# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

## LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA

**Tesis:**

**Efecto de la cafeína sobre la capacidad proliferativa y migratoria en la línea celular A549, proveniente de cáncer de pulmón de células no pequeñas.**

**Para obtener el título de:**

**Maestra en Ciencias Fisiológicas**

**Presenta:**

**LFT. Yarely Rocio Herrera Sánchez**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. AMIRA DEL RAYO FLORES URBINA**

**CODIRECTOR DE TESIS**

**DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN**

**Puebla, Pue.** **ABRIL, 2025**

# ÍNDICE

**ABREVIATURAS**.....

**RESUMEN** ..... 1

**INTRODUCCIÓN** ..... 3

**CÁNCER** ..... 3

FISIOPATOLOGÍA..... 5

EPIDEMIOLOGÍA ..... 7

DIAGNÓSTICO..... 7

**CÁNCER DE PULMÓN** ..... 8

SIGNOS Y SÍNTOMAS..... 8

FACTORES DE RIESGOS ..... 9

DIAGNÓSTICO..... 9

CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN ..... 11

TRATAMIENTO ..... 13

**CAFEÍNA** ..... 14

**PACLITAXEL** ..... 17

**QUIMIORESISTENCIA** ..... 18

**JUSTIFICACIÓN**..... 21

**HIPÓTESIS** ..... 22

**OBJETIVOS** ..... 22

GENERAL ..... 22

ESPECÍFICOS ..... 22

**METODOLOGÍA** ..... 23

CULTIVO CELULAR ..... 23

EXPERIMENTOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR) ..... 24

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN ..... 28

ENSAYO DE MIGRACIÓN EN CÁMARA TRANSWELL ..... 29

ANÁLISIS ESTADÍSTICO ..... 30

**RESULTADOS** ..... 31

**DISCUSIÓN** ..... 60

**CONCLUSIONES** ..... 66

**PERSPECTIVAS** ..... 66

**BIBLIOGRAFÍA** ..... 67

## ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **ABC** | Transportador de Casete de unión ATP |
| **ABCG2** | Transportador de Casete de proteína de unión a ATP G2 |
| **ABCC1** | Miembro 1 de la subfamilia C del casete de unión del transportador de casete unión ATP |
| **ACS** | Sociedad Estadounidense del Cáncer |
| **ADN** | Ácido Desoxirribonucleico |
| **ADNc** | Ácido Desoxirribonucleico Complementario |
| **AJCC** | Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer |
| **AMPc** | Monofosfato de adenosina cíclico |
| **ARNm** | Ácido ribonucleico mensajero |
| **AKT** | Proteína cinasa B |
| **ALK** | Quinasa del linfoma anaplásico |
| **α-SMA** | Actina alfa de músculo liso |
| **ATM** | Mutación Ataxia Telangiectasa |
| **ATR** | Mutación Ataxia Telangiectasa y relacionado con Rad3 |
| **Bret** | Bromuro de etidio |
| **C-Myc** | Proteína reguladora del crecimiento |
| **EGFR** | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| **EMT** | Transición Epitelio Mesénquima |
| **EPOC** | Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica |
| **$GABA_A$** | Ácido γ-aminobutírico tipo A |
| **GLOBOCAN** | Observatorio mundial del cáncer |
| **IARC** | Agencia Internacional sobre la Investigación del Cáncer |
| **IL** | Interleucina |

| | |
|---|---|
| **K-RAS** | Oncogén viral del sarcoma de rata Kristen |
| **MAPK** | Proteínas quinasas activadas por mitógenos |
| **MDR** | Resistencia a múltiples fármacos |
| **NSCLC** | Carcinoma de pulmón de células no pequeñas |
| **OMS** | Organización Mundial de la Salud |
| **PCR-RT** | Reacción en cadera de la polimerasa con retrotranscripción |
| **PD-1** | Proteína de muerte celular programada1 |
| **PDE** | Fosfodiesterasa |
| **RET** | Reorganizado durante la transfección |
| **RyR** | Receptores de rianodina |
| **SFB** | Suero fetal bovino |
| **TNF-α** | Factor de necrosis tumoral alfa |

## RESUMEN

El cáncer de pulmón posee alta incidencia global, y es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, tanto en hombres como en mujeres. Diversos factores presentes en el microambiente tumoral favorecen su potencial metastásico, donde las células aumentan su capacidad proliferativa, migratoria y de supervivencia.

Paclitaxel es uno de los principales fármacos quimioterapéuticos usados para combatir el cáncer, sin embargo, se ha observado que a largo plazo puede generar quimiorresistencia de las células tumorales, volviendo el tratamiento ineficiente. La resistencia al paclitaxel, es un desafío importante en el tratamiento del cáncer de pulmón, y se ha relacionado con la sobreexpresión de transportadores que extruyen el fármaco de las células cancerosas, disminuyendo así su eficacia terapéutica. Por lo que diversos grupos de investigación están en la búsqueda de nuevas opciones farmacológicas para un tratamiento más efectivo del cáncer de pulmón.

La cafeína, recientemente ha sido objeto de estudio en el campo de la oncología, debido a que se ha observado que puede reducir el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer.

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue investigar si la cafeína es capaz de disminuir el potencial metastásico de las células A549, derivadas de cáncer de pulmón de células no pequeñas, para lo cual se evaluaron sus propiedades funcionales de proliferación y migración.

Los resultados obtenidos muestran que la cafeína inhibe de manera significativa la capacidad proliferativa y migratoria de las células A549. El tratamiento conjunto de las células A549 con cafeína y paclitaxel no alteran el efecto citotóxico al observado, cuando son tratadas de manera individual, lo cual sugiere que comparten la misma vía de señalización intracelular.

# INTRODUCCIÓN

## CÁNCER

En 1838 se describieron células con morfología alterada, y se postuló que estas eran la causa de las neoplasias a las que actualmente conocemos como cáncer **(Sánchez C., 2013).** Actualmente, la Organización Mundial de la Salud **(OMS)** define el cáncer como gran conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo, cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos **(Organización Mundial de la Salud, 2023)**

## FISIOPATOLOGÍA

El crecimiento celular de manera descontrolada se debe a dos tipos diferentes de mutaciones: genéticas y epigenéticas, las cuales permiten a las células proliferar y autorrenovarse dando lugar a la formación de tumores **(de Visser & Joyce, 2023; Yin et al., 2021).**

Genéticamente, el desequilibrio entre proliferación y muerte celular es debido a mutaciones de protooncogenes y/o supresores tumorales, elementos encargados de regular el ciclo celular **(Bermúdez et al., 2019).** La célula tumoral presenta una mayor capacidad para dividirse en comparación con las células normales, misma que también poseerán las células hijas que logran evadir los mecanismos de control del sistema inmune **(Sánchez C., 2013).**

Por su parte, las alteraciones epigenéticas (aquellas que no se asocian a alteraciones de la secuencia de ADN) implicadas en el desarrollo del cáncer son; modificación de las histonas, posicionamiento de los nucleosomas y remodelación de la cromatina **(You et al., 2023).**

Los procesos de mutación mencionados dotan a las células cancerígenas de características fisiopatológicas intrínsecas, como la capacidad de continuar su crecimiento lejos de su origen; al dotarlas de una mejorada capacidad migratoria e invasiva a tejidos lejanos en un proceso conocido como metástasis, la facultad para activar procesos inflamatorios, potencial de replicación ilimitado, resistencia a la muerte celular programada, alteraciones del metabolismo celular, evasión del sistema inmune, liberación de factores angiogénicos, entre otros. **(Hanahan, 2022) (Figura 1).** demás, es importante destacar la capacidad de plasticidad fenotípica, que llegan a presentar las células tumorales, tales como: a) transdiferenciación; b) desdiferenciación, y c) transición epitelio – mesénquima (EMT), este último se refiere a que las células de fenotipo epitelial dejan de expresar sus marcadores características, como E-cadherina, y en su lugar, comienzan a expresar marcadores de fenotipo mesenquimal, como vimentina, $\alpha$-SMA , N-cadherina y fibronectina. La importancia de la transición epitelio-mesénquima radica en ser el paso inicial de la metástasis, ya que se favorece la capacidad migratoria e invasiva de la células cancerosas **(Du et al., 2024).**

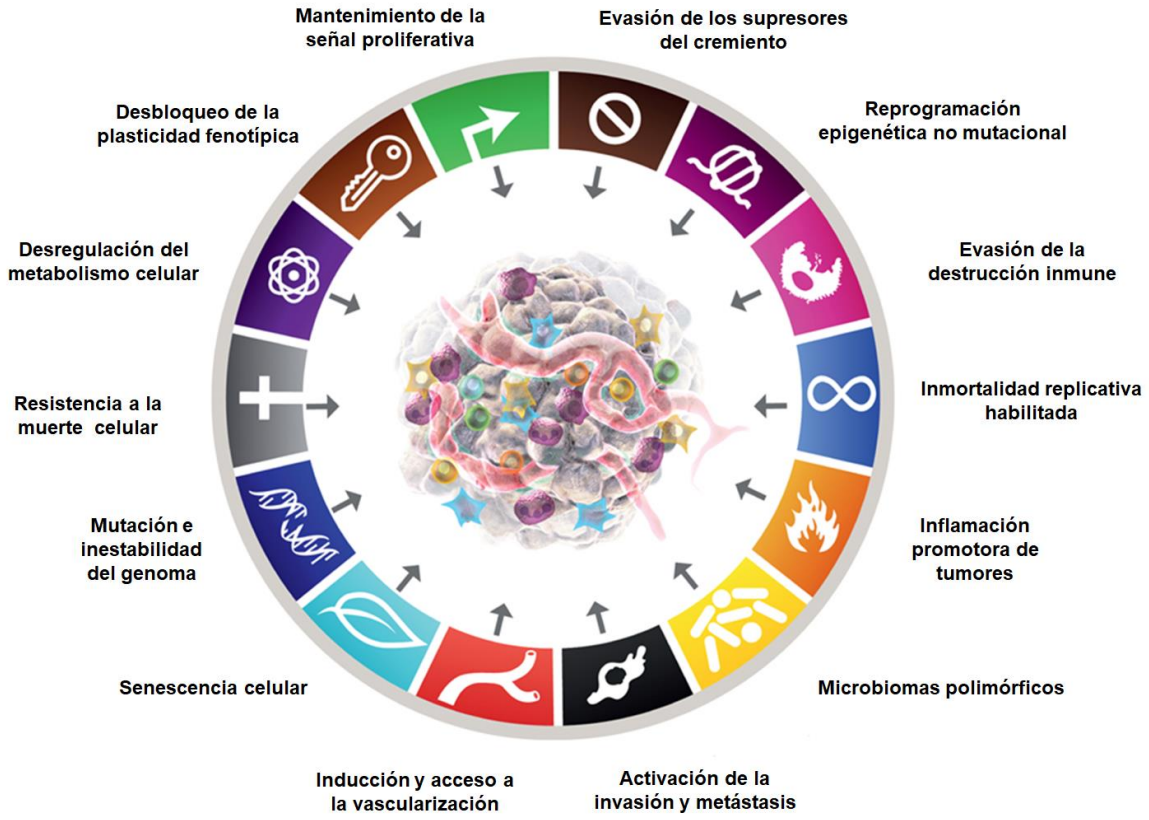



**Figura 1.** Características de las células cancerígenas. Imagen modificada de **(Modificado de Hanahan, 2022).**

## EPIDEMIOLOGÍA

De acuerdo con datos proporcionados por parte de la Organización Mundial de la Salud en el 2022, el cáncer ocupa el cuarto lugar como una de las principales causa de muerte a nivel mundial **(OMS, 2022)**. Además, la Agencia Internacional sobre la Investigación del Cáncer (**IARC**) reportó que 1 de cada 5 personas en todo el mundo, llegará a desarrollar algún tipo de cáncer en algún momento de su vida. Igualmente informó, que se registraron alrededor de 20 millones de nuevos casos de cáncer y aproximadamente 10 millones de muertes por cáncer a nivel mundial en ese año (**IARC, 2024).**

Los tipos de cáncer más frecuentes reportados en 2022 son; el cáncer de pulmón (12.4%), de mama (11.5%), colorrectal (9.6%), de próstata (7.3%), gástrico (4.8%),

y de hígado (4.3%) **(Figura 2).** En cuanto mortalidad, el cáncer de pulmón siguió ocupando el primer lugar con un 18.7%, seguido del cáncer colorrectal (9.3%), hígado (7.8%), de mama y gástrico (6.8%) **(Figura 3) (GLOBOCAN, 2022a).**

