



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**Laboratorio de Cáncer y Comunicación Intercelular**



---

**“PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P1 EN LA  
GENERACIÓN DE CAMBIOS INTRACELULARES DE  $Ca^{2+}$  EN UNA LÍNEA  
CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN”**

Tesis para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**Presenta:**

L.FT. Leonel Ramón Ledezma Estrada

**Director de tesis:**

Dr. Fabián Galindo Ramírez

**Revisores:**

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Dr. José Everardo Avelino Cruz

Junio 2023

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>Cáncer.....</b>	<b>8</b>
Definición.....	8
Características distintivas del cáncer.....	8
Clasificación.....	9
Epidemiología.....	10
En el mundo.....	10
México.....	10
<b>Cáncer de pulmón.....</b>	<b>11</b>
Etiología.....	11
Factores de riesgo.....	12
Clasificación.....	12
Epidemiología del cáncer de pulmón.....	13
En el mundo.....	13
México.....	14
Diagnóstico.....	15
<b>Línea celular LP07.....</b>	<b>16</b>
<b>Adenosina.....</b>	<b>19</b>
Metabolismo de la adenosina.....	19
Receptores de adenosina.....	20
Distribución y expresión de los receptores de adenosina.....	22
<b>Adenosina y cáncer.....</b>	<b>24</b>
Microambiente tumoral.....	24
Receptores de adenosina y cáncer de pulmón.....	26
<b>Calcio.....</b>	<b>27</b>
<b>Adenosina y calcio intracelular.....</b>	<b>29</b>

<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
Objetivo general.....	33
Objetivos particulares.....	33
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
Cultivo celular.....	34
Inmunofluorescencia.....	34
Determinación del cambio en el nivel intracelular de Ca <sup>2+</sup> secundario a la activación de receptores de adenosina.....	35
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
Inmunofluorescencia.....	37
Realización de cámaras para llevar a cabo experimentos en microscopio de epifluorescencia.....	39
Determinación del cambio en el nivel intracelular de Ca <sup>2+</sup> secundario a la activación de receptores de adenosina.....	40
Cafeína, antagonista de los receptores de adenosina en la línea celular LP07.....	45
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

## ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADA	Adenosina deaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AK	Adenosina quinasa
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Receptor de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
ALK	Quinasa del linfoma anaplásico
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAF	Fibroblastos asociados con el cáncer
CD39	Ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1
CD73	5' ectonucleotidasa
CK	Citoqueratina
CNCG	Carcinoma neuroendocrino de células grandes
CNT	Transportadores de nucleósidos concentrados
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4' 6-diamidino-2-fenilindol
EC50	Concentración efectiva media
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ENT	Transportadores de nucleósidos equilibrantes
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FHIT	Tríada de histidina frágil
GLOBOCAN	Observatorio Global del Cáncer
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HER2	Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HIF1	Factor de transcripción inducible por hipoxia 1
IHC	Inmunohistoquímica
IP3	Fosfatidil inositol 1, 4, 5 – trifosfato
K <sup>+</sup>	Potasio
LP07	Línea celular de cáncer de pulmón murina
LRP1B	Proteína 1B relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno

MAT	Microambiente tumoral
MCU	Uniportador mitocondrial de calcio
MEM	Medio Esencial Mínimo
Na <sup>+</sup>	Sodio
NCAM	Moléculas de adhesión celular neurales
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NCLX	Intercambiador sodio/calcio mitocondrial
NOS	Óxido nítrico sintasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAI1	Proteína 1 del canal de calcio activado por liberación de calcio
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad alfa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	Bomba de calcio de la membrana plasmática
RE	Retículo endoplásmico
ROI	Regiones de interés
RT – PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SAH	S-adenosilhomocisteína
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarco/endoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
SLC	SoLuteCarrier
SOCE	Canales operados por depósitos intracelulares
SPCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> de la vía secretora
STIM1	Molécula de interacción estromal 1
Tipo-L	Canal de calcio dependiente de voltaje de tipo L
TNE	Tumor neuroendocrino
TPC	Canal de dos poros
TRPM8	Receptor de potencial transitorio melastatina 8
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1
TRPV6	Receptor de potencial transitorio vaniloide 6
TTF-1	Factor de transcripción tiroidea 1
UTP	Uridina trifosfato

## RESUMEN

La adenosina es una molécula ubicua que se obtiene a partir de la hidrólisis de nucleótidos de adenina. Los receptores de adenosina P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ), pertenecen a la familia de receptores purinérgicos y son receptores acoplados a proteínas G que se encuentran ampliamente distribuidos en nuestro organismo. Los receptores  $A_1$  son receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ , los receptores  $A_{2A}$  están acoplados a proteínas  $G_s$ , los receptores  $A_{2B}$  a proteínas  $G_{s/q}$ , y finalmente los receptores  $A_3$  se encuentran acoplados a proteínas  $G_{i/q}$ . En condiciones fisiológicas la concentración extracelular de adenosina se mantiene en rangos nanomolares, pero en el cáncer, las concentraciones de adenosina pueden llegar a alcanzar rangos micromolares. La adenosina se une a sus receptores en las células del microambiente tumoral (MAT) ejerciendo una variedad de efectos. Se han reportado efectos tanto protumorales como antitumorales en diferentes líneas celulares de cáncer a través de la estimulación de los diferentes subtipos de receptores de adenosina, y un mecanismo mediante el cual se producen estos efectos está relacionado con el cambio en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular. En el presente trabajo se estudió la presencia de receptores de adenosina ( $A_1$  y  $A_3$ ) en una línea celular de cáncer de pulmón murino (LP07) y su participación en los cambios intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia que mostraron la expresión del receptor  $A_1$  en núcleo y citoplasma; y la expresión del receptor  $A_3$  en núcleo, citoplasma y membrana plasmática. También se midieron los cambios intracelulares de  $Ca^{2+}$  como consecuencia de la administración por microperfusión de diferentes concentraciones de adenosina (100nM, 300nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30 $\mu$ M y 100 $\mu$ M) observándose un aumento con todas las concentraciones utilizadas en ausencia y presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, lo que nos indicó que el aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  se debe principalmente a la actividad de los canales de liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplasmático. Finalmente, para confirmar el efecto agonista de la adenosina en los cambios intracelulares de  $Ca^{2+}$  se utilizó un antagonista de receptores de adenosina.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Cáncer**

El cáncer ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad. Los papiros de Smith y Ebers, papiros del antiguo Egipto escritos entre los años 1500-1600 A.C, contienen las primeras descripciones del cáncer de las que se tenga registro escrito (Robinson, 1944). El caso más antiguo de cáncer documentado científicamente es el de un rey Escita de entre 40 y 50 años que se calcula vivió hace más de 2700 años (Faguet, 2015).

### **Definición**

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020) define al “Cáncer” como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. En este amplio grupo de enfermedades, mutaciones genéticas conducen a un crecimiento celular no regulado, la invasión y diseminación de células desde un sitio de origen, o sitio primario, hacia otros sitios del organismo (Pecorino, 2012; Karp et al., 2015).

Los dos principales tipos de genes mutados que contribuyen al desarrollo del cáncer son proto-oncogenes, que en su estado mutado reciben el nombre de oncogenes, y los genes supresores de tumores (Zhu et al., 2015).

Alteraciones epigenéticas como metilación del ADN, modificaciones de la cromatina, posicionamiento de nucleosomas y alteraciones en los perfiles de ARN no codificantes también pueden contribuir a la iniciación y progresión del cáncer (Kanwal, 2015)

### **Características distintivas del cáncer**

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron agrupar seis características distintivas del cáncer, las cuales comprenden aquellas alteraciones fisiológicas adquiridas por la célula cancerosa durante el desarrollo y progresión de la enfermedad. En una nueva revisión,

realizada once años después, los autores propusieron agregar cuatro características adicionales (Hanahan & Weinberg, 2000; 2011) (Figura 1).



**Figura 1. Características distintivas del cáncer.** (Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).

## Clasificación

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, por sus siglas en inglés) clasifica a los diferentes tipos de cáncer, dependiendo del tipo de tejido en el que se origina, en seis diferentes categorías: carcinomas, sarcomas, linfomas, mielomas, leucemias y de tipo mixto.

Los carcinomas se originan en células epiteliales de la piel, tracto gastrointestinal, órganos internos y otros sitios anatómicos; los sarcomas proceden de músculos, tejido adiposo, hueso o vasos sanguíneos y los linfomas se originan en el tejido linfóide (Carbone, 2020).

Los mielomas, linfomas y leucemias incluyen una variedad de tipos de cáncer que se originan en las células sanguíneas de la médula ósea o del sistema linfático (Taylor et al., 2017)



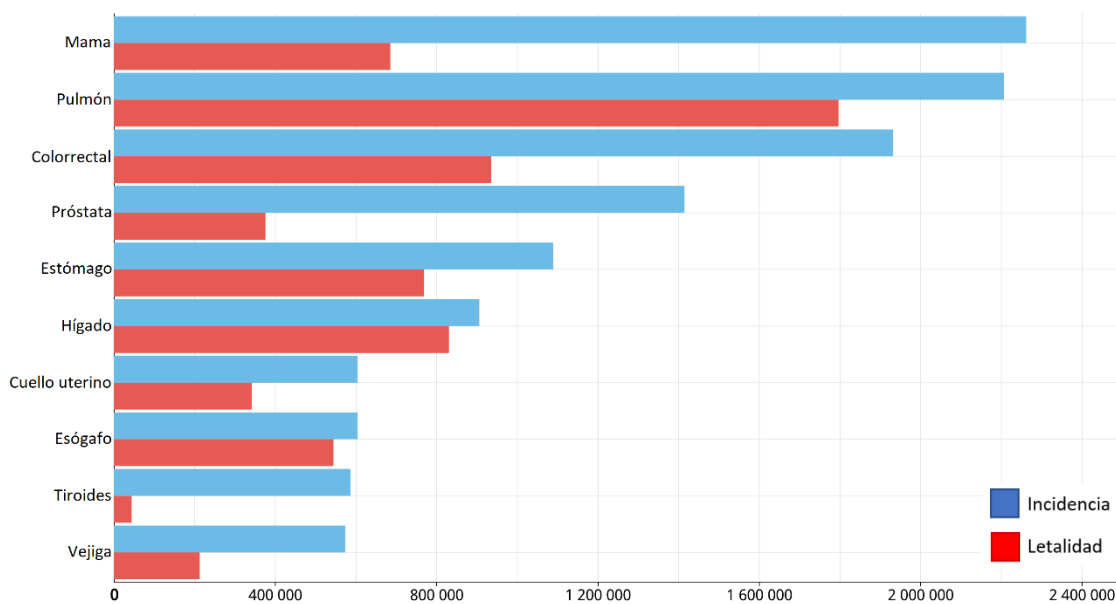
## Epidemiología

### En el mundo

Se estima que durante el año 2020 se presentaron 18,094,716 de casos nuevos de cáncer y 9,894,402 de muertes por cáncer en el mundo (GLOBOCAN, 2020).

El cáncer con mayor incidencia en el mundo fue el de mama con 2,261,419 casos (12.5%), seguido por el de pulmón con 2,206,771 casos (12.2%) y el colorrectal con 1,931,590 casos (10.7%).

El cáncer de pulmón fue la principal causa de muerte por cáncer con 1,796,144 muertes (18.2%), seguido por el colorrectal con 935,173 muertes (9.5%) y el de hígado con 830,180 muertes (8.4%) (Figura 2).



**Figura 2. Número estimado de nuevos casos y muertes ocasionados por cáncer en todo el mundo durante el año 2020, ambos sexos, todas las edades. (GLOBOCAN, 2020).**

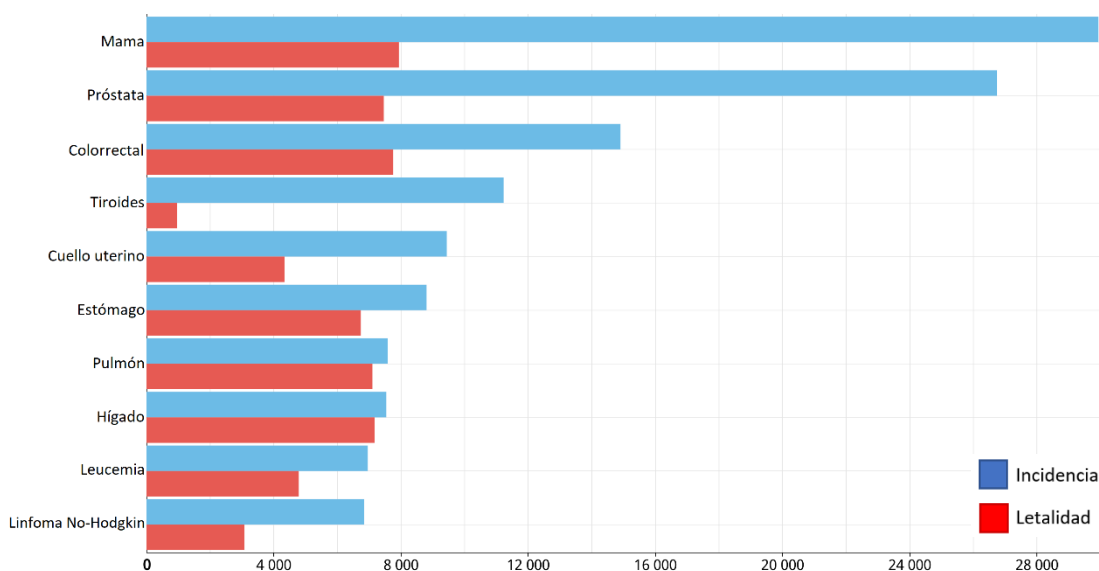
### México

En México durante el año 2020 se presentaron 186,746 nuevos casos de cáncer y 89,172

muerres por cáncer. (GLOOBCAN, 2020).

El cáncer con mayor incidencia en México fue el de mama con 29,929 casos (16.0%), seguido por el de próstata con 26,742 casos (14.3%) y por el colorrectal con 14,901 casos (8.0%).

El cáncer de mama fue la principal causa de muerte por cáncer con 7931 muertes (8.9%), seguido por el colorrectal con 7755 muertes (8.7%) y el de próstata con 7457 muertes (8.4%) (Figura 3).



**Figura 3. Número estimado de nuevos casos y muertes ocasionados por cáncer en México durante el año 2020, ambos sexos, todas las edades.** (GLOBOCAN, 2020).

### Cáncer de pulmón

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer pulmonar como aquel tumor que se origina en el epitelio respiratorio (bronquios, bronquiolos, alvéolos).

### Etiología

El tabaquismo es la principal causa de cáncer de pulmón. Fumar cigarrillos causa todos los tipos de cáncer de pulmón, pero está más estrechamente relacionado con el cáncer de

pulmón de células pequeñas (CPCP) y el carcinoma de células escamosas; el adenocarcinoma es el tipo más común en pacientes que nunca han fumado (Herbst, 2008).

Se han identificado más de 8700 componentes químicos en el humo del cigarrillo. (Stabbert et al., 2017). De estos componentes químicos, hay 72 carcinógenos completamente caracterizados, entre los cuales se sabe que al menos 20 causan tumores pulmonares en animales de laboratorio (Hecht et al., 2017).

La exposición a diferentes carcinógenos puede provocar alteraciones genéticas en las células pulmonares, como lo son la activación de oncogenes de la familia MYC, RAS y BRAF, así como la mutación y amplificación de genes como EGFR, HER2, ALK, MET y PIK3CA. Sekido, 2003; Herbst, 2008). Esta exposición, también puede conducir a la mutación de genes protectores, encargados de la reparación de las alteraciones del ADN y el control de la multiplicación celular, como los genes supresores de tumores p53, p14ARF, p16INK4a, RB, FHIT, RASSF1A y LRP1B (Camargo, 2019).

### **Factores de riesgo**

Además del tabaquismo, se han identificado otros factores de riesgo del cáncer de pulmón como la exposición al humo de segunda mano, la quema de biomasa, la contaminación del aire, la exposición a uranio, radio y radón, así como las exposiciones ocupacionales a asbesto, arsénico, berilio, cadmio, éter bis(clorometílico), níquel y sílice (Bade y de la Cruz, 2020).

Enfermedades respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis pulmonar predisponen a los pacientes a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, especialmente cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (Barreiro, 2019).

### **Clasificación**

El cáncer de pulmón se clasifica tradicionalmente en cáncer de pulmón de células no

pequeñas (CPCNP) y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), el primero representa el 85% de los casos y el segundo el 15% restante (Inamura, 2017). Las formas más comunes de CPCNP incluyen al adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes.

## Epidemiología del cáncer de pulmón

### En el mundo

En los últimos años se ha ido presentado un aumento en el consumo de tabaco y en el número de casos y muertes por cáncer de pulmón, sobre todo en los países en desarrollo. Hasta el 80% de los fumadores actuales viven en países de ingresos bajos o medianos, y más de la mitad de las muertes por cáncer de pulmón se producen en las regiones menos desarrolladas (Bade y de la Cruz, 2020)

Se estima que durante el año 2020 se presentaron 2,206,771 nuevos casos de cáncer de pulmón en el mundo, ocupando el segundo lugar en incidencia de cáncer a nivel mundial, solo por detrás del cáncer de mama (Tabla 1). Del total de casos, 1,435,943 se registraron en hombres y 770,828 en mujeres, los cuales representaron el 65% y 35% respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

**Tabla 1. Los 10 primeros lugares en número de nuevos casos de cáncer en el mundo durante el año 2020.** (GLOBOCAN, 2020).

