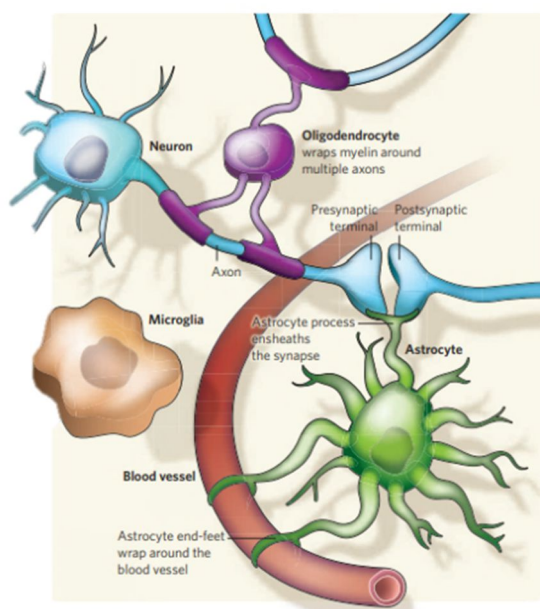
## CELULAS GLIALES

El sistema nervioso central (SNC) consta de neuronas y células gliales que funcionan juntas para crear comportamientos complejos. Las neuronas generan y propagan señales eléctricas

y químicas, mientras que la glía funciona principalmente como moduladora de la función y señalización de las neuronas.

Tradicionalmente se ha considerado que la glía es solamente un contribuyente pasivo en la función cerebral, sin embargo, ahora se sabe que funciona como regulador maestro del sistema nervioso (SN), controlando diversos aspectos del desarrollo, la plasticidad y la enfermedad del mismo. (Barres, 2008 ; Fields et al., 2015).

Con base en su morfología, fisiología y localización en el cerebro podemos identificar los siguientes tipos principales de glía: microglía, oligodendroglía, glía NG2 y, astroglia. (Kettenmann *et al.*, 2013). Estos tipos diferentes de glía, son específicos de una parte del sistema nervioso, por ejemplo, en el SNC se encuentran astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias, glía radial y microglía, mientras que en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) las células gliales principales son células de Schwann, células satélites y glía entérica.



**Figura 3 | Interacciones glía-neurona.** Los diferentes tipos de glía interactúan con las neuronas y los vasos sanguíneos circundantes. Los oligodendrocitos envuelven la mielina alrededor de los axones para acelerar la transmisión neuronal. Los astrocitos extienden procesos que envuelven los vasos sanguíneos y las sinapsis. Microglía mantiene el cerebro bajo vigilancia por daños o infecciones. (Allen & Barres, 2009)

## ASTROGLIA

La astrogliá comprende a los astrocitos, las células endimales y la glía radial. Una característica que tienen en común es la presencia de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) expresada en el citoesqueleto (Reyes D., Bulavina L., 2014).

## ASTROCITOS

Los astrocitos son una clase de células neuronales de origen ectodérmico y neuroepitelial altamente heterogéneo en forma y función, y demuestran una notable plasticidad adaptativa que define el mantenimiento funcional del SNC en el desarrollo y el envejecimiento (Matias *et al.*, 2019).

Este tipo celular tiene una morfología característica similar a una estrella y son el tipo de célula glial más numeroso del SNC. En el cerebro sano, los astrocitos recubren todo el SNC de una manera continua y esencialmente no superpuesta, ordenada y bien organizada, además envían múltiples ramas que terminan en miles de procesos finos que interactúan con sinapsis, vasos sanguíneos y otras células.

## FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS

Estas células sirven como reservas de combustible de glucógeno y por lo tanto como productoras de glucosa para alimentar a las neuronas durante periodos de alta tasa de actividad neuronal e hipoglucemia (Brown AM, Ransom BR, 2007).

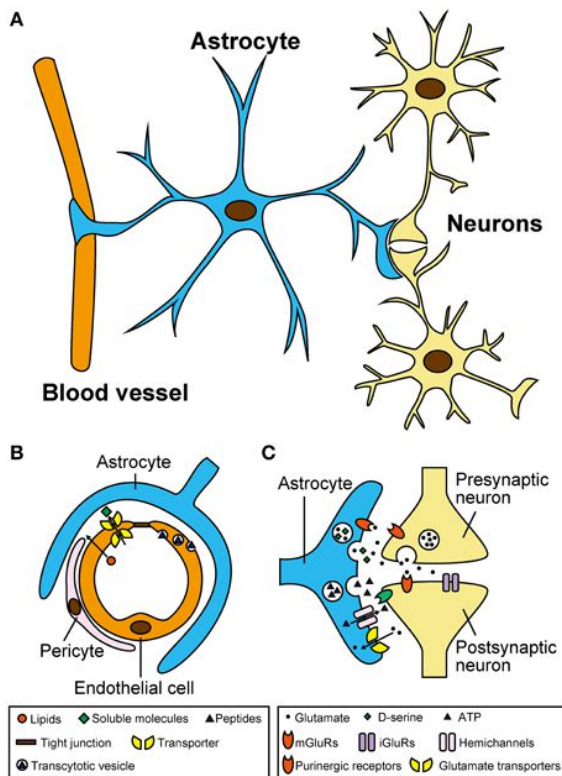
Tienen un importante papel en el desarrollo de la materia gris y blanca del SN ya que los límites moleculares formados por los astrocitos participan de guía en la migración de los axones en desarrollo y ciertos neuroblastos (Powell & Heller, 1999). En lo que respecta a la materia blanca, la pérdida o función de las conexiones de astrocitos y uniones comunicantes conduce a la desmielinización. (Lutz *et al.*, 2009).

Eliminan y catabolizan neurotransmisores, así como también liberan precursores de estos neurotransmisores y funcionan como carroñeros de especies reactivas.

Ejercen funciones esenciales para mantener la homeostasis del fluido, pH y neurotransmisores, a través de acuaporina 4, transportadores para la absorción de  $K^+$ , intercambiadores de protones (Obara *et al.*, 2008) y de transportadores de neurotransmisores (Sattler *et al.*, 2007).

Los astrocitos también tienen papeles en la sinapsis ya que participan en la transmisión sináptica a través de la liberación regulada de moléculas sinápticamente activas que incluyen glutamato, purinas (ATP y adenosina), GABA y D-serina (Halassa *et al.*, 2007; Perea *et al.*, 2009). La liberación de dichos gliotransmisores se produce en respuesta a cambios en la actividad sináptica neuronal, implica la excitabilidad de los astrocitos reflejada en el aumento de calcio intracelular.

Regulan el flujo sanguíneo local del SNC al hacer múltiples contactos bidireccionales. Hallazgos recientes muestran que los astrocitos producen y liberan diversos mediadores moleculares como: prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico que pueden aumentar o disminuir el diámetro de los vasos sanguíneos y el flujo sanguíneo de manera coordinada (Gordon *et al.* 2007).



**Figura 4| Los astrocitos tienen asociaciones morfológicas y funcionales cercanas con la microvasculatura y las neuronas. (A) Ubicación de los astrocitos alrededor de los vasos sanguíneos y las neuronas en el sistema nervioso central. (B) Diagrama esquemático que muestra la barrera hematoencefálica y sus funciones en la selección y el transporte de diversas moléculas del torrente sanguíneo. (C) Diagrama esquemático que muestra la sinapsis tripartita y las complejas interacciones de señalización mediadas por neurotransmisores y gliotransmisores. (Tomada de Harada *et al.*, 2016)**

## ANTECEDENTES ESPECIFICOS

---

### GLIOMAS

Glioma es un término general usado para describir tumores cerebrales primarios que se cree derivan de células madre o progenitoras neurogliales conocidas como -Glioblastoma Stem-like Cells (GSCs) que tienen un alto potencial maligno que tiende a invadir tejido circundante. Son los tumores más frecuentes del sistema nervioso central (SNC), que representan casi el 80% de todos los tumores primarios malignos del cerebro (Schwartzbaum *et al.*, 2006; Agnihotri *et al.*, 2013; Messali *et al.*, 2014).

Sobre la base de su apariencia histológica, se han clasificado en astrocíticos (astrocitoma, astrocitoma anaplásico y glioblastoma), oligodendrogliomas, ependimomas y gliomas mixtos. (Holland, 2000; Maher *et al.*, 2001; Schwartzbaum *et al.*, 2006; Agnihotri *et al.*, 2013).

A los gliomas se les han asignado los grados I a IV de acuerdo a con la nomenclatura establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que indica diferentes grados de malignidad determinados por criterios histopatológicos. Los gliomas de grado I se relacionan con lesiones que tienen un bajo potencial proliferativo y pueden curarse mediante un procedimiento quirúrgico, mientras que los gliomas de grado II a IV son altamente malignos e invasivos (Louis *et al.*, 2007; Jovčevska *et al.*, 2013).

A través del atlas del genoma del cáncer se ha informado un catálogo de anomalías genómicas de GBM que permitió al grupo de Verhaak clasificar GBM en cuatro subtipos: clásico, mesenquimatoso, proneural y neural (Verhaak *et al.*, 2010).

El subtipo clásico tiene amplificación EGFR y pérdida de TP53 y CDKN2A, también alberga una mutación EGFRvIII constitutivamente activa debido a la eliminación de los exones 2 a 7 del gen EGFR. Este subtipo presenta sobreexpresión de Nestina y ha activado las vías Notch y SHH. El subtipo mesenquimatoso está asociado con una supervivencia general deficiente y contiene mutaciones NF1 y pérdida de IDH1, PIK3R1, y PDGFRA. Presenta sobreexpresión de MET y CHI3L1 y activación de la vía NF  $\kappa$  B (Fusnari *et al.*, 2007).

El subgrupo proneural ha aumentado la frecuencia de mutaciones en IDH1 y TP53 y amplificaciones de PDGFRA y PIK3CA / PIK3R1. Este grupo tiene el mayor porcentaje de pacientes más jóvenes. El subtipo neural tiene niveles elevados de marcadores neurales como NEFL, pero no tiene alteraciones distintivas únicas de otras clases, aunque se observan tasas elevadas de mutaciones EGFR, TP53 y PTEN.

## GLIOBLASTOMA

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tipo más maligno y frecuente de astrocitomas primarios. Es un tumor difusamente infiltrante y pobremente diferenciado que representa más del 60% de todos los tumores cerebrales en adultos (Rock et al., 2014). A pesar de la variedad de terapias modernas contra GBM, Todavía es una enfermedad mortal con un pronóstico extremadamente malo. Los pacientes suelen tener una supervivencia media de aproximadamente 14 a 15 meses desde el diagnóstico (Ohka *et al.*, 2012; Thakkar *et al.*, 2014) y un 10% de supervivencia a los 5 años (Auffinger *et al.*, 2012).

El término “multiforme” refleja la heterogeneidad de este tipo de tumor con respecto a la presentación clínica, la patología, la firma genética y la respuesta al tratamiento (Iacob & Dinca, 2009).

Aunque los GBM aparecen casi exclusivamente en el cerebro, también pueden aparecer en el tronco del encéfalo, el cerebelo y la médula espinal. El 61% de todos los gliomas primarios se producen en los cuatro lóbulos del cerebro: frontal (25%), temporal (20%), parietal (13%) y occipital (3%) (Asociación Americana de Enfermeras de Neurociencia [AANN] 2014).

## EPIDEMIOLOGIA

Los GBM se presentan a una edad promedio de 64 años (Thakkar *et al.*, 2014) pero pueden ocurrir a cualquier edad, incluida la infancia. La incidencia es ligeramente más alta en hombres que en mujeres (1.6:1) y en caucásicos en comparación con otras etnias (Ellor, Pagano-Young, & Avgeropoulos, 2014). Los GBM pueden clasificarse como primarios, o *de novo*, que surgen sin un precursor conocido; o secundaria, donde un tumor de bajo grado se transforma con el tiempo en GBM. La mayoría de los GBM son

primarios, y estos pacientes tienden a envejecer y tienen un peor pronóstico que los pacientes con GBM secundarios (Wilson, Karajannis y Harter, 2014).

## **FACTORES DE RIESGO PARA TUMORES CEREBRALES PRIMARIOS**

Existen muchos factores de riesgo estudiados y relacionados con la aparición de tumores cerebrales, sin embargo, sólo en algunos de ellos se ha podido establecer una relación real como lo son la radiación ionizante, susceptibilidad genética y alergias (Mcneill, 2016).

### **Radiación ionizante**

En relación con la radiación ionizante existe una relación causal bien descrita. Estudios de seguimiento a poblaciones expuestas a radiación por motivos médicos durante la niñez (tinea capitis, hemangiomas cutáneos, hipertrofia amigdalina, linfoma, leucemia u otros tumores cerebrales primarios en niños) ha demostrado estar relacionada con la aparición de tumores cerebrales años posteriores a la radioterapia (Shore *et al.*, 2003; Sadetzki *et al.*, 2005). Los tumores radio-inducidos más frecuentes son los meningiomas, gliomas y schwannomas (Neglia *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2006). El tiempo entre la exposición y la aparición de un glioma o meningioma radio-inducido son de 9 a 18 años y 17 a 23 años respectivamente (Neglia *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 1998). Existe además una relación entre la dosis aplicada y el riesgo, siendo de 0.079 a 0.56 por Gy de radiación para gliomas y 0.64 a 5.1 por Gy para meningiomas (Braganza *et al.*, 2012). El riesgo es mayor de desarrollar un meningioma radioinducido que el de desarrollar un glioma radioinducido (Walter *et al.*, 2006)

### **Susceptibilidad Genética**

Si bien es cierto que la gran mayoría de los tumores cerebrales son esporádicos, existen riesgos genéticos para su aparición como lo es la delección de los genes homólogos de fosfatasa y tensina en el cromosoma 10 y delección p16 y pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 10q y 17p (Yoshida, 1996)



## **Alergias y relaciones inmuno-mediadas**

Existe evidencia de que las alergias y condiciones autoinmunes están inversamente relacionadas con el riesgo de aparición de gliomas. Pacientes con asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica tienen menos riesgo en la aparición de gliomas (Brenner *et al.*, 2002; Wiemels *et al.*, 2002).

## **FACTORES DE RIESGO PARA TUMORES CEREBRALES SECUNDARIOS**

Los glioblastomas secundarios son más comunes entre pacientes más jóvenes. Surgen como tumores de bajo grado y en unos pocos años progresan a glioblastomas. Se caracterizan por mutaciones en el gen supresor de tumores p53, anomalías en las vías p16 y retinoblastoma y aberraciones en el número de copias del ADN (Wen & Kesari, 2008).