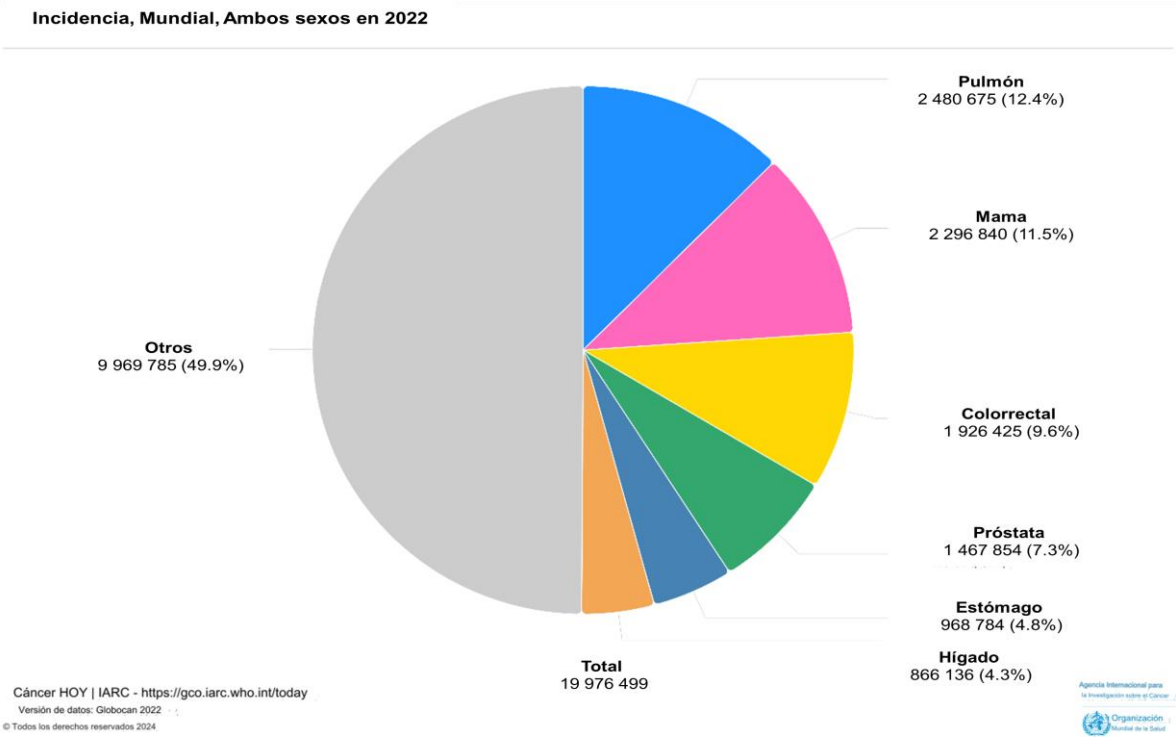



**Figura 2.** Gráfica de los nuevos casos diagnosticados de cáncer a nivel mundial **(GLOBOCAN, 2022).**

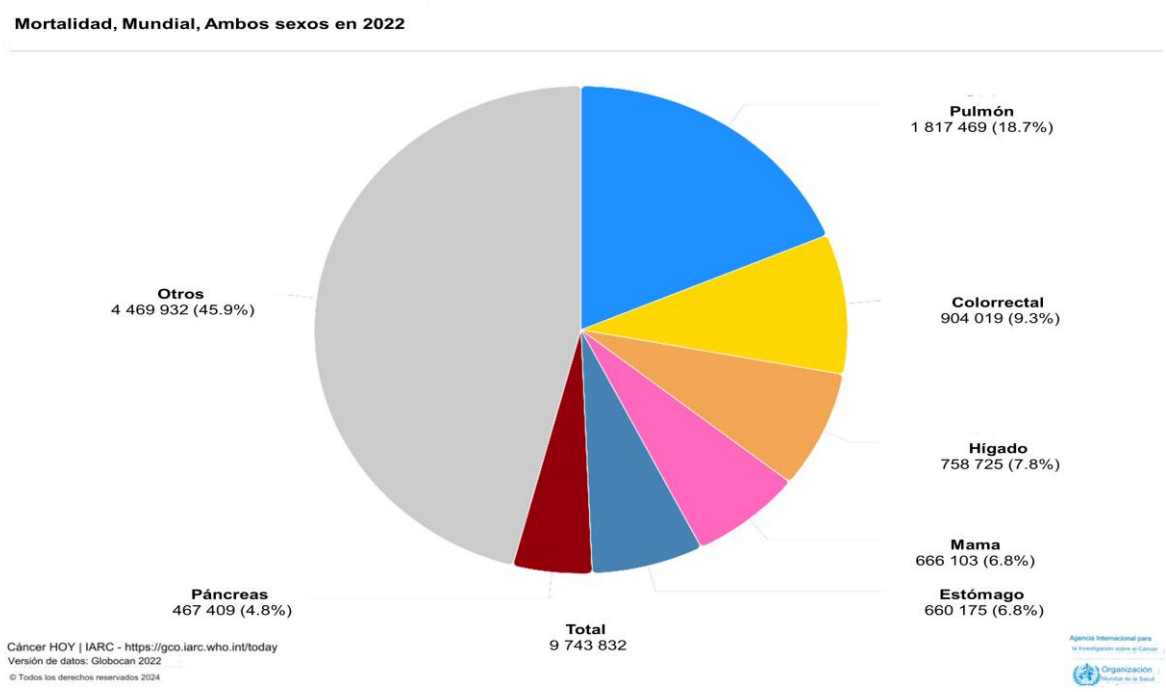



**Figura 3.** Gráfica de la mortalidad provocada por cáncer a nivel mundial **(GLOBOCAN, 2022a).**

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico oportuno del cáncer es de suma importancia, no existe una única prueba para el diagnóstico de esta enfermedad, sino que de acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer **(2023)** se establece una serie de pasos diagnósticos que incluyen:

- Exploración física.
- Pruebas de laboratorio: pruebas de marcadores tumorales, análisis citogenético, inmunofenotipificación.
- Pruebas con imagen: resonancia magnética, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, ecografía, radiografía.
- Biopsias para determinar el estadio del cáncer.

Una proporción elevada de pacientes presentan recurrencia al diagnóstico de cáncer y por ende, no logran una supervivencia a largo plazo **(Yin et al., 2021)** por

lo anterior, se considera un reto importante extender la supervivencia en pacientes diagnosticados con cáncer, considerándose como uno de los principales problemas económicos, de salud pública y social a nivel global **(Bray et al., 2024).**

## CÁNCER DE PULMÓN

La exposición a carcinógenos como el humo de cigarrillo, toxinas ambientales, infecciones pulmonares y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) provocan mutaciones e inflamación crónica en el parénquima pulmonar. Como consecuencia, en las vías respiratorias pulmonares y el tejido alveolar se produce un constante infiltrado de células inflamatorias, un aumento en la actividad de elementos del sistema inmune; y como consecuencia se propicia un ambiente óptimo para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas **(O'Callaghan et al., 2010).** Existen marcadores moleculares asociados con la supervivencia y proliferación celular, como el factor antígeno nuclear de células Ki-67, que se correlaciona positivamente con la capacidad proliferativa, además existen otros marcadores con un valor clínico importante en el tratamiento y pronóstico de diversos tipos de cáncer de pulmón **(Hu et al., 2023).**

### a) SIGNOS Y SÍNTOMAS

Los síntomas más comunes del cáncer de pulmón, de acuerdo con la **OMS** (**2023**) son:

- Pérdida de peso sin causa aparentemente conocida.
- Infecciones pulmonares recurrentes.
- Hemoptisis (tos con sangre).
- Dolor torácico.
- Fatiga.
- Disnea (dificultad para respirar).

## b) FACTORES DE RIESGO

**Tabaquismo:** Es el principal factor de riesgo, aumenta 20 veces más la probabilidad de cáncer de pulmón en personas fumadoras en comparación con personas no fumadoras. El humo del tabaco contiene 7,000 sustancias dañinas, de las cuales, hay que destacar al nitrato y a las N-nitrosaminas. Datos estadísticos señalan que el consumo de tabaco suele ser mayor en personas con un nivel socioeconómico bajo, en quienes además existe también una mayor recurrencia al fracaso en el intento de dejar de fumar **(Schabath & Cote, 2019).**

**Factores genéticos:** La bibliografía existente, indica que antecedentes familiares de cáncer de pulmón aumentan la predisposición genética un 25% a desarrollar la enfermedad **(Alexander et al., 2020; Schabath & Cote, 2019).**

**Edad:** A través de diversos estudios, sea demostrado la existencia de una relación directamente proporcional entre una edad avanzada con una mayor probabilidad en el riesgo de padecer cáncer de pulmón **(Dubin & Griffin, 2020).**

**Género:** El género masculino presenta mayor incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón, en comparación con el género femenino, una de las explicaciones es que los varones tienden con mayor probabilidad a fumar tabaco **(Thandra et al., 2021).** Tan solo en el año 2022, se diagnosticaron 1’572,045 casos en hombres, y 908, 630 casos en mujeres. En relación a la mortalidad, durante ese mismo año, se reportó la defunción de 1’233,241 hombres y de 584,228 mujeres **(GLOBOCAN, 2022)**. Para el caso específico de la población femenina sobre el desarrollo de cáncer de pulmón en mujeres fumadoras, se ha demostrado que un factor adicional son mutaciones en el gen supresor de tumores p53 y el protooncogén K-RAS, donde los carcinógenos del tabaco poseen una significativa interacción con los estrógenos **(Stapelfeld et al., 2020).**

**Exposiciones ambientales:** La exposición ambiental al cromo, arsénico, asbesto, amianto e hidrocarburos aromáticos policíclicos se ha asociado con un aumento de la probabilidad de padecer cáncer de pulmón. En los países en vías de desarrollo,

utilizar leña para quemar, así como pasar muchas horas en tareas de cocina se consideran factores de riesgo ambientales para desarrollar cáncer de pulmón **(Alexander et al., 2020; Dubin & Griffin, 2020).**

**Radón:** Un elemento gaseoso que suele encontrarse en rocas, agua subterránea y suelo, además se produce al desintegrarse uranio-238 o radio-226, fácilmente puede acumularse en los hogares, siendo un riesgo mayor en personas no fumadoras expuestas constantemente a él **(Dubin & Griffin, 2020).**

### c) DIAGNÓSTICO

El diagnóstico precoz resulta prometedor para mejorar la supervivencia a largo plazo en pacientes con cáncer de pulmón. Los estudios de imagen como la tomografía computarizada resultan de gran utilidad diagnóstica **(Louis et al., 2024)** sin embargo, de acuerdo con la **IARC,** la existencia de biomarcadores moleculares brindan un panorama diagnóstico más prometedor, ya que existen alrededor de 36 marcadores proteicos asociados con el desarrollo del cáncer de pulmón. Un ejemplo de ellos son los marcadores bioquímicos del estado inmunológico e inflamatorios, utilizados para medir la proporción de neutrófilos y linfocitos, que de estar presentes de manera elevada serán un indicador de mal pronóstico **(IARC 2023; Chen et al., 2024**).

### d) CLASIFICACIÓN

El cáncer de pulmón se divide en dos grandes grupos de acuerdo a su histología: cáncer de pulmón de células pequeñas, que representa el 15% de los cánceres de pulmón, y el cáncer de pulmón de células no pequeñas siendo el tipo más común, pues representa del 80 – 90% de los cánceres de pulmón **(Schabath & Cote, 2019).**

El cáncer de pulmón de células pequeñas se caracteriza por surgir de la submucosa de las vías respiratorias y también originarse de células neuroendocrinas del epitelio bronquial basal. Se puede subclasificar en puro o combinado (en combinación con

el cáncer de pulmón de células no pequeñas), además, este pueden llegar a realizar metástasis a hueso, hígado y cerebro **(Nooreldeen & Bach, 2021).**

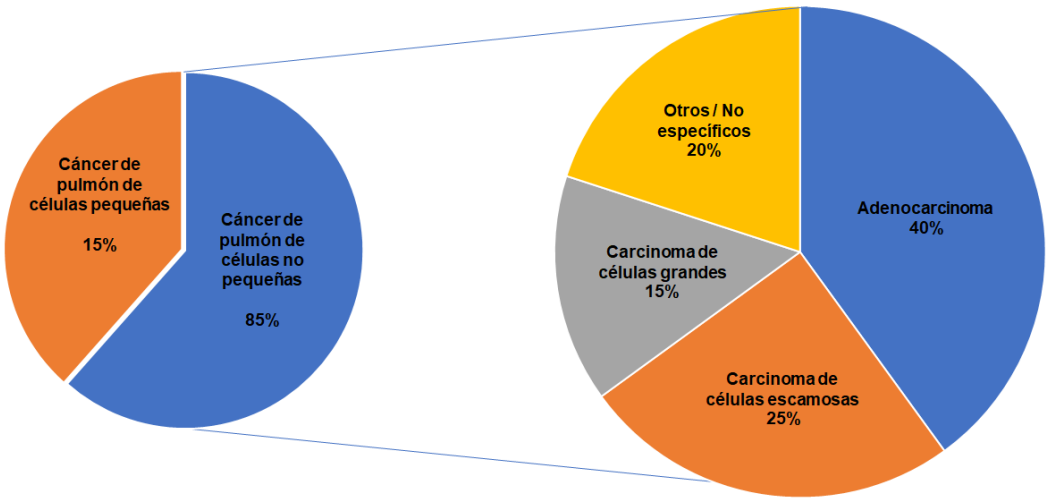



**Figura 4.** Clasificación Histológica del cáncer de pulmón **(Modificado de Schabath & Cote, 2019).**

El cáncer pulmón de células no pequeñas, histológicamente se subdivide en cuatro subtipos; adenocarcinoma (40%), carcinoma de células escamosas (25-30%), carcinoma de células grandes (10-15%) y otros subtipos no especificados como el tumor carcinoide bronquial **(Figura 4).** El cáncer de pulmón de células no pequeñas tiende a crecer de manera más lentamente en comparación con el cáncer de pulmón de células pequeñas, debido a que el primero no hace metástasis en las etapas iniciales **(Guo et al., 2022)** sin embargo este tipo de tumores, tiende a detectarse en estadios avanzados, por lo que genera poca sintomatología a medida que avanza.