Sitio del cáncer	No. de casos nuevos (% de todos los sitios)
<b>Mama</b>	2,261,419 (12.5)
<b>Pulmón</b>	2,206,771 (12.2)
<b>Colorrectal</b>	1,880,725 (10.7)
<b>Próstata</b>	1,414,259 (7.8)
<b>Estómago</b>	1,089,103 (6.0)
<b>Hígado</b>	905,677 (5.0)
<b>Cuello uterino</b>	604,127 (3.3)
<b>Esófago</b>	604,100 (3.3)
<b>Tiroides</b>	586,202 (3.2)
<b>Vejiga</b>	573,278 (3.2)

Ese mismo año se presentaron 1,796,144 muertes por cáncer de pulmón en el mundo, ocupando el primer lugar en letalidad por cáncer a nivel mundial (Tabla 2). Del total de muertes, 1,188,679 se registraron en hombres y 607,465 en mujeres, las cuales representaron el 66% y 34% respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

**Tabla 2. Los 10 primeros lugares en número de muertes por cáncer en el mundo durante el año 2020.** (GLOBOCAN, 2020).

Sitio del cáncer	No. de muertes (% de todos los sitios)
<b>Pulmón</b>	1,796,144 (18.2 )
<b>Colorrectal</b>	935,173 (9.5)
<b>Hígado</b>	830,180 (8.4)
<b>Estómago</b>	768,793 (7.8)
<b>Mama</b>	684,996 (6.9)
<b>Esófago</b>	544,076 (5.5)
<b>Páncreas</b>	466,003 (4.7)
<b>Próstata</b>	375,304 (3.8)
<b>Cuello uterino</b>	341,831 (3.4)
<b>Leucemia</b>	311, 594 (3.1)

### México

Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2018) en México hay 14,820,107 de fumadores, 10,652,720 de hombres y 4,167,375 de mujeres. Las muertes por cáncer de pulmón son más frecuentes en hombres e individuos de mayor edad, con más del 50% de todas las muertes en pacientes mayores de 70 años, y afectan con mayor frecuencia a la región norte del país. Además, el 80% de todas las muertes se registran en pacientes que residen en regiones urbanas (Arrieta et al., 2019).

Se estima que durante el año 2020 se presentaron 7,588 nuevos casos de cáncer de pulmón en México, ocupando el séptimo lugar en incidencia de cáncer a nivel nacional (Tabla 3). Del total de casos, 4,503 se registraron en hombres y 3,085 en mujeres, los cuales representaron el 59% y 41%, respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

**Tabla 3. Los 10 primeros lugares en número de nuevos casos de cáncer en México durante el año 2020.** (GLOBCAN, 2020).

Sitio del cáncer	No. de casos nuevos (% de todos los sitios)
<b>Mama</b>	29,929 (16.0)
<b>Próstata</b>	26,742 (14.3)
<b>Colorrectal</b>	14,901 (8.0)
<b>Tiroides</b>	11,227 (6.0)
<b>Cuello uterino</b>	9,439 (5.0)
<b>Estómago</b>	8,804 (4.7)
<b>Pulmón</b>	7,588 (4.1)
<b>Hígado</b>	7,536 (4.0)
<b>Leucemia</b>	6,955 (3.7)
<b>Linfoma no Hodgkin</b>	6,840 (3.7)
<b>Otros</b>	59,627 (30.5)

Ese mismo año se presentaron 7,100 muertes por cáncer de pulmón en México, ocupando el quinto lugar en letalidad por cáncer a nivel nacional (Tabla 4). Del total de muertes, 4,304 se registraron en hombres y 2,796 en mujeres, las cuales representaron el 61% y 39% respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

**Tabla 4. Los 10 primeros lugares en número de muertes por cáncer en México durante el año 2020.** (GLOBCAN, 2020).

Sitio del cáncer	No. de muertes (% de todos los sitios)
<b>Mama</b>	7,931 (8.9)
<b>Colorrectal</b>	7,755 (8.7)
<b>Próstata</b>	7,457 (8.4)
<b>Hígado</b>	7,175 (8.0)
<b>Pulmón</b>	7,100 (8.0)
<b>Estómago</b>	6,735 (7.6)
<b>Leucemia</b>	4,786 (5.4)
<b>Páncreas</b>	4,720 (5.3)
<b>Cuello uterino</b>	4,335 (4.9)
<b>Riñón</b>	3,083 (3.4)
<b>Otros</b>	28,330 (31.4)

## **Diagnóstico**

El método auxiliar más importante en el diagnóstico y clasificación del cáncer de pulmón es la inmunohistoquímica (IHC). La IHC se usa de forma rutinaria en la práctica clínica para diagnosticar el cáncer de pulmón, particularmente en biopsias pequeñas o muestras citológicas y tumores poco diferenciados (Yatabe et al., 2019).

Las biopsias y muestras citológicas para el estudio inmunohistoquímico pueden ser obtenidas por citología de esputo, toracocentesis, biopsia de ganglio linfático accesible, broncoscopia, aspiración con aguja transtorácica, toracoscopia asistida por video o toracotomía (Collins et al., 2007)

Los marcadores IHC utilizados para determinar la diferenciación del adenocarcinoma incluyen TTF-1 y NapsinA. En el carcinoma de células escamosas, p40, CK5/6, CK5 y p63 son los marcadores comúnmente expresados. Siendo p40 el más preferible para identificar el carcinoma de células escamosas (Zheng, 2016; Yatabe et al., 2019).

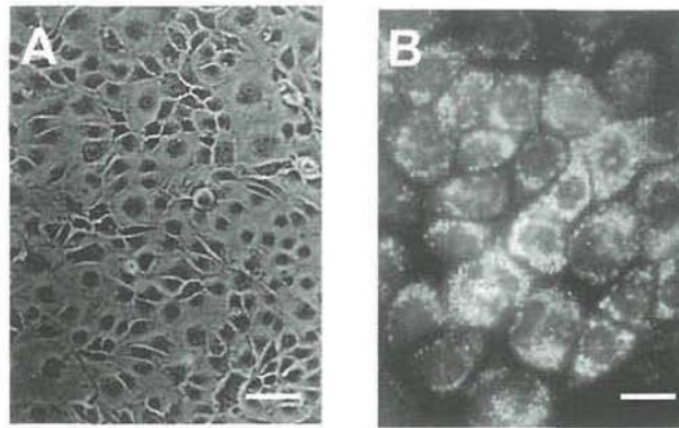
## **Línea celular LP07**

Las líneas celulares son sistemas de modelo *in vitro* que se utilizan ampliamente en diferentes campos de la investigación médica, como herramienta para la investigación básica del cáncer y el descubrimiento de fármacos (Mirabelli et al., 2019)

Se ha visto que los tumores pulmonares espontáneos en ratones son similares en morfología, histopatología y características moleculares a los adenocarcinomas humanos, es por ello que, una gran variedad de modelos pulmonares murinos son utilizados con fines de investigación básica, así como para estudios preclínicos de intervención tumoral. (Meuwissen & Berns, 2005)

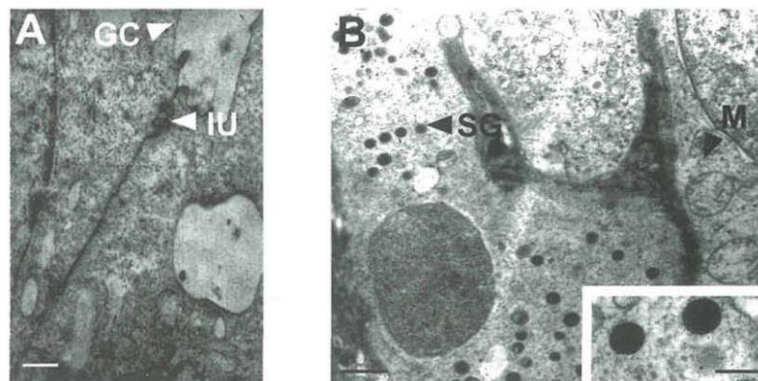
La línea LP07 es una línea celular derivada de un adenocarcinoma de pulmón P07, que apareció espontáneamente en el pulmón de un ratón BALB/c. Morfológicamente son

células epitelioides poliédricas en su mayoría (alrededor del 95%), de tamaño y forma heterogéneos que poseen abundantes gránulos intracelulares secretores. Las células LP07 son anclaje-dependientes, y crecen hasta confluir en una monocapa (Figura 2).



**Figura 2. Características principales de LP07.** A), Microscopía de contraste de fase de células LP07. Las monocapas están compuestas por células poliédricas epitelioides de tamaño y forma heterogéneas, x400. Barra de escala 50 µm. B), células vivas teñidas con acridina naranja (10µg/ml) y observadas con un microscopio de fluorescencia. Las células presentan un gran número de gránulos intracelulares heterogéneos con localización perinuclear citoplásmica, x 1.000. (Tomada de Urtreger et al., 2001).

La observación de las células LP07 con el microscopio electrónico evidencia uniones intercelulares muy rudimentarias y conductos de tipo glandular, así como también, abundantes ribosomas libres, escasas membranas del retículo endoplásmico y mitocondrias con alteraciones morfológicas (Figura 3).



**Figura 3. Microscopía electrónica de la línea celular LP07.** Las células LP07 que crecen in vitro muestran (A), uniones intercelulares (IU) muy rudimentarias y conductos de tipo glandular (GC). (B), Mitocondrias morfológicamente alteradas (M) y gránulos secretores (SG), x7.000. Barra de escala 3 µm. Gránulos secretores encastrados x20.000. Barra de escala 1 µm. (Tomada de Urtreger et al., 2001).



La mayoría de las células LP07 expresan vimentina, y sólo algunas expresan citoqueratinas (CK) y S-100, lo que nos indica un origen epitelio-glandular pero con un bajo grado de diferenciación. (Urtreger et al., 2001).

En estudios *in vivo* se ha observado que la inoculación de ratones BALB/c con células LP07 hace que el huésped desarrolle síndromes paraneoplásicos como caquexia, leucocitosis o hipercalcemia que se observan con frecuencia en pacientes con diversas enfermedades malignas. (Peluffo et al., 2004; Diament, 2006; Penedo-Vázquez et al., 2021).

La expresión de moléculas de adhesión celular neurales (NCAMs) como NCAM-120, NCAM-140 y NCAM-180 también ha sido observada en modelos *in vivo* e *in vitro* (Campodónico et al., 2010).

### **Adenosina**

La adenosina es un nucleósido purínico endógeno, obtenido principalmente por la hidrólisis de nucleótidos de adenina. (Franco et al., 2021). Un nucleósido es una molécula formada por la unión de una base nitrogenada, derivada de purinas o pirimidinas, a una pentosa a través de un enlace N-glicosídico. La base nitrogenada que conforma a la adenosina es una purina, la adenina; y la pentosa corresponde a una ribosa (Bowater & Gates, 2015).

La primera evidencia de la adenosina como una molécula implicada en la fisiología celular se remonta al año 1929, cuando Drury y Szent-Györgyi identificaron a un compuesto de adenina como el responsable del enlentecimiento del ritmo y frecuencia cardíaca (Drury y Szent-Györgyi, 1929). Años más tarde, Burnstock propuso el término de “señalización purinérgica” para hacer referencia a la señalización extracelular mediada por nucleótidos y nucleósidos de purina, que incluyen al ATP, ADP, AMP y adenosina (Burnstock, 1972).

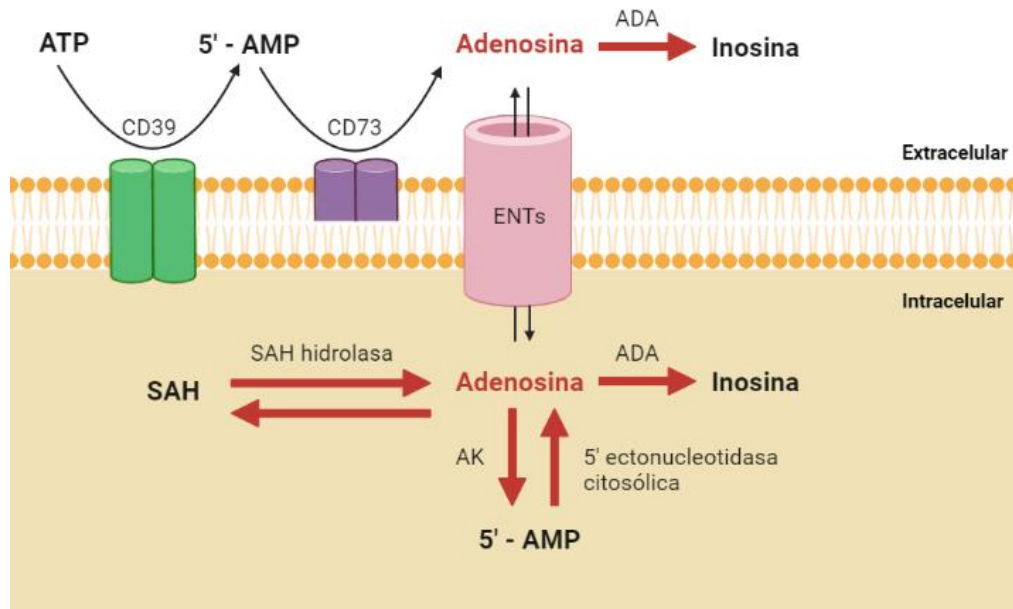
En un principio se propuso a la adenosina como una hormona o como un segundo mensajero, sin embargo, una vez conocido su particular mecanismo de generación, sobre

todo durante condiciones de estrés, hizo que se le considerara como un nuevo tipo de regulador celular acuñándole el termino de “metabolito de represalia” (Newby, 1984)

### **Metabolismo de la adenosina**

Extracelularmente es generada por la desfosforilación del adenosín trifosfato (ATP) a través de las ectoenzimas de la superficie celular CD39 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1) y CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) y su concentración extracelular está regulada dentro de un rango de 30-200 nM (Jeffrey et al., 2020). También puede ser generada intracelularmente a partir de la hidrólisis de adenosín monofosfato (AMP) y S-adenosilhomocisteína (SAH) a través de la enzima endo-5'-nucleotidasa y la enzima SAH hidrolasa, respectivamente (Borea et al., 2018). Puede ser convertida nuevamente a adenosín monofosfato (AMP) por la acción de la enzima adenosina quinasa (AK), o también puede ser convertida a inosina por la acción de la enzima adenosina deaminasa (ADA) (Garcia et al., 2021) (Figura 4).

Las concentraciones extracelulares de adenosina están reguladas por dos grupos de transportadores de membrana que pertenecen a la superfamilia SoLuteCarrier (SLC, por sus siglas en inglés), en particular, a las familias de genes SLC28 y SLC29. Los transportadores de nucleósidos concentrados (CNT, por sus siglas en inglés), codificados por los genes SLC28, son transportadores activos dependientes de  $\text{Na}^+$  y se han identificado 3 subtipos humanos hasta el momento (hCNT1, hCNT2 y hCNT3); mientras que los transportadores de nucleósidos equilibrantes (ENT, por sus siglas en inglés), codificados por los genes SLC29, son transportadores bidireccionales pasivos que transportan adenosina a través de la membrana plasmática a partir de su gradiente de concentración y cuentan con 4 subtipos identificados (hENT1, hENT2, hENT3 y hENT4) (Pastor & Pérez, 2018; Effendi et al., 2020).



**Figura 4. Metabolismo y transporte de adenosina en el medio extra-intracelular.** A nivel intracelular, la adenosina se deriva de S-adenosilhomocisteína (SAH) y es degradada por la adenosina desaminasa (ADA) en inosina y a adenosín monofosfato (AMP) por la adenosina quinasa (AK). Extracelularmente, es generada por CD39-CD73 y convertida en inosina por la adenosina desaminasa (ADA). Los transportadores equilibrantes de nucleósidos (ENTs) permiten el flujo libre de adenosina a través de la membrana celular, siguiendo el gradiente de concentración. (Modificada de Borea et al., 2018) (Creada en BioRender.com)

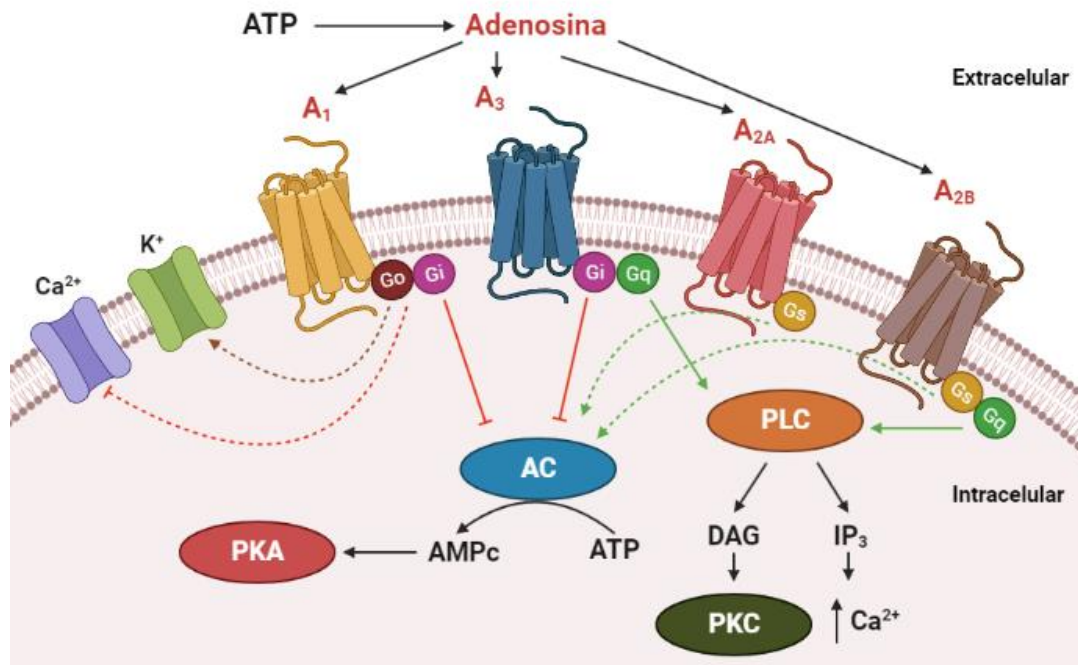
### Receptores de adenosina

Los receptores de adenosina (ARs, por sus sigas en inglés) pertenecen a la familia de receptores purinérgicos, los cuales se dividen en dos tipos: canales iónicos activados por ligandos (P2X) y receptores acoplados a proteínas G (P2Y y P1) (Björkgren y Lishko, 2016). Los receptores P2X son activados por ATP; los receptores P2Y son activados por una amplia gama de nucleótidos, incluido ATP, ADP y UTP, entre otros; y los receptores P1 son activados por adenosina (Burnstock, 2018).