Los orígenes más comunes de las lesiones metastásicas cerebrales son los cánceres primarios de pulmón (65%) (Chi & Komaki, 2010), piel (melanomas, 10–40%) (Mathieu D., *et al* 2007), mama y tracto gastrointestinal.

Por ejemplo, los factores comúnmente identificados como predictivos de metástasis cerebrales en el cáncer de mama son la sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el estado negativo del receptor de estrógeno (ER), alto grado histológico, alta tasa de proliferación, metástasis extracraneal extensas y edad más temprana (Hickis *et al.*, 2006).

## **ADENOSINA**

La adenosina es un nucleósido de purina que está presente fisiológicamente a niveles bajos en los fluidos intersticiales de los tejidos sin estrés, puede aumentar rápidamente en afecciones fisiopatológicas como: hipoxia, isquemia, inflamación o trauma (Hasko *et al.*, 2008). Después de ser liberada la adenosina se comporta como una “alarma” o señal de peligro activando los receptores de adenosina en las células diana, la cual tiene como

objetivo restaurar la homeostasis de los tejidos (Antonioli *et al.*, 2008). De hecho, se ha demostrado que la acumulación de adenosina en la lesión aguda tiene efectos protectores, ya que protege a las células y tejidos de la respuesta inflamatoria excesiva y el daño inmunoimediato y respalda una respuesta inmune autolimitada. Sin embargo, la persistencia de concentraciones más altas de adenosina más allá de la fase de lesión aguda puede ser perjudicial para los tejidos al activar vías que desencadenan la supresión inmune o promueven un proceso incesante de cicatrización de heridas (Longhi *et al.*, 2013).

Esta molécula endógena ubicua también afecta varios aspectos de la fisiología celular, incluida la actividad neuronal, la función vascular, la agregación plaquetaria y la regulación de las células sanguíneas (Newby, 1984).

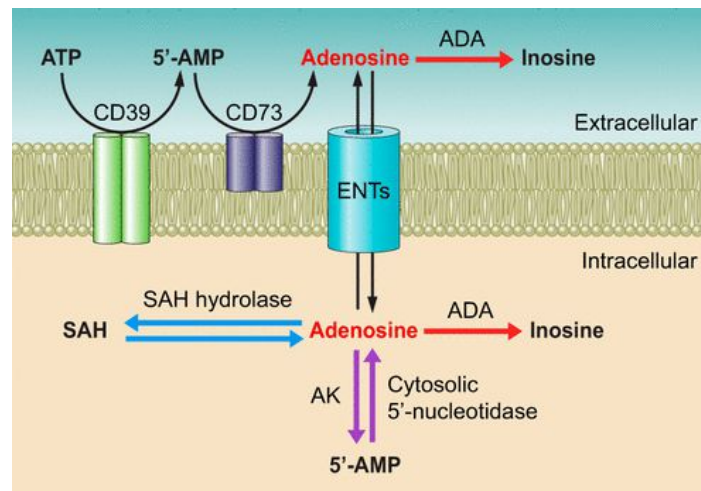
### **Metabolismo de la adenosina**

La adenosina se forma en los sitios intracelulares y extracelulares por dos vías distintas que involucran dos sustratos diferentes: Adenosin Mono Fosfato (AMP) y S-adenosil homocisteína y es transportada a través de las membranas celulares por transportadores de nucleósidos Equilibrados (ENT), (Livingston *et al.*, 2004).

Después de la captación intracelular, la adenosina sufre una rápida fosforilación a AMP a través de la Adenosina Quinasa (AQ) o la desaminación a inosina por la adenosina desaminasa (ADA) (Gracia *et al.*, 2013) lo que proporciona a la adenosina una vida media fisiológica de 1 s. Los valores de constante Michaelis ( $K_m$ ) respectivos de estas enzimas son 2 M (AQ) y 17–45 M (ADA), lo que sugiere que AQ es el principal medio de eliminación de adenosina en el medio fisiológico, mientras que la desaminación se produce preferentemente en condiciones patológicas que presentan niveles elevados de adenosina. (Donwiddie & Diao, 2000).

La adenosina extracelular se genera principalmente por la descomposición del ATP a través de la función de dos ecto-nucleotidasas que incluyen apirasa (CD39) y 5'-nucleotidasa CD73 (Eltzschig, 2013). Se deriva de la liberación y el metabolismo de los nucleótidos de adenina como el ATP, ADP y AMP en respuesta a ciertos estímulos incluidos: el estrés mecánico, la provocación osmótica, la inflamación y la lesión tisular. (Covarrubias *et al.*, 2016). Las acciones combinadas de estos mecanismos de generación y eliminación de

adenosina regulan los niveles extracelulares de adenosina, que varían de 10 a 200 nM en condiciones homeostáticas, pero pueden elevarse a 10–100  $\mu$ M en ambientes hipóxicos o de estrés (Fredholm, 2007). Por lo tanto, está claro que existen esencialmente tres sistemas que pueden explicar la inactivación y / o eliminación de adenosina en los tejidos: adenosina desaminasa, adenosina cinasa y el sistema de absorción (Fig. 5)



**FIGURA 5| Metabolismo y transporte en el medio intra y extracelular de la adenosina.** A nivel intracelular, la adenosina deriva de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAH) o 5' nucleotidasa citosólica y se degrada por la adenosina desaminasa (ADA) y la adenosina quinasa (AK). Extracelularmente, es generado por CD73 y convertido a inosina por ADA. Los transportadores de nucleósidos equilibrantes (ENT) permiten la liberación de adenosina y el flujo a través de la membrana celular, siguiendo el gradiente de concentración (Borea *et al.*, 2018)

### Receptores de adenosina

Los receptores purinérgicos que median los efectos de la adenosina se clasificaron como receptores P1, mientras que los receptores activados por nucleótidos como la adenosina 5-trifosfato (ATP) se clasificaron como receptores P2 (Burnstock, 1978). Se descubrió que los receptores de adenosina modulan los niveles intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y se subdividieron inicialmente en subtipos A1 y A2 según su capacidad para inhibir o estimular la adenilato ciclasa, respectivamente (van Calker y otros, 1979; Londos *et al.*, 1980).

## **Estructura molecular**

La adenosina media sus efectos principalmente a través de su interacción con cuatro receptores de tipo P1 acoplados a proteínas G (GPCR); Estos se caracterizan por una distribución tisular y un acoplamiento efector diferentes y por una afinidad alta ( $A_{1}$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{3}$ ) o baja ( $A_{2B}$ ) para la molécula original.

Los cuatro receptores a adenosina (RA) han sido clonados y se han analizado sus propiedades farmacológicas, presentan una estructura común: cada uno posee un dominio central que cruza la membrana plasmática siete veces, en la que cada hélice tiene una longitud de 20 a 27 aminoácidos y está unida por tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares (Fredholm *et al.*, 2000). El extremo  $NH_2$  extracelular contiene uno o más sitios de glicosilación, mientras que el extremo  $COOH$  intracelular proporciona sitios para la fosforilación y palmitoilación, desempeñando así un papel en la desensibilización del receptor y los mecanismos de internalización.

## **Distribución, efectos fisiológicos y transducción de señales**

Los RA se encuentran distribuidos en el sistema nervioso, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, urogenital e inmune, así como en los huesos, articulaciones, ojos y piel (Peleti *et al.*, 2017). Cada RA se caracteriza por una distribución única de células y tejidos, transductores de señalización secundarios y efectos fisiológicos. Las señales de los receptores  $A_1$  y  $A_3$  están mediadas a través de los miembros  $G_i$  y  $G_o$  de la familia de proteínas G, a través de los cuales reducen la actividad de Adenilato Ciclasa (AC), los niveles de cAMP y aumentan los niveles intracelulares de Diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), provocando la activación de la Proteína Cinasa C (PKC), mientras que los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  se acoplan a las proteínas  $G_s$ , a través de los cuales estimulan la AC aumentando los niveles de cAMP, permitiendo la activación de la enzima Proteína Cinasa A (PKA) así como de una gran variedad de mediadores dependiendo de la señalización activada por el cAMP en células específicas,  $A_{2B}$ , también activa a  $G_q$ , estimulando la actividad de la fosfolipasa C (PLC) generando un incremento en los niveles de IP3, DAG y como consecuencia también aumenta la actividad de PKC (Fredholm *et al.*, 2001).

Los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> se caracterizan por una alta afinidad por la adenosina, mientras que los receptores A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> muestran una afinidad significativamente menor por la adenosina (Cieslak *et al.*, 2008), como se observa en el resumen de la tabla 1.

Nombre del receptor	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>
Proteína acoplada	G <sub>i/o</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>s</sub> G <sub>q/11</sub>	G <sub>i</sub> G <sub>q/11</sub>
Sistema efector	↓ Adenilato ciclasa ↑ Fosfolipasa C	↑ Adenilato ciclasa ↑ MAP cinasa	↑ Adenilato ciclasa ↑ Fosfolipasa C ↑ MAP cinasa	↓ Adenilato ciclasa ↑ Fosfolipasa C ↑ PI-3 cinasa ↑ MAP cinasa
Proteína Activada.	Cinasa PKC	Cinasa PKA	Cinasa PKA y PKC	Cinasa PKC
Afinidad adenosina	1- 10 nM	30 nM	1000 nM	100 nM
Agonistas	CCPA, R-PIA, CPA, IB-MECA, Adenosina	CGS21680, UK-432,097, HE-NECA, NECA, R-PIA, Adenosina	NECA, BAY60-6583, R-PIA, IB-MECA, Adenosina	Cl <sup>-</sup> IB-MECA, IB-MECA, MRS5698, NECA, R-PIA, CGS21680, Adenosina.
Antagonistas	PSB36, DPCPX, Teofilina.	KW-3902, Cafeína y Teofilina.	SCH442416, ZM241385, SCH58261, DPCPX, Cafeína, Teofilina	PSB-603, ZM241385, MRS 1754, DPCPX, Cafeína y Teofilina.
				MRE3008F20, MRS1523, DPCPX, ZM241385, Cafeína y Teofilina.

**Tabla 1. Clasificación y mecanismos de acción de los receptores de adenosina.** (Tomada y modificada de Borea *et al* 2018)

En varios estudios se han utilizado diversos activadores de la adenilato ciclasa para poder entender el efecto que se tiene sobre diversas vías de señalización donde se encuentran implicadas las proteínas cinasas, por ejemplo, en el caso de AC, se utiliza forskolina, un activador permeable a las células que interactúa directamente con la subunidad catalítica de la enzima para aumentar los niveles intracelulares de AMPc. Mientras que para la activación de PKC se utiliza Phorbol-12 miristato- 13 acetato (PMA) que es un potente activador nanomolar de esta cinasa *in vivo e in vitro*. Se une al dominio C1 de la proteína quinasa C, induce la translocación de la membrana y la activación enzimática.

## ADENOSINA Y CANCER

La adenosina puede acumularse crónicamente en el entorno del tumor y el estroma, en un proceso que se ha asociado con un nicho inmunosuprimido que favorece la aparición de neoplasias. Múltiples mecanismos contribuyen a la generación de este nicho, que incluye la inhibición de la producción de citocinas de las células T cooperadoras 1 (células TH, por sus siglas en inglés), la desregulación de la diferenciación y la maduración de las células fagocíticas mononucleares y la supresión de las células T efectoras (Longhi *et al.*, 2013). Además, el aumento crónico de los niveles de adenosina puede contribuir a la generación de un entorno de remodelación de la matriz y angiogénico que sea adecuado para el crecimiento del cáncer (Hasko & Pacher, 2012).

Se ha demostrado que la activación del receptor A<sub>1</sub> induce quimiotaxis de células tumorales de melanoma (Woodhouse *et al.*, 1998), sin embargo, agonistas del mismo receptor A Adenosina, inhiben el desarrollo tumoral en leucemias (D'Ancona *et al.*, 1993). Los receptores A<sub>2A</sub> a través de la expresión de factores angiogénicos como VEGF y bFGF, son capaces de inducir el crecimiento de cáncer de próstata, colon y pulmón (Lutty & McLeod, 2003; Sexl *et al.*, 1997). Estudios *in vitro* han demostrado un efecto opuesto al receptor A<sub>2B</sub> en el desarrollo tumoral: el uso de agonistas no específicos (NECA) para los receptores A adenosina induce apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 en líneas celulares de

cáncer de ovario con alta expresión del receptor A<sub>2B</sub> (Hajiahmadi et al., 2015), mientras que la activación de este mismo receptor promueve la proliferación de células provenientes de cáncer de próstata y glioblastoma (Wei *et al.*, 2013; Lui *et al.*, 2014). Se ha reportado que la activación de A<sub>3</sub> inhibe el crecimiento de tumores de colon, próstata y melanoma.

Otro grupo demostró que la adenosina extracelular derivada de la actividad de CD73 aumenta la invasividad de las células de cáncer de mama in vivo (Stagg *et al.*, 2016), además las señales de adenosina pueden modular la Transición Epitelio Mesénquima (TEM) en ciertos tipos de neoplasias como el cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de vesícula biliar, lo que resulta en un fenotipo más invasivo (Ren *et al.*, 2016)

## APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que puede originarse a partir de perturbaciones demasiado intensas o prolongadas del microambiente intracelular o extracelular que son excesivas para generar respuestas adaptativas y restaurar la homeostasis celular (Galluzzi *et al.*, 2016)

Es un proceso fisiológico de eliminación celular estrechamente regulado y caracterizado por una secuencia de cambios morfológicos estereotipados: contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear y celular, con formación de cuerpos apoptóticos que son engullidos por las células fagocíticas próximas, antes de que se pierda la integridad de la membrana (Zhou & Yu, 2008). Las redes de apoptosis están compuestas por cientos de proteínas que se encuentran fuertemente reguladas por cascadas de señalización complejas en múltiples puntos, si este proceso es inadecuado debido a la interferencia con esta red reguladora se pueden tener múltiples efectos que están asociados con muchas neoplasias malignas humanas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos autoinmunes y cáncer (Elmore, 2007).

En el caso del cáncer, estas alteraciones en la regulación de la apoptosis son críticas para el desarrollo y la resistencia al tratamiento, esto debido principalmente a aberraciones genéticas de las células tumorales que en condiciones fisiológicas inducen con frecuencia su muerte por apoptosis, pero en el proceso de malignización adquieren cambios en genes y

proteínas implicadas en estas vías, permitiendo a estas células tumorales evadir dicho proceso (Kinchen *et al.*, 2008).