Característicamente, los carcinomas de células no pequeñas son el tipo más común de entre todos los tipos de cáncer de pulmón **(Padinharayil et al., 2023)**. La ubicación del crecimiento de estas células cancerosas determinará el tipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas al que pertenece, por ejemplo, si crece en las

células escamosas de los pulmones, pertenece al carcinoma de células escamosas, también llamado cáncer epidermoide, en cambio sí crece en varios tipos de células grandes, pertenece al carcinoma de células grandes, o si el crecimiento inicia en glándulas, como los alveolos, pertenece al subtipo de adenocarcinoma **(National Foundation for Cancer Research, 2020).**

Por otra parte el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) clasifica a los estadios mediante el sistema TNM que como se observa en la **(Tabla 1)** cada letra evalúa un aspecto del tumor, entre los que se encuentran (T) tamaño del tumor primario, (N) categorizando el nivel de afectación de los ganglios linfáticos y (M) la presencia o ausencia de metástasis **(Nooreldeen & Bach, 2021; Schabath & Cote, 2019).**

TNM de clasificación de tumores malignos.

| Tamaño del tumor (cm) | | Ganglios linfáticos | | Metástasis | |
|---|---|---|---|---|---|
| T1 | <3 | N0 | Sin ganglios linfáticos | M0 | No |
| T2 | T2a 3–5<br>T2b 5–7 | N1 | Ganglios linfáticos broncopulmonares/hiliares ipsilaterales | M1 | Presente |
| T3 | >7 | N2 | Ganglios linfáticos mediastínicos/subcarinales ipsilaterales | | |
| T4 | Invasión<br>Órganos mediastínicos<br>Cuerpos vertebrales | N3 | Ganglios linfáticos supraclaviculares contralaterales/hiliares/mediastínicos | | |
| Etapa I | | Etapa II | | | |
| I A | T1, N0, M0 | IIA | T2b, N0, M0 | | |
| BI | T2a, N0, M0 | IIA | T1, N1, M0 | | |
| | | IIA | T2a, N1, M0 | | |
| | | IIB | T2b, N1, M0 | | |
| | | IIB | T3, N0, M0 | | |

**Tabla 1.** Estadios del cáncer de pulmón de células no pequeñas **(Modificado de Nooreldeen & Bach, 2021).**

## e) TRATAMIENTO

Los enfoques del tratamiento son de acuerdo con diversos factores como el estadio, condición del paciente, alteraciones genéticas e histología del cáncer. Por ello existen diversas alternativas de tratamiento, entre las que destacan la cirugía, inmunoterapia, radioterapia, quimioterapia y terapias moleculares dirigidas, opciones que pueden ser aplicadas de forma individual o dual **(Alexander et al., 2020)**.

i. Quirúrgico

La cirugía es el tratamiento recomendado en pacientes con cáncer de pulmón en estadios I – II (etapas tempranas), ya que gracias a la recesión del tumor logran tener una esperanza de vida de hasta 5 años, de acuerdo al estadio clínico en que se encuentre el paciente. Los porcentajes reportados de pacientes que lograron tener una supervivencia de 5 años, posteriores a la cirugía, en los diferentes estadios son: en estadio IA el 77% -92%, en estadio IB el 68%, en estadio IIA el 65% y en estadio IIB el 56%.

ii. Terapia dirigida

Son un tratamiento viable en el 69% de los casos en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas mostrando una alta efectividad inclusive en pacientes con etapas avanzadas del tumor. Para varios subtipos de cáncer de pulmón de células no pequeñas se encuentran aprobados los inhibidores de la tirosina cinasa, además, las terapias dirigidas a EGFR, ALK, RET, BRAF V600E y NTRK mostraron resultados favorables (**Alexander et al., 2020; Hirsch et al., 2017)**.

iii. Quimioterapia

Se recomienda su administración en los estadios IB – IIIA con una supervivencia de 5 años en el 5.4 al 6.9% de los pacientes **(Hirsch et al., 2017).** El principal fármaco empleado es el paclitaxel, desafortunadamente, un alto porcentaje de pacientes sometidos a quimioterapia, en un tiempo determinado llegan a presentar quimioresistencia, siendo un factor importante en la recurrencia tumoral.

La efectividad del tratamiento depende fundamentalmente de un diagnóstico certero y temprano, desafortunadamente, en la mayoría de los casos, el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas, reduciendo con mucho la efectividad del tratamiento y la supervivencia de los pacientes. Diversos grupos de investigación están dedicados a la búsqueda de nuevos fármacos que controlen de manera efectiva el crecimiento tumoral y que, además, reduzca la posibilidad de desarrollar quimiorresistencia, tal sería el caso de la cafeína, la cual se ha visto que ejerce efectos citotóxicos en diferentes tipos de cáncer.

## CAFEÍNA

La cafeína es un alcaloide de purina de la familia metilxantina, presente en diversas plantas y productos como café, tés de hoja verde, refrescos, medicamentos, bayas de guaraná, chicles, nueces y granos de cacao **(Rodak et al., 2021).** Estructuralmente posee similitud con la molécula de adenosina, por lo que es capaz de antagonizar los receptores de adenosina: $A_1$, $A_{2A}$, $A_{2B}$ y $A_3$. De manera específica, cafeína ha mostrado una capacidad como antagonista del receptor $A_{2A}$, reduciendo la liberación de citocinas inflamatorias y obteniendo como resultado una disminución del crecimiento tumoral maligno **(Venkata et al., 2019).**

Del mismo modo, la cafeína es un antagonista de los receptores del ácido γ-aminobutírico tipo A ($GABA_A$), además es también un inhibidor competitivo no selectivo de las fosfodiesterasas (PDE); las enzimas que degradan el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) lo que da como resultado un aumento de la concentración de AMPc, agonista de los receptores de rianodina (RyR), que, a su vez, provoca un aumento en la liberación de $Ca^{2+}$ desde el retículo sarcoplasmático.

Se plantea que la cafeína posee propiedades antiinflamatorias, lo cual se atribuye a su capacidad para disminuir los niveles de marcadores proinflamatorios como lo son la proteína C reactiva, adiponectina e interleucinas (IL): IL-1β, IL- 6, IL-10 IL-18,

TNF-α (Factor de necrosis tumoral α) **(Eguchi et al., 2022; Meisaprow et al., 2021; Rodak et al., 2021).**

Se ha documentado una amplia variedad de efectos benéficos atribuibles a la cafeína, actúa como colaborar en la prevención del Alzheimer y la demencia, reduce el riesgo de padecer Parkinson, entre otras **(Rodak et al., 2021).** Recientemente se ha investigado su papel en la potenciación de los efecto antitumorales de los fármacos usados en el tratamiento del cáncer, donde se ha propuesto que el mecanismo subyacente a dicho papel es a través del efecto inhibidor de la reparación del ADN, el cual puede afectar directamente la proliferación e inducir la apoptosis celular **(Pascua et al., 2020; Wang et al., 2020).** Además cabe mencionar que la cafeína mejor la respuesta inmunitaria antitumoral **(Eguchi et al., 2022)**.

Los tratamientos combinados con cafeína parecen ser prometedores para ciertos tipos de tumores malignos como el cáncer de páncreas, el cáncer de estómago, hígado, piel, ovarios y pulmón **(Pascua et al., 2020; Wang et al., 2020).** Se ha demostrado que el uso combinado de cafeína con atorvastatina tiene fuertes efectos inhibidores sobre el crecimiento modelos in vitro de cáncer de próstata y de mama, dónde se observó que interfería en la función lisosomal y el metabolismo celular al aumentar el nivel de fosforilación oxidativa **(Pascua et al., 2020),** así como un fuerte efecto estimulante de la apoptosis, además de suprimir la migración, la invasión y la formación esferas tumorales **(Wang et al., 2020).**

De la misma manera, se ha demostrado que la cafeína afecta a las proteínas quinasas ATR y ATM, las cuales ejecutan un papel importante en la reparación del ADN, deteniendo el ciclo celular en G1 y provocando la muerte celular por apoptosis en las células cancerígenas sin dañar a las células epiteliales normales de la mama.

En otro sentido la cafeína también se ha relacionado con la aceleración de la degradación lisosomal, al disminuir los niveles de la proteína claudina-2 (presente en mayor medida en adenocarcinoma de pulmón) y disminuir también los niveles de expresión del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2

(Nrf2), aumentando así la citotoxicidad de la doxorrubicina, dando como resultado la supresión de la proliferación y migración celular **(Eguchi et al., 2022).**

La cafeína tiene también su implicación en el glioblastoma multiforme en la línea celular U87-MG, ya que su uso como pretratamiento como regulador de la vía de señalización ATM, la cual modula al ciclo celular, mejorando la eficacia del cotratamiento con Temozolomida, reduciendo así la proliferación celular al inhibir la fosforilación de la vía ATM/p53/p21. Además se ha demostrado que atenúa a la detención del ciclo celular en la fase G2 inducida posterior a la exposición al quimioterapéutico, ya que se sabe que el retraso del ciclo celular después de quimioterapéuticos puede favorecer la reparación de ADN, promoviendo la quimio resistencia, al favorecer la supervivencia de las células cancerosas **(Li et al., 2018).** También es capaz de inhibir la invasión a través de vías de señalización MAPK y Captesina B en el gliobastoma **(Cheng et al., 2016).**

De acuerdo con Meisaprow et al., **(2021)** la cafeína es capaz de detener las etapas G0/G1 del ciclo celular, y como consecuencia obtener una inhibición de la proliferación celular capaz de reducir el potencial migratorio e invasivo, esto gracias a mecanismos que modifican los niveles de expresión de las integrinas en las subunidades αv y β3, de las cuales se ha reconocido un papel fundamental en la metástasis y agresividad del cáncer afectando así a los factores de transcripción y la señalización de proteínas. Gracias a este mecanismo, se ve reducida la interacción con proteínas intracelulares, afectando a elementos oncogénicos como c-Myc, fundamental en la formación de filopodios que facilitan la migración celular **(Meisaprow et al., 2021).**

## PACLITAXEL

El paclitaxel o taxol, como anteriormente se conocía, proviene del árbol Taxus brevifolia, aunque posteriormente debido a su escasez se optó por producirlo de manera sintética. Se ha observado que paclitaxel tiene efectos sobre la

regeneración de axones, la fibrosis hepática y renal, enfermedades de la piel, procesos de inflamación y enfermedades coronarias. Sin embargo, el uso que ha destacado es el de fármaco anticancerígenos de primera línea utilizado en cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, cáncer de colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de vejiga urinaria, cáncer de cabeza y cuello. Se ha demostrado que este fármaco se almacena intracelularmente e induce la detención del ciclo celular (en la fase G2/M) impidiendo la disociación de los microtúbulos. Secundario a este suceso, ocurre un fenómeno de control mitótico, en el que, al detectarse la detención de la mitosis, se induce un inicio del proceso de destrucción celular eficaz a través de la vía apoptótica mitocondrial **(Weaver, 2014; L. Zhu & Chen, 2019; Z. Zhu et al., 2018)**. Sin embargo, una gran desventaja es su baja biodisponibilidad oral, escasa solubilidad acuosa y su naturaleza hidrofóbica, además de sus efectos citotóxicos los cuales pueden producir neuropatías periféricas, hepatotoxicidad, miopatía, embolia de lípidos pulmonares, alopecia, neurotoxicidad, miopía e hipersensibilidad **(Alqahtani et al., 2019; Weaver, 2014).**

Algunos estudios señalan que paclitaxel, participa en la detención del ciclo celular, inducción de la apoptosis e inhibición de la proliferación **(Z. Zhu et al., 2018).** Liu colaboradores **(2013)** observaron que el tratamiento de paclitaxel durante 24 horas de 10 *μg* /ml en células A549 generaron una marcada inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis en conjunto con autofagia **(Liu et al., 2013)**. Zheng y Xu **(2020**) detallaron, que el paclitaxel, posiblemente se une a la tubulina, inhibiendo la replicación del ADN, las vías del ciclo celular, llevando a la muerte de las células A549. Sumado a estos estudios, Lian y colaboradores **(2021)** detallaron que tras combinar paclitaxel con fisetina, se observa una reducción en la invasión y migración; y que esto posiblemente se deba a la desorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto.

## QUIMIORRESISTENCIA

La quimiorresistencia es definida como una resistencia específica adquirida por cualquier célula a la acción de determinadas sustancias químicas. Específicamente para el contexto de nuestro estudio, nos referimos a ella como la capacidad de las células cancerosas para desarrollar mecanismos resistente a una variedad de fármacos con propiedades anticancerígena, lo que permite que las células cancerosas continúen su crecimiento **(Ahmadpour et al., 2023; Mondal & Meeran, 2021)**.