Los receptores P1 (codificados por los genes ADORA1, ADORA2A, ADORA2B y ADORA3) ejercen sus efectos fisiológicos a través de la activación de cuatro subtipos de receptores específicos clasificados como receptor de adenosina A<sub>1</sub> (ADORA1), receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ADORA2A), receptor de adenosina A<sub>2B</sub> (ADORA2B) y receptor de adenosina A<sub>3</sub> (ADORA3) (Franco et al., 2021). Los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> poseen una alta afinidad por la adenosina, mientras que los receptores A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> muestran una afinidad

relativamente menor. Los miembros de esta familia tienen la estructura típica de los receptores acoplados a proteína G, con una  $\alpha$ -helicoidal de siete segmentos transmembranales, un extremo N-terminal extracelular, tres bucles extracelulares, un extremo C-terminal intracelular y tres bucles intracelulares (Piiirainen et al., 2011).

Los ARs están acoplados a diferentes proteínas G, las vías de señalización desencadenadas por la activación de los receptores dependerán del tipo de proteína G a la que este asociada el receptor. Los receptores  $A_1$  están acoplados a proteína  $G_i$ , cuya actividad inhibe a la enzima adenilato ciclasa (AC) disminuyendo la producción de AMP cíclico (AMPC), la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB); también pueden estar acoplados a proteína  $G_o$ , que es una proteína involucrada en la modulación de canales de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ . Los receptores  $A_{2A}$  se acoplan a proteína  $G_s$ , cuya actividad estimula a la AC aumentando el nivel intracelular de AMPC, lo que resulta en la activación de la PKA y la fosforilación de CREB; los receptores  $A_{2B}$  están acoplados a proteínas  $G_s/G_q$  cuya activación estimula a la AC y a la enzima fosfolipasa C (PLC) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ) dando como resultado un aumento del nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC). Finalmente, los receptores  $A_3$  se acoplan a proteínas  $G_i/G_q$ , cuya actividad inhibe a la AC y estimula a la PLC (Van Calker et al., 2019; Sheth et al., 2014)



**Figura 5. Cuatro subtipos de receptores de adenosina y su señalización intracelular.** AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosin trifosfato; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; DAG, diacilglicerol; G, proteína G; IP3, inositol trifosfato; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C. (Modificada de Van Calker et al., 2019) (Creada en BioRender.com)

Además, se ha demostrado que los cuatro ARs están involucrados en las cascadas de señalización mitogénica a través de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), que incluyen a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y p38 MAPK, lo que les confiere un papel importante en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación, apoptosis y respuestas al estrés. (Schulte and Fredholm, 2003; Guo et al., 2020).

### Distribución y expresión de los ARs

La adenosina es una molécula endógena ubicua, por lo que podemos encontrar a sus receptores distribuidos en varias partes del cuerpo desde el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio, el sistema tejido gastrointestinal, el sistema renal, el sistema inmunológico, hasta en los huesos, las articulaciones, los ojos y la piel (Peleti et al., 2017) (Tabla 5).

**Tabla 5. Distribución y expresión de receptores de adenosina.** (Modificado de Sachdeva & Gupta, 2013)

Nivel de expresión	Receptores A <sub>1</sub>	Receptores A <sub>2A</sub>	Receptores A <sub>2B</sub>	Receptores A <sub>3</sub>
<b>Expresión alta</b>	Cerebro (corteza, hipocampo, cerebelo), médula espinal, ojo, glándula suprarrenal, aurículas.	Plaquetas sanguíneas, bulbo olfatorio, bazo, timo, leucocitos	Ciego, colon, vejiga	Testículo (rata), mastocitos (rata).
<b>Expresión media</b>	Otras regiones del cerebro, músculo esquelético, hígado, riñón, tejido adiposo	Corazón, pulmón, vasos sanguíneos, nervios periféricos.	Pulmón, vasos sanguíneos, ojos, mastocitos	Cerebelo, hipocampo
<b>Expresión baja</b>	Pulmón, páncreas	Otras regiones del cerebro	Tejido adiposo, glándula suprarrenal, cerebro, riñón	Tiroides, la mayor parte del cerebro, glándula suprarrenal, bazo, hígado, riñón, corazón

Los ARs presentes en el sistema respiratorio se encuentran distribuidos tanto en vía aérea superior como en vía aérea inferior, localizándose en diferentes sitios (Tabla 6).

**Tabla 6. Distribución y expresión de receptores de adenosina en la vía aérea.** (Burnstock et al., 2012)

Sitio	Receptor expresado
<b>Epitelio nasal</b>	A <sub>2B</sub>
<b>Epitelio traqueal</b>	A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>
<b>Neumocitos tipo 1</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>
<b>Neumocitos tipo 2</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>
<b>Músculo liso</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>
<b>Endotelio</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>

Mediante RT-PCR se ha detectado la presencia de los genes ADORA1, ADORA2A, ADORA2B y ADORA3 en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón humano y murino, y a través de técnicas de inmunofluorescencia se ha confirmado su expresión en las células (Tabla 7)

(Schneider et al., 2015, Otsuki et. al 2012, Kanno et. al 2012, Ryzhov et. al 2018.)

**Tabla 7. Expresión de receptores P1 en líneas celulares humanas y murinas de CPCNP y CPCP.** (Elaboración propia)

Línea celular	Receptor expresado	Referencia
<b>A549</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>	(Kamiya et, al 2012)
<b>HTB177</b>	A <sub>2B</sub>	(Schneider et al., 2015)
<b>HTB183</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>	(Schneider et al., 2015)
<b>CRL5803</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>	(Schneider et al., 2015)
<b>CRL2062</b>	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>	(Schneider et al., 2015)
<b>CRL5853</b>	A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>	(Schneider et al., 2015)
<b>Lu-95</b>	A <sub>3</sub>	(Otsuki et. al 2012)
<b>SBC-3</b>	A <sub>3</sub>	(Kanno et. al 2012)
<b>LLC</b>	A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>	(Ryzhov et. al 2018)

## Adenosina y cáncer

### Microambiente tumoral

El microambiente tumoral consta de todas las interacciones entre las células cancerosas, las células del estroma tumoral que incluyen fibroblastos estromales, células endoteliales y células inmunes como microglía, macrófagos y linfocitos, y los componentes no celulares de la matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina, moléculas, iones, entre otros (Baghban et al., 2020).

La adenosina está presente en altas concentraciones, hasta 1,000–10,000 nM, en el microambiente tumoral (MAT) y se cree que estas altas concentraciones podrían ayudar a la progresión del cáncer (Blay 1997, Chen et al., 2013).

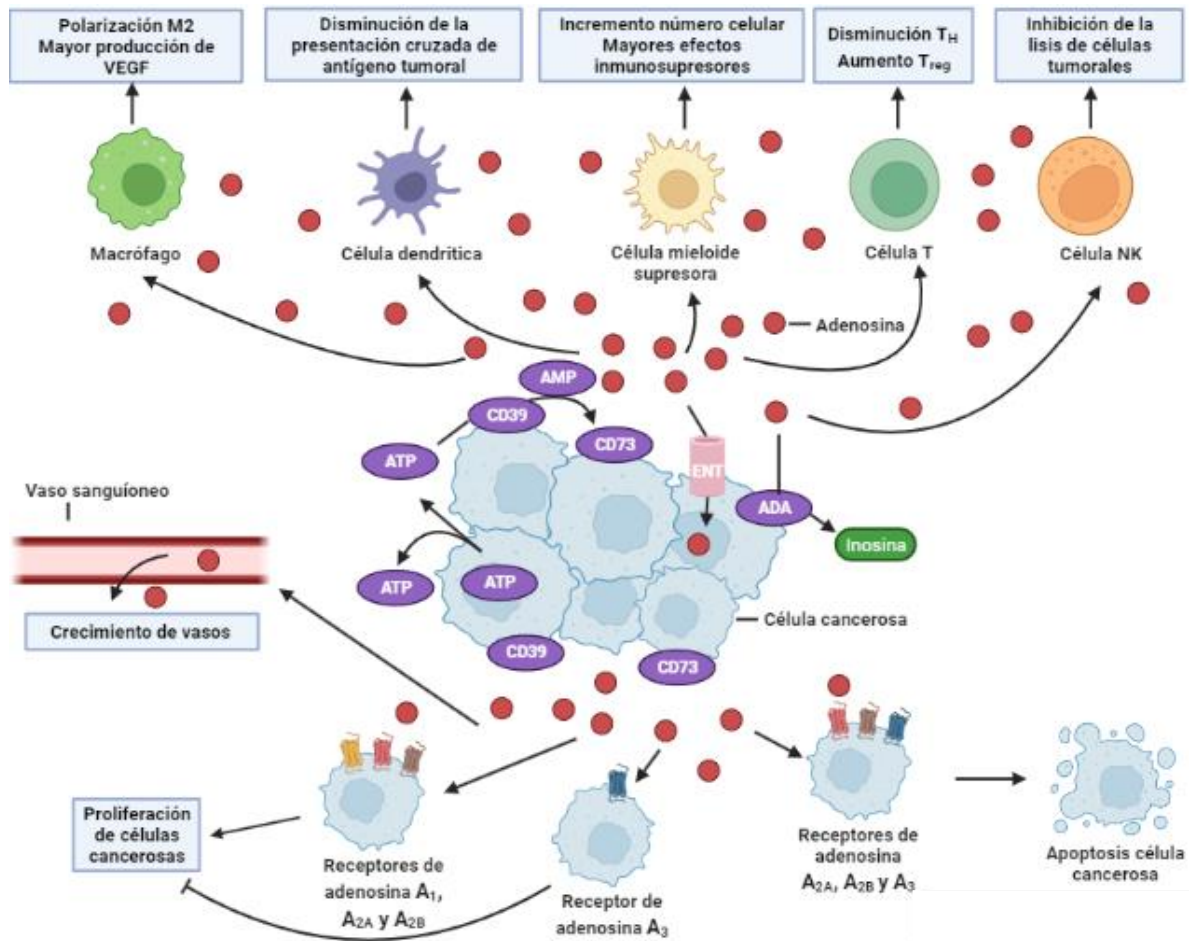
El MAT se caracteriza por ser hipóxico y por haber una gran liberación de ATP por parte de las células que lo conforman (Di Virgilio et al., 2018). Se ha visto que en situaciones de hipoxia el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF1) aumenta la expresión de las ectonucleotidasas CD39/CD73, de los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub>, y regula negativamente a la

adenosina quinasa (AK) inhibiendo la conversión de adenosina a AMP (Ohta, 2016).

En el MAT la adenosina se une a sus receptores presentados en células inmunes y células tumorales, regulando la progresión tumoral y múltiples respuestas inmunes (Feng et al., 2020). La acumulación de adenosina puede favorecer el crecimiento tumoral y la metástasis a través de efectos sobre las células tumorales y el estroma. (Vijayan et al., 2017). La adenosina interfiere en la proliferación de las células cancerosas, la apoptosis y la angiogénesis a través de la activación de sus receptores que se expresan en las células cancerosas y las células endoteliales, respectivamente (Antonioli, 2013).

La señalización a través de los ARs regula al alza una serie de moléculas antiinflamatorias y células inmunorreguladoras, lo que conduce al establecimiento de un entorno inmunosupresor de larga duración (Ohta, 2016). La acumulación de adenosina en tumores sólidos inhibe la síntesis de citocinas, la adhesión de las células inmunitarias a la pared endotelial y la función de las células T, los macrófagos, células dendríticas, células mieloides supresoras y las células NK (Spychala, 2000) (Figura 7)





**Figura 7. Adenosina en el microambiente tumoral.** (Modificada de Antonioli, 2013) (Creada en BioRender.com)

### Receptores de adenosina y cáncer de pulmón

Se han reportado efectos tanto protumorales como antitumorales en diferentes líneas celulares de cáncer a través de la estimulación de los diferentes subtipos de ARs (Gessi et al., 2011; Kazemi et al., 2018; Campos et al., 2020).

Entre las líneas celulares de cáncer de pulmón en las que se han reportado efectos se encuentran las líneas humanas: A549, Lu-95, PC-9 y SBC-3; y la línea murina: LLC. (Tabla 8)

**Tabla 8. Efectos protumorales y antitumorales reportados en líneas celulares de cáncer de pulmón.**

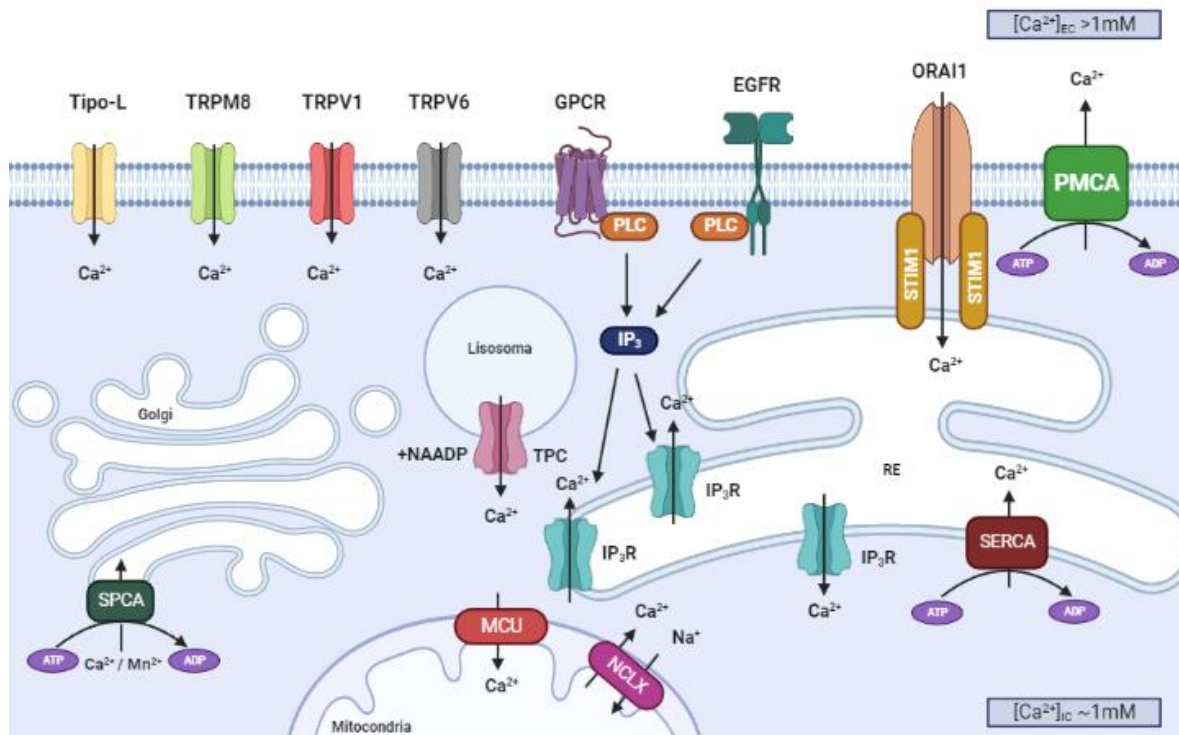
Línea celular	Receptor	Efecto	Referencia
A549	A <sub>3</sub>	Arresto del ciclo celular e inducción de la apoptosis	(Kim et. al 2008)
A549	A <sub>3</sub>	Inducción de la apoptosis	(Kamiya et, al 2012)
A549	A <sub>2A</sub>	Incremento del crecimiento tumoral	(Mediavilla et. al 2013)
A549	A <sub>2B</sub>	Promoción de la transición epitelio mesenquimal	(Giacomelli et. Al 2018)
LLC	A <sub>3</sub>	Inhibición de la proliferación	(Nakamura et. al 2006)
LLC	A <sub>2B</sub>	Incremento del crecimiento tumoral	(Ryzhov et. al 2018)
Lu-95	A <sub>3</sub>	Inducción de la apoptosis	(Otsuki et. al 2012)
SBC-3	A <sub>3</sub>	Inducción de la apoptosis	(Kanno et. al 2012)

## Calcio

El calcio (Ca<sup>2+</sup>), el segundo mensajero más abundante, tiene una diversidad de funciones en la fisiología celular, incluida la expresión génica, el control del ciclo celular, la motilidad celular, la autofagia y la apoptosis. (Cui et al., 2017). El nivel de Ca<sup>2+</sup> libre citosólico es de aproximadamente 100nM, el cual es bajo en comparación con el nivel de Ca<sup>2+</sup> libre en la mayoría de los fluidos extracelulares (> 1mM) (Monteith et al., 2017)

El Ca<sup>2+</sup>, a través de canales iónicos, puede entrar las células para entregar información sin la intermediación de un primer mensajero o también puede actuar como un primer mensajero, al interactuar con un receptor de la membrana plasmática para poner en movimiento las vías de señalización intracelular que involucran al propio Ca<sup>2+</sup>, como sucede en la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup> en las células cardíacas. (Brini et al., 2013)

Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  están reguladas por un repertorio diverso de mecanismos que son conocidas colectivamente como la maquinaria de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ . La maquinaria de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  puede clasificarse en aquellas que elevan el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (como los canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular) y las que reducen el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (como las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y las proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Bruce & James, 2020) (Figura 7)



**Figura 7. Ejemplos de canales y bombas permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , e intercambiadores de la membrana plasmática y orgánulos intracelulares.** Tipo-L, canal de calcio dependiente de voltaje de tipo L; TRPM8, receptor de potencial transitorio melastatina 8; TRPV1, receptor de potencial transitorio vaniloide 1; TRPV6, receptor de potencial transitorio vaniloide 6; GPCR, receptor acoplado a proteína G; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; ORA11, proteína 1 del canal de calcio activado por liberación de calcio; STIM1, molécula de interacción estromal 1; PMCA, bomba de calcio de la membrana plasmática; SPCA, ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la vía secretora; TPC, canal de dos poros;  $\text{IP}_3\text{R}$ , receptor de inositol trifosfato; SERCA, ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico; MCU, uniportador mitocondrial de calcio; NCLX, intercambiador sodio/calcio mitocondrial. (Modificada de Monteith et al., 2017) (Creada en BioRender.com)

## Adenosina y calcio intracelular

Los receptores acoplados a proteínas G desempeñan un papel importante en la regularización de la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , esta regulación es llevada a cabo a través de las rutas de las proteínas  $G_i/G_o$ ,  $G_q$  y  $G_s$ , a las cuales se encuentran acoplados los diferentes subtipos de ARs (Dhyani et al., 2020) (Figura 8, 9 y 10).