Existen dos vías apoptóticas bien caracterizadas; uno iniciado a través de la participación de los receptores de muerte en la superficie celular por sus ligandos específicos (Vía Extrínseca) y el otro desencadenado por cambios en la integridad celular interna (Vía Intrínseca). Ambas vías al converger resultan en la activación de caspasas específicas que representan el brazo efector del proceso apoptótico. La inhibición de la apoptosis mejora la supervivencia de las células cancerosas y facilita su escape de la vigilancia inmune y las terapias citotóxicas (Reed, 2003).

En términos generales se pueden observar tres tipos principales de cambios bioquímicos en la apoptosis: 1) Activación de caspasas, 2) Fragmentación del ADN y degradación de proteínas, 3) cambios de membrana y reconocimiento por las células fagocíticas.

Al principio del proceso apoptótico ocurre la aparición de fosfatidilserina en la membrana celular externa que se ha “invertido” desde la capa interna, esto permite el reconocimiento temprano de las células muertas por los macrófagos, lo que resulta en fagocitosis sin la liberación de componentes celulares proinflamatorios (Hengartner *et al.*, 2001). Esto a su vez es seguido de una descomposición característica del ADN, en grandes piezas de 50 a 300 kilobases, más tarde hay una escisión internucleosómica del ADN en oligonucleosomas en múltiplos de 180 a 200 pares de bases, por endonucleasas. Otra característica específica es la activación de un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las cisteínas proteasas llamadas caspasas. La “c” de caspasas, se refiere a una cisteína proteasa, mientras que la “aspasa” se refiere a la propiedad única de la enzima para escindir después de los residuos de ácido aspártico. Las caspasas activadas escinden muchas proteínas celulares vitales y rompen el armazón nuclear, el citoesqueleto, y activan a las ADNasas,

### **Vía extrínseca de la apoptosis**

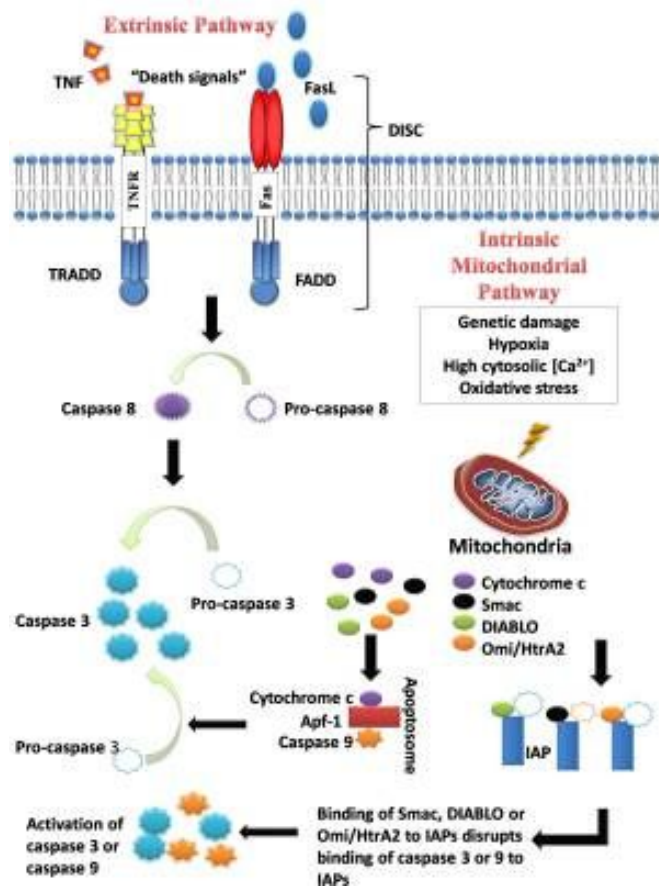
La vía extrínseca de la apoptosis, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte correspondiente, aunque se han descrito varios de estos receptores de muerte los más conocidos son, el receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1 (TNF1) y una Proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos se llaman TNF y Ligando Fas



(FasL) respectivamente (Hengartner *et al.*, 2001). Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como cisteína proteasas como la caspasa 8 (Schneider & Tschopp, 2000). La unión del ligando de la muerte al receptor de la muerte, da como resultado la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y todo el complejo de proteína del adaptador ligando-receptor-adaptador se conoce como el complejo de señalización inductora de muerte (DISC) (O'Brien *et al.*, 2008). Luego, DISC inicia el ensamblaje y la activación de la pro-caspasa 8. La forma activada de la enzima, la caspasa 8 es una caspasa iniciadora, que inicia la apoptosis al escindir otras caspasas posteriores o ejecutoras (Karp G, 2008).

### **Vía intrínseca de la apoptosis**

Como su nombre lo indica, la vía intrínseca se inicia dentro de la célula, los estímulos internos, como el daño genético irreparable, la hipoxia, las concentraciones extremadamente altas de  $Ca^{2+}$  citosólico y el estrés oxidativo severo son algunos factores desencadenantes del inicio de la vía mitocondrial intrínseca (Karp, 2008). Independientemente de los estímulos, esta vía es el resultado del aumento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo-c en el citoplasma (Danial & Korsmeyer, 2004). Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 (Tsujimoto *et al.*, 1984). Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, a saber, las proteínas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X L, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Mientras que las proteínas antiapoptóticas regulan la apoptosis al bloquear la liberación mitocondrial de citocromo-c, las proteínas proapoptóticas actúan promoviendo dicha liberación. No es la cantidad absoluta sino el equilibrio entre las proteínas pro y antiapoptóticas lo que determina si se iniciará la apoptosis (Semin Hematol. 1997). Otros factores apoptóticos que se liberan del espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma incluyen el factor inductor de apoptosis (AIF), el segundo activador derivado de mitocondrias de la caspasa (Smac), la proteína de unión directa a IAP con bajo pI (DIABLO) y la proteína Omi / temperatura alta requerida A (HtrA2) (Kroemer *et al.*, 2008). La liberación citoplasmática del citocromo c



activa la caspasa 3 a través de la formación de un complejo conocido como apoptosoma que está formado por el citocromo c, Apaf-1 y la caspasa 9. Por otro lado, Smac / DIABLO u Omi / HtrA2 promueve la activación de la caspasa al unirse al inhibidor de las proteínas de apoptosis (IAP), lo que posteriormente conduce a la interrupción en la interacción de IAP con caspasa -3 o -9 (Kroemer *et al.*, 2008)

### **Vía común de la apoptosis**

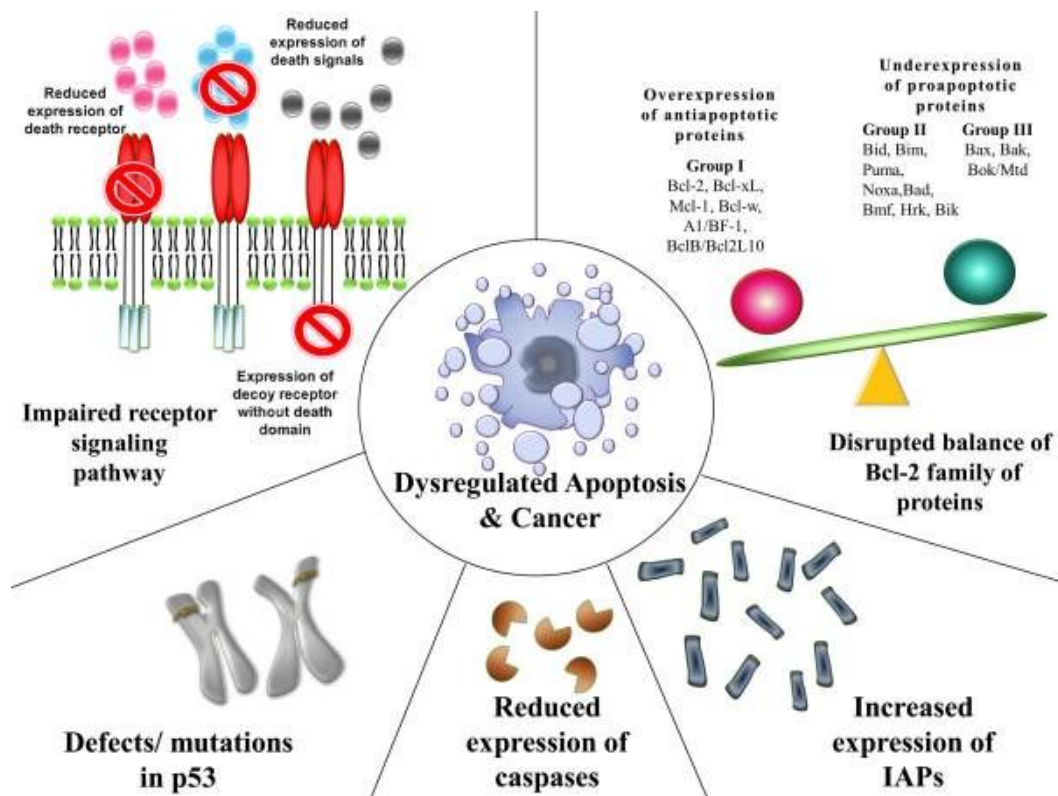
La fase de ejecución de la apoptosis implica la activación de una serie de caspasas. La caspasa río arriba de la ruta intrínseca es la caspasa 9, mientras que la de la ruta extrínseca es la caspasa 8. Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la caspasa 3, esta caspasa escinde el inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear. Además, las caspasas posteriores inducen la escisión de las proteínas cinasas, de algunas proteínas del citoesqueleto, proteínas de reparación del ADN y las subunidades inhibitoras de la familia de las endonucleasas. También tienen un efecto sobre el citoesqueleto, el ciclo celular y las vías de señalización, que en conjunto contribuyen a los cambios morfológicos típicos en la apoptosis (Ghobrial *et al.*, 2005)

## **APOPTOSIS Y CARCINOGENESIS**

---

**Figura 6| Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.** (Tomada de Helmy *et al.*, 2019)

Hay muchas maneras en que una célula maligna puede adquirir reducción en la apoptosis o resistencia a la apoptosis. En general, los mecanismos por los cuales se produce la evasión de la apoptosis se pueden dividir ampliamente en: 1) equilibrio alterado de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, 2) función de caspasa reducida y 3) señalización del receptor de muerte deteriorada, en la figura 6 se resumen los mecanismos que contribuyen a la evasión de la apoptosis y la carcinogénesis.



**Figura 7| Mecanismos que contribuyen a la evasión de la apoptosis en la carcinogénesis.** Los mecanismos que contribuyen son disrupción del balance entre proteínas anti y proapoptóticas, incremento en la expresión de IAPs, reducción de la expresión de caspasas, defectos/mutaciones de P53 y señalización de muerte deteriorada (Tomada de Wong et al., 2011).

### PROTEINAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS (IAP)

Los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) son reguladores antiapoptóticos que bloquean la muerte celular en respuesta a diversos estímulos (Varfolomeev *et al.*, 2007).

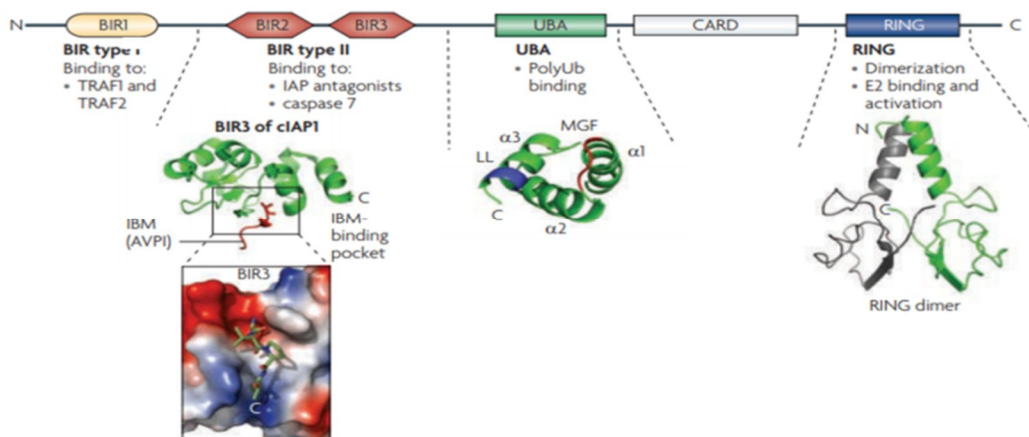
La familia IAP humana está compuesta por ocho miembros: IAP neuronal (NAIP), IAP1 celular (c-IAP1) [BIRC2], IAP2 celular (c-IAP2) [BIRC3], IAP ligado al cromosoma X (XIAP) [BIRC4], survivin [BIRC5], Apollon/Bruce [BIRC6], IAP de Melanoma (ML-IAP) e IAP-like Protein 2 (ILP-2). Se sabe que solo BIRC2, BIRC3 y BIRC4 regulan la actividad de la caspasa 18. BIRC4, además, inhibe directamente a las caspasas 3,7 y 9. Estas proteínas representan un grupo de reguladores negativos tanto de las caspasas como de la muerte celular. Los IAP más prominentes controlan los eventos de señalización dependientes de ubiquitina (Ub) que regulan la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK) que a su vez estimulan la expresión de genes importantes para la inflamación, inmunidad, migración celular, y la supervivencia celular. Los IAP funcionan de este modo como ligasas E3, mediando la transferencia de Ub de E2 a sustratos objetivo. Esto, a su vez, modula el proceso de señalización, regulando la estabilidad de proteínas, así como los medios no degradativos (LaCasse *et al.* 2008).

## ESTRUCTURA DE LAS IAP

### **Dominio BIR**

Las IAP se definen por la presencia de (los) dominio (s) de repetición IAP de baculovirus (BIR) (Birnbaum *et al.*,1994), un dominio de unión a zinc de aproximadamente 70 residuos de gran tamaño que contienen la secuencia característica CX<sub>2</sub>, CX<sub>16</sub>, HX<sub>6</sub>, C (C=cisteína, H= histidina, X= cualquier aminoácido) que se pliegan como laminas betas de tres cadenas rodeadas por cuatro hélices alfa, las cuales se empaquetan fuertemente para formar un núcleo hidrófobo, en el centro del cual se encuentra un átomo de zinc coordinado por las tres cisteínas y la histidina que media las interacciones proteína-proteína (Hinds *et al.*, 1999).