Dicha quimiorresistencia se logra a través de mecanismos como la alteración en la interacción fármaco–blanco, aumento de factores que impiden alcanzar la concentración intracelular efectiva, cambios en la respuesta celular que le permite evadir las vías apoptóticas y tolerar condiciones de estrés celular. Al cambiar estos mecanismos en la respuesta celular de las células cancerígenas desencadena el fracaso de los fármacos anticancerígenos **(Gatti & Zunino, 2005).** Los fármacos quimioterapéuticos son una gran opción para combatir el cáncer, sin embargo, la desventaja de estos fármacos es la probable quimiorresistencia que puedan inducir, algo análogo a lo que sucede con los antibióticos. La quimiorresistencia es una de las principales causas en la recurrencia del tumor. Existen dos tipos de quimiorresistencia de acuerdo a su origen: intrínseca y adquirida, la intrínseca está relacionada con la presencia de células madre tumorales, mientras que la quimiorresistencia adquirida, se debe a alteraciones o mutaciones en los mecanismos de la respuesta adaptativa posteriores al administrar el fármaco quimioterapéutico **(Figura 5) (Ramos et al., 2021; Genovese et al., 2021).**

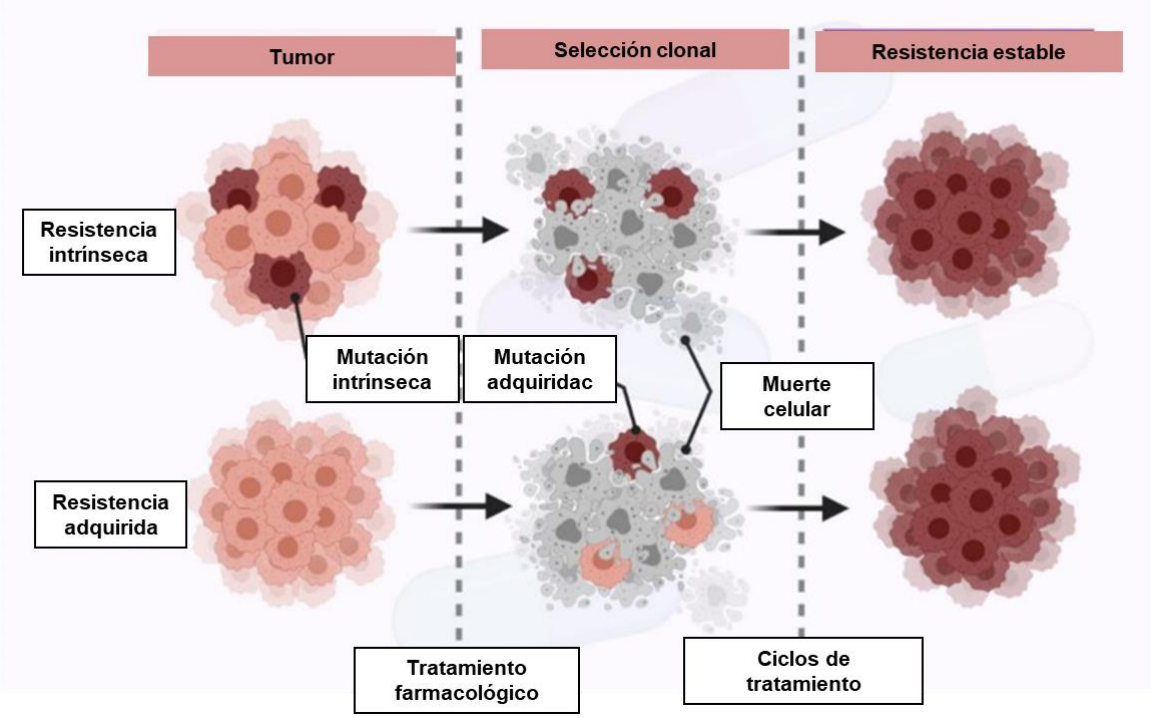



**Figura 5.** Quimiorresistencia intrínseca y adquirida en el cáncer **(Modificado de Ramos et al., 2021)**

La quimioresistencia puede ser a un solo o diversos fármacos anticancerígenos con mecanismos independientes, en este caso se denomina resistencia a múltiples fármacos.

Recientemente se ha probado el tratamiento combinado de fármacos quimioterapéuticos con otros compuestos, con el fin de mantener o incrementar el efecto citotóxico del fármaco a menores concentraciones de uso, con el fin de reducir la posibilidad de que las células tumorales desarrollen quimiorresistencia, a estos compuestos se les denomina coadyuvantes.

## COADYUVANTES AL USO DEL PACLITAXEL

El paclitaxel, como tratamiento farmacológico contra el cáncer, se ha visto limitado por su baja solubilidad y la presencia de efectos secundarios tóxicos, lo cual deriva en una importante quimiorresistencia. Por tal razón, se ha propuesto su uso en combinación con distintos coadyuvantes para contrarrestar sus limitantes y así mejorar su eficacia. Un ejemplo de esta modalidad quimioterapéutica es el uso de paclitaxel complementado con gentamicina, tratamiento que favoreció la supervivencia general en pacientes en adenocarcinoma conductual pancreático **(Tempero et al., 2023).**

Una propuesta de coadyuvantes del paclitaxel ha sido la quimioterapia combinada con cisplatino y carboplatino, ambos con capacidad comprobada para aumentar en las células cancerosas la sensibilidad al fármaco y prevenir la quimioresistencia en diferentes tipos de cánceres, entre ellos en esófago, ovarios, cabeza y cuello **(Nassif et al., 2022; Wang et al., 2020; Zou, 2023).** Sin embargo, es de considerarse que Ngoi et al. (2022) documentaron que en el cáncer epitelial de ovario el uso combinado de paclitaxel más carboplatino generó efectos secundarios como anemia de alto riesgo y neutropenia, además la evidencia en dicho estudio describe como nula o escasa la mejora en la supervivencia de los pacientes al comparar el cotratamiento con tratamiento individual **(Ngoi et al., 2022).**

Otra propuesta interesante que se ha implementado como cotratamiento del paclitaxel en células MCF-7, es el apatinib, un fármaco antineoplásico que inhibe la función de la bomba de fármacos de la glucoproteína P, mecanismo a que se le atribuye la resistencia a múltiples fármacos. Además sensibiliza a las células cancerígenas ante los fármacos anticancerígenos, esta combinación mantiene la eficacia y desencadena efectos secundarios aceptables como síndrome mano-pie, proteinuria e hipertensión **(Zhang et al., 2020).**

También se ha empleado el uso de paclitaxel en combinación con bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento endotelial vascular en cáncer de mama metastásico, en donde se comprobó que la combinación prolonga la

supervivencia libre sin progresión de manera significativa en comparación con el tratamiento con paclitaxel de manera individual. Por otro lado, la supervivencia general fue similar en ambos grupos, sin embargo, el cotratamiento aumento los efectos secundarios tales como isquemia cerebrovascular, proteinuria, cefaleas e hipertensión **(Miller et al., 2007).**

En el último lustro se ha combinado paclitaxel con carboplatino, bevacizumab y nivolumab, tres anticancerígenos que tienen en común un efecto citotóxico e inhibidor de la angiogénesis, característica por la que pueden interactuar con fármacos inhibidores de la angiogénesis en cáncer de pulmón de células no pequeñas no escamoso avanzado (en estadio IIIB/IV) logrando mejorar la supervivencia de los pacientes, mientras que sus efectos adversos solo fueron los propios de la quimioterapia, disminuyendo así el grado de neuropatía periférica causada por paclitaxel solo **(Sugawara et al., 2021).**

Se ha utilizado también como coadyuvante del paclitaxel, al lapatinib, el cual ha mostrado la capacidad de revertir la resistencia a múltiples fármacos provocada por el paclitaxel solo, esto se logra ya que al suprimir a los transportadores ABC, aumenta la citotoxicidad del paclitaxel inhibiendo el flujo de este fármaco hacia fuera de las células cancerígenas, por lo tanto el resultado es un aumentando en su efectividad **(Zajdel et al., 2021).** En el tratamiento de segunda línea del cáncer gástrico avanzando se observó mayor mejora clínica con el cotratamiento de paclitaxel más lapatinib en comparación con el tratamiento de paclitaxel solo, sin embargo, la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión no resulta diferente al usar entre ambos grupos de tratamiento **(Satoh et al., 2014)**

Los resultados más alentadores se han documentado con el uso de paclitaxel más el coadyuvante trastuzumab en cáncer de mama (estadio 1 y positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) en donde se presentaron mejores resultados en cuanto a la supervivencia de los pacientes, tanto a corto como largo plazo. La importancia de este cotratamiento radica en que esto permitió reducir la dosis del quimioterapéutico paclitaxel para así reducir los efectos adversos

como la neuropatía y la alopecia, lo que repercute en la preservación de la calidad de vida de los pacientes **(Tolaney et al., 2019, 2021).**

# JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte a nivel mundial, además este tipo de neoplasia también destaca al ocupar el primer lugar en incidencia global **(GLOBOCAN, 2022a, 2022b).** El subtipo de cáncer de pulmón más frecuente (85%) es el cáncer de células no pequeñas, cuyo tratamiento de primera elección es el quimioterapéutico paclitaxel, el cual participa en la detención del ciclo celular, inducción de la apoptosis e inhibición de la proliferación de las células cancerosas **(Zhu et al., 2018).**

A pesar de ser un fármaco anticancerígeno de primera línea para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, los resultados clínicos de la quimioterapia con paclitaxel a largo plazo (6 a 12 meses), son a veces insatisfactorios, ya que, en muchos casos, los pacientes llegan a desarrollar resistencia a este fármaco, fenómeno conocido como qumiorresistencia. Es por esta razón, que resulta imprescindible la búsqueda de nuevos fármacos que inhiban de manera efectiva el crecimiento tumoral y que no induzcan quimiorresistencia. Este efecto puede ser inducido de manera independiente, o en combinación, con menores de dosis de otros agentes anticancerígenos disponibles en el mercado, funcionando como coadyuvantes.

La cafeína, ha demostrado ser un compuesto efectivo para el tratamiento de diferentes tipos de tumores, desconociéndose hasta el momento, su probable efecto sobre el desarrollo y la progresión del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Por lo que el propósito del presente trabajo de tesis, es investigar si la presencia de cafeína altera la capacidad migratoria y proliferativa de las células A549, las cuales derivan de cáncer de pulmón de células no pequeñas, y determinar de manera complementaria, si la cafeína pudiera potenciar el efecto citotóxico del paclitaxel.

## HIPÓTESIS

La presencia de cafeína reduce la capacidad proliferativa y migratoria de las células A549, provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de cafeína es capaz de alterar la capacidad proliferativa y migratoria de las células A549, provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la cafeína sobre la capacidad proliferativa de las células A549.

2. Determinar el efecto que ejerce la cafeína sobre la capacidad migratoria de las células A549.

3. Iniciar la identificación de los elementos moleculares relacionados con la capacidad proliferativa y migratoria que son alterados por el tratamiento de cafeína.

4. Investigar si la presencia de cafeína potencia el efecto citotóxico del paclitaxel sobre las células A549.

# MÉTODOS

## CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR A549

Las células A549 son una línea celular de cáncer pulmonar de células no pequeñas del subtipo de adenocarcinoma, que fue obtenida a partir de tejido proveniente de un paciente caucásico con carcinoma pulmonar con 58 años.

Las células A549 fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 $cm^2$ de superficie, con medio de cultivo Advanced DMEM (Gibco, EUA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina). Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C, con una atmosfera húmeda al 5% de CO2 y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas, y cada 3 días las células se tripsinizarón. La cosecha de células consistió en los siguientes pasos: se retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con 5 ml de PBS a una concentración de 1X estéril, se adicionarón 2 ml de tripsina y se dejó reposar durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y posteriormente se mezcló con 4 ml de medio de cultivo, la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico y se centrifugo a 1500 rpm por 5 min. Se elimino el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular que quedo en el tubo con medio de cultivo fresco, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y lo demás se utilizó para sembrar las células que se utilizaron para experimentos posteriores. Para realizar los experimentos, las células se sembraron en placas de 4 cajas Petri a las cuales se les dio tratamientos a distintas concentraciones y a diferentes tiempos según sea necesario en 1.5 ml de medio de cultivo por pozo. Para ello, las células sembradas debieron tener una confluencia de más del 50% para dar comienzo a cada uno de los tratamientos dependiendo del tiempo en el que se mantuvieron las células, se realizaron recambios de medio cada 24 horas, agregando en cada recambio el mismo tratamiento. Esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

## ENSAYO DE EXPRESION GENICA (RT-PCR DE PUNTO FINAL)

### a) Extracción de ácido ribonucleico total (ARNT)

Las células A549 se sembraron en cajas Petri, una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo, y se dio inicio al tratamiento correspondiente, en el que se realizó recambio de medio cada 24 horas. Una vez considerado el tiempo respectivo al tratamiento, se procedió a realizar la extracción del RNA total por medio de un kit comercial FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini (Favorgene, Biotech Corp., China), siguiendo las instrucciones del fabricante:

Para iniciar el proceso se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se preparó el buffer de lisis suplementado con 1% de β-mercapto-etanol y se agregaron 350 µL de buffer de lisis por caja Petri. Seguido, con ayuda de una micropipeta se resuspendió y se transfirió el homogenado celular a la columna FARB que contenía el filtro blanco, se centrifugo a 12000 rpm por 2 minutos y se desechó la columna FARB. El contenido restante que quedo en el tubo colector se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml y se agregaron 350 µL de etanol al 70% en cada tubo. Posteriormente, se colocaron en otra columna los filtros rojos y se les añadió lo obtenido en el tubo eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos y se retiró el sobrenadante. Se realizó un lavado con buffer de lavado 1 y dos lavados con buffer de lavado 2. Tras cada lavado, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 minutos. Después, las columnas se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y se agregaron 30 µL de agua libre de RNAsas y se dejó reposar la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 3 minutos para obtener el RNA total.