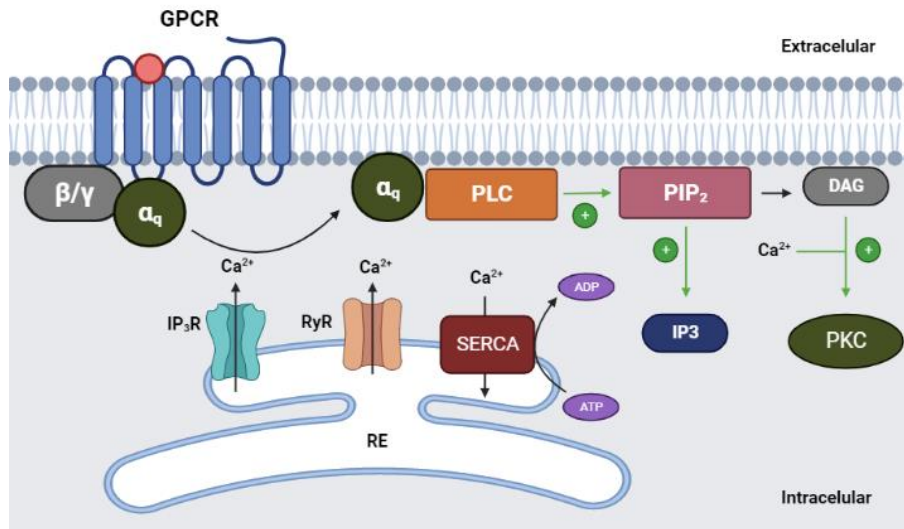


Figura 8. Vía bioquímica y detalles moleculares del control de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de receptores acoplados a proteínas Gq. (Modificada de Dhyani et al., 2020) (Creada con BioRender.com).

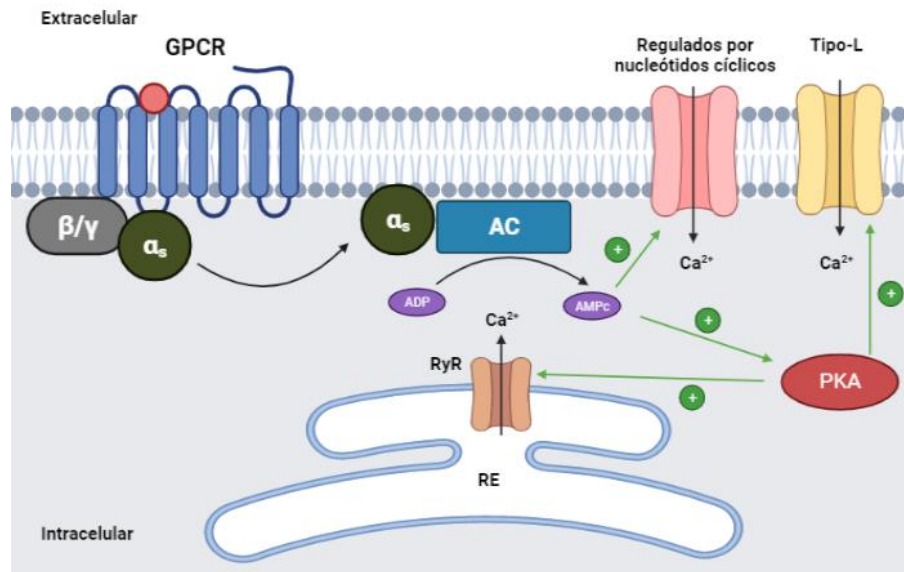
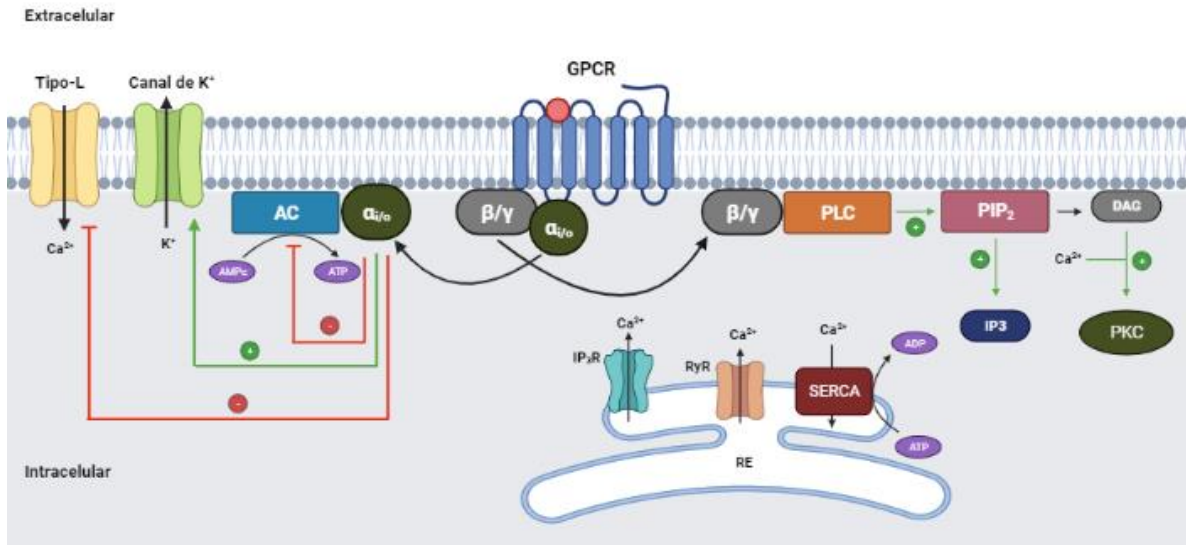


Figura 9. Vía bioquímica y detalles moleculares del control de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de receptores acoplados a proteínas Gs. (Modificada de Dhyani et al., 2020) (Creada con BioRender.com)



**Figura 10.** Vía bioquímica y detalles moleculares del control de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de receptores acoplados a proteínas  $\text{Gi/o}$ . (Modificada de Dhyani et al., 2020) (Creada con BioRender.com).

La adenosina, al unirse a sus diferentes receptores, puede desempeñar un papel importante en el control de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Son varios los estudios en los que se han reportado cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a cambios en el nivel de adenosina extracelular (Tabla 9)

**Tabla 9. Líneas y tipos celulares con cambios reportados en la  $[Ca^{2+}]_i$ , en respuesta a cambios en el nivel de adenosina extracelular.**

Línea o tipo celular	Concentración de adenosina (uM) extracelular	Cambio en la $[Ca^{2+}]_i$	Receptor responsable del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$	Referencia
<b>BTEC (carcinoma de mama humano)</b>	100	Aumento	A <sub>2B</sub>	(Scarpellino et al., 2019)
<b>Astrocitos</b>	0.3, 1, 10, 30 y 100	Aumento	A <sub>2A</sub>	(Doengi et al., 2008)
<b>Neuronas colinérgicas</b>	100	Aumento	A <sub>1</sub>	(Basheer et al., 2002)
<b>Arteriolas aferentes</b>	100	Aumento	A <sub>1</sub>	(Gutiérrez et al., 1999)
<b>Miocito uterino</b>	100	Aumento	A <sub>1</sub> / A <sub>3</sub>	(Tsai et al., 1998)
<b>Neuronas piramidales</b>	50	Aumento	A <sub>3</sub>	(Fleming y Mogul, 1997)
<b>Miocito auricular</b>	0.1 - 100	Disminución	A <sub>1</sub>	(Pelzmann et al., 1995)
<b>Motoneuronas</b>	40	Disminución	A <sub>1</sub>	(Mynlieff y Beam, 1994)
<b>DDTIMF-2 (células del músculo liso)</b>	100	Aumento	A <sub>1</sub>	(Dickenson y Hill, 1993)

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia y con peor pronóstico, además de ser el cáncer con la mayor tasa de mortalidad en el mundo y una de las más altas en México.

La adenosina es un nucleósido que está presente en altas concentraciones en el microambiente tumoral. Se ha demostrado que las células inmunes y tumorales expresan receptores P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) y que la adenosina, a través de ellos, participa en la regulación tumoral. Se han reportado una variedad de efectos protumorales y antitumorales secundarios a la activación de receptores de adenosina. Un mecanismo mediante el cual se producen estos efectos está relacionado con el cambio en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular generados por la unión de la adenosina a sus diferentes receptores.

El empleo de modelos *in vitro*, como la línea celular LP07, que presenta características similares a las células de adenocarcinoma pulmonar humano junto con la utilización de microscopía de epifluorescencia y confocal, nos permitirá estudiar la presencia de receptores de adenosina y los cambios generados en la dinámica de  $Ca^{2+}$  tras su activación, brindando la posibilidad de en un futuro generar un tumor en un modelo *in vivo* donde se puedan realizar experimentos similares a los planteados en este proyecto, situación fundamental para la comprensión de la fisiopatología del cáncer y la generación de nuevas formas de tratamiento o el mejoramiento de algunas ya existentes.

## **HIPÓTESIS**

Los receptores purinérgicos A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> están presentes en la línea tumoral LP07 y su activación genera cambios en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup>.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la presencia de receptores P1 en las células de la línea tumoral LP07 y su participación en la generación de cambios intracelulares de Ca<sup>2+</sup>.

### **Objetivos particulares**

1. Identificar la presencia de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> mediante la técnica de inmunofluorescencia.
2. Medir los cambios en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> como consecuencia de la administración de adenosina.
3. Reconocer si los cambios en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> son dependientes de Ca<sup>2+</sup> extracelular.
4. Reconocer si el bloqueo de los receptores de adenosina modifica los cambios generados en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> por adenosina.



## METODOLOGÍA

### Cultivo celular

Se utilizó la línea celular LP07. Esta línea celular es una línea tumoral que deriva de un adenocarcinoma de pulmón murino. Las células fueron mantenidas en un medio esencial mínimo (MEM) (Gibco-A1048901-EUA) en frascos T25 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) (Gibco-26140079-EUA) y 1% de antibióticos (estreptomicina con anfotericina b) (Gibco-15240062-EUA). Las células se mantuvieron en una incubadora Thermo Scientific Heracel 150i-EUA a 37 °C con 5% de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

### Inmunofluorescencia

A través de estos experimentos se evaluó la presencia de los receptores A1 y A3 en las células LP07. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) (SigmaAldrich- 158127-EUA) al 4% y posteriormente se permeabilizaron y saturaron los sitios inespecíficos con Tritón (SigmaAldrich-T8787-EUA) al 0.1% disuelto en solución de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (SigmaAldrich-A3294-EUA) al 2% a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo primario (Tabla 9) diluido en solución de BSA al 1% (A1 y A3) y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 9) conjugado a una molécula fluorescente (Abcam-ab150077-EUA) durante dos horas a temperatura ambiente. Por último, se realizó el marcaje de los núcleos con DAPI (Abcam-ab104139-EUA) y el citoesqueleto con faloidina (Abcam-ab176759-EUA) para finalmente sellar la preparación y observarla al microscopio. Entre cada cambio de solución se realizaron tres lavados con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) (Gibco-10010023-EUA).

**Tabla 9.- Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.**

Anticuerpo para el receptor	Marca, número de catálogo y país	Especie huésped	Clonalidad	Isotipo
A <sub>1</sub>	Abcam-ab82477-EUA	Conejo	Policlonal	IgG
A <sub>3</sub>	Abcam-ab197350-EUA	Conejo	Policlonal	IgG

### Determinación del cambio en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> secundario a la activación de receptores de adenosina.

Para la determinación de los cambios en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> se incubaron a las células LP07 con el AM éster de Fluo-4FF (Invitrogen-F23981-EUA) (Tabla 10) a una concentración de 16 µM durante 1 hora y 20 minutos a 37°C. La fluorescencia fue medida en tiempo real empleando el programa ImageMaster versión 1.1 y un microscopio Nikon Eclipse Ti-U (Japón) con sistema de epifluorescencia con filtros (excitación: 470/40; emisión: 510; dicróico: 505nm) acoplado a una cámara CCD IC-200.

**Tabla 10. Especificaciones Fluo-4FF AM**

Máximo de longitud de onda de excitación	Máximo de longitud de onda de emisión	Peso molecular	Fórmula molecular
494 nm	516 nm	1118.89 g/mol C	C <sub>50</sub> H <sub>46</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>

La composición de la solución extracelular (Tabla 11) empleada para realizar las pruebas estuvo compuesta por NaCl, Dextrosa, KCl, HEPES, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>.

**Tabla 11.- Composición solución extracelular células LP07.**

Reactivo	Marca, número de catálogo y país	Peso molecular	Molaridad
NaCl	J.T.Baker- 15528154 -EUA	58.44 g/mol	144 mM
Dextrosa	J.T.Baker-15587934-EUA	180.16 g/mol	5.6 mM
KCl	J.T.Baker-15149145 -EUA	74.55 g/mol	5.4 mM
HEPES	Gibco-11344041-EUA	238.30 g/mol	5.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	J.T.Baker-15587894 -EUA	110.98 g/mol	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	J.T.Baker-10785921-EUA	95.21 g/mol	1.0 mM

Se utilizó un agonista y antagonista de receptores de adenosina (Tabla 12) y se analizó si su aplicación a través de microperfusión genera un cambio en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup>.

**Tabla 12. Especificaciones adenosina y cafeína**

	Adenosina	Cafeína
<b>Peso molecular</b>	267.2413 g/mol	194.19 g/mol
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Marca</b>	SigmaAldrich	SigmaAldrich
<b>Función</b>	Agonista no selectivo de receptores de adenosina (A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> y A <sub>3</sub> )	Antagonista no selectivo de receptores de adenosina (A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> y A <sub>3</sub> )
<b>Uso</b>	Se aplicó por microperfusión en solución extracelular con o sin Ca <sup>2+</sup> durante 90 segundos para activar receptores de adenosina.	Se aplicó por microperfusión en solución extracelular con Ca <sup>2+</sup> durante una hora para bloquear receptores de adenosina.

El análisis de las imágenes obtenidas en estos experimentos se realizó seleccionando las regiones de interés (ROI) mediante el programa de procesamiento digital Image J. Los valores fueron mostrados como  $\Delta F/F_0$ , donde F<sub>0</sub> representa la fluorescencia basal durante los primeros 30 segundos de registro. Se midió el área bajo la curva de la respuesta y la amplitud fue calculada mediante la diferencia entre la respuesta al pico menos la respuesta basal justo antes de aplicar el estímulo.

Se obtuvieron las áreas bajo la curva calculando la integral del punto en donde se inició la respuesta hasta el final de la captura de imágenes. Se calculó con el programa SigmaPlot usando una integral definida:  $\int_b^a f(x)(dx)$  Esta área bajo la curva corresponde a la integral de la respuesta de las células ante el estímulo dado por el agonista en presencia o no del antagonista.