Los BIR pueden estar presentes en una sola copia o en un conjunto de dos o tres repeticiones en la porción N- terminal de la IAP, estos dominios individualmente pueden variar considerablemente, proporcionando una explicación de por qué diferentes dominios BIR, incluso dentro de la misma proteína exhiben funciones distintas (Eckelman et al. 2006). Los BIR se pueden agrupar en dominios de tipo I o II en función de la presencia de un surco profundo de unión a péptido (Figura 8). Mientras que los dominios BIR tipo I carecen de este surco de unión a péptidos, o simplemente poseen un bolsillo poco profundo, los cuales vinculan los IAP a procesos de señalización específicos. Los BIR tipo II llevan una hendidura hidrofóbica distintiva a través de la cual se une a motivos de unión a IAP (IBM) presentes en caspasas y moléculas inhibidoras de IAP como el Segundo Activador de la Mitocondria (Smac)/DIABLO en mamíferos. (Vince *et al.*, 2007) formando enlaces de hidrogeno con residuos vecinos. Los cambios sutiles en la ranura de unión a péptidos de los dominios BIR de tipo II alteran la preferencia por IBMs particulares (Yoo, S. *et al.*, 2002). Por lo tanto, diferentes dominios BIR de tipo II tienen preferencias de unión distintas para proteínas específicas portadoras de IBM. Por lo tanto, el BIR2 de XIAP se une a los IBM de la caspasa 3 y la caspasa 7, y el BIR3 se une al IBM de la caspasa 9 (Srinivasula *et al.*, 2001). XIAP, cIAP1, cIAP2, *Drosophila melanogaster* IAP1 (DIAP1) y DIAP2 llevan dos de estos dominios BIR tipo II. La disposición en tándem de estos BIR tipo II aumenta el repertorio de proteínas con las que estos IAP pueden interactuar y mejora



**Figura 8| Estructura y dominios de las proteínas inhibidoras de apoptosis.** (Tomada de Silke & Meier, 2013).

la afinidad de unión a las proteínas portadoras de IBM que forman dímeros o trímeros.

### **Dominio RING**

El dominio RING se encuentra en el extremo carboxilo terminal que les proporciona actividad de ligasa E3 que promueve la transferencia de Ubiquitina (Ub) a proteínas diana. Ub es un pequeño modificador de proteínas que se une covalentemente a proteínas en un proceso gradual que involucra enzimas activadoras de Ub (E1), enzimas conjugadoras de Ub (E2) y ligasas de proteínas Ub (E3). Las E3 confieren especificidad de sustrato al llevar E2 cargado con Ub a sustratos objetivo y promover la formación de un enlace isopeptídico entre el carboxilo terminal de Ub (glicina [G]) y el grupo amino de un residuo de lisina (K) del sustrato. Ub puede conjugarse como un resto único o como cadenas de longitud variable (Komander 2009)

Estos IAP también albergan dominios adicionales, como el dominio de asociación a ubiquitina (UBA) a través del cual interactúan con proteínas ubiquitinadas (Hansen et al., 2008). Finalmente, cIAP1 y cIAP2 contienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) que puede inhibir la actividad de la ligasa E3 (Dueber *et al.*, 2011).

## **PROTEINAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS Y CANCER**

El cáncer es un ejemplo en el que los mecanismos normales de regulación del ciclo celular son disfuncionales, con una proliferación excesiva de células y/o una disminución de la eliminación de células (King & Cidlowski, 1998). De hecho, se cree que la supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis desempeña un papel central en el desarrollo y la progresión de algunos tipos de cáncer (Kerr *et al.*, 1994).

Las IAP se expresan a niveles elevados en diferentes tipos de cáncer y contribuyen a la supervivencia de las células tumorales, la resistencia a la quimioterapia, la progresión de la enfermedad y el mal pronóstico. (Silker & Meier, 2013). Por ejemplo, se han documentado expresiones más altas de IAP en gliomas malignos que a menudo, se correlacionan con un mal pronóstico (Wagenknecht *et al.*, 1999).

Dentro de las alteraciones genómicas comúnmente detectadas en GBM está la amplificación de la banda cromosómica 11q22, que contiene genes que codifican IAP1 e IAP2 (Weber *et al.*, 1996; Wagenknecht *et al.*, 1999)

### **BIRC 3**

De acuerdo a varios estudios se ha identificado a BIRC3 como un determinante crítico de supervivencia en pacientes con GBM. BIRC3 fue el único IAP entre varios IAP cuya expresión diferencial se relacionó significativamente con la supervivencia a 5 años en pacientes con GBM. Los niveles de expresión más bajos de BIRC3 se asociaron con un resultado notablemente favorable (Wang *et al.*, 2016), también se ha visto que BIRC3 desempeña un papel funcional en muchos tumores malignos, incluidos el carcinoma oral de células escamosas, carcinoma hepatocelular y cáncer de páncreas. Además, juega un papel importante en la regulación de la vía de señalización del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que participa en el desarrollo del cáncer (Alhourani *et al.*, 2016).

Yang y colaboradores en 2016 midieron mediante inmunohistoquímica la expresión de cIAP1 y cIAP2 en tejido de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y observaron que la expresión de estas dos proteínas inhibitoras fue significativamente mayor que en los tejidos normales adyacentes, y que además había una correlación positiva con un estadio tardío y mal pronóstico. En este mismo estudio se demostró que un mimético de Smac (LCL161) sensibilizó a las células al paclitaxel a través de la degradación de cIAP1 y cIAP2 (Yang *et al.*, 2016).

Al igual que ellos, otro grupo de investigadores mostraron que la expresión de cIAP2 fue elevada en tejidos de pacientes con cáncer de vesícula biliar (CVB) correlacionándose con un pronóstico negativo para los pacientes, este estudio también sugiere que cIAP2 puede promover la invasión de CVB y la linfangiogenesis mediante la activación de la vía NF $\kappa$ B (Jiang *et al.*, 2017)

En 2018 Wang y colaboradores usando muestras de tejidos de pacientes mostraron que la expresión de BIRC3 aumenta con la recurrencia y además identificaron un nuevo papel



para esta IAP como predictor de agresividad y resistencia terapéutica a TMZ y radioterapia (RT) mediada por la señalización de STAT3 y PI3K. (Wang *et al.*, 2016)

El mismo grupo de Wang en 2003 encontró que los niveles de ARNm que codifican para BIRC3 aumentaron notablemente en células de cáncer de colon humano mediante el tratamiento con PMA, demostrando una ruta dependiente de PKC/ NFκB en la regulación de la expresión de esta proteína (Wang *et al.*, 2003).

Jo y colaboradores demostraron que entre los 8 genes de IAPs, solo BIRC3 estaba regulado al alza en células de cáncer de mama triple negativo en comparación con otros subtipos de cáncer de mama. Ellos proponen que cIAP2 regula la Transición Epitelio Mesénquima (TEM) a través de la vía de señalización de AKT (Jo *et al.*, 2017).

Conte y colaboradores en 2006 Demostraron que el Lipopolisacárido (LPS) regula positivamente a cIAP2 en macrófagos, y que los macrófagos cIAP2 - / - son altamente susceptibles a la apoptosis en un entorno proinflamatorio inducido por LPS. Por lo tanto, cIAP2 es crítico en el mantenimiento de una respuesta inflamatoria inmune innata normal (Cohen *et al.*, 2006).

El grupo de Nishihara demostró que cAMP puede inducir la expresión de c-IAP2 en células de cáncer de colon a través de la fosforilación de CREB a través de una vía que implica la activación de ERK1/2 y p38 MAPK (Nishihara *et al.*, 2003)

Otro grupo de investigadores en 2012 observaron que en células de carcinoma de ovario que han sido tratadas con cisplatino existe un aumento significativo de los niveles de IL-6 y cIAP-2 y que su inhibición los sensibilizaba significativamente a este mismo tratamiento (Cohen *et al.*, 2013)

## JUSTIFICACION

---

Desde hace varias décadas los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios como causa de mortalidad a nivel mundial representando un gran desafío para las economías y sistemas de salud. Tan solo para el año 2030 las predicciones sugieren que 13 millones de personas morirán de cáncer cada año y tres cuartas partes se darán en países de ingresos bajos (IARC, 2018).

Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más común en adultos y uno de los tipos de cáncer más agresivos en el hombre, a pesar de los avances en las estrategias multimodales de resección quirúrgica, radioterapia (RT) y quimioterapia con temozolomida (TMZ), la mediana de supervivencia para pacientes recién diagnosticados ronda los 14 meses. Además, el pronóstico es marcadamente sombrío para los pacientes con GBM recurrente, donde a menudo se logra una mediana de supervivencia de 3 a 9 meses con quimioterapia estándar. El desarrollo de resistencia a la muerte celular ha sido reconocido como uno de los mecanismos básicos durante el desarrollo del cáncer y, sus vías, se presentan como dianas terapéuticas prometedoras, por otra parte, es bien sabido que el sistema de adenosina juega un papel fundamental en el microambiente tumoral de células de glioma, donde se genera un marcado entorno hipóxico, sobre la proliferación, la migración y la supervivencia, haciendo hincapié en esta última proponiendo que este fenómeno se deba en parte a la disminución de la muerte celular.

Por ello es importante conocer los elementos moleculares de la vía de señalización activada por adenosina que participan en la evasión de la apoptosis, lo que a corto, mediano y largo plazo nos permitirá proponer marcadores moleculares que pudieran ser considerados como blancos terapéuticos para el glioblastoma de grado IV y de esta forma mejorar el pronóstico y calidad de vida del paciente.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

La inhibición de la apoptosis es un sello distintivo de todos los tipos de cáncer porque los defectos en sus reguladores acompañan invariablemente la tumorigénesis y sostienen la progresión maligna, por ello es importante investigar las vías moleculares subyacentes a este proceso y así permitir identificar y apuntar a los IAP críticos contribuyentes a la evasión apoptótica en GBM.

El presente trabajo busca delinear el papel mecanicista de BIRC3 en la evasión de la apoptosis en células de glioblastoma, el cual podría estar regulado por adenosina.

## HIPOTESIS

---

La adenosina aumentará la expresión de BIRC3 a través de la activación de los receptores a adenosina en la línea celular de glioblastoma U87 MG.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo general

Estudiar el efecto de la adenosina sobre la expresión de BIRC3, así como la posible vía de señalización por la cual es regulada en la línea celular de glioblastoma U87 MG.

### Objetivos particulares

1. Determinar el nivel de expresión del ARNm que codifica para los diferentes receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) en la línea celular U87 MG.
2. Investigar si la presencia de la adenosina en el medio de cultivo de células U87 MG estimula la expresión del ARNm que codifica para BIRC3.

3. Indagar si el efecto de la adenosina sobre la expresión del ARNm que codifica para BIRC3 se debe a la activación de la vía de Proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) o Proteína cinasa dependiente de calcio (PKC).
4. Evaluar el efecto de la adenosina, PMA y cafeína sobre la viabilidad celular en la línea celular U87 mediante ensayos de MTT.

## MATERIAL Y METODOS

---

### Cultivo celular

Las células U87 MG se sembraron en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con medio de cultivo *Advanced DMEM* (Gibco, EUA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina). Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37° C con una atmosfera húmeda del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 4 días las células se tripsinizaron. La tripsinización consiste en los siguientes pasos: retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con 5 mL de PBS estéril a una concentración de 1X, adicionar 2 mL de tripsina y dejan reposar por 5 min. Se re suspendió la suspensión celular con 4 mL de medio de cultivo, la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico y se centrifugo a 1500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular que se quede en el tubo, se resuspendió con medio de cultivo fresco, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células que se utilizaron para experimentos posteriores. Esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

## Extracción del Ácido Ribonucleico Total

Las células se sembraron en placas de 6 pozos, una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se cambió el medio de cultivo, se dio inicio al tratamiento correspondiente, con cambio de medio cada 24 horas. Una vez considerado el tiempo respectivo al tratamiento se procedió a realizar la extracción del RNA total por medio de un kit comercial *FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini* (Favorgene, Biotech Corp., China), siguiendo las instrucciones del fabricante: se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se preparó el buffer de lisis suplementado con 1% de  $\beta$ -mercapto-etanol y se agregaron 350  $\mu$ L de buffer de lisis por pozo, con ayuda de una micropipeta se resuspendió y se transfirió el homogenado celular a la columna que tenía el filtro blanco, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min, se desechó la columna blanca y lo que quedó en el tubo colector se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml, se agregaron 350  $\mu$ L de etanol al 70% en cada tubo. Se colocó en otra columna los filtros rojos y se les añadió lo del tubo eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante, se realizó 1 lavado con buffer de lavado uno y 2 lavados con buffer de lavado dos. Tras cada lavado, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. Por último, la columna fue transferida a un tubo de 1.5 mL estéril y se agregó 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Se dejó reposar la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos para obtener el RNA total.

## Cuantificación de RNA

Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración y la cantidad de ARN extraído mediante espectrofotometría. Para ello se empleó una dilución con 4  $\mu$ L de la muestra y 196  $\mu$ L de agua inyectable, para obtener un volumen final de 200  $\mu$ L; la concentración se evaluó 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 (A260/A280). El valor del cociente obtenido debió ubicarse en un rango de 1.8-2.0 para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad y poder ser empleado en los ensayos de RT-PCR.

## Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario

Para la síntesis de la primera cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN extraído (ADNc), se empleó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) como se muestra en la tabla de abajo del

REACTIVO	VOLUMEN
Buffer RT	4 $\mu$ L
Random	2 $\mu$ L
dNTP's	1 $\mu$ L
Agua	2.5 $\mu$ L

cual se añadió 9  $\mu$ L de forma común a todas las muestras.

Para cada tubo de reacción se empleó un volumen final de 20  $\mu$ L, por lo que el volumen restante (10  $\mu$ L) se complementó con la muestra de ARN más agua.

Se realizaron los cálculos para conocer el volumen final de la muestra de ARN que fue requerido por cada tubo de reacción mediante una “regla de tres” de forma que cada uno de ellos tuviera 4  $\mu$ g de ARN por cada microlitro.