### b) Cuantificación de ARN

Posterior a la extracción, se cuantificó la cantidad y calidad de ARN extraído mediante espectrofotometría. Para ello se emplearon, una dilución con 4 µL de la muestra de ARN y 196 µL de agua inyectable, para obtener un volumen final de 200

µL, la concentración se evaluó a una longitud de onda de 260 nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (A260/A280). El valor del cociente obtenido se ubicó en un rango de 1.8 a 2.0 para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad y poder ser empleado en los ensayos de RT-PCR.

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

Para la síntesis de la cadena de Ácido Desoxirribonucleico Complementario **(ADNc)** a Ácido Ribonucleico **(ARN)** extraído, se empleó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) como se muestra en la siguiente tabla, en el cual se añadieron 6 µL de forma común a todas las muestras.

| **Reactivo** | **Volumen** |
|---|---|
| **Buffer RT** | 4µl |
| **DNTPs** | 1µl |
| **Ramdoms Primers** | 0.5µl |
| **Mull** | 0.5µl |
| **Total** | 6 µl por tubo |

Para cada tubo de reacción se empleó un volumen final de 20 µL, más 2 µg ARN por tubo de reacción, por lo que el volumen restante (12 µL) se complementó con agua.

Se empleó un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, de esta manera fueron almacenados en congelación hasta su empleo.

### d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN complementario obtenido en la retro-transcripción se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el Kit comercial DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las indicaciones del proveedor, con un volumen total de reacción mínimo de 20 µL.

| **Reactivo** | **Volumen** |
|---|---|
| **Green Dream Taq** | 10µl |
| **Primer Forward** | 1µl |
| **Primer Reverse** | 1µl |
| **Agua** | 6µl |
| **DNA complementario** | 2µl |
| **Total** | 20 µL |

Se empleo un termociclador Mastercycler S50 (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 5 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura media del oligonucleótido a utilizar, 1 minuto a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, de esta manera fueron almacenados en congelación hasta su empleo.

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR de punto final se muestran a continuación:

| **OLIGONUCLEÓTIDOS** | **DIRECCIÓN** | **SECUENCIA** | **TAMAÑO DEL AMPLICOM (PB)** | **TEMPERATURA MEDIA (°C)** |
|---|---|---|---|---|
| **β-actina** | Forward | CAAGAGATGGCCACGGCT | 275 pb | 72.9 |
| | Reverse | TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA | | 72.5 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **E-Cadherina** | Forward | TTCCCTCGACACATTCAAAGT | 488 pb | 63.8 |
| | Reverse | AGCTGTTGCTGTTGTGCTTAACCC | | 69.4 |
| **Vimentina** | Forward | AGAACCTGCAGGAGGCAGAAGAAT | 201 pb | 64.5 |
| | Reverse | CTTCCATTTCACGCATCTGGCGTT | | 73.6 |
| **Ki-67** | Forward | AGTACCAGGAGGTGAGGATAA | 415 pb | 61.5 |
| | Reverse | CTGCACTGGAGTTCCCATAAA | | 62.3 |
| **Ciclina B** | Forward | TTGGTGTCACTGCCATGTTT | 314 pb | 64.6 |
| | Reverse | TAAGCAAAAAGCTCCTGCTG | | 62.6 |
| **Ciclina E** | Forward | AGGCAGTCAACATCCAGGAC | 259 pb | 64.5 |
| | Reverse | ATCCTCCAAAGTTGCACCAG | | 64.5 |
| **Bax** | Forward | GGGCTGGACATTGGACTTCC | 201 pb | 68.2 |
| | Reverse | AGATGGTGAGTGAGGCGGTG | | 68.1 |
| **BIRC3** | Forward | CACTCATTACTTCCGGGTACAG | 420 pb | 62.7 |
| | Reverse | AACACTAGAGGGCCAGTTAAAG | | 60.7 |
| **ABCG2** | Forward | TGGAACTGTGGGTAGAGTGAG | 747 pb | 60.3 |
| | Reverse | GGGAAGCTGAGCAAAGAGTAG | | 62.4 |

### e) Separación electroforética de los productos de PCR

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

Para la preparación del gel, se disolvieron 600 miligramos de agarosa en 50 mL de buffer TAE 1X, la solución fue calentada por 1 minuto con 30 segundos, después se añadieron 4 µL de bromuro de etidio, asegurándose de disolverlo adecuadamente. Seguido a ello, todo el contenido se vertió en la cámara de electroforesis y se colocaron los peines correctamente dejando gelificar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel se cargó con 9 µL de cada muestra. Como marcador de peso molecular se cargó con 4 µL, se empleó el patrón de ADN comercial Gene Ruler 100 pb DNA Laddery junto con el con buffer 6X DNA Loading Dye (ambos de Thermo Scientific, EUA).

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

### f) Densitometría

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

## ENSAYO DE PROLIFERACION (CONTEO CELULAR)

Las células fueron sembradas en placas de 4 cajas Petri con medio de cultivo Advanced-DMEM (Gibco®, EUA), suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico –antimicótico (25µg/ml de anfotericina

B, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina), una vez alcanzada la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo y se dio inicio al tratamiento de las células. Después de 48 horas de tratamiento con cafeína a una concentración de 5mM, se obtuvo la suspensión celular para realizar el conteo celular, para lo cual se empleó una cámara de Neubauer. El procedimiento consistió en los siguientes pasos; primeramente, se retiró el medio de cultivo de cada una de las cajas Petri, se lavaron las células dos veces con PBS estéril, se agregó a cada caja Petri 500 µl de Tripsina-EDTA 0.25% y se dejó incubar por 5 minutos, se añadieron 700 µl del medio de cultivo, la suspensión celular fue transferida a un tubo cónico eppendorf y se centrifuga a 2,000 rpm por 5 minutos, del cual, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue resuspendida en 1 ml de medio de cultivo fresco, después se combinaron en un tubo tipo eppendorf 10 µl de la suspensión celular con 10 µl de azul de tripano (colorante vital que tiñe a las células proceso de apoptosis) y se resuspendió por varias veces la suspensión celular. Se depositaron 10 µl de la mezcla en cada una de las cámaras de Neubauer, posteriormente se procedió a realizar el conteo de las células no teñidas de azul (células vivas) en un microscopio de campo claro, el conteo celular se expresó en células/ml.

## ENSAYO DE MIGRACIÓN (CÁMARA TRANSWELL)

Para evaluar la migración de las células A549 se emplearon Soportes Permeables Transwell® con poros de 8 µm de diámetro (Corning Incorporated, EUA). De la misma forma se sembraron células bajo las condiciones antes descritas; hasta llegar a la confluencia requerida y con un duración de tratamiento de 48 horas con Cafeína a una concentración de de 5mM, posterior al conteo, se realizaron los cálculos correspondientes para sembrar las células en los injertos de la cámara Transwell, en estos mismos injertos se colocaron en la parte superior 350µL compuestos por medio libre de suero fetal, junto con el cálculo obtenido de la suspensión celular y en la parte inferior, 750µl de medio completo, posterior a esto se metió a la incubadora la cámara Transwell, y posterior a un lapso de 18 horas se procedió a

fijar preparando en un tubo un mix en relación 1:1 con metanol 5 ml y acetona 5ml agregando un 1ml al pozo y dejando que fije las células durante 1 minuto, lo consiguiente fue desechar el metanol y acetona por último se tiñeron con 1 ml de cristal violeta en un lapso de 8 minutos. Se procede a realizar los lavados con 1ml de agua desionizada y por último se agrega agua desionizada para mantener hidratadas las células. Se obtuvieron microfotografías de 4 campos aleatorios a 10X para la realización del conteo celular con ayuda del software ImageJ donde se observaron las células que lograron migrar hacia la parte inferior a través de los poros de la membrana. Los datos fueron normalizados con respecto de los valores obtenidos del control.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos y las gráficas obtenidas se realizaron con el software SigmaPlot 12.5 (Jandel Corporation, EUA). Se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes con distribución normal y varianza homogénea para evaluar la diferencia entre las medias de los datos obtenidos para cada grupo experimental, y se determinó si entre dichos parámetros las diferencias fueron estadísticamente significativas o no, tomándose como parámetro de significancia, un valor de $p < 0.5$ (*). Las gráficas muestran el valor promedio ± error estándar.

# RESULTADOS

## CAFEINA REDUCE EL TAMAÑO DE LA POBLACION DE CELULAS A549

Inicialmente, decidimos evaluar si la cafeína, es capaz de ejercer efectos citotóxicos sobre la línea celular A549, para lo cual, las células fueron mantenidas en presencia de 5 mM de cafeína por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer, empleando el colorante vital azul de tripano, y solamente se contabilizaron las células vivas. La **Figura 6** muestra que la presencia de 5 mM de cafeína por 48 horas reduce de manera significativa, aproximadamente un 65%, el tamaño de la población celular con respecto al grupo control.

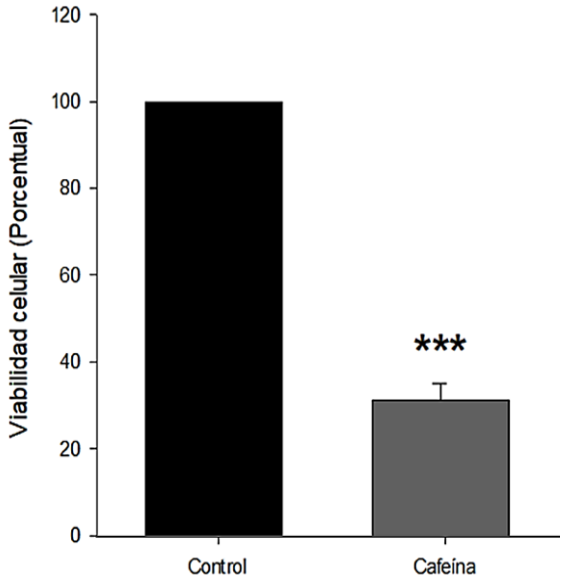



**FIGURA 6. Cafeína reduce el tamaño de la población celular.** Las células A549 fueron mantenidas en presencia de cafeína a una concentración de 5 mM por 48 horas. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (*) el valor de $p^{***} \leq 0.001$

Posteriormente, se procedió a investigar, si el efecto de cafeína sobre el tamaño de la población celular, depende de la concentración empleada, así como de la duración del tratamiento. Realizamos una curva dosis-efecto, probando diferentes concentraciones de cafeína: 0.5, 1, 2, 5 y 10 mM en la línea celular A549 por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se realizó de nueva cuenta el conteo celular en una cámara de Neubauer **(Figura 7),** observándose que, a partir de una concentración de 1 mM de cafeína, hay una reducción significativa en el tamaño de la población celular, alrededor del 15% con respecto a la condición control, alcanzándose un efecto máximo inhibitorio del 30% a una concentración de 5 y 10 mM de cafeína. Por lo que se decidió emplear en los experimentos subsiguientes 5 mM de cafeína.