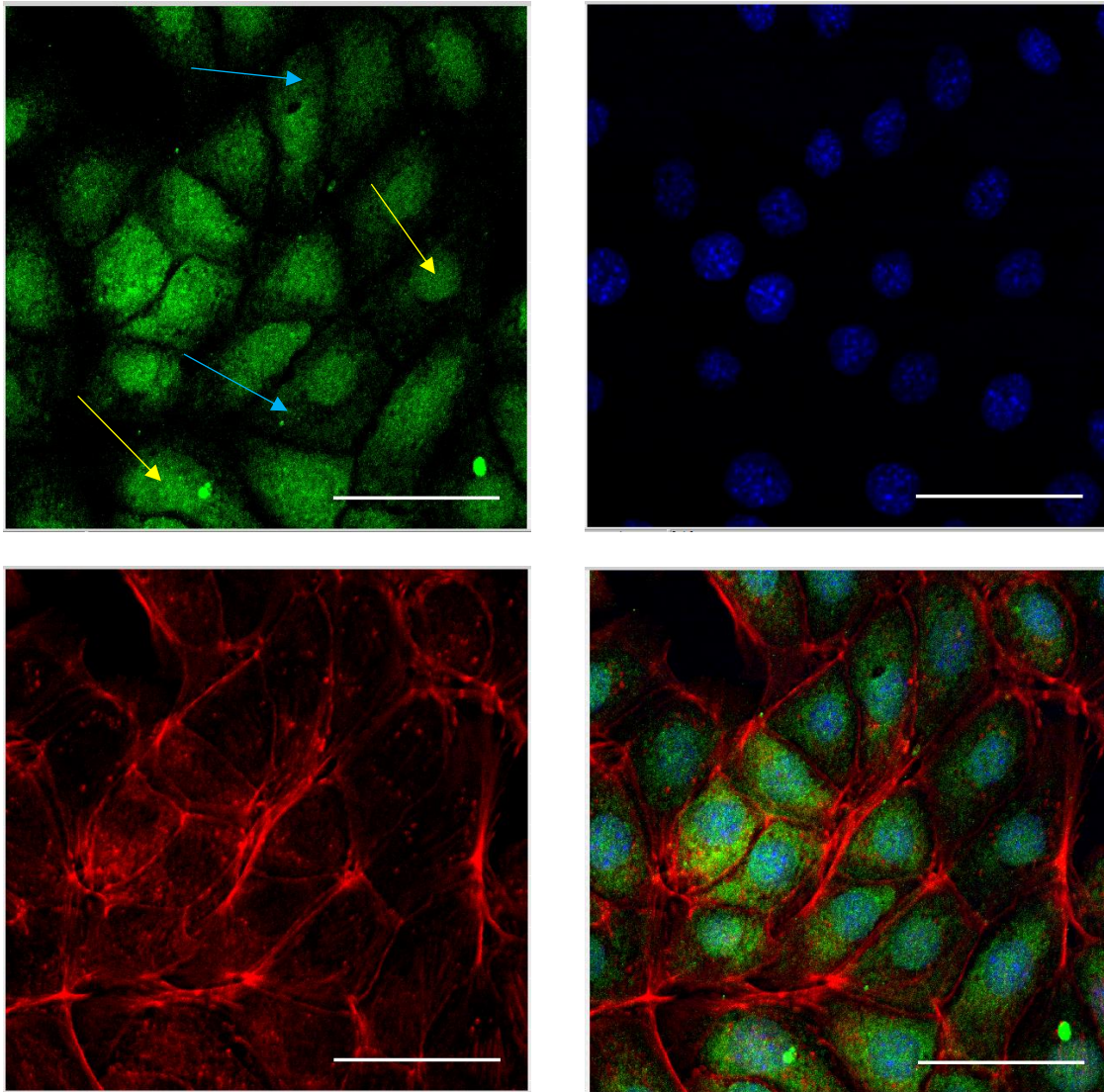
## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En las pruebas estadísticas se consideró una ( $p \leq 0.05$ ) como significancia estadística. Se emplearon las pruebas t de Student y ANOVA de una vía dependiendo del protocolo experimental, para evaluar si existió una diferencia significativa entre los grupos experimentales y control. Las gráficas presentadas muestran el valor  $\pm$  error estándar de la media y su análisis se realizó mediante el programa estadístico SigmaPlot.

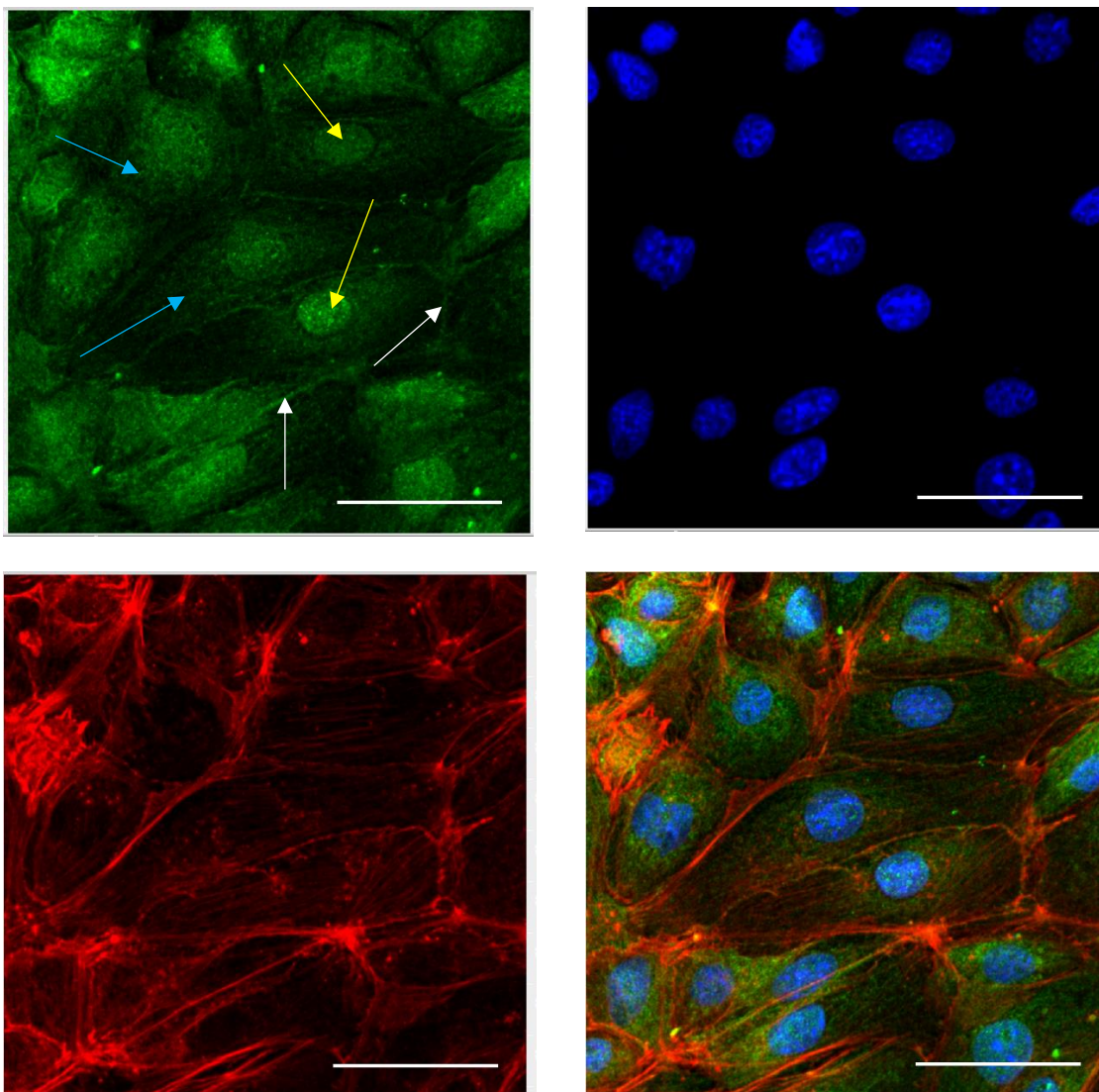
## RESULTADOS

### Inmunofluorescencia

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para identificar la presencia de receptores de adenosina en las células LP07. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal de la expresión del receptor  $A_1$  muestran que se expresa en el núcleo al igual que en el citoplasma (Figura 11). Mientras que el receptor  $A_3$  muestra expresión en núcleo, citoplasma y membrana plasmática (Figura 12).



**Figura 11. Expresión del receptor  $A_1$  en las células LP07.** Se observa el marcaje positivo del receptor  $A_1$  en núcleo y citoplasma de las células LP07. Flechas amarillas: núcleo. Flechas azules: citoplasma. Receptor  $A_1$  marcado con Alexa Fluor 488. Núcleo marcado con DAPI. Citoesqueleto marcado con Faloidina Fluor 647. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

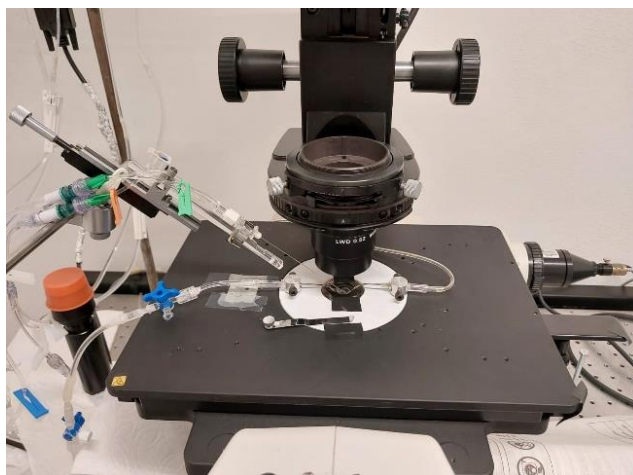
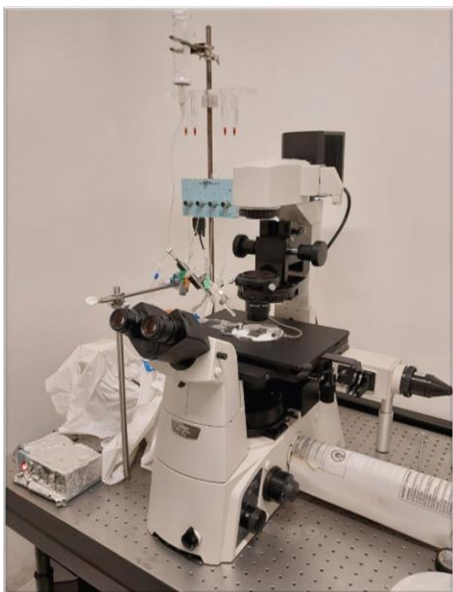


**Figura 12. Expresión del receptor  $A_3$  en las células LP07.** Se observa el marcaje positivo del receptor  $A_3$  en núcleo, citoplasma y membrana de las células LP07. Flechas amarillas: núcleo. Flechas naranjas: citoplasma. Flechas blancas: membrana. Receptor  $A_1$  marcado con Alexa Fluor 488. Núcleo marcado con DAPI. Citoesqueleto marcado con Faloidina Fluor 647. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

### **Realización de cámaras para llevar a cabo experimentos en microscopio de epifluorescencia**

Se diseñaron y fabricaron, para la visualización de células LP07 en el microscopio Nikon Eclipse Ti-U, cámaras especializadas circulares de acrílico de 3.5 cm de diámetro, con espacios que permitían acoplarles un sistema de perfusión y succión. A las cámaras de acrílico se les adaptó un cubreobjetos cuadrado de vidrio de 0.25 mm de grosor, el cual cumplió la función de ser el sustrato de adhesión celular.

Antes de iniciar con los experimentos del proyecto, se estandarizaron las condiciones para el cultivo celular en las cámaras utilizando un medio MEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico en un volumen final de 315  $\mu\text{L}$  por cámara. Para comprobar la eficacia y rendimiento de las cámaras se realizaron pruebas en diversas condiciones utilizando un sistema de 4 válvulas solenoides antirretorno de control manual (on/off) para regular el flujo de la perfusión y microperfusión aplicada a través de una microaguja no biselada de calibre 28G.

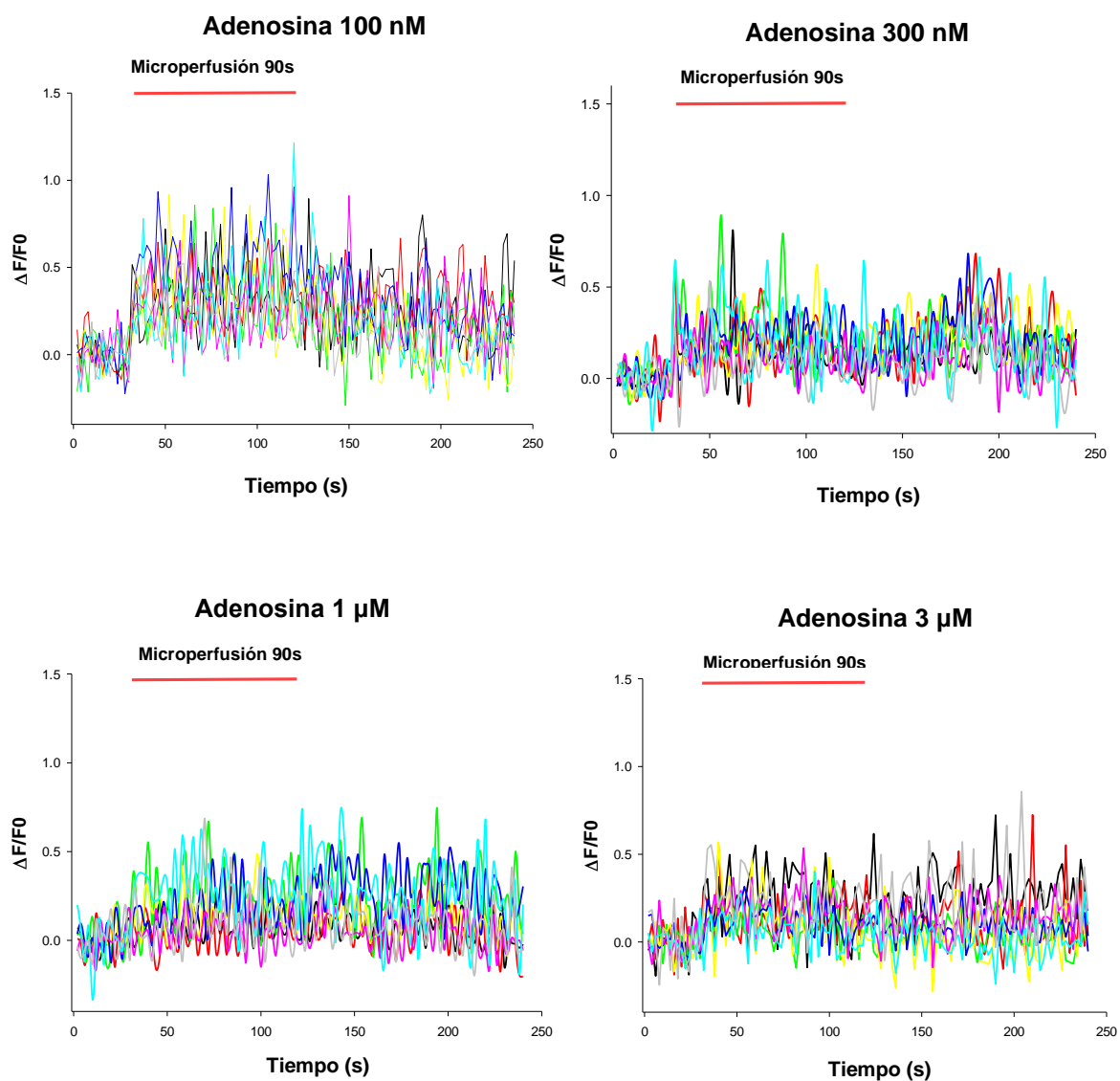


**Figura 13.** Sistema de válvulas solenoides con perfusión y microperfusión acoplada a un microscopio Nikon Eclipse Ti-U para la visualización de cambios de la concentración intracelular de calcio en cultivo celular.

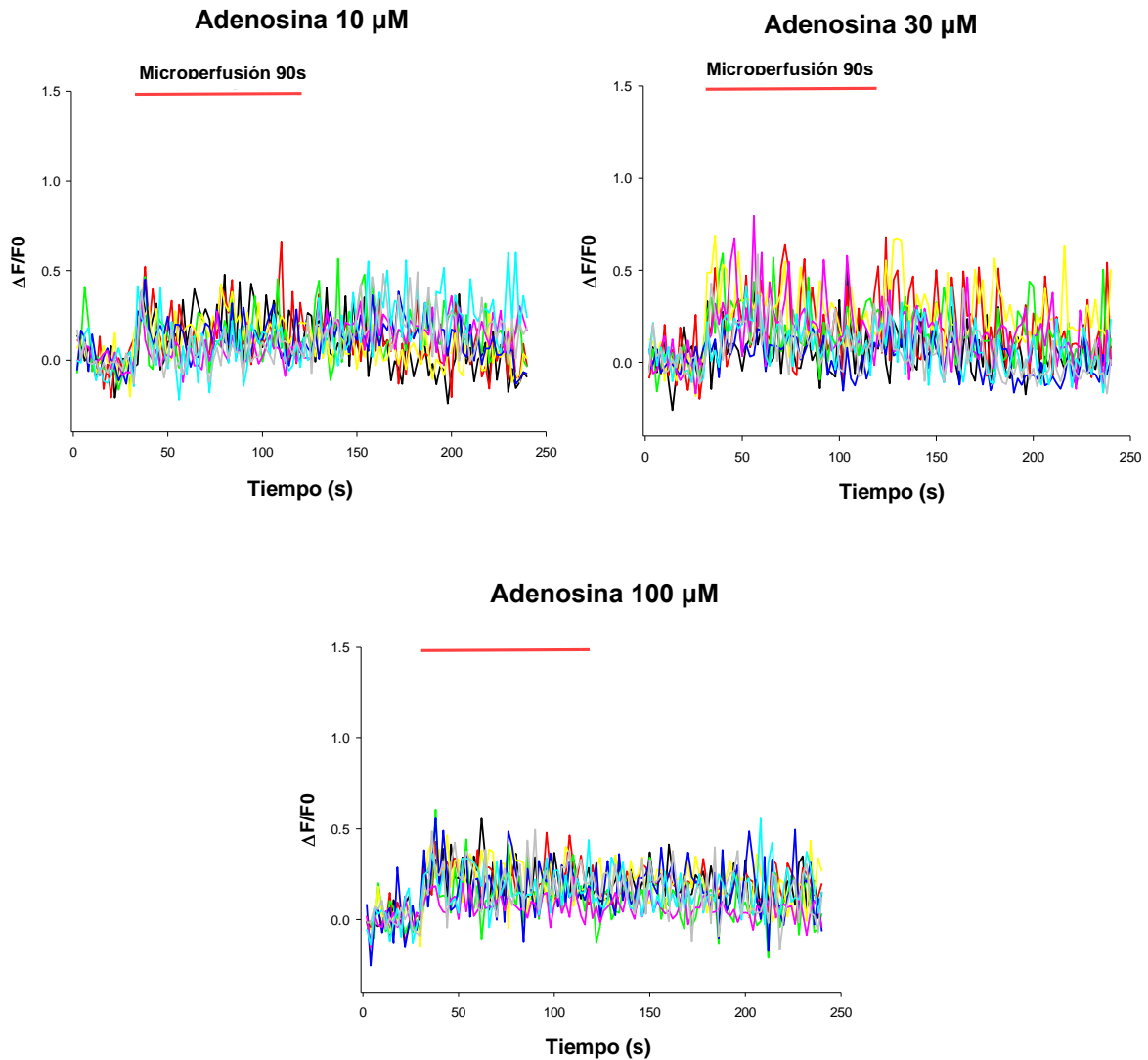
### **Determinación del cambio en el nivel intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ secundario a la activación de receptores de adenosina**

Se realizaron experimentos en el microscopio de epifluorescencia para la determinación de los cambios en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular secundario a la administración de adenosina mediante microperfusión en concentraciones de 100nM, 300nM, 1 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 30 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$  con solución extracelular con  $\text{Ca}^{2+}$ .