**CONDICION                      CONCENTRACION DE ARN**

“X”                                      X  $\mu$ g \_\_\_\_\_ 1000  $\mu$ l

4  $\mu$ g \_\_\_\_\_ X  $\rightarrow$  **Volumen de muestra requerido.**

Se empleó un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) para realizar 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 hasta su empleo.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles)

A partir del ADN complementario obtenido en la retro-transcripción se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el Kit comercial *DreamTaq PCR Master Mix* (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las indicaciones del proveedor, con un volumen total de reacción mínimo de 20  $\mu$ L. Los oligonucleótidos que fueron utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Oligonucleotidos	Sentido	Secuencia	Tamaño del amplicon (pb)	T <sub>m</sub>
<b>BIRC3</b>	Forward	AACACTAGAGGGCCAGTTAAAG	422 pb	62.3
	Reverse	CACTCATTACTTCCGGGTACAG		60.2
<b>Ki-67</b>	Forward	AGTACCAGGAGGTGAGGATAA	415 pb	61.5
	Reverse	CTGCACTGGAGTTCCCATAAA		62.3
<b><math>\beta</math> actina</b>	Forward	CAAGAGATGGCCACGGCT	218 pb	72.9
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTGCGCA		72.5
<b>Receptor A<sub>2B</sub></b>	Forward	AGTGCTCAAGAGAGGCAGTCCATT	633 pb	60.2
	Reverse	GAAAGCTGCTGCCTTGTGAAGTGT		60.2
<b>Receptor A<sub>1</sub></b>	Forward	TACTTCCACACCTGCCTCATGGTT	421 pb	60.2
	Reverse	ACACCTTCTTGTTGAGCTGCTTGC		60.2
<b>Receptor A<sub>2A</sub></b>	Forward	AACTTCTTTGCCTGTGTGCTGGTG	893 pb	60.2
	Reverse	TTCCTCAGAACCCAAGCCCTTCTT		60.3
<b>Receptor A<sub>3</sub></b>	Forward	AAAGGCAGCCATGACAGAGCAAAC	463 pb	60.4
	Reverse	TCTTTACCCACGCCTCCATCATGT		60.2

REACTIVO	VOLUMEN
Green Dream Taq	10 $\mu$ L
Primer Forward	1 $\mu$ L
Primer Reverse	1 $\mu$ L
Agua	6 $\mu$ L
ADNc	2 $\mu$ L

Se empleó un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 5 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la T<sub>m</sub> del oligonucleótido a utilizar, 1 minuto a 72°C y 10 minutos a 72°C, todo esto por 30 ciclos y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

### Separación electroforética de los productos de PCR

A partir de los productos de PCR se procedió a la separación electroforética, utilizando geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de etidio (BrEt).

Para la preparación del gel se disolvieron 600 miligramos de agarosa en 50 mL de buffer TAE 1X, la solución fue calentada por 1:30 minutos, se añadió 4  $\mu$ L de bromuro de etidio y se vertió en la cámara de electroforesis dejando gelificar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel fue cargado con 9  $\mu$ L de cada muestra. Como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial Gene Ruler 100 pb DNA Laddery junto con el buffer 6X DNA Loading Dye (ambos de Thermo Scientific, EUA).

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1X a 65 Voltios durante 80 minutos; finalmente, se obtuvieron tres microfotografías de cada uno de los geles en el fotodocumentador de geles AXYGEN.



## Densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas utilizando el software *ImageJ* que es proporcionado gratuitamente por el instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (De sus siglas en inglés, NIH).

## Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que nos permitirá evaluar la viabilidad celular. Las células U87 se sembraron en una placa de 6 pozos, al alcanzar un aproximado de 60% de confluencia se dio inicio al tratamiento con Adenosina, PMA y cafeína por 72 horas. Al terminar el tiempo de tratamiento, las células fueron cosechadas siguiendo el protocolo anteriormente descrito, y se procedió al re-sembrado en una placa de 96 pozos a una densidad de 50  $\mu$ L por pozo. El medio fue recambiado cada 24 horas y cuando se cumplieron las 72 horas, a cada pozo se le adicionaron 10  $\mu$ L de reactivo MTT y se dejó incubando por 4 horas. Al haber transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol con HCl 0.1N a cada pozo para disolver los cristales de formazan, posteriormente se llevó a un espectrofotómetro para ser leído a 570 nm. Los resultados se obtuvieron en unidades de absorbancia para después ser analizados y ser mostrados como porcentaje de supervivencia celular.

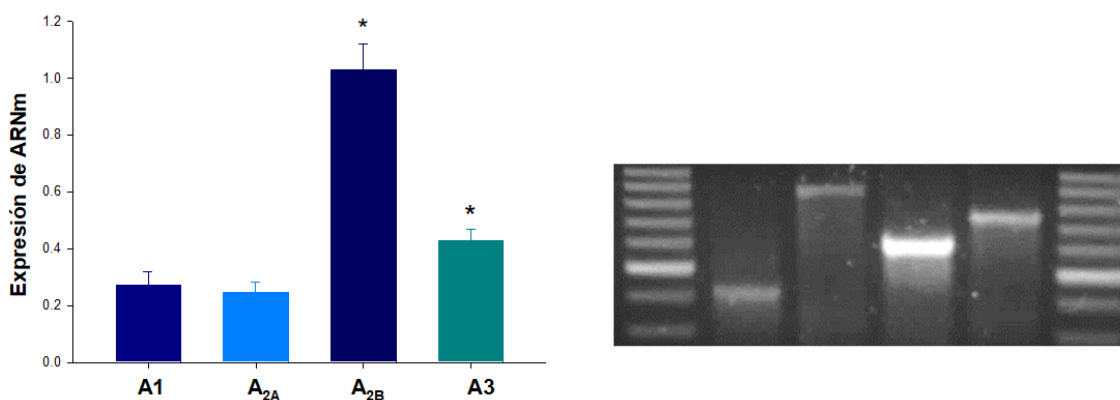
## Análisis de datos

Una vez concluida la fase de experimentación del proyecto, se realizó el análisis e interpretación de los resultados obtenidos utilizando el programa SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, EUA) se utilizó la prueba *t de Student* para evaluar la diferencia entre grupos, para considerar la diferencia estadísticamente significativa *p* debe ser menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### 1. Las células de glioblastoma U87 en condiciones basales expresan ARNm que codifica para los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>

Se decidió investigar de manera inicial si nuestro modelo de estudio, las células U87 MG, expresan el ARNm que codifica para los receptores de adenosina, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>, para lo cual se realizaron ensayos de expresión génica, RT-PCR de punto final. Como se muestra en la figura 9, esta línea celular expresa los cuatro receptores de adenosina, observándose una expresión mayor del receptor A<sub>2B</sub> en comparación con los otros 3 receptores.

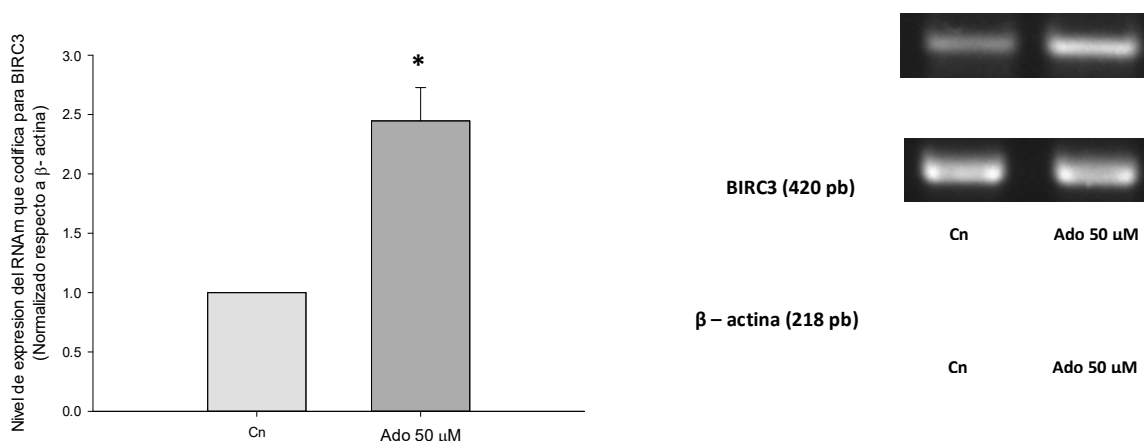


**FIGURA 9|** En estado basal las células U87MG presentan los cuatro tipos de receptores a adenosina. Las células U87MG fueron cultivadas en medio advanced DMEM suplementadas con suero fetal bovino y una solución de antibiótico- antimicótico. Cuando se alcanzó una confluencia del 100%, se extrajo el ARN total, se realizó RT-PCR y los productos finales fueron separados electroforéticamente. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a cada receptor, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de p <0.05.

### 2. La presencia de Ado estimula la expresión del ARNm que codifica para BIRC3 en las células U87

Una vez comprobada la expresión de los cuatro receptores a adenosina, decidimos indagar si Ado podía modificar el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3, proteína antiapoptótica, por lo que realizamos nuevamente una RT- PCR de punto final en presencia

y ausencia de 50  $\mu\text{M}$  de Ado. La figura 10 muestra que Ado induce de manera significativa un incremento de 2 veces la expresión de BIRC3 con respecto a la condición control

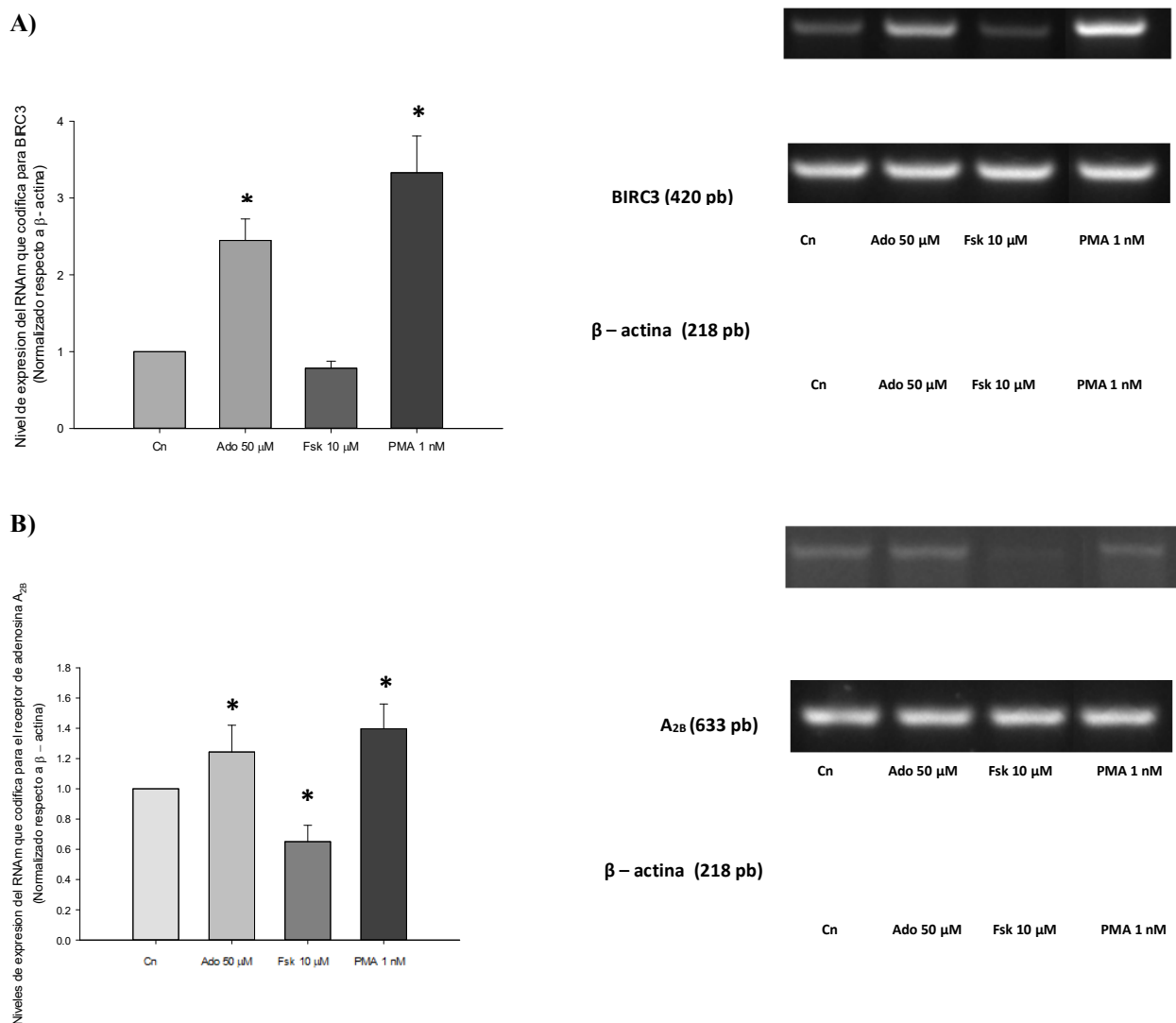


**FIGURA 10| Ado incrementa el nivel de expresión de RNAm que codifica para BIRC3.** Ensayo de RT-PCR muestra los niveles de expresión del RNAm que codifica para la proteína BIRC3 cuando las células de glioblastoma U87 fueron tratadas con Ado a una concentración de 50 $\mu\text{M}$  por 48 horas. Los productos fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1X. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a  $\beta$ - actina y la condición control, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de  $p < 0.05$ .

### 3. El efecto estimulador que ejerce Ado sobre la expresión de BIRC3 es mediado por la vía DAG/PKC

La Ado es un metabolito inmunosupresor altamente producido en el microambiente tumoral, considerándolo como un posible estimulador de la supervivencia y de la evasión de la apoptosis. Los receptores para Ado son capaces de interactuar con diferentes proteínas G, Gs o Gq, activando de esta manera dos vías de señalización: AMPc/PKA y DAG/PKC respectivamente. Debido a estas dos posibilidades, se decidió evaluar cuál de las dos vías de señalización está involucrada en el efecto estimulador de la Ado sobre la expresión de BIRC3. Con el fin de resolver este cuestionamiento, se decidió utilizar un activador de la Adenilato ciclasa, Forskolina (Fsk), a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y un activador de la PKC, el éster de forbol PMA a una concentración de 1 nM. De acuerdo con los datos presentados en la figura 11A, se observa que Fsk no tiene ningún efecto positivo sobre la expresión de BIRC3, al contrario, al parecer disminuye su expresión, aunque no de manera significativa, en cambio, la presencia de PMA induce un incremento de más de 3 veces la

expresión de BIRC3, incluso, es mayor que la inducida por la propia Ado (2 veces). Este resultado sugiere que la expresión de BIRC3 depende de la vía de señalización DAG/PKC. La expresión del receptor de Ado  $A_{2B}$  es el receptor que se encuentra mayormente expresado en esta línea celular y que además es capaz de activar ambas proteínas cinasas, por lo que se decidió investigar de manera complementaria si estos mismos tratamientos presentan un efecto sobre el nivel de expresión de este receptor. Al igual que para BIRC3, el tratamiento tanto con Ado como con PMA, aumenta significativamente su nivel de expresión (Figura 11B).