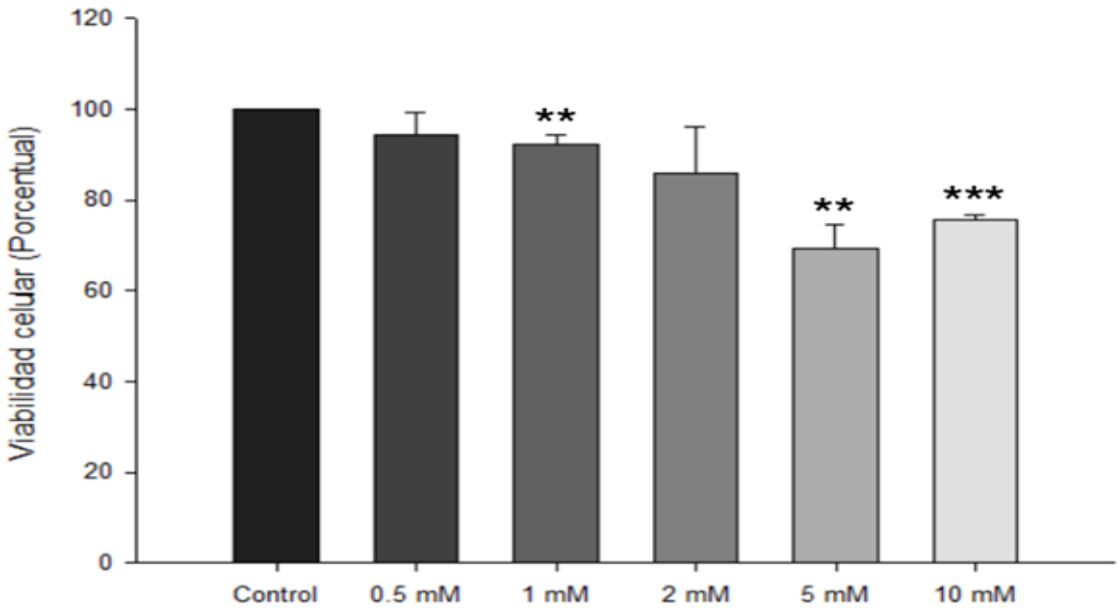



**FIGURA 7. Curva dosis-efecto de la cafeína sobre la viabilidad de las células A549.** Las células A549 fueron tratadas en ausencia y presencia de cafeína a diferentes concentraciones (0.5mM, 1mM, 2mM, 5mM y 10 mM) durante 48 horas. Se realizo el conteo celular con la cámara Neubauer al finalizar el tratamiento donde se comparó el número de células tratadas con cafeína con respecto al grupo control. Todos los datos fueron normalizados. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (***) el valor de p***≤0.001, (**) el valor de p**≤0.01.

Una vez determinada la concentración de trabajo de cafeína (5 mM), se procedió a establecer el tiempo adecuado de tratamiento, para lo cual se realizó un curso temporal, exponiendo las células A549 a 5 mM de cafeína a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). La **Figura 8** muestra que el efecto citotóxico de la cafeína depende de la duración del tratamiento, por ejemplo, a las 24 horas de tratamiento se observa una reducción del 20%, a las 48 horas del 46% y a las 72 horas del 55%, con respecto a la condición control. A partir de los resultados obtenidos en la curva dosis-efecto (**Figura 7**) y en el curso temporal (**Figura 8**), se consideró para los experimentos subsiguientes, una concentración de 5 mM de cafeína y una duración de tratamiento de 48 horas.

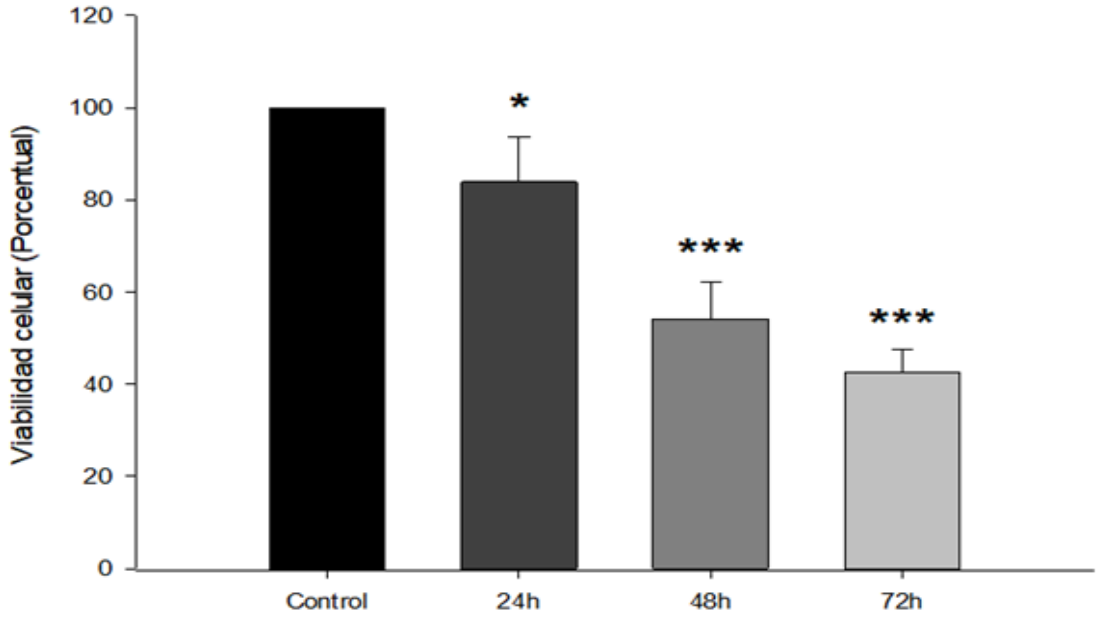



**FIGURA 8. Curso temporal del efecto de la cafeína sobre la viabilidad de las células A549.** Las células A549 fueron tratadas en ausencia y presencia de cafeína a una concentración de 5mM a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Se realizo el conteo celular con la cámara Neubauer al finalizar el tratamiento donde se comparó el número de células tratadas con cafeína con respecto al grupo control. Todos los datos fueron normalizados. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (***) el valor de $p^{***} \leq 0.001$, (*) el valor de $p^{*} \leq 0.05$.

El número de células que conforman una población celular depende del balance de dos procesos fisiológicos antagónicos, por un lado, de su capacidad proliferativa, relacionada con la duración de su ciclo celular, y por otro lado, de su capacidad

apoptótica. En estos términos, el decremento observado en la población celular A549 debido a la presencia de cafeína, puede deberse a una reducción en su capacidad proliferativa o a un incremento en su capacidad apoptótica, por lo que para poner a prueba estas dos posibilidades, se decidió evaluar el nivel de expresión del ARNm que codifica para marcadores moleculares asociados a la capacidad proliferativa (Ki-67, ciclina B y ciclina E) y a la capacidad apoptótica (Bax y BIRC-3), en las células A549, en presencia y ausencia de 5 mM de cafeína.

La **Figura 9**, ilustra contrario a lo que esperábamos, un incremento significativo en la expresión del ARNm que codifica para Ki-67 inducido por la presencia de cafeína.

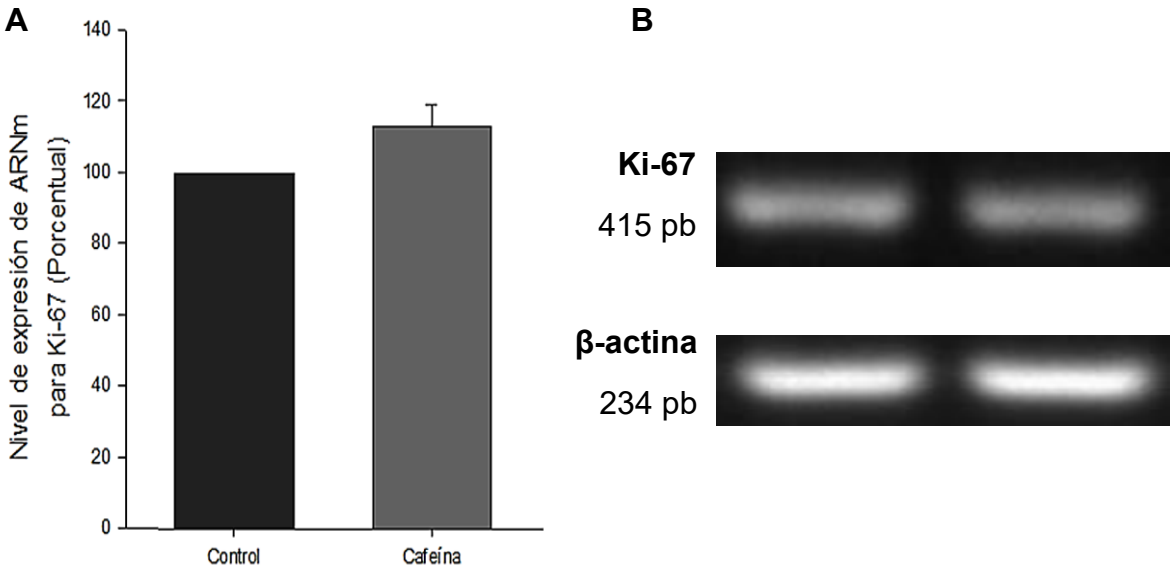



**FIGURA 9. Efecto de cafeína sobre la expresión de Ki-67 en las células A549.** Las células fueron tratadas con 5 mM de cafeína por 48 horas. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β actina. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (*) el valor de $p^* \leq 0.05$.

La ciclina E, es una proteína que favorece el tránsito de la célula de la Fase G1 a la fase S, donde ocurre la duplicación del material genético. La expresión de esta proteína depende de la fase del ciclo celular, por ejemplo, es baja cuando las células quedan arrestadas en la fase G1, y se incrementa, cuando la célula decide entrar a la fase S. El nivel de expresión de ciclina E no resulta afectado por el tratamiento con cafeína con respecto a la condición control (**Figura 10**).

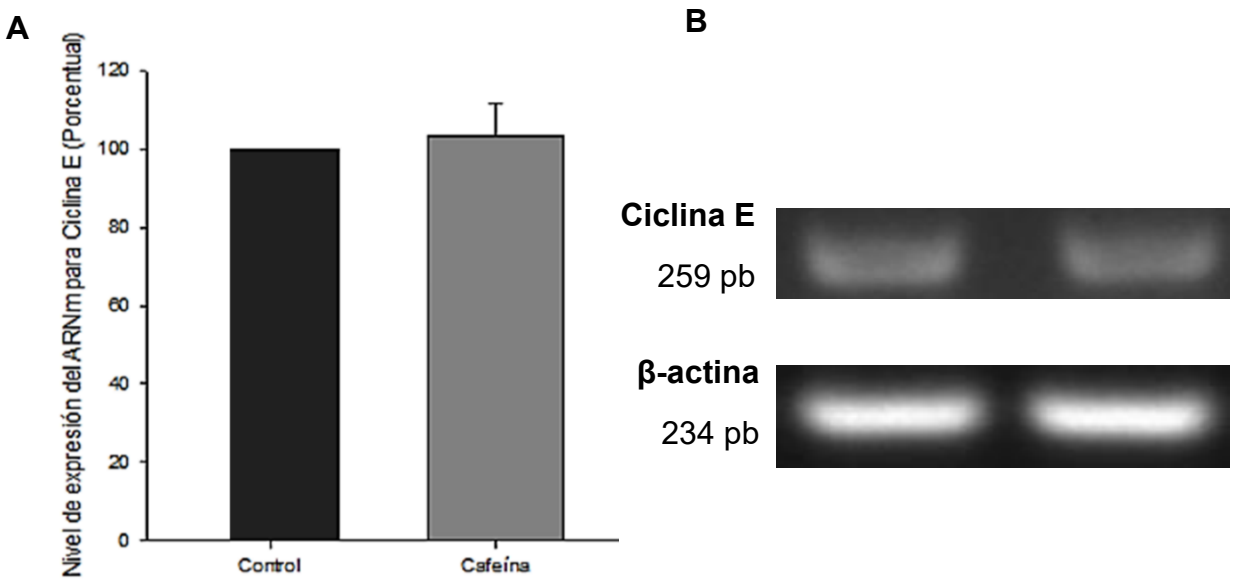



**FIGURA 10. Efecto de cafeína sobre la expresión de la ciclina E en las células A549.** Las células fueron tratadas con 5 mM de cafeína por 48 horas. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β actina. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (*) el valor de $p^* \leq 0.05$.

Por su parte, la ciclina B, es una proteína que participa en la decisión "todo o nada" para la entrada de la célula a la etapa de división celular, es decir, favorece el paso de la fase G2 a la fase M del ciclo celular. Igualmente, al resultado obtenido para la ciclina E, la presencia de 5 mM de cafeína no afecta de manera significativa la expresión del ARNm que codifica para la ciclina B, aunque es posible observar una clara tendencia hacia la baja, con respecto a la condición control (**Figura 10**).

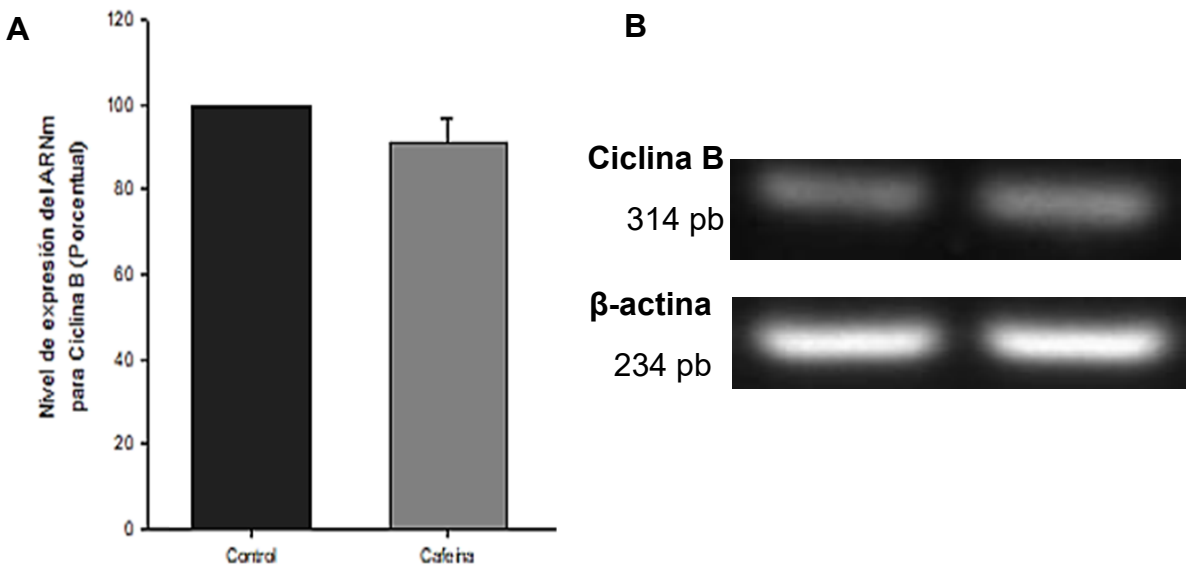



**FIGURA 11. Efecto de cafeína sobre la expresión de ciclina B en las células A549.** Las células fueron tratadas con 5 mM de cafeína por 48 horas. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β actina. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (*) el valor de $p^* \leq 0.05$.