El protocolo de administración constó de 240 segundos. Los primeros 30 segundos se tomó captura de control, posteriormente se aplicó adenosina en diferentes concentraciones mediante microperfusión por 90 segundos y finalmente se llevó a cabo un lavado con solución extracelular durante 120 segundos. A continuación, se muestra un gráfico representativo de 8 células y sus cambios de fluorescencia durante el experimento (figura 14)

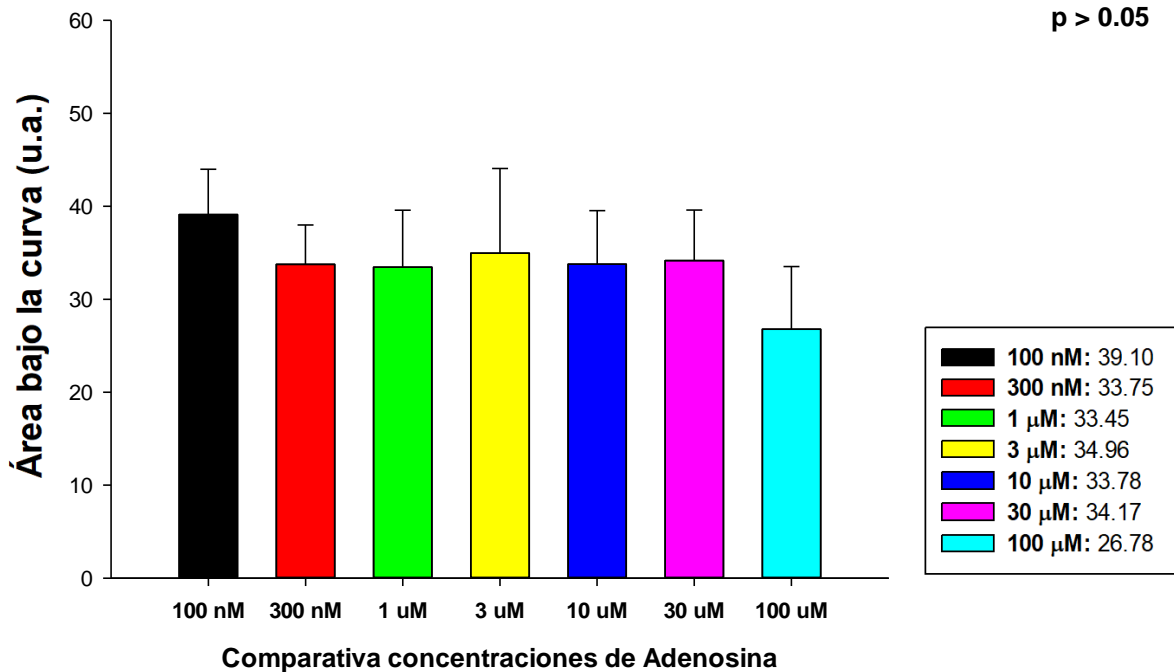






**Figura 14. Incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  secundario a la microperfusión de adenosina.** Gráficas en las que cada línea de diferente color representa el cambio de fluorescencia en una célula diferente al aplicar por 90 segundos adenosina a una concentración de 100nM, 300nM, 1 $\mu\text{M}$ , 3 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 30 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$ .

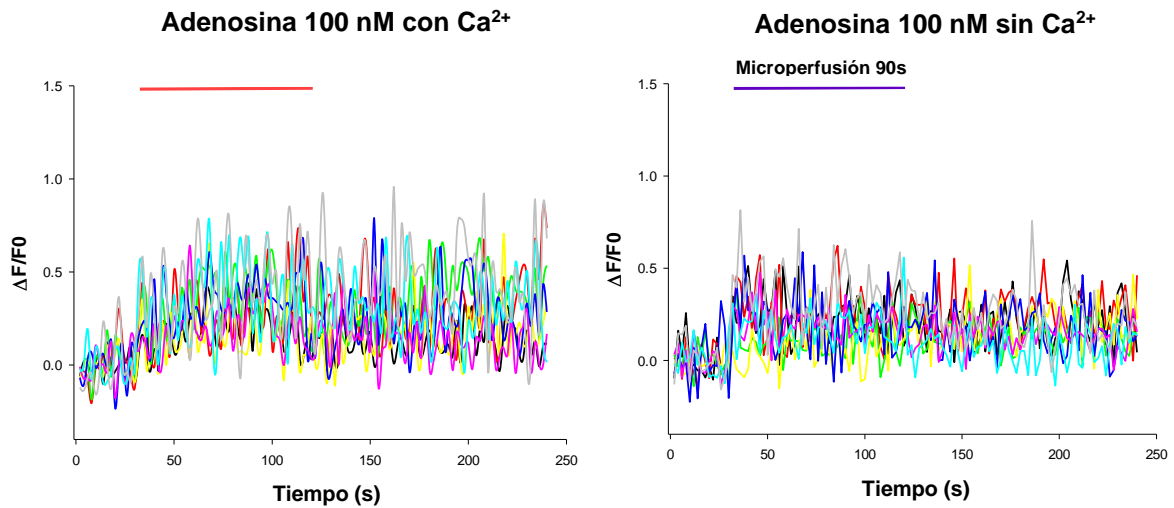
Se realizaron 5 experimentos por concentración (N=5) y en cada uno de ellos se seleccionaron 8 células (n=40). Se calculó por cada concentración, el área bajo la curva de las 40 células, buscando identificar alguna concentración en la que el aumento en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  haya sido mayor con respecto a las demás. (Figura 15).



**Figura 15- Áreas bajo la curva del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en células LP07 estimuladas por adenosina en concentración de 100nM, 300nM, 1μM, 3 μM, 10μM, 30 μM y 100μM.** Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. N = 5, n = 40. Se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía,  $p > 0.05$ .

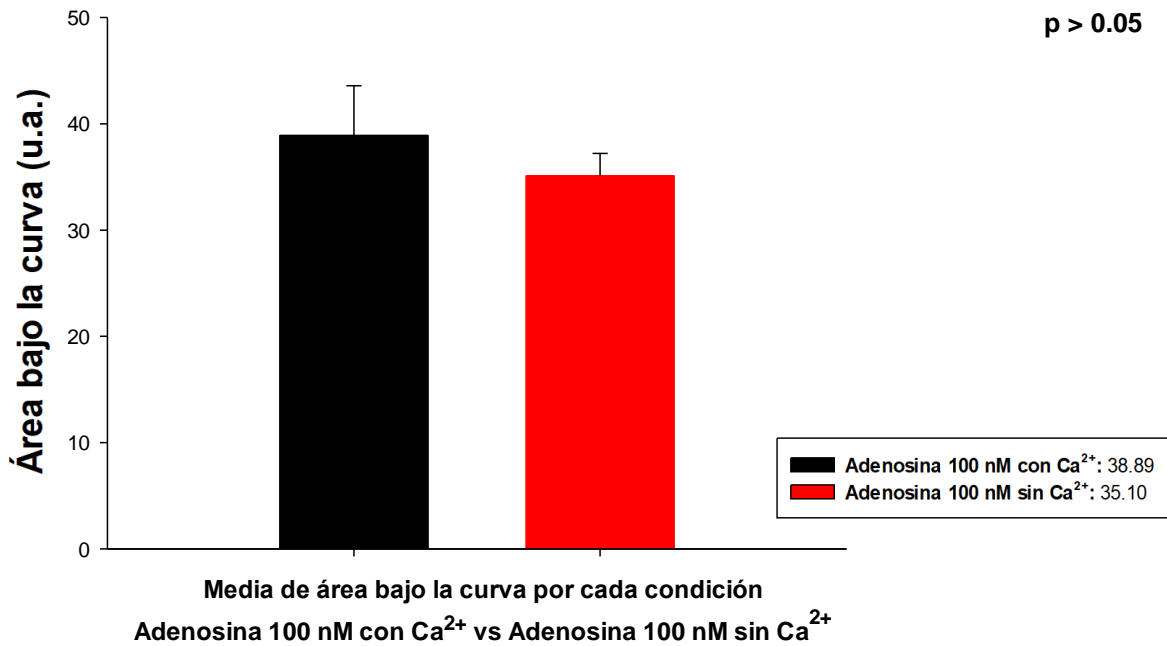
Se compararon las áreas bajo la curva obtenidas para cada concentración en el programa SigmaPlot, donde se obtuvieron las medias siguientes con su error estándar para 100nM,  $39.10 \pm 4.88$ ; 300nM,  $33.75 \pm 4.24$ ; 1μM  $33.45 \pm 6.13$ ; 3μM,  $34.96 \pm 9.10$ ; 10μM,  $33.78 \pm 5.75$ ; 30μM,  $34.17 \pm 5.44$ ; 100μM,  $26.78 \pm 6.73$ . Se realizó análisis de ANOVA de una vía mediante SigmaPlot donde se obtuvo un valor crítico F de 0.340 con 6 grados de libertad, con un valor de  $p > 0.05$ ; es decir, que las medias entre los grupos no son estadísticamente significativas.

Se llevaron a cabo experimentos comparativos entre la aplicación de adenosina 100nM en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. A continuación, se muestra un gráfico representativo de 8 células y sus cambios de fluorescencia durante el experimento (Figura 16).



**Figura 16. Incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  secundario a la microperfusión de adenosina en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular.** Gráficas en las que cada línea de diferente color representa el cambio de fluorescencia en una célula diferente al aplicar por 90 segundos adenosina concentración de 100nM en presencia de  $Ca^{2+}$  (izquierda) y en ausencia de  $Ca^{2+}$  (derecha) extracelular.

Para valorar las diferencias en la respuesta de calcio, se compararon las áreas bajo la curva obtenidas para cada condición. (Figura 17). Se realizó una prueba *t*-Student para determinar si hay cambios estadísticamente significativos entre los dos grupos de estudio. La diferencia en los valores medios de los dos grupos (Adenosina 100nM con  $Ca^{2+}$  cuyo promedio fue  $38.89 \pm 4.68$  contra el Adenosina 100nM sin  $Ca^{2+}$  con valor de  $35.10 \pm 2.12$ ). Se obtuvo un valor *t* de 0.737 con 8 grados de libertad, con un valor de  $p > 0.05$ ; es decir, que las medias entre los grupos no son estadísticamente significativas.



**Figura 17.- Comparativa de media de área bajo la curva del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en presencia y ausencia de calcio extracelular empleando adenosina en una concentración de 100nM.** Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. N = 5, n= 40. Se analizaron mediante la prueba estadística t-Student,  $p > 0.05$ .

También se midieron las intensidades máximas alcanzadas entre las células estimuladas con adenosina 100nM en presencia y ausencia de calcio extracelular. ( $0.72 \pm 0.09$  y  $0.48 \pm 0.04$ , respectivamente), los datos se analizaron mediante la prueba *t* de Student, obteniéndose un valor de *t* de 2.349 con 8 grados de libertad, con un valor de  $p = 0.047$ ; es decir, que las medias entre los grupos son estadísticamente significativas. (Figura 18)

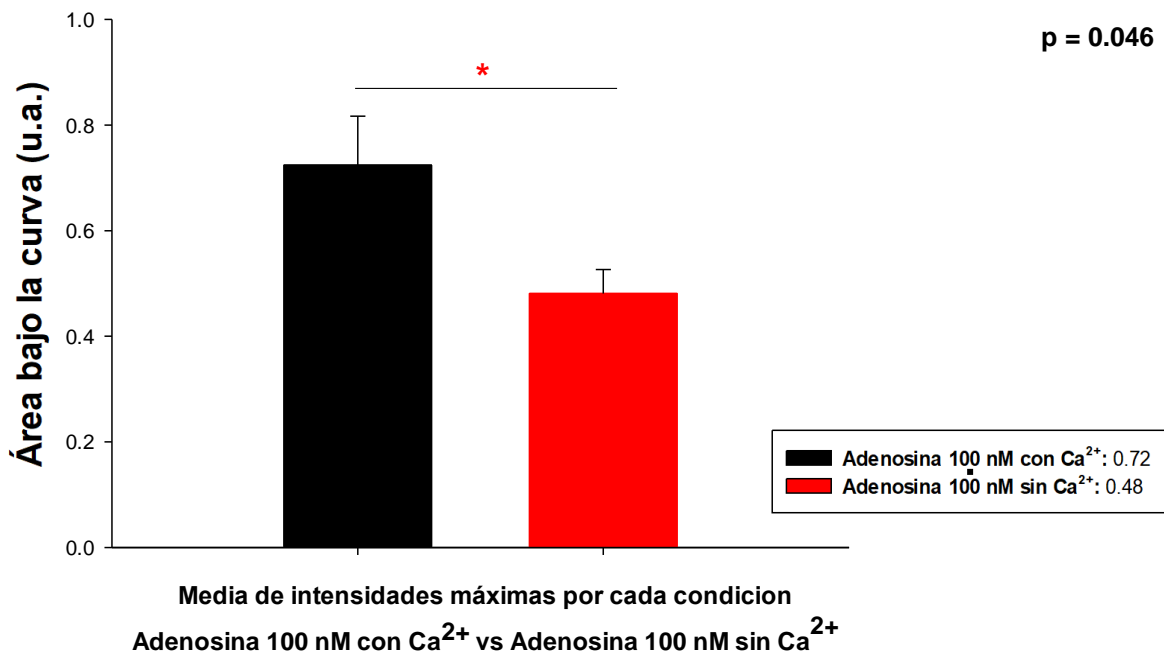
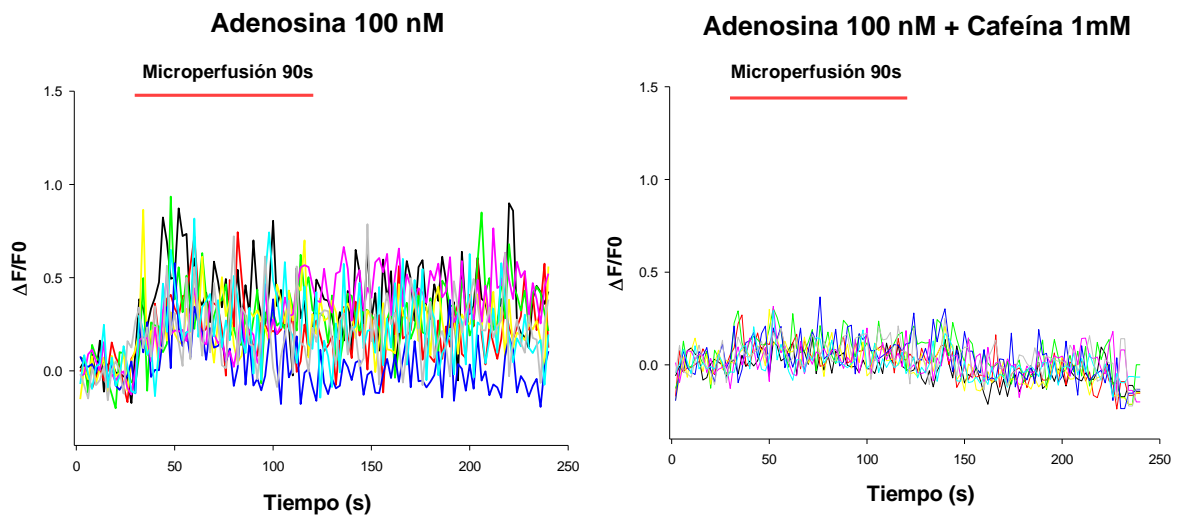


Figura 18.- Comparativa de media intensidades máximas obtenidas en presencia y ausencia de calcio extracelular posterior a la microperfusión con adenosina en concentración de 100nM. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. N = 5, n = 40. Se analizaron mediante la prueba estadística t-Student, p = 0.046

### Cafeína, antagonista de los receptores de adenosina en la línea celular LP07

Se administró adenosina 100nM mediante microperfusión, y después se mantuvieron a las células LP07 durante una hora en presencia de Cafeína 1 mM, un antagonista no selectivo de receptores de adenosina, posteriormente se volvió a administrar adenosina en una concentración de 100nM siguiendo el protocolo establecido en los experimentos previos. Se muestran las gráficas comparativas de referencia que representan 8 células por campo (Figura 19).



**Figura 19.- Incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  secundario a la microperfusion de adenosina después de bloquear a los receptores de adenosina con cafeína 1mM por una hora.** Gráficas en las que cada línea de diferente color representa el cambio de fluorescencia en una célula diferente al aplicar por 90 segundos adenosina concentración de 100nM antes de bloquear a los receptores de adenosina (izquierda) y después de bloquear a los receptores de adenosina (derecha).

Para valorar las diferencias en la respuesta en presencia de Cafeína 1mM, se compararon las áreas bajo la curva obtenidas para cada condición (Figura 20). Se realizó una prueba *t*-Student para observar si hay cambios estadísticamente significativos entre los dos grupos de estudio. La diferencia en los valores medios de los dos grupos (Adenosina 100nM cuyo promedio fue  $35.88 \pm 6.22$  contra el Adenosina 100nM + Cafeína 1mM con valor de  $7.55 \pm 6.40$ ). Se obtuvo un valor *t* de 3.173 con 8 grados de libertad, con un valor de  $p = 0.007$ ; es decir, que las medias entre los grupos son estadísticamente significativas.