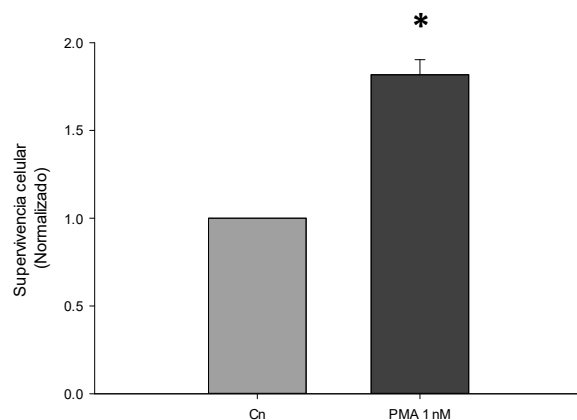
**Figura 11| Efecto de adenosina, PMA y Forskolina sobre la expresión de la proteína BIRC3 y del receptor a adenosina  $A_{2B}$ .** Las células U87MG fueron tratadas con Ado (50  $\mu$ M), Fsk (10 $\mu$ M) y PMA (1 nM) por 48 horas. Se muestra un gel representativo de la expresión de estas proteínas a) RNAm que codifica para

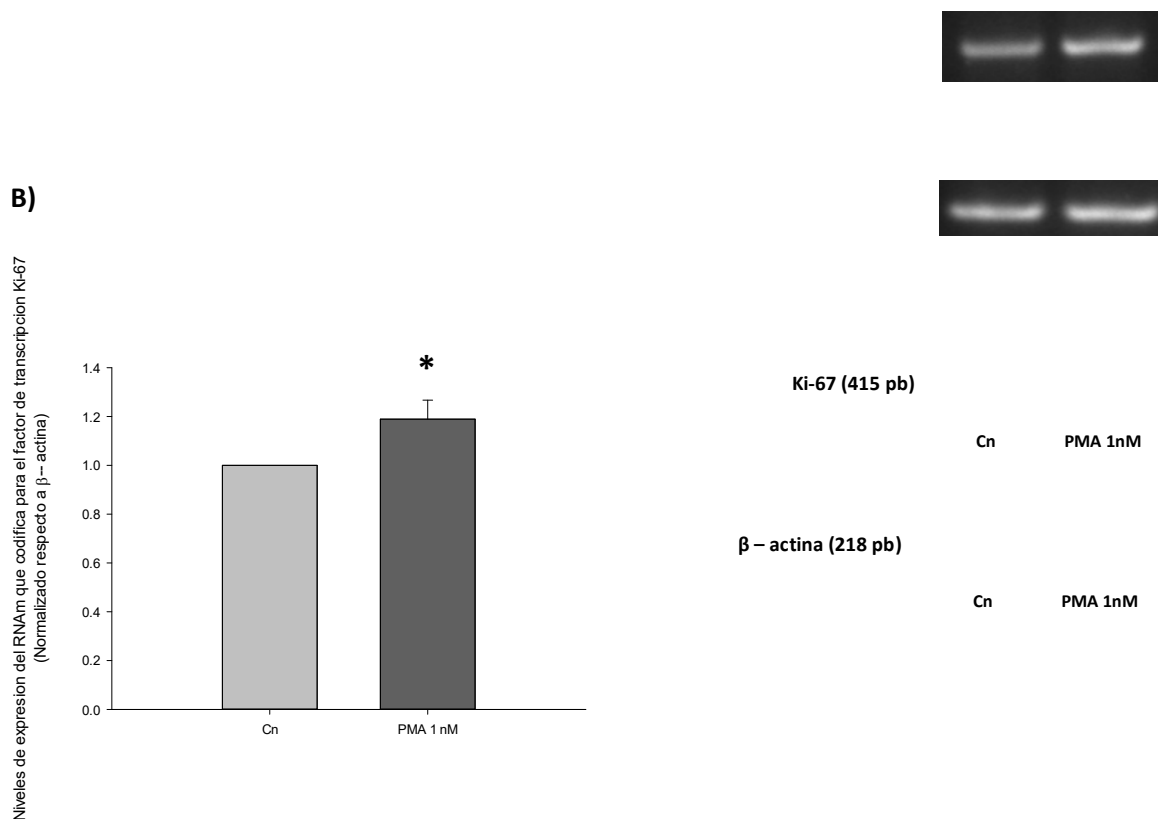
BIRC3 y b) RNAm que codifica para el receptor  $A_{2B}$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto a  $\beta$ - actina y la condición control, así como el error estándar,  $n= 3$  experimentos independientes. \* Valor de  $p < 0.05$ .

#### 4. El PMA afecta la supervivencia de células de glioblastoma U87 MG.

El PMA induce un incremento significativo en la expresión de la proteína anti-apoptótica BIRC3, por lo que muy probablemente este metabolito estará incidiendo sobre la capacidad de supervivencia de la línea celular de glioblastoma U87 MG. Mediante ensayos de MTT decidimos evaluar dicha posibilidad. La figura 12A muestra que las células tratadas con PMA a una concentración de 1 nM tienen un mayor porcentaje de supervivencia en comparación a las células control, se presenta un incremento del 70%. Al observar este resultado sobre la supervivencia celular, se evaluó de manera complementaria el nivel de expresión del ARNm que codifica para el factor de transcripción Ki-67, el cual es un marcador nuclear de proliferación celular. La presencia de 1 nM de PMA induce un aumento significativo del 20% en el nivel de expresión de Ki-67 con respecto a la condición control (Figura 12B).

A)



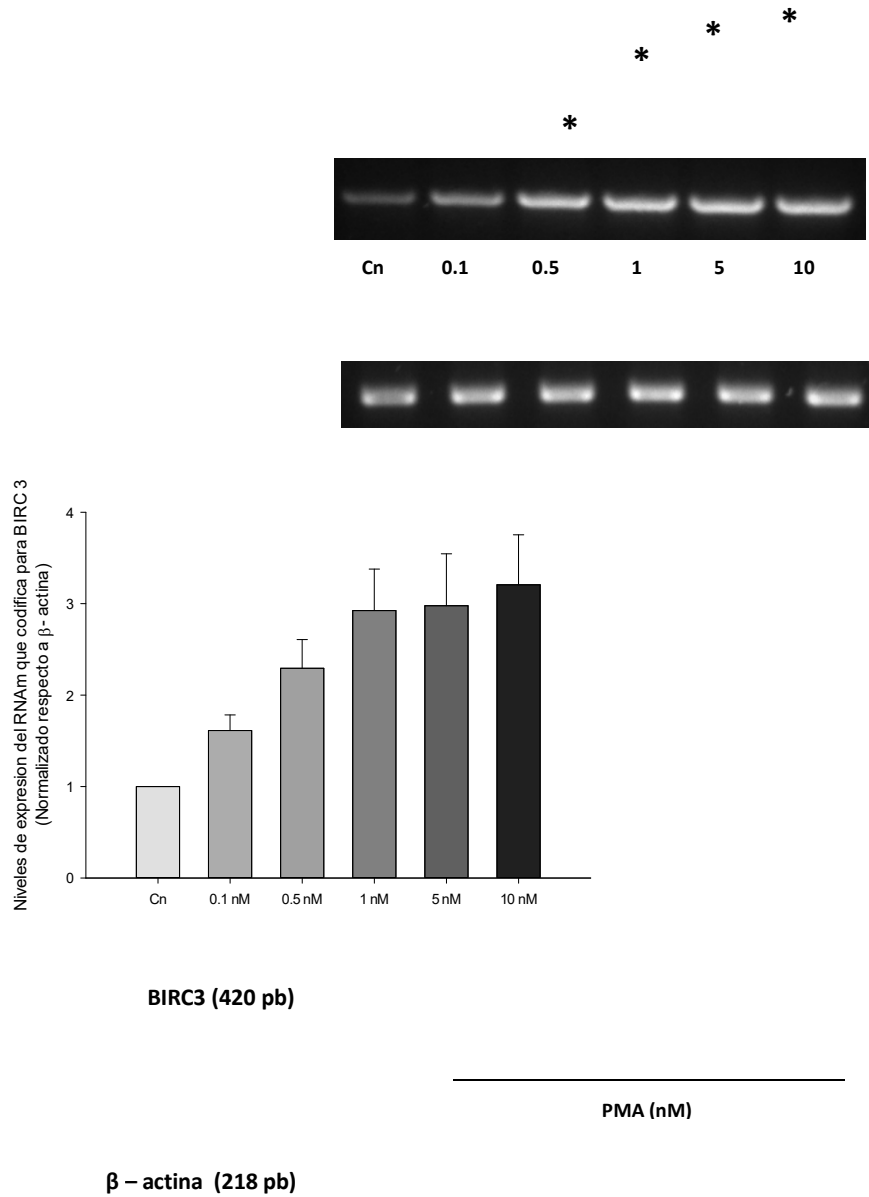


**Figura 12| La supervivencia celular aumenta en células de glioblastoma U87 MG cuando son tratadas con PMA.** A) las células de glioblastoma U87 fueron tratadas por 72 horas con PMA y el porcentaje de células viables se evaluó mediante el ensayo de MTT. El recuento de células viables no tratadas se asumió como un 100%. B) Los niveles del RNAm que codifican para el factor de transcripción Ki-67 se midieron por RT-PCR de punto final en células tratadas con PMA 1nM por 48 horas. Los valores graficados se expresan como el porcentaje con respecto al 100% de la condición control, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de  $p < 0.05$ .

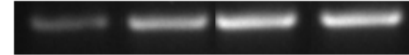
### 5. PMA ejerce un efecto dosis-dependiente sobre la expresión del ARNm que codifica para BIRC3.

La presencia de 1 nM de PMA aumenta la expresión de BIRC3, así como la capacidad de supervivencia de las células de glioblastoma U87, por lo que procedimos a investigar si este efecto podría ser dependiente de la concentración de PMA. Se realizó una curva dosis-efecto, empleando diferentes concentraciones de PMA (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 nM) por 48 horas y evaluando el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3. La gráfica 13 muestra que a partir de la concentración de 0.1 nM de PMA se observa un aumento

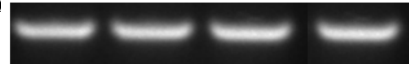
significativo del 70% sobre la expresión de esta proteína anti-apoptótica, a la concentración de 0.5 nM de PMA, se eleva un 130% con respecto a la condición control, y para concentraciones superiores de PMA (1, 5 y 10 nM) se mantiene el efecto estimulador de casi 3 veces, por lo que la concentración empleada de PMA para los experimentos fue de 1 nM, concentración mínima a la cual se alcanza el efecto máximo.



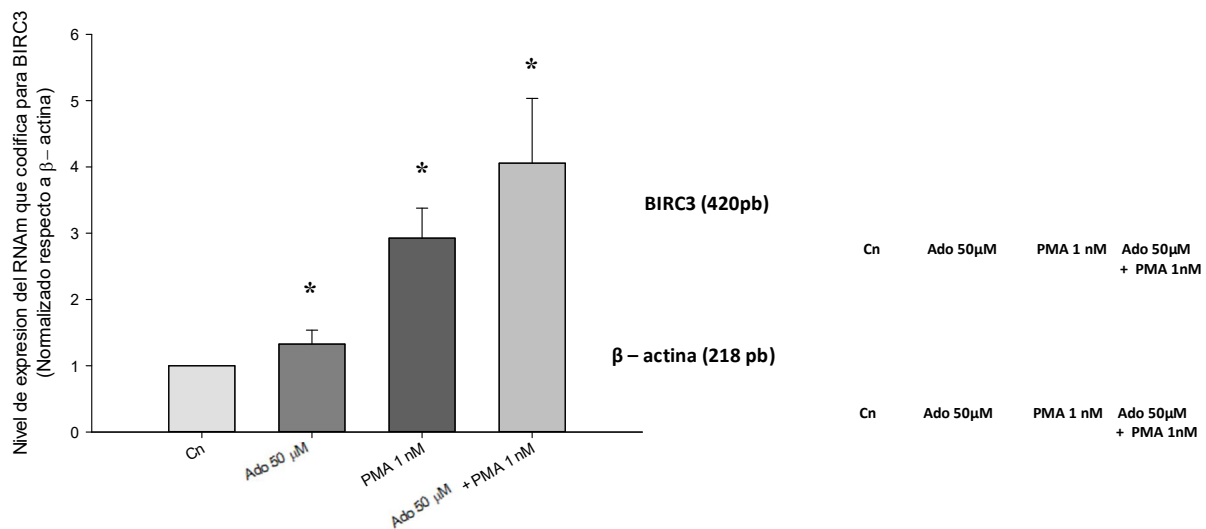
**Figura 13| El efecto de PMA sobre la expresión de BIRC3 en las células de glioblastoma U87 MG es dosis dependiente.** Las células de glioblastoma fueron tratadas por 48 horas con PMA. A) el ensayo de RT-PCR muestra que la presencia de PMA 1nM estimula la expresión del RNAm que codifica para BIRC3, b) este efecto es dosis dependiente ya que en presencia de PMA a 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 nM se observa un aumento en su expresión. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a  $\beta$ - actina y la condición control así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de  $p < 0.05$ .



## 6. La presencia simultánea de Ado y PMA potencia el nivel de expresión de BIRC3



Se procedió a evaluar si la presencia simultánea de Ado y PMA potencian el nivel de expresión de BIRC3. La figura 14 muestra que el cotratamiento con Ado y PMA ejerce un efecto estimulador sobre la expresión de esta IAP, se presenta un aumento de casi cuatro veces en comparación al control, que también hace diferencia con el incremento observado cuando las células son mantenidas solamente en presencia de Ado o PMA.