Los resultados presentados hasta el momento no muestran con claridad, si la reducción de la población celular inducida por la presencia de cafeína se debe a una disminución en la capacidad proliferativa de las células A549, por lo que, se decidió evaluar la segunda posibilidad, que la cafeína estuviera acelerando la capacidad apoptótica de las células A549.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, que regula la densidad celular en tejidos y órganos, tanto en la etapa embrionaria como en la posnatal de todos los seres vivos pluricelulares. Particularmente, las células tumorales, se caracterizan por presentar una baja tasa apoptótica, asegurando con ello, el crecimiento y progresión de los tumores. Diversos compuestos con efecto anti-tumoral, exacerban la capacidad apoptótica de las células cancerígenas, reduciendo de manera significativa el tamaño de los tumores.

Se procedió a investigar sí, el efecto citotóxico que ejerce la cafeína sobre las células A549, se debe a un incremento en su capacidad apoptótica, para lo cual se evaluó el nivel de expresión del ARNm que codifica para una proteína pro-apoptótica

(Bax), y una proteína anti-apoptótica (BIRC-3). Al igual que los experimentos anteriores, las células A549 fueron tratadas en presencia de 5 mM de cafeína por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se evaluó el nivel de expresión del ARNm de las proteínas Bax y BIRC-3. La **Figura 12A** muestra claramente, que la presencia de cafeína induce un incremento significativo del 30 % en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax, mientras que el nivel de expresión del ARNm de la proteína anti-apoptótica BIRC-3, no resulta alterado (*Figura 12C*), todo esto, con respecto a la condición control.

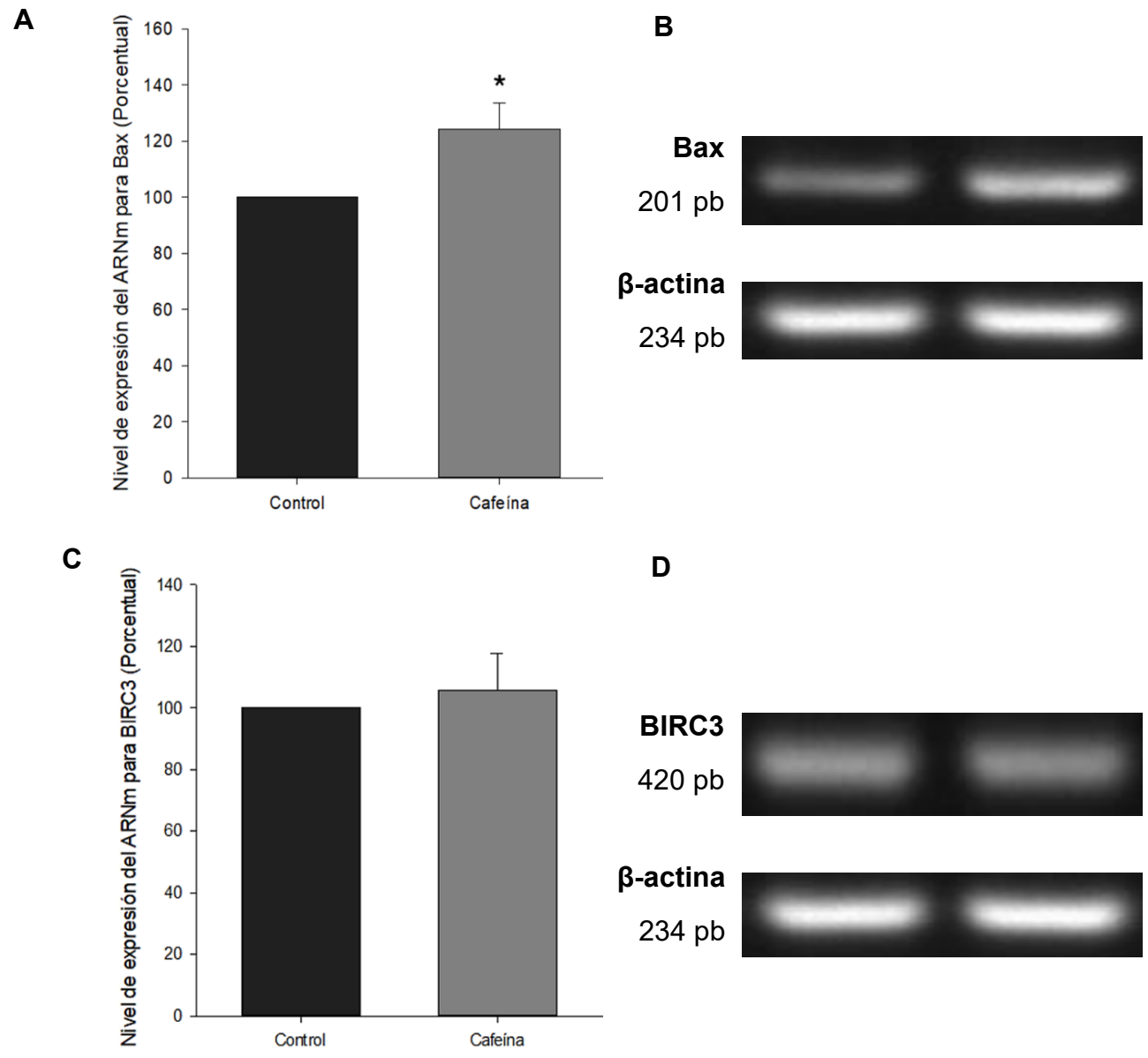
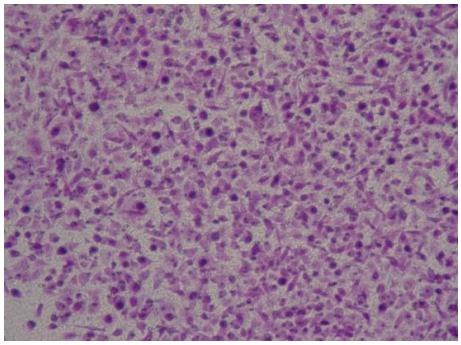



**FIGURA 12. Cafeína regula la expresión de elementos moleculares que participan en la apoptosis en células A549.** Las células fueron tratadas con 5 mM de cafeína por 48 horas. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β actina. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (*) el valor de $p^* \leq 0.05$.

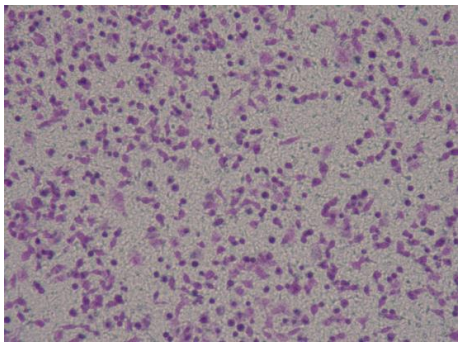
**CAFEINA INFLUYE NEGATIVAMENTE SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS A549.**

Las células tumorales además de caracterizarse por su alta capacidad proliferativa, también presentan alta capacidad migratoria, lo cual asegura su éxito en la diseminación a otros tejidos y órganos, proceso conocido como metástasis. Por lo que se decidió explorar a continuación, si la presencia de cafeína es capaz de reducir la capacidad migratoria de las células A549.

Las células A549, se mantuvieron por 48 horas en presencia de 5 mM de cafeína, al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas y se resembraron 30,000 células en cada inserto de la cámara transwell, con el fin de evaluar su capacidad migratoria. La presencia de cafeína reduce un 60% el número de células que migran a través de los poros del inserto de la cámara transwell **(Figura 12)**.



**Control**



**Cafeína**

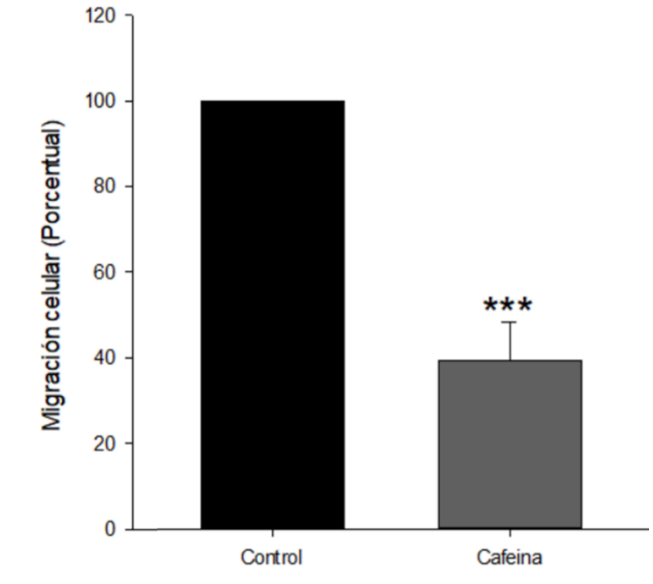



**FIGURA 12. Cafeína reduce la capacidad migratoria de las células A549.** Ensayo de migración en cámara transwell, las células A549 fueron tratadas con 5 mM de cafeína por 48 horas. A) Microfotografías de células teñidas con cristal violeta, utilizando un objetivo 10x. B) Cuantificación

de las células que atravesaron el inserto de la cámara transwell empleando el software Image J. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (***) el valor de $p^{***} \leq 0.001$

El fenotipo de las células, determina su capacidad migratoria, por ejemplo, las células con fenotipo epitelial presentan baja capacidad migratoria, mientras que las células con fenotipo mesénquimal, muestran alta capacidad migratoria. Debido a que la cafeína, reduce la capacidad migratoria de las células A549, muy probablemente este modificando el fenotipo celular, específicamente, favoreciendo el fenotipo epitelial con respecto al fenotipo mesénquimal. Para poner a prueba esta posibilidad, evaluamos de manera preliminar, el nivel de expresión del ARNm que codifica para marcadores del fenotipo epitelial, como es la E-cadherina, y marcadores del fenotipo mesénquimal, como la vimentina. La **Figura 13A Y 13C**, muestra, que la presencia de cafeína no modifica el nivel de expresión de los marcadores moleculares de fenotipo que evaluamos, E-cadherina y vimentina, por lo que será necesario, evaluar la expresión de otros marcadores moleculares relacionados al fenotipo celular.