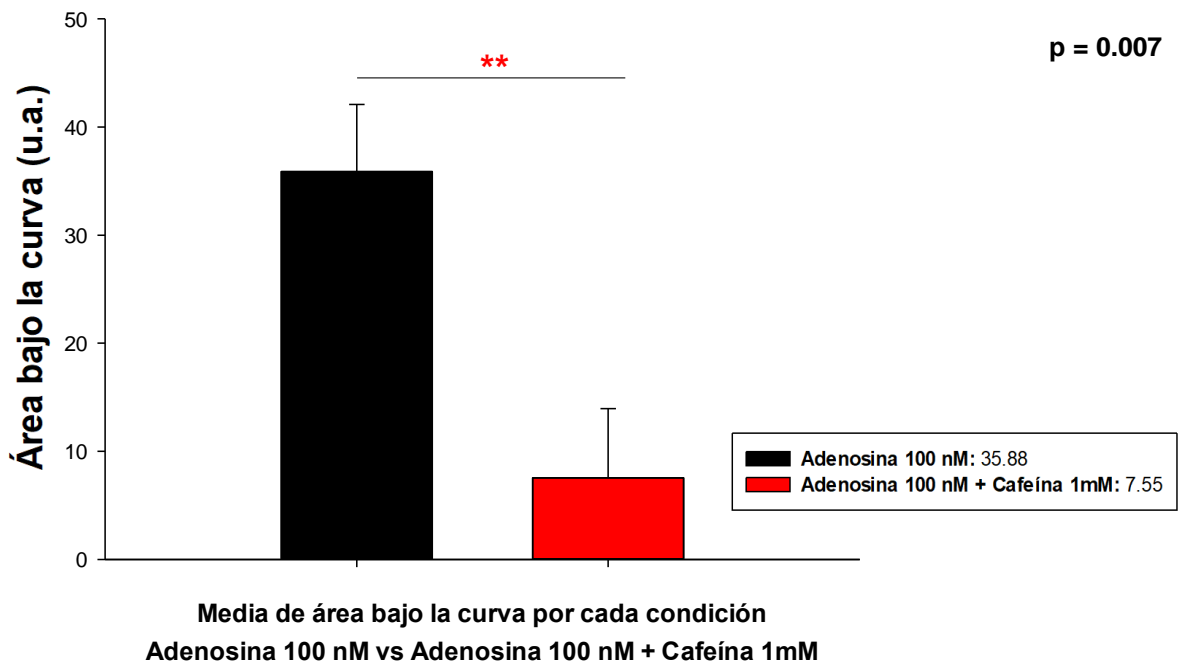


Figura 20.- Área bajo la curva del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  secundario a la microperfusión de adenosina 100nM y adenosina 100nM + cafeína 1mM. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. N = 5, n = 40. Se analizaron mediante la prueba t-Student, p = 0.007.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer corresponde a un amplio grupo de enfermedades que se originan a partir de un crecimiento descontrolado de células. La composición del microambiente tumoral ha demostrado ser primordial en la generación de un medio que facilite este crecimiento descontrolado, los componentes celulares y no celulares que lo integran participan de manera sinérgica en la generación de este entorno favorecedor (Baghban et al., 2020).

Este microambiente tumoral se caracteriza por una concentración inusualmente alta de ATP (Di Virgilio et al. 2018). El ATP puede ser degradado a ADP, AMP o adenosina, mediante un sistema enzimático conocido como ectonucleotidasas (Jeffrey et al., 2020). Los componentes celulares del microambiente tumoral expresan ectonucleotidasas en su membrana plasmática (CD39 y CD73) es por ello, que las concentraciones de adenosina también encuentran elevadas en el microambiente tumoral, encontrándose presente en concentraciones micromolares. (Chen et al., 2013).

Los nucleótidos (ATP, ADP, AMP) y el nucleósido adenosina funcionan como moléculas de señalización que activan a los receptores purinérgicos a través de señalización autócrina y paracrina (Lazarowski, 2012). Además de expresar ectonucleotidasas, las células que integran al microambiente tumoral también expresan receptores purinérgicos en su membrana plasmática. A través de la unión a sus receptores, estos nucleótidos y nucleósidos participan en la regulación de la progresión tumoral (Feng et al., 2020).

Esta regulación es llevada a cabo a través de efectos protumorales y antitumorales. Los efectos protumorales que se han reportado por la activación de receptores de adenosina son: aumento de la proliferación celular, promoción de la progresión del ciclo celular, inhibición de P27, disminución las caspasas, disminución de la apoptosis, aumento de la invasión, aumento de la quimiotaxis y la migración, disminución de la metástasis, aumento de los factores y receptores angiogénicos, aumento del escape inmunológico, aumento la infiltración tumoral de macrófagos, aumento de ERK1/2 y aumento de HIF-1 $\alpha$  (Gessi et al.



2011; Kazemi et al., 2018; Campos et al., 2020).

Entre los efectos antitumorales reportados encontramos: disminución de la proliferación, detención del ciclo celular, aumento de la apoptosis, disminución del crecimiento y de la invasividad del tumor, disminución de la metástasis, disminución de la vascularización y de los factores y receptores angiogénicos, protección de la integridad endotelial y disminución de ERK1/2 (Gessi et al., 2011; Kazemi et al., 2018; Campos et al., 2020).

Es por lo anterior, que la relación que existe entre el cáncer y la señalización purinérgica ha ido tomando un gran interés los últimos años. El interés de este proyecto se centra en el cáncer pulmonar, la señalización purinérgica mediada por adenosina y su participación en la generación de cambios intracelulares de  $Ca^{2+}$ .

La señalización purinérgica en el pulmón sano es fundamental ya que participa en la defensa contra infecciones o sustancias nocivas para el mismo (Lazarowski, 2011). Se ha reportado la distribución y expresión de receptores de adenosina en diferentes sitios de la vía aérea, desde el epitelio nasal ( $A_{2B}$ ) y traqueal ( $A_{2B}$  y  $A_3$ ), en neumocitos tipo 1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) y tipo 2 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ), así como en células de músculo liso ( $A_1$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) y endotelio ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ) (Burnstock et al., 2012)

La afinidad de los receptores de adenosina a este nucleósido no es la misma. Los receptores  $A_1$  presentan la mayor afinidad, mientras que los receptores  $A_{2B}$  presentan la menor afinidad. Las concentraciones efectivas medias ( $EC_{50}$ ) reportadas para cada receptor de adenosina son:  $A_1$  (1-10nM),  $A_{2A}$  (30nM),  $A_{2B}$  (1 $\mu$ m) y  $A_3$  (100nM). (Thompson et al 2021)

Los receptores de adenosina también están presentes en el cáncer pulmonar. Se ha estudiado la expresión de estos receptores mediante RT-PCR e inmunofluorescencia en líneas celulares de cáncer de pulmón humano y murino. Se ha reportado la expresión de receptores de adenosina en las líneas celulares de cáncer de pulmón humana A549 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,

A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>); HTB177 (A<sub>2B</sub>); HTB183 (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>); CRL5803 (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>); CRL2062 (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>); CRL5853 (A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>); Lu-95 (A<sub>3</sub>) y SBC-3 (A<sub>3</sub>). También se ha reportado la expresión de receptores de adenosina en líneas de cáncer de pulmón murino, como en la línea LLC (A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>) (Otsuki et al., 2012, Kanno et al., 2012, Ryzhov et al., 2018.)

En la línea celular LP07 no se habían reportado la expresión de receptores purinérgicos, hasta que en un trabajo realizado en nuestro laboratorio se reportó la expresión de receptores P2 en el núcleo de las células (P2X4, P2X7, P2Y2, P2Y6 y P2Y4), en el citoplasma (P2X7, P2Y6, P2Y2 y P274) y en la membrana plasmática (P2Y2 y P2Y4) (Martinez, 2021)

En el presente trabajo se continuó estudiando la expresión de receptores purinérgicos en la línea celular LP07, concretamente los receptores P1 de adenosina. Encontrando mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta la presencia del receptor A<sub>1</sub> en el núcleo y citoplasma de las células, así como la expresión del receptor A<sub>3</sub> en el núcleo, citoplasma y membrana celular.

El interés de estudiar la expresión de los receptores de adenosina en la línea celular LP07 se basa en el papel que pueden desempeñar en la regulación de la progresión tumoral en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón humano y murino. De manera general, se ha visto que la activación de los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> produce efectos protumorales y que la activación del receptor A<sub>3</sub> produce efectos antitumorales.

El receptor A<sub>2A</sub> promueve el incremento del crecimiento tumoral en las células A549, esto se ha podido comprobar al bloquear selectivamente al receptor, cuando se silencia A<sub>2A</sub> hay un aumento de células apoptóticas y un aumento de la actividad de las caspasas efectoras 3-7. (Mediavilla et al., 2013). Mientras que el receptor A<sub>2B</sub>, promueve en estas células la transición epitelio mesenquimal a través de la activación de la vía cAMP/PKA. (Giacomelli et al., 2018). El receptor A<sub>2B</sub>, también promueve el crecimiento del carcinoma en ratones inoculados con células LLC al aumentar la producción de VEGF (Ryzhov et al., 2018).

En la línea celular A549, el receptor A<sub>3</sub> induce la detención de la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> por regulación a la baja de ciclina D1, c-myc y CDK4. (Kim et al., 2008). También regula al alza la expresión de Bax, Bad y Puma, para interrumpir los potenciales de membrana mitocondrial y activar la caspasa-9 seguida del efector caspasa-3, y de esta forma inducir la apoptosis de las células. (Kamiya et al., 2012). En las células de cáncer de pulmón humano Lu-65, la adenosina induce la apoptosis al aumentar la expresión de la proteína supresora de tumores p53 a través del receptor de adenosina A<sub>3</sub>, promoviendo la transcripción del gen Noxa dependiente de p53, provocando así la activación de la caspasa-9 y el efector caspasa-3. (Otsuki et al., 2012) La adenosina induce la apoptosis de las células SBC-3 al aumentar la expresión de AMID, una proteína inductora de la apoptosis, y promover la translocación de AMID en el núcleo a través del receptor de adenosina A<sub>3</sub>. (Kanno et al., 2012)

La apoptosis puede desencadenarse por diversas señales intracelulares, especialmente el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El aumento de la concentración del Ca<sup>2+</sup> intracelular en las células se logra principalmente mediante el aumento de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática o la liberación de Ca<sup>2+</sup> del almacenamiento interno, como el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias (Bruce & James, 2020).

La sobrecarga y el agotamiento de Ca<sup>2+</sup> en el RE conduce al estrés de este organelo celular. El estrés prolongado estimula la activación de la caspasa-12, una vez activada esta caspasa, actúa sobre la caspasa-9, que a su vez activa la caspasa efectora-3 para inducir la apoptosis. (Orrenius et al., 2003)

La afinidad por el Ca<sup>2+</sup> del uniportador mitocondrial de calcio (MCU) es baja y el tamaño de la reserva de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial es pequeño en condiciones fisiológicas (>100 μM). Sin embargo, pueden acumularse cantidades mucho mayores de Ca<sup>2+</sup> en las mitocondrias cuando las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> aumentan. Una sobrecarga sostenida de

$\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria induce a la producción de especies reactivas de oxígeno, radicales libres y la liberación de citocromo c, que una vez en el citosol activa directamente a la caspasa-9 (Andreyev et al., 2006).

Hay muchos otros objetivos potenciales para la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en la apoptosis. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la calcineurina, una proteína dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina, conducen a alteraciones en la transcripción génica generando la muerte celular. El  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima involucrada en la síntesis de óxido nítrico y la regulación de la apoptosis. La fosfolipasa A (PLA2), enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , participa en la generación de especies reactivas de oxígeno. Miembros de la familia calpaína de cisteína, proteasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , también participan en la apoptosis (Garrido et al., 2006).

Los receptores acoplados a proteínas G, como los receptores de adenosina, pueden participar en la modificación del nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y contribuir de esta forma a la inducción de la apoptosis. Se han observado cambios en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a cambios en el nivel de adenosina extracelular en carcinoma de mama humano (Scarpellino et al., 2019), astrocitos (Doengi et al., 2008), neuronas colinérgicas (Basheer et al., 2002), células de músculo liso (Tsai et al., 1998) neuronas piramidales (Fleming & Mogul, 1997), entre otros. Estos cambios en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se han observado a partir de concentraciones extracelulares de adenosina de 100nM y hasta concentraciones de 100 $\mu\text{M}$ .

En líneas celulares de cáncer de próstata como DU145 y PC3, se ha reportado que la estimulación de receptores purinérgicos acoplados a proteínas G, como los receptores P2Y y P1, induce un aumento rápido y elevado del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Marchetti et al., 2022). En células endoteliales derivadas de tumores también se ha reportado un aumento del calcio citosólico, generado por la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (principalmente RE) y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (Scarpellino et al., 2019). La estimulación de receptores acoplados a proteínas G, en líneas celulares de adenocarcinoma de endometrio,

induce rápidamente la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y regula la expresión de proteínas relacionadas con el  $\text{Ca}^{2+}$  (Huang et al., 2022)

Cabe recalcar que cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  secundarios a la activación de receptores de adenosina no han sido reportados en células de pulmón sanas o tumorales, ya que el principal interés se ha centrado en los receptores purinérgicos P2, de los cuales sí hay reportes de cambios en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  desde hace mucho tiempo (Evans et al., 1999)

Los experimentos que realizamos con la línea celular LP07 mostraron que la aplicación directa de adenosina 100 nM por microperfusión genera un cambio en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto se pudo ver reflejado de forma indirecta mediante el empleo de la sonda de calcio (Fluo-4 FF AM) y la medición de los cambios de fluorescencia. Se realizaron experimentos con concentraciones de mayores de adenosina (300nM, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M), se calculó el área bajo la curva para cada uno de ellos y al compararlos no se apreció una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el aumento del nivel intracelular de calcio respecto a la concentración de 100nM. Estos experimentos fueron realizados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

También pudimos observar que el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico fue de menor magnitud, en comparación a otros experimentos realizados con receptores purinérgicos en el laboratorio, en donde la estimulación de receptores P2, producen un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  de hasta 10 veces más que la estimulación de receptores P1 (Martinez, 2021). Este aumento muy probablemente se relaciona con la presencia de receptores de adenosina  $A_3$  en la membrana plasmática de las células LP07.

Los receptores de adenosina  $A_3$  son receptores acoplados a proteína  $G_q$ , esta proteína estimula a la fosfolipasa C (PLC), quien incrementa la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ).  $\text{IP}_3$  se une a sus receptores ubicados en la membrana del RE

conduciendo a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo de esta manera un aumento del nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para comprobar que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  era secundario a la estimulación de los receptores de adenosina y posterior movilización de este segundo mensajero desde los depósitos intracelulares, se realizaron experimentos comparativos en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Se decidió utilizar para estos experimentos una concentración de 100nM de adenosina, ya que es la  $\text{EC}_{50}$  reportada para los receptores  $\text{A}_3$ , receptores cuya expresión pudimos observar mediante inmunofluorescencia, además de haber sido la concentración a la que se pudo observar un mayor aumento en la fluorescencia en los primeros experimentos.

Se comparó a los experimentos con  $\text{Ca}^{2+}$  contra aquellos sin él y pudimos observar, al realizar el cálculo de área bajo la curva, que no hubo diferencia significativa en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  al estimular las células LP07 mediante microperfusión con una concentración de 100nM. Sin embargo, si hubo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la media de intensidad máxima de fluorescencia alcanzada por las células, siendo mayor la fluorescencia alcanzada en las células con presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

El que haya habido una diferencia significativa en la media de intensidad máxima de fluorescencia alcanzada por las células en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular nos sugiere que muy probablemente algunos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  siguiendo su gradiente de concentración se trasladaron al interior de la célula por canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, al hacer el análisis del área bajo la curva y calcular la media del total del cambio de fluorescencia no se encontró diferencia significativa, lo que nos indica que el aumento del calcio intracelular se debe principalmente a la actividad de los canales de liberación del retículo endoplásmico (RE).

Para confirmar el efecto agonista de los receptores de adenosina sobre los cambios en la

señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se empleó un antagonista. Se utilizó una concentración de 1mM de cafeína, que es un antagonista competitivo no selectivo de todos los subtipos de receptores de adenosina. (Ribeiro & Sebastiao, 2010).

Se ha reportado que la cafeína ejerce sus efectos antagonistas en los receptores de adenosina en concentraciones mayores a  $100\mu\text{M}$  (Fredholm et. al 2011). La cafeína tiene una vida media aproximada de 4 a 9 horas, y es metabolizada por el citocromo P450 (CYP1A2) a diferentes metabolitos activos que incluyen: paraxantina en un 84%, teobromina en un 12% y teofilina en un 4%. (Jovel & Mejía, 2017).

Se realizó una aplicación directa de adenosina 100nM por microperfusión a las células LP07, posteriormente se bloquearon a los receptores de adenosina durante 1 hora con cafeína 1mM, y se volvió a realizar una aplicación de adenosina 100nM durante la cual no se observó un cambio en la fluorescencia.

Finalmente, para corroborar que no hubo un cambio en el nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó el cálculo del área bajo la curva, y las medias de los cambios de fluorescencia de ambas condiciones se compararon encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). De esta forma se pudo confirmar, que la adenosina a través de sus receptores localizados en la membrana de las células LP07 participa en la generación de cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## CONCLUSIONES

- Las células de la línea tumoral LP07 expresan receptores de adenosina A<sub>1</sub> en el núcleo y citoplasma; y receptores A<sub>3</sub> en el núcleo, citoplasma y membrana plasmática.
- La concentración que generó un incremento en el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> fue 100nM, sin apreciarse una diferencia significativa al administrarse concentraciones mayores
- El aumento en el nivel de Ca<sup>2+</sup> intracelular es independiente de la presencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular.
- El efecto de la adenosina sobre la dinámica de Ca<sup>2+</sup> es antagonizado por la cafeína.