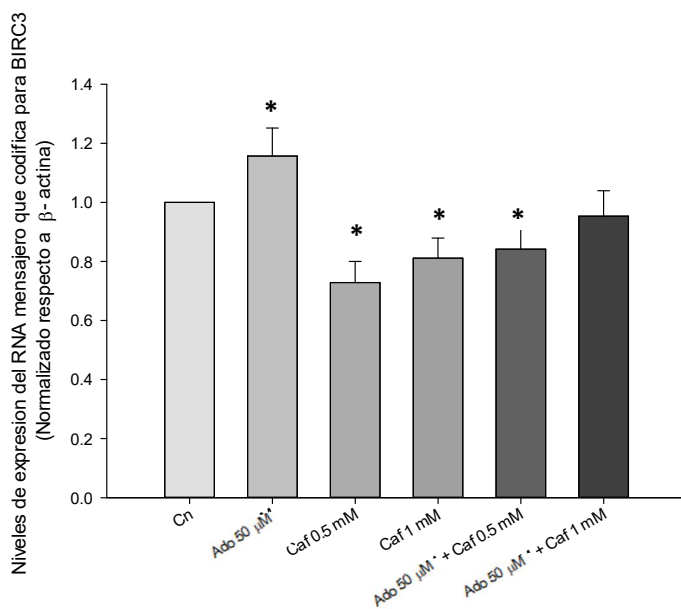
**Figura 14| El contratamiento con Ado y PMA aumenta casi cuatro veces la expresión de BIRC3 en comparación a la expresión de las células control.** La presencia de Ado (50 $\mu$ M) y PMA (1 nM) por 48 horas, estimula la sobreexpresión de BIRC3 en las células U87 MG. Los niveles del RNAm que codifican para esta proteína se midieron por RT-PCR de punto final, los valores graficados se expresan normalizados respecto a  $\beta$ - actina y a la condición control, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de  $p < 0.05$ .

## 7. La cafeína inhibe el efecto estimulador que Ado ejerce sobre la expresión del ARNm que codifica para BIRC3.



Los resultados mostrados hasta el momento indican que la unión de Ado a su receptor A2B, el cual está acoplado a una proteína Gq, activa la vía de señalización DAG-PKC, la cual influye sobre el nivel de expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis, BIRC3, favoreciendo la capacidad de supervivencia de las células U87. Con el fin de apoyar nuestros resultados, se decidió utilizar un inhibidor inespecífico del receptor para Ado, la cafeína a una concentración de 0.5 y 1 mM. La figura 15A muestra una reducción significativa en el nivel de expresión del ARNm que codifica para BIRC3, independientemente de la concentración empleada de cafeína. Se observa de igual manera, que la presencia de esta metilxantina inhibe el efecto estimulador que ejerce la Ado sobre la expresión de BIRC3, confirmando la participación del receptor para Ado. El efecto que se presenta sobre la expresión de BIRC3 se traduce en el mismo sentido sobre la capacidad de supervivencia de las células U87 (Figura 15B), es decir una reducción en presencia de cafeína sola o combinada con Ado.

A)



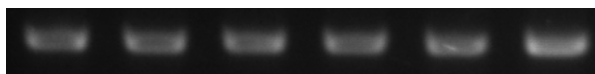
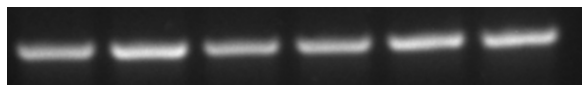
**BIRC3 (420 pb)**

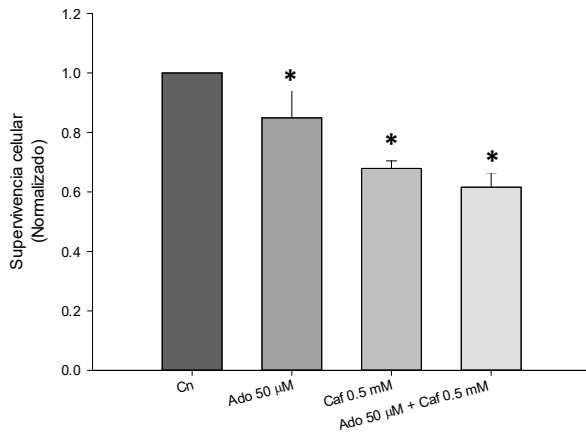
Cn	Ado 50 $\mu$ M	Caf 0.5 mM	Caf 1 mM	Ado 50 $\mu$ M + Caf 0.5 mM	Ado 50 $\mu$ M + Caf 1 mM
----	----------------	------------	----------	--------------------------------	------------------------------

**$\beta$  – actina (218 pb)**

Cn	Ado 50 $\mu$ M	Caf 0.5 mM	Caf 1 mM	Ado 50 $\mu$ M + Caf 0.5 mM	Ado 50 $\mu$ M + Caf 1 mM
----	----------------	------------	----------	--------------------------------	------------------------------

**B)**

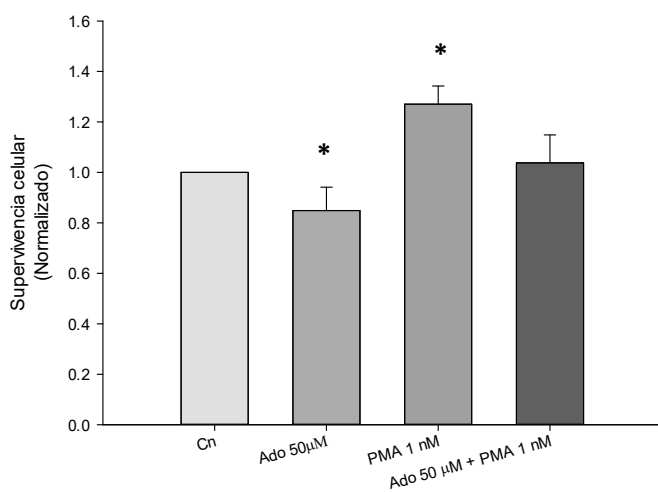




**Figura 15| Cafeína abate el efecto de adenosina sobre el nivel de expresión de BIRC3.** A) El ensayo de RT- PCR muestra los niveles de expresión del RNAm que codifica para BIRC3 en las células de glioblastoma U87 MG, en condición control y en presencia de Ado 50 μM y cafeína 0.5 y 1 mM por 48 horas. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a β- actina y a la condición control, así como el error estándar, B) Se muestra el nivel de supervivencia celular cuando las celular son tratadas por 72 horas con Ado 50 mM y cafeína 0.5 mM. Los valores graficados se expresan normalizados respecto a la condición control, así como el error estándar. n= 3 experimentos independientes. \* Valor de p <0.05.

## 8. La presencia simultánea de Ado y PMA no potencia la capacidad de supervivencia de las células U87.

Debido a que la presencia simultánea de Ado y PMA potencia la expresión de BIRC3, se decidió explorar la posibilidad de que este efecto se tradujera en una mayor capacidad de supervivencia de las células U87, por lo que evaluamos la supervivencia celular en presencia independiente o combinada de Ado y PMA. De acuerdo al grafico que se presenta (Figura 15), se puede decir que la presencia combinada de Ado y PMA no potencia la capacidad de supervivencia de la línea tumoral U87, tal y como se observó para el caso de la expresión de BIRC3.



**Figura 16| Adenosina no aumenta la supervivencia celular.** Las células U87 MG se cultivaron en placas de 96 pozos, una vez que alcanzaron una confluencia del 50% se dio inicio a los diversos tratamientos por 72 horas. Se evaluó el porcentaje de células viables a través de ensayos de MTT. Los valores graficados se expresan como el porcentaje con respecto al 100% de la condición control, así como el error estándar, n= 3 experimentos independientes. \* Valor de  $p < 0.05$ .

## DISCUSION

---

El glioblastoma multiforme (GBM) es el subconjunto más común y maligno de tumores cerebrales primarios en adultos representando más del 60% (Rock et al., 2014), a pesar de la variedad de terapias modernas contra GBM, todavía es una enfermedad mortal con un pronóstico extremadamente malo. Los pacientes suelen tener una supervivencia media de aproximadamente 14 a 15 meses desde el diagnóstico (Ohka *et al.*, 2012; Thakkar *et al.*, 2014).

Las purinas y las pirimidinas son moléculas de señalización fundamentales para controlar la supervivencia y la proliferación de astrocitos, así como para mediar la comunicación de célula a célula entre las células gliales y las neuronas en el cerebro sano. La transformación maligna de los astrocitos hacia tumores cerebrales progresivamente más agresivos (desde el astrocitoma hasta el glioblastoma anaplásico) conduce a modificaciones en las vías de supervivencia y muerte celular que en general confieren una ventaja de crecimiento a las células malignas y resistencia a muchos estímulos citotóxicos. Sin embargo, se ha demostrado que, en los astrocitomas, varias vías purinérgicas (en particular adenosinérgicas) que controlan la supervivencia y la muerte celular siguen siendo efectivas y, en algunos casos, incluso mejoradas (Tapper *et al.* 2012). Además, se sabe que la evasión de la apoptosis es un sello distintivo de todos los tipos de cáncer y es considerada como una de las ocho alteraciones esenciales por las cuales una célula normal se transforma y se convierte en un tumor maligno (Hanahan & Weinberg, 2000). Varias proteínas que se han relacionado con la muerte celular programada desregulada se denominan colectivamente proteínas de supervivencia, Bcl-2, la proteína de choque térmico (HSP) y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) se consideran las principales familias de proteínas de supervivencia. Las IAP se expresan a niveles elevados en diferentes tipos de cáncer y contribuyen a la supervivencia de las células tumorales, la resistencia a la quimioterapia, la progresión de la enfermedad y el mal pronóstico. (Silker & Meier, 2013). Por ejemplo, se han documentado expresiones más altas de IAP en gliomas malignos que a menudo, se correlacionan con un mal pronóstico (Wagenknecht *et al.*, 1999), en específico de BIRC3 ya que este fue el único IAP entre varios IAP cuya expresión diferencial se relacionó significativamente con la supervivencia

a 5 años en pacientes con GBM (Wang *et al.*, 2016). Por ello el presente trabajo tuvo como propósito investigar el rol que ejerce la adenosina sobre la supervivencia celular y expresión de una proteína antiapoptótica BIRC3 en la línea tumoral de glioblastoma U87 MG, así como el mecanismo molecular involucrado con el fin de proponer a corto, mediana y largo plazo blancos farmacológicos responsables de la evasión de la apoptosis.

En el espacio extracelular, para que Ado pueda tener un efecto debe activar sus receptores de membrana, denominados colectivamente receptores P1 (Fredholm *et al.* 2011), así que de manera inicial decidimos investigar si nuestro modelo experimental, las células de glioblastoma U87 MG expresaban el ARNm que codifica para los receptores a Ado, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, y A<sub>3</sub>, y al igual que el grupo de Castillo en 2007 en células de glioma C6 (Castillo *et al.*, 2007) encontramos que la línea celular de glioblastoma U87 de manera basal expresa los cuatro receptores, observándose una mayor expresión del receptor A<sub>2B</sub> en comparación con los otros tres receptores. Posteriormente evaluamos si la presencia de Adenosina en el medio de cultivo de nuestras células modificaba el nivel de expresión del ARNm que codifica para la proteína Inhibidora de la apoptosis BIRC3, por lo que realizamos una RT-PCR de punto final en presencia y ausencia de 50  $\mu$ M de Ado. Utilizamos esta concentración alta de Adenosina porque se sabe que en condiciones patológicas los niveles de esta purina pasan de niveles nanomolares a niveles micromolares debido a la hidrólisis enzimática de ATP extracelular por las nucleotidasas CD39 y CD73 o la exportación a través de transportadores equilibrantes bidireccionales de membrana (ENT), este ATP se libera no solo de las neuronas a través de las vesículas sinápticas, sino también de varias células secretoras (p. Ej., Plaquetas, macrófagos, células endocrinas) así como de las células dañadas o moribundas (Lazarowski *et al.*, 2011). Además de que Melani y colaboradores en 2011 midieron la concentración de Ado en el líquido extracelular del tejido de glioma de 21 pacientes sometidos a extirpación quirúrgica del tumor e informaron que esta se encontraba en el rango micromolar bajo (Melani *et al.*, 2003), lo que significa que es lo suficientemente alto como para estimular los cuatro subtipos de receptores P1. La figura 10 muestra que Ado en nuestro modelo celular induce de manera significativa un incremento de 2 veces la expresión de BIRC3 con respecto a la condición control.

De acuerdo a nuestros resultados obtenidos hasta el momento sabíamos que adenosina ejerce un efecto sobre el nivel de expresión de BIRC3, y que seguramente se debía a la activación de alguno de sus cuatro receptores. Las señales de los receptores  $A_1$  y  $A_3$  están mediadas a través de los miembros  $G_i$  y  $G_o$  de la familia de proteínas G, a través de los cuales reducen la actividad de AC, los niveles de cAMP y aumentan los niveles intracelulares de DAG e IP3, provocando la activación de la Proteína Cinasa C (PKC), mientras que los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  se acoplan a las proteínas  $G_s$ , a través de los cuales estimulan la AC aumentando los niveles de cAMP, permitiendo la activación de la enzima Proteína Cinasa A (PKA),  $A_{2B}$ , también activa a  $G_q$ , estimulando la actividad de PLC generando un incremento en los niveles de IP3, DAG y como consecuencia también aumenta la actividad de PKC (Fredholm *et al.*, 2001). Como los receptores a Ado son capaces de interactuar con diferentes proteínas  $G_q$  o  $G_s$  activando de esta manera dos vías de señalización: AMPc/PKA y DAG/PKC respectivamente, decidimos evaluar cuál de estas dos vías de señalización estaban involucradas en el efecto estimulador de la Ado sobre el nivel de expresión de BIRC3, utilizando Fsk como activador de AC y PMA como activador de PKC, se observa que Fsk no tiene ningún efecto positivo sobre la expresión de BIRC3, al contrario, al parecer disminuye su expresión, aunque no de manera significativa, en cambio, la presencia de PMA induce un incremento de más de 3 veces la expresión de BIRC3, incluso, es mayor que la inducida por la propia Ado (2 veces). Sugiriendo que la sobreexpresión del RNAm que codifica para esta proteína es debida a la vía de señalización DAG/PKC. Como describimos anteriormente, el receptor  $A_{2B}$  presenta una mayor expresión en comparación a los otros receptores de adenosina y que además puede activar las dos diferentes vías de señalización: a) AMPc/PKA y b) DAG/PKC, evaluamos si los mismos tratamientos tenían un efecto sobre la expresión del receptor  $A_{2B}$  y observamos que tanto el tratamiento con Ado como con PMA aumentaban significativamente su nivel de expresión.

Se ha encontrado que las PKC están implicadas en la regulación del crecimiento de astrocitos (Yong *et al.*, 1994) y que los niveles de actividad de PKC son aún mucho más altos en los astrocitos neoplásicos en comparación con las células gliales normales (Da *et al.*, 2002; Sharif *et al.*, 1999). De igual forma varios grupos de investigadores han relacionado la actividad de esta proteína cinasa como un inductor de la migración e

invasión en las células de glioblastoma. Por ejemplo, Naoko y colaboradores en 2007 observaron que al tratar las células de glioblastoma A172 con PMA, un activador de la PKC, la invasión y migración de estas células aumentaba ya que PMA inducía la formación de lamelopodios y de complejos focales (Naoko *et al.*, 2007). Por su parte, Waheed y colaboradores en 2017 se dieron cuenta que al tratar a las células de glioblastoma T-98 G con PMA estas aumentaban la secreción de Metaloproteinasa 2 y 9, y por lo tanto su capacidad migratoria e invasiva también aumentaba. Otro grupo de investigadores en 2004 demostraron que la proteína Cinasa C media una respuesta proliferativa inducida por PMA en células U251 GBM por la activación de las vías de señalización de Akt y mTOR (Aeder *et al.*, 2004), lo que nos llevó a pensar que si PKC induce un incremento significativo en la expresión de la proteína antiapoptótica BIRC3, muy probablemente estará este metabolito incidiendo sobre la capacidad de supervivencia de la línea celular de glioblastoma U87 MG, dicha posibilidad la evaluamos mediante ensayos de MTT y encontramos que las células tratadas con PMA a una concentración de 1 nM tienen un mayor porcentaje de supervivencia en comparación a las células control, se presenta un incremento del 70%. Al observar este resultado sobre la supervivencia celular, se evaluó de manera complementaria el nivel de expresión del ARNm que codifica para el factor de transcripción Ki-67, el cual es un marcador nuclear de proliferación celular. La presencia de 1 nM de PMA induce un aumento significativo del 20% en el nivel de expresión de Ki-67 con respecto a la condición control. Posterior a ello decidimos investigar si el efecto de PMA sobre la expresión del RNAm que codifica para BIRC3 era dependiente de la concentración, de manera que realizamos una curva dosis-efecto empleando diferentes concentraciones de PMA (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 nM) por 48 horas y evaluamos el nivel de expresión del ARNm, encontrando que a partir de la concentración de 0.1 nM de PMA se observa un aumento significativo del 70% sobre la expresión de esta proteína anti-apoptótica, a la concentración de 0.5 nM de PMA, se eleva un 130% con respecto a la condición control, y para concentraciones superiores de PMA (1, 5 y 10 nM) se mantiene el efecto estimulador de casi 3 veces, por lo que la concentración empleada de PMA para los experimentos fue de 1 nM, concentración mínima a la cual se alcanza el efecto máximo. Continuando con los experimentos procedimos a evaluar si la presencia simultánea de Ado y PMA potenciaban el nivel de expresión de BIRC3, como lo esperábamos, este cotratamiento ejerce un efecto



estimuladorio sobre la expresión de esta IAP de casi cuatro veces en comparación al control, que también hace diferencia con el incremento observado cuando las células son mantenidas solamente en presencia de Ado o PMA.

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que la unión de Ado a uno de sus receptores activa la vía de señalización DAG/IP3- PKC y por lo tanto el nivel de expresión de la proteína Inhibidora de la apoptosis BIRC3, con el fin de apoyar nuestra propuesta, decidimos utilizar un inhibidor inespecífico de los receptores a adenosina, Cafeína a una concentración de 0.5 y 1 mM.

Nigh y colaboradores en 2018, realizaron una curva dosis efecto de cafeína sobre la citotoxicidad en células de glioblastoma U87 y encontraron que las dosis inferiores a 1mM no afectaban la viabilidad de estas células, por lo que ellos utilizaron 1mM como dosis idónea para sus siguientes experimentos. Por nuestra parte decidimos utilizar las concentraciones de 0.5 y 1 Mm de la cafeína para realizar nuestros experimentos. La figura 15 muestra que el nivel de expresión del RNAm que codifica para BIRC3 es abatido por la presencia de Cafeína tanto a 0.5 mM como a 1 mM y que este efecto aún se observa cuando las células son tratadas con Ado y cafeína juntas. Con este resultado confirmamos que el efecto que adenosina tiene sobre el nivel de expresión de esta IAP se debe a la activación de alguno de sus propios receptores. El efecto que se presenta sobre la expresión de BIRC3 se traduce en el mismo sentido sobre la capacidad de supervivencia de las células U87 (Figura 15B), es decir una reducción en presencia de cafeína sola o combinada con Ado.

Finalmente debido a que la presencia simultánea de Ado y PMA potencia la expresión de BIRC3, se decidió explorar la posibilidad de que este efecto se tradujera en una mayor capacidad de supervivencia de las células U87, por lo que evaluamos mediante ensayos de MTT la supervivencia celular en presencia sola o combinada de Ado y PMA. Sin embargo, de acuerdo a los resultados, se puede decir que la presencia combinada de Ado y PMA no potencia la capacidad de supervivencia de la línea tumoral U87, tal y como se observó para el caso de la expresión de BIRC3, sin embargo, la presencia independiente de PMA si aumenta la supervivencia celular, por lo que podríamos decir que este aumento de la supervivencia celular debe ser mediada por otra cosa que no son los receptores a adenosina.

## CONCLUSIONES

---

- Las células de glioblastoma U87 de manera basal expresan el RNAm que codifica para los cuatro tipos de receptores a adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>
- La adenosina aumenta el nivel de expresión del RNAm que codifica para la proteína antiapoptótica BIRC3.
- A nivel de RNAm el cotratamiento de la adenosina con PMA potencia el nivel de expresión de BIRC3.
- PMA aumenta la supervivencia celular, así como el nivel de expresión del RNAm que codifica para Ki-67 en la línea celular de glioblastoma multiforme U87 MG
- La presencia de PMA en el medio de cultivo de las células U87 aumentan el nivel de expresión del RNAm que codifica para BIRC3.
- La cafeína inhibe el efecto que la adenosina tiene sobre la expresión del RNAm que codifica para BIRC3.
- La presencia simultánea de la Ado y PMA no potencia la capacidad de supervivencia de las células U87.

## BIBLIOGRAFIA

---

Auffinger, B., Thaci, B., Nigam, P., Rincon, E., Cheng, Y., & Lesniak, M. (2012). New therapeutic approaches for malignant glioma: in search of the Rosetta stone. *F1000 Medicine Reports*, 4. <https://doi.org/10.3410/M4-18>

Agencia Internacional para la Investigacion del Cancer. World Cancer Report 2018.

Barres, B. A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*, 60(3), 430–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>

Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12), 1263–1271. <https://doi.org/10.1002/glia.20557>

Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling: past, present and future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(1), 3–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008005000037>

Cieślak, M., Komoszyński, M., & Wojtczak, A. (2008). Adenosine A2A receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic Signalling*, 4(4), 305–312. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9100-8>

Covarrubias, R., Chepurko, E., Reynolds, A., Huttinger, Z. M., Huttinger, R., Stanfill, K., Gumina, R. J. (2016). Role of the CD39/CD73 Purinergic Pathway in Modulating Arterial Thrombosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(9), 1809–1820. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307374>

Ellor, S. V., Pagano-Young, T. A., & Avgeropoulos, N. G. (2014). Glioblastoma: Background, Standard Treatment Paradigms, and Supportive Care Considerations. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, 42(2), 171–182. <https://doi.org/10.1111/jlme.12133>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fields, R. D., Woo, D. H., & Basser, P. J. (2015). Glial Regulation of the Neuronal Connectome through Local and Long-Distant Communication. *Neuron*, 86(2), 374–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.014>

Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., & Wasserman, W. (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(4–5), 364–374. <https://doi.org/10.1007/s002100000313>

Gordon, G. R. J., Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55(12), 1214–1221. <https://doi.org/10.1002/glia.20543>

Gracia, E., Farré, D., Cortés, A., Ferrer-Costa, C., Orozco, M., Mallol, J., Casadó, V. (2013). The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *The FASEB Journal*, 27(3), 1048–1061. <https://doi.org/10.1096/fj.12-212621>

Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13(2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005>

JovčEvska, I., KočEvar, N., & Komel, R. (2013). Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Molecular and Clinical Oncology*, 1(6), 935–941. <https://doi.org/10.3892/mco.2013.172>

Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>

LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252–6275. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.302>

Li, T., Quan Lan, J., Fredholm, B. B., Simon, R. P., & Boison, D. (2007). Adenosine dysfunction in astrogliosis: cause for seizure generation? *Neuron Glia Biology*, 3(4), 353–366. <https://doi.org/10.1017/S1740925X0800015X>

Livingston, M., Heaney, L. G., & Ennis, M. (2004). Adenosine, inflammation and asthma ? a review. *Inflammation Research*, 53(5), 171–178. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-1248-2>

Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>

McNeill, K. A. (2016). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 34(4), 981–998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>

Newby, A. C. (1984). Adenosine and the concept of “retaliatory metabolites.” *Trends in Biochemical Sciences*, 9(2), 42–44. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90176-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90176-2)

Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). CELLULAR R ESPONSES TO DNA D AMAGE. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367>

Norden, A. D., Drappatz, J., Muzikansky, A., David, K., Gerard, M., McNamara, M. B., ... Wen, P. Y. (2009). An exploratory survival analysis of anti-angiogenic therapy for

recurrent malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 92(2), 149–155.  
<https://doi.org/10.1007/s11060-008-9745-8>

Omari, K. M., Lutz, S. E., Santambrogio, L., Lira, S. A., & Raine, C. S. (2009). Neuroprotection and Remyelination after Autoimmune Demyelination in Mice that Inducibly Overexpress CXCL1. *The American Journal of Pathology*, 174(1), 164–176.  
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080350>

Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(9), 494–503.  
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>

Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4), a006098–a006098.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>

Tak, E., Ridyard, D., Kim, J.-H., Zimmerman, M., Werner, T., Wang, X. X., ... Grenz, A. (2014). CD73-Dependent Generation of Adenosine and Endothelial Adora2b Signaling Attenuate Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(3), 547–563. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012101014>

Takayama, S., Reed, J. C., & Homma, S. (2003). Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 9041–9047. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207114>

Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(10), 1985–1996.  
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>

Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V., Kayagaki, N., Garg, P., ... Vucic, D. (2007). IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF-κB

Activation, and TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis. *Cell*, 131(4), 669–681.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>

Wilson, T., Karajannis, M., & Harter, D. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5(1), 64.  
<https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>

Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>

Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., ... Hay, B. A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature Cell Biology*, 4(6), 416–424. <https://doi.org/10.1038/ncb793>

Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., ... Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410(6824), 112–116.  
<https://doi.org/10.1038/35065125>

Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W., ... Meier, P. (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- $\kappa$ B as well as cell survival and oncogenesis. *Nature Cell Biology*, 10(11), 1309–1317. <https://doi.org/10.1038/ncb1789>

Galluzzi, L., Yamazaki, T., & Kroemer, G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11), 731–745.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0>

Stagg, J., Divisekera, U., McLaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., ... Smyth, M. J. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1547–1552.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908801107>

Takenaka, M. C., Gabriely, G., Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Wheeler, M. A., Chao, C.-C., ... Quintana, F. J. (2019). Control of tumor-associated macrophages and T cells in

glioblastoma via AHR and CD39. *Nature Neuroscience*, 22(5), 729–740. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0370-y>

Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Del Tacca, M., & Blandizzi, C. (2008). Regulation of enteric functions by adenosine: Pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(3), 233–253. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.08.010>

Ren, Z.-H., Lin, C.-Z., Cao, W., Yang, R., Lu, W., Liu, Z.-Q., ... Zhang, C.-P. (2016). CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. *Oncotarget*, 7(38). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11435>

Rasband, M. N. (2016). Glial Contributions to Neural Function and Disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(2), 355–361. <https://doi.org/10.1074/mcp.R115.053744>

Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 759–770. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>

Zuchero, J. B., & Barres, B. A. (2015). Glia in mammalian development and disease. *Development*, 142(22), 3805–3809. <https://doi.org/10.1242/dev.129304>

Krepela. (2009). Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *International Journal of Oncology*, 35(06). [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000464](https://doi.org/10.3892/ijo_00000464)

Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews*, 98(3), 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>

Small, S., Keerthivasan, G., Huang, Z., Gurbuxani, S., & Crispino, J. D. (2010). Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. *Leukemia*, 24(11), 1920–1926. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.198>

Ashhab, Y., Alian, A., Polliack, A., Panet, A., & Yehuda, D. Ben. (2001). Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue



distribution pattern. *FEBS Letters*, 495(1–2), 56–60. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02366-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02366-3)

Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Current Biology*, 10(21), 1359–1366. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00781-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00781-8)

Lopes, R. B., Gangeswaran, R., McNeish, I. A., Wang, Y., & Lemoine, N. R. (2007). Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *International Journal of Cancer*, 120(11), 2344–2352. <https://doi.org/10.1002/ijc.22554>

Vucic, D., & Fairbrother, W. J. (2007). The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(20), 5995–6000. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0729>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3), 178–194. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178>

LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252–6275. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.302>

Tsujimoto, Y., Finger, L., Yunis, J., Nowell, P., & Croce, C. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678), 1097–1099. <https://doi.org/10.1126/science.6093263>

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death. *Cell*, 116(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)

O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572–585. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x>

Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., & Tsuruo, T. (1999). A Human IAP-Family Gene, Apollon, Expressed in Human Brain Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(3), 847–854. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1585>

Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>

Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499>

Dunwiddie, T. V., & Diao, L. (1999). Regulation of extracellular adenosine in rat hippocampal slices is temperature dependent: role of adenosine transporters. *Neuroscience*, 95(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00404-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00404-2)

Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>

SZEGEZDI, E., FITZGERALD, U., & SAMALI, A. (2003). Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010(1), 186–194. <https://doi.org/10.1196/annals.1299.032>

Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., ... Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature

Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, 12(S2), 1463–1467.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>

Abbas, S., Abdou, N., Lasheen, D., & Abou El Ella, D. (2019). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to discovery of advanced selective Bcl-2 family inhibitors. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*, 3(1), 37–54.  
<https://doi.org/10.21608/aps.2019.20225>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Verhagen, A. M., Coulson, E. J., & Vaux, D. L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-7-reviews3009>

Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis. *Cell*, 104(3), 325–328.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00219-7)

Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74(2–3), 281–286. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(99\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(99)00038-2)