## PERSPECTIVAS



Los resultados obtenidos sobre los efectos de la adenosina en la línea celular LP07 dan la pauta para que este proyecto continúe. Para su continuación, se proponen las siguientes perspectivas:

- Identificar la presencia de receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  mediante la técnica de inmunofluorescencia en la línea celular tumoral LP07.
- Identificar la presencia de receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  mediante técnicas moleculares en la línea celular tumoral LP07.
- Realizar experimentos con agonistas y antagonistas selectivos de receptores P1 en la línea celular tumoral LP07 para reconocer la influencia de cada receptor en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular.
- Utilizar la estimulación de receptores P1 en la línea celular tumoral LP07 en conjunto con la terapia fotodinámica para evaluar cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y reconocer su influencia en los efectos de muerte celular.
- Realizar experimento *in vivo* en biomodelo murino (Balb/c) con la intención de evaluar la presencia de estos receptores en un tumor.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

- Andreyev, A., Tamrakar, P., Rosenthal, R. E., & Fiskum, G. (2018). Calcium uptake and cytochrome c release from normal and ischemic brain mitochondria. *Neurochemistry International*, 117, 15-22.
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 13, Issue 12, pp. 842–857). <https://doi.org/10.1038/nrc3613>
- Arrieta, O., Zatarain-Barrón, Z. L., Aldaco, F., Barrón, F., Báez-Saldaña, R., Campos-Gómez, S., Trejo, R., & de la Garza, J. (2019). Lung Cancer in Mexico. In *Journal of Thoracic Oncology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1695–1700). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.05.018>
- Bade, B. C., & dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. In *Clinics in Chest Medicine* (Vol. 41, Issue 1, pp. 1–24). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* 18, 59 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>
- Barreiro, E., Tang, J., Ramis-Cabrer, D., & Wang, X. (2019). Immunotherapy with monoclonal antibodies in lung cancer of mice: oxidative stress and other biological events. *Cancers*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/cancers11091301>
- Basheer, R., Arrigoni, E., Thatte, H. S., Greene, R. W., Ambudkar, I. S., & McCarley, R. W. (2002). Adenosine induces inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-mediated mobilization of intracellular calcium stores in basal forebrain cholinergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(17), 7680-7686.
- Björkgren, I., & Lishko, P. v. (2016). Purinergic signaling in testes revealed. In *Journal of General Physiology* (Vol. 148, Issue 3, pp. 207–211). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611676>

- Blay, J., White, T. D., & Hoskin, D. W. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Research*, 57(13), 2602–2605.
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev*, 98, 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017.-Adenosine>
- Bowater, R. P., & Gates, A. J. (2015). Nucleotides: Structure and Properties. In eLS (pp. 1–9). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001333.pub3>
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Metal Ions in Life Sciences*, 12, 119–168. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_5)
- Bruce, J. I. E., & James, A. D. (2020). Targeting the calcium signalling machinery in cancer. *Cancers*, 12(9), 1–34. <https://doi.org/10.3390/cancers12092351>
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509–581.
- Burnstock, G., Brouns, I., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2012). Purinergic signaling in the airways. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 64, Issue 4, pp. 834–868). <https://doi.org/10.1124/pr.111.005389>
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 239821281881749. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>
- Camargo Barros-Filho, M., Guisier, F., D. Rock, L., D. Becker-Santos, D., P. Sage, A., A. Marshall, E., & L. Lam, W. (2019). Tumour Suppressor Genes with Oncogenic Roles in Lung Cancer. In *Genes and Cancer*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85017>
- Campodónico, P. B., de Kier Joffé, E. D. B., Urtreger, A. J., Lauria, L. S., Lastiri, J. M., Puricelli, L. I., & Todaro, L. B. (2010). The neural cell adhesion molecule is involved in the metastatic capacity in a murine model of lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*, n/a–n/a. doi:10.1002/mc.20611.

- Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. In *Cells* (Vol. 9, Issue 7). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
- Cancer Classification | SEER Training. (s. f.). U.S. National Cancer Institute. <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Carbone, A. (2020). Cancer classification at the crossroads. *Cancers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/cancers12040980>
- Chen, J. F., Eltzschig, H. K., & Fredholm, B. B. (2013). Adenosine receptors as drug targets-what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(4), 265–286. <https://doi.org/10.1038/nrd3955>
- Collins, Lauren & Haines, Christopher & Perkel, Robert & Enck, Robert. (2007). Lung Cancer: Diagnosis and Management. *American family physician*
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., & Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 7, Issue 1, pp. 3–17). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.11.001>
- Dhyan, V., Gare, S., Gupta, R. K., Swain, S., Venkatesh, K. v., & Giri, L. (2020). GPCR mediated control of calcium dynamics: A systems perspective. In *Cellular Signalling* (Vol. 74). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109717>
- Diament, M. J., Peluffo, G. D., Stillitani, I., Cerchietti, L. C., Navigante, A., Ranunolo, S. M., & Klein, S. M. (2006). Inhibition of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in a murine lung adenocarcinoma by medroxyprogesterone acetate and indomethacin. *Cancer Investigation*, 24(2), 126–131. <https://doi.org/10.1080/07357900500524322>
- Di Virgilio, F., Alba Clara Sarti, Simonetta Falzoni, Elena De Marchi & Elena Adinolfi. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature*, 18, 601-618. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0037-0>
- Dickenson JM, Hill SJ. Adenosine A1-receptor stimulated increases in intracellular calcium in the smooth muscle cell line, DDT1MF-2. *Br J Pharmacol*. 1993

Jan;108(1):85-92. doi:10.1111/j.1476-5381.1993.tb13444.x. PMID: 8428218; PMCID: PMC1907699

- Doengi, M., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2008). New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *The FASEB Journal*, 22(7), 2368-2378.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213–237. doi:10.1113/jphysiol.1929.sp002608
- Effendi, W. I., Nagano, T., Kobayashi, K., & Nishimura, Y. (2020). Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. In *Cells* (Vol. 9, Issue 3). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9030785>
- Evans, J. H., & Sanderson, M. J. (1999). Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277(1), L30-L41.
- Faguet, G. B. (2015). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. In *International Journal of Cancer* (Vol. 136, Issue 9, pp. 2022–2036). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>
- Feng, L. L., Cai, Y. Q., Zhu, M. C., Xing, L. J., & Wang, X. (2020). The yin and yang functions of extracellular ATP and adenosine in tumor immunity. In *Cancer Cell International* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01195-x>
- Fleming, K. M., & Mogul, D. J. (1997). Adenosine A3 receptors potentiate hippocampal calcium current by a PKA-dependent/PKC-independent pathway. *Neuropharmacology*, 36(3), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)83762-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)83762-8)
- Franco, R., Cordoní, A., Llinas del Torrent, C., Lillo, A., Serrano-Marín, J., Navarro, G., & Pardo, L. (2021). Structure and function of adenosine receptor heteromers. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 78, Issue 8, pp. 3957–3968). Springer

Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03761-6>

- Fredholm, B. B., Ilzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacological reviews*, 63(1), 1-34.
- Garcia-Gil, M., Camici, M., Allegrini, S., Pesi, R., & Tozzi, M. G. (2021). Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.672182>
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433.
- Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., & Borea, P. A. (2011). Adenosine receptors and cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1808, Issue 5, pp. 1400–1412). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.020>
- Giacomelli, C., Daniele, S., Romei, C., Tavanti, L., Neri, T., Piano, I., Celi, A., Martini, C., & Trincavelli, M. L. (2018). The A2B Adenosine Receptor Modulates the Epithelial-Mesenchymal Transition through the Balance of cAMP/PKA and MAPK/ERK Pathway Activation in Human Epithelial Lung Cells. *Frontiers in pharmacology*, 9, 54. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00054>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Gutiérrez AM, Kornfeld M, Persson AE. Calcium response to adenosine and ATP in rabbit afferent arterioles. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1999 Jul;166(3):175-181. DOI: 10.1046/j.1365-201x.1999.00557.x. PMID: 10468653.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. In *Cell* (Vol. 100). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hecht, S., Park, S. L., Carmella, S., Stram, D., Haiman, C., le Marchand, L., Murphy, S., & Yuan, J.-M. (2017). ED01.02 Tobacco Carcinogens and Lung Cancer Susceptibility. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(1), S19–S20. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.021>
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M. (2008). Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367–1380. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0802714>.
- Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>
- INEGI-INSP. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2018). México. Reporte Nacional (En Prensa)
- Jeffrey, J. L., Lawson, K. v., & Powers, J. P. (2020). Targeting Metabolism of Extracellular Nucleotides via Inhibition of Ectonucleotidases CD73 and CD39. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13444–13465. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01044>
- Jovel, C. E., & Mejía, F. S. (2017). Cafeína y cefalea: consideraciones especiales. *Neurología*, 32(6), 394-398.
- Kamiya, H., Kanno, T., Fujita, Y., Gotoh, A., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2012). Apoptosis-related gene transcription in human A549 lung cancer cells via A(3) adenosine receptor. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 29(5-6), 687–696. <https://doi.org/10.1159/000312589>
- Kanno, T., Nakano, T., Fujita, Y., Gotoh, A., & Nishizaki, T. (2012). Adenosine induces apoptosis in SBC-3 human lung cancer cells through A(3) adenosine receptor-dependent AMID upregulation. *Cellular physiology and biochemistry : international*

journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 30(3), 666–677. <https://doi.org/10.1159/000341447>

- Kanwal, R., Gupta, K., & Gupta, S. (2015). Cancer epigenetics: an introduction. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 1238, pp. 3–25). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1)
- Karp, G., Iwasa, J., & Marshall, W. (2015). *Karp's Cell and Molecular Biology, Binder Ready Version*. Wiley.
- Kazemi, M. H., Raoofi Mohseni, S., Hojjat-Farsangi, M., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Mohammadi, H., & Jadidi-Niaragh, F. (2018). Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 233, Issue 3, pp. 2032–2057). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.25873>
- Kim, S. J., Min, H. Y., Chung, H. J., Park, E. J., Hong, J. Y., Kang, Y. J., Shin, D. H., Jeong, L. S., & Lee, S. K. (2008). Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-Cl-IB-MECA, a novel A3 adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells. *Cancer letters*, 264(2), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.037>
- Lazarowski E.R., Sesma J.I., Seminario L., Esther C.R., Kreda S.M. (2011) Nucleotide Release by Airway Epithelia. In: Picher M., Boucher R. (Eds) *Purinergic Regulation of Respiratory Diseases. Subcellular Biochemistry*, vol 55. Springer, Dordrecht.
- Lazarowski E. R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic signalling*, 8(3), 359–373. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9304-9>.
- Martínez Zavala, R. (2021). Participación de los receptores purinérgicos en la generación de cambios intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en células de cáncer de pulmón. [Tesis de Maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional – BUAP.
- Mediavilla-Varela, M., Luddy, K., Noyes, D., Khalil, F. K., Neuger, A. M., Soliman, H., & Antonia, S. J. (2013). Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their



growth. *Cancer biology & therapy*, 14(9), 860–868.  
<https://doi.org/10.4161/cbt.25643>

- Meuwissen, R., & Berns, A. (2005). Mouse models for human lung cancer. In *Genes and Development* (Vol. 19, Issue 6, pp. 643–664).  
<https://doi.org/10.1101/gad.1284505>
- Mirabelli, P., Coppola, L., & Salvatore, M. (2019). Cancer cell lines are useful model systems for medical research. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/cancers11081098>
- Monteith, G. R., Prevarskaya, N., & Roberts-Thomson, S. J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 6, pp. 367–380). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.18>
- Mynlieff, M., & Beam, K. G. (1994). Adenosine Acting at an A1 Receptor Decreases N-Type Calcium Current in Mouse Motoneurons. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 14, Issue 6).
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2006). Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer research*, 26(1A), 43–47.
- Newby AC. (1984) Adenosine and the concept of "retaliatory metabolites." *Trends Biochem Sci* 9: 42– 44. doi:10.1016/0968-0004(84)90176-2
- Ohta, A. (2016). A metabolic immune checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00109>
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 552-565.
- Otsuki, T., Kanno, T., Fujita, Y., Tabata, C., Fukuoka, K., Nakano, T., Gotoh, A., & Nishizaki, T. (2012). A3 adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in Lu-65 human lung cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international*

journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 30(1), 210–220. <https://doi.org/10.1159/000339058>

- Pastor-Anglada, M., & Pérez-Torras, S. (2018). Who is who in Adenosine transport. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00627>
- Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics* (3.a ed.). Oxford Univ Pr (Sd).
- Peleli, M., Fredholm, B. B., Sobrevia, L., & Carlström, M. (2017). Pharmacological targeting of adenosine receptor signaling. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 55, pp. 4–8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.12.002>
- Pelosi, G., Sonzogni, A., Harari, S., Albini, A., Bresaola, E., Marchiò, C., Massa, F., Righi, L., Gatti, G., Papanikolaou, N., Vijayvergia, N., Calabrese, F., & Papotti, M. (2017). Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: New insights. In *Translational Lung Cancer Research* (Vol. 6, Issue 5, pp. 513–529). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.09.04>
- Peluffo, G. D., Stillitani, I., Rodríguez, V. A., Diament, M. J., & Klein, S. M. (2004). Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *International Journal of Cancer*, 110(6), 825–830. <https://doi.org/10.1002/ijc.20226>
- Pelzmann, B., Schaffer, P., Michler, H., Rigler, B., & Koidl, B. (1995). Adenosine inhibits the L-type calcium current in human atrial myocytes. In *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (Vol. 351).
- Penedo-Vázquez, A., Duran, X., Mateu, J., López-Postigo, A., & Barreiro, E. (2021). Curcumin and resveratrol improve muscle function and structure through attenuation of proteolytic markers in experimental cancer-induced cachexia. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164904>
- Piirainen, H., Ashok, Y., Nanekar, R. T., & Jaakola, V. P. (2011). Structural features of adenosine receptors: From crystal to function. In *Biochimica et Biophysica Acta* -

Biomembranes (Vol. 1808, Issue 5, pp. 1233–1244).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.021>

- Robinson V. (1944) *The Story of Medicine*. New Home Library. p.16-20
- Ribeiro, J. A., & Sebastiao, A. M. (2010). Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s1), S3-S15.
- Ryzhov, S., Novitskiy, S. V., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Carbone, D. P., Biaggioni, I., Dikov, M. M., & Feoktistov, I. (2008). Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(9), 987–995.  
<https://doi.org/10.1593/neo.08478>
- Sachdeva, S., & Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 21, Issue 3, pp. 245–253). <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.011>
- Scarpellino, G., Genova, T., Avanzato, D., Bernardini, M., Bianco, S., Petrillo, S., Tolosano, E., de Almeida Vieira, J. R., Bussolati, B., Fiorio Pla, A., & Munaron, L. (2019). Purinergic Calcium Signals in Tumor-Derived Endothelium. *Cancers*, 11(6), 766. <https://doi.org/10.3390/cancers11060766>
- Schneider, G., Glaser, T., Lameu, C., Abdelbaset-Ismail, A., Sellers, Z. P., Moniuszko, M., Ulrich, H., & Ratajczak, M. Z. (2015). Extracellular nucleotides as novel, underappreciated pro-metastatic factors that stimulate purinergic signaling in human lung cancer cells. *Molecular Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0469-z>
- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. In *Cellular Signalling* (Vol. 15, Issue 9, pp. 813–827). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00058-5)
- Sekido, Y., Fong, K. M., & Minna, J. D. (2003). Molecular Genetics of Lung Cancer. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 54, pp. 73–87). <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152202>

- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2024-2052.
- Spychala, J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & therapeutics*, 87(2-3), 161-173.
- Stabbert, R., Dempsey, R., Diekmann, J., Euchenhofer, C., Hagemester, T., Hausmann, H. J., Knorr, A., Mueller, B. P., Pospisil, P., Reininghaus, W., Roemer, E., Tewes, F. J., & Veltel, D. J. (2017). Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicology in Vitro*, 42, 222–246. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.003>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taylor, J., Xiao, W., & Abdel-Wahab, O. (2017). Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. In *Blood* (Vol. 130, Issue 4, pp. 410–423). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-734541>
- Thompson, R. J., Sayers, I., Kuokkanen, K., & Hall, I. P. (2021). Purinergic receptors in the airways: potential therapeutic targets for asthma?. *Frontiers in Allergy*, 2, 677677.
- Tsai E, M, Chiang P, H, Lee J, N: Adenosine-Stimulated Intracellular Calcium Increase in Cultured Human Uterine Myocyte. *Gynecol Obstet Invest* 1998;45:41-44. doi: 10.1159/000009922.
- Urtreger AJ, Diament MJ, Ranuncolo SM, et al (2001). New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. In: *International Journal of Oncology*, 18, 639 – 647. <https://doi.org/10.3892/ijo.18.3.639>.

- Van Calker, D., Biber, K., Domschke, K., & Serchov, T. (2019). The role of adenosine receptors in mood and anxiety disorders. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 151, Issue 1, pp. 11–27). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.14841>
- Vijayan, D., Young, A., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 12, pp. 709–724). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86>
- Yatabe, Y., Dacic, S., Borczuk, A. C., Warth, A., Russell, P. A., Lantuejoul, S., Beasley, M. B., Thunnissen, E., Pelosi, G., Rekhtman, N., Bubendorf, L., Mino-Kenudson, M., Yoshida, A., Geisinger, K. R., Noguchi, M., Chirieac, L. R., Bolting, J., Chung, J. H., Chou, T. Y., ... Moreira, A. L. (2019). Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(3), 377–407. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.005>
- WHO. (2020). Report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. In *Surgical Oncology Clinics of North America* (Vol. 25, Issue 3, pp. 447–468). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>
- Zhu, K., Liu, Q., Zhou, Y., Tao, C., Zhao, Z., Sun, J., & Xu, H. (2015). Oncogenes and tumor suppressor genes: Comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics*, 16(7). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S7-S8>