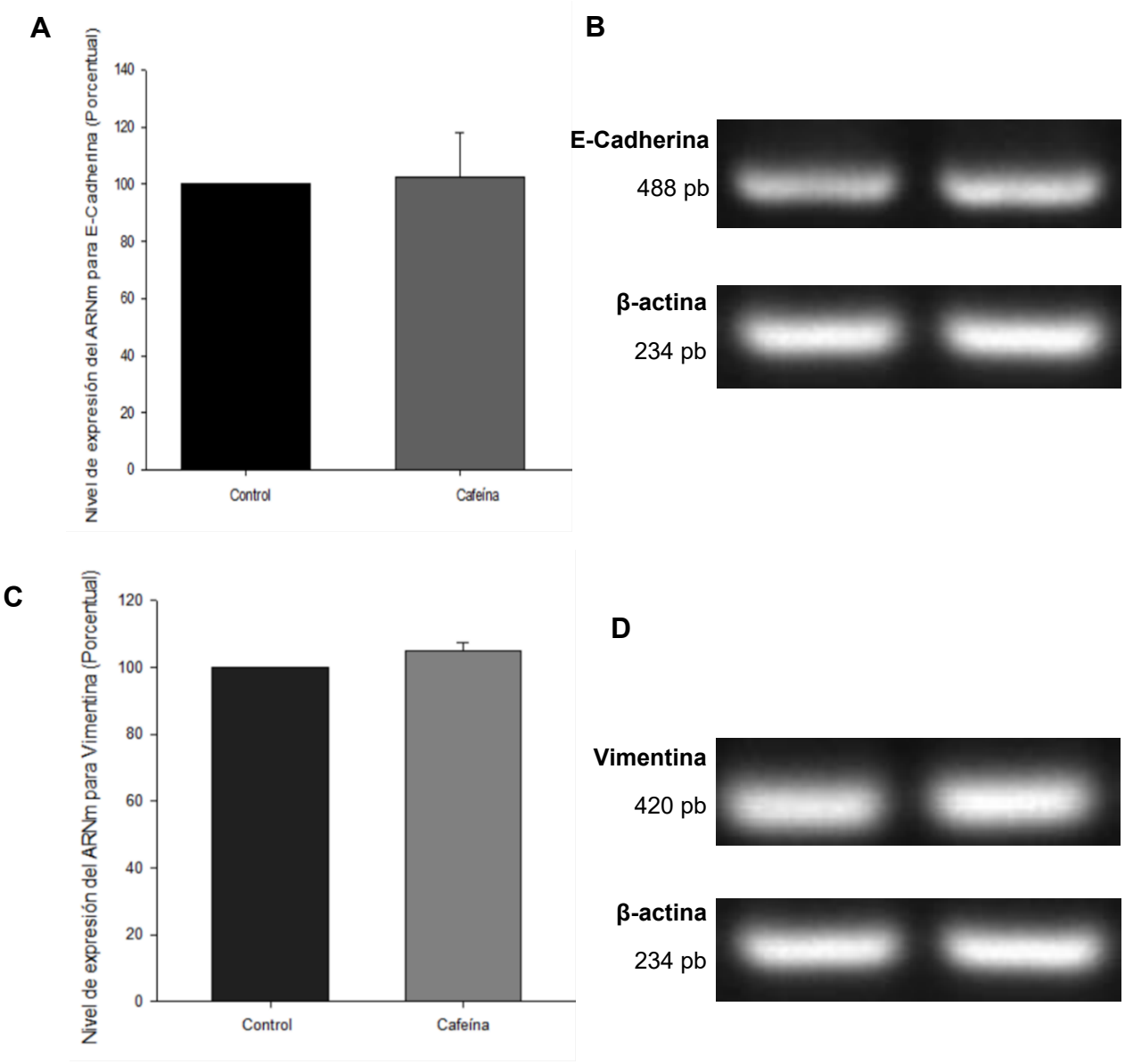



**FIGURA 13. Cafeína no modifica el nivel de expresión de marcadores moleculares asociados al fenotipo epitelial y mesénquimal en células A549.** Las células se mantuvieron en presencia de 5 mM de cafeína por 48 horas, al finalizar el tratamiento, por RT-PCR se evaluaron los niveles de expresión del ARNm que codifica para E-cadherina **(A y B)**, y para vimentina **(C y D)**. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de expresión del ARNm que codifica para β actina. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (*) el valor de $p^* \leq 0.05$.

**PAPEL DE LA CAFEÍNA COMO COADYUVANTE DEL EFECTO CITOTOXICO DEL PACLITAXEL.**

El paclitaxel es un agente alquilante, que se incorpora al ADN, lo fragmenta, impidiendo la replicación y favoreciendo la muerte de la célula tumoral. Desafortunadamente, el uso prolongado de paclitaxel induce quimiorresistencia en las células tumorales, dejando de ser un tratamiento eficiente. La nueva estrategia en la clínica para el tratamiento del cáncer, es el uso de coadyuvantes que permitan reducir la concentración del fármaco antitumoral, para prevenir el fenómeno de quimiorresistencia. Con base a los resultados presentados anteriormente, donde se muestra que la cafeína induce efectos citotóxicos en las células A549, proponemos que la cafeína pudiera ser considerada como un coadyuvante del paclitaxel para el tratamiento más efectivo del cáncer de pulmón reduciendo la incidencia de quimiorresistencia. En primera instancia, a partir de una curva dosis-efecto, determinamos el efecto citotóxico del paclitaxel sobre las células A549, con el fin de poder calcular su valor de $IC_{50}$. Se evaluaron diferentes concentraciones de paclitaxel (0.1 µM, 0.25 µM, 0.50 µM, 1 µM y 10 µM) por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, realizamos el conteo celular, observando que a partir de una concentración de 0.25 µM de paclitaxel, hay una reducción significativa del 30% sobre la viabilidad de las células A549, para 0.50 µM, una reducción del 50%, y para concentraciones superiores (1 y 10 µM), del 60 y 70%, respectivamente **(Figura 14).**

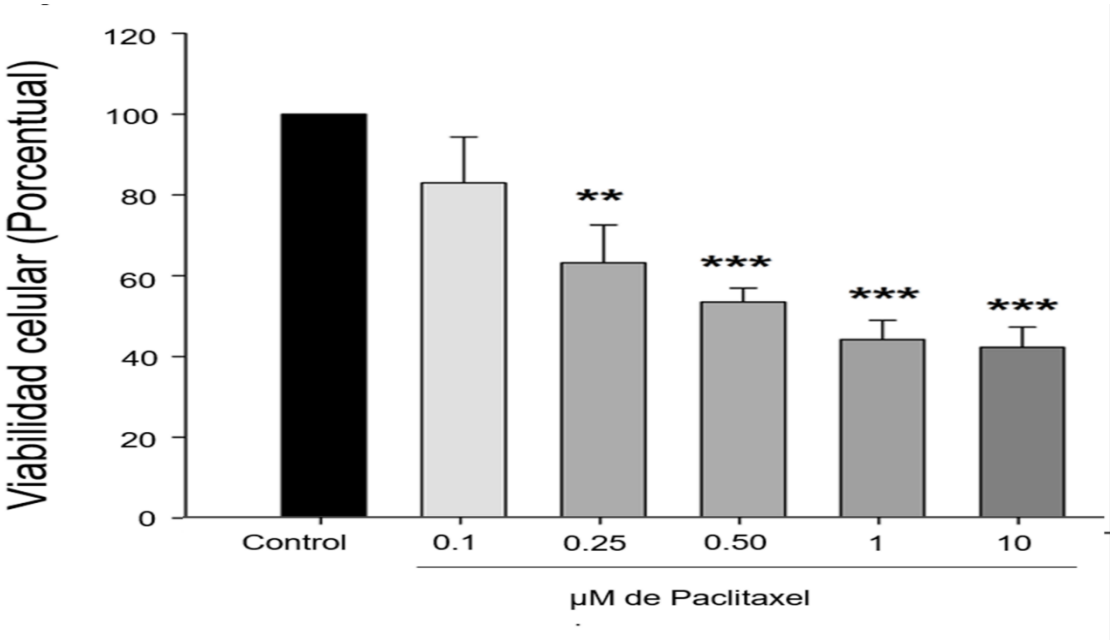



**FIGURA 14. Curva dosis-efecto del paclitaxel sobre la viabilidad de las células A549.** Las células A549 fueron tratadas a diferentes concentraciones de paclitaxel (0.1 µM, 0.25 µM, 0.50 µM 1 µM y 10 µM) por 48 horas. Se realizo el conteo celular con la cámara Neubauer, se comparó el número de células tratadas con paclitaxel con respecto al grupo control. Todos los datos fueron normalizados. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (***) el valor de $p^{***} \leq 0.001$, (**) el valor de $p^{**} \leq 0.01$.

Una vez determinada la $IC_{50}$ del paclitaxel, se procedió a establecer el tiempo de tratamiento idóneo mediante un curso temporal, evaluando el efecto citotóxico del paclitaxel (0.50 µM) a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas). La **Figura 15** muestra que, a las 24 horas de tratamiento, se alcanza una reducción de aproximadamente del 60 al 50% en la población celular. Con estos resultados, se consideró trabajar con 0.50 µM de paclitaxel y una duración máxima de tratamiento por 24 horas, para los experimentos subsiguientes, donde se evaluará si el pretratamiento con 5 mM de cafeína es capaz de potenciar el efecto citotóxico del paclitaxel en las células A549.

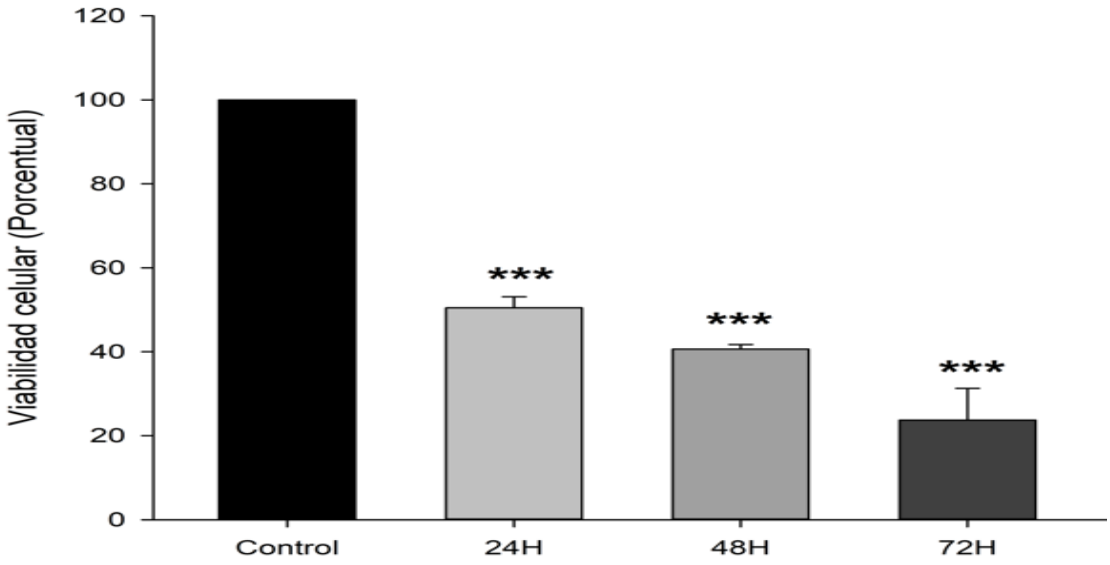



**FIGURA 15. Curso temporal del efecto de paclitaxel sobre la viabilidad de las células A549.** Las células A549 se mantuvieron con una concentración de 0.50 µM de paclitaxel a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Al finalizar el tratamiento se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer. Los datos fueron normalizados con respecto al grupo control. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (***) el valor de $p^{***} \leq 0.001$, (**) el valor de $p^{**} \leq 0.01$

Las células A549 fueron sometidas a las siguientes condiciones experimentales: a) 5 mM de cafeína por 48 horas; 0.50 µM de paclitaxel por 24 horas; y c) 5 mM de cafeína (48 h) y 0.50 µM de paclitaxel (24 h). Todas las células, se mantuvieron el mismo tiempo en cultivo, 5 días. Al finalizar el tratamiento, se realizó el conteo celular y se observó que tanto la cafeína como el paclitaxel, de manera independiente, ejercen su efecto citotóxico, y que el cotratamiento con cafeína, no modifica el efecto citotóxico del paclitaxel, manteniéndose éste, entre el 60 y 70%, con respecto al grupo control (**Figura 16**). Estos resultados sugieren que la cafeína y el paclitaxel comparten, muy probablemente la misma vía de señalización, lo cual limita el uso de la cafeína como un coadyuvante del paclitaxel.

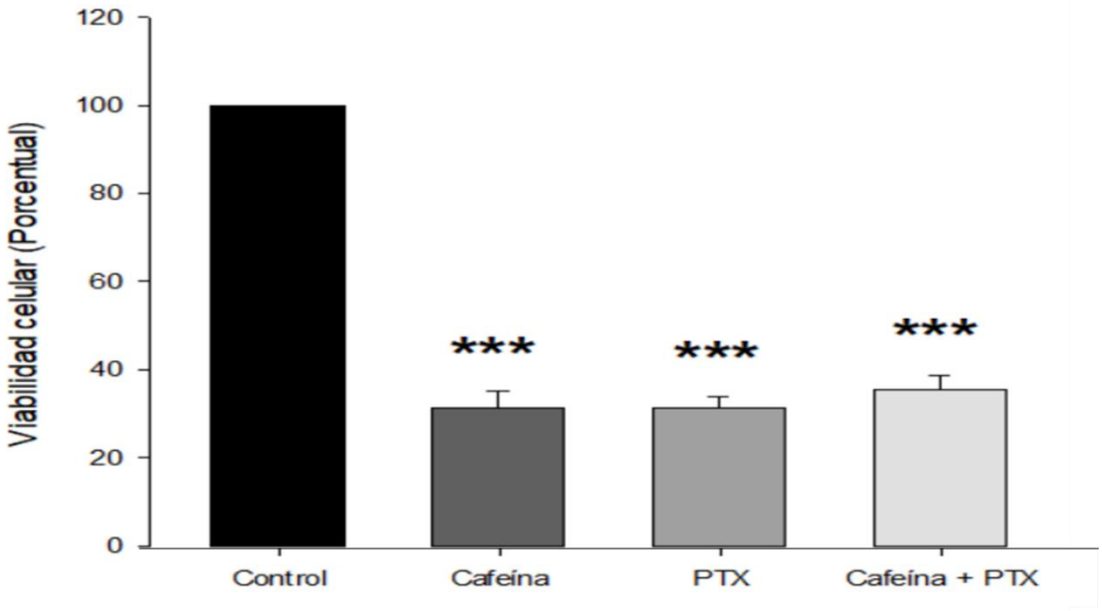



**FIGURA 16. El pretratamiento con cafeína no potencia el efecto citotóxico del paclitaxel sobre células A549.** Las células A549 se mantuvieron en presencia de 5 mM de cafeína por 48 horas, 500 nM de paclitaxel por 48 horas, y de manera conjunta cafeína (5 mM por 48 h) y paclitaxel (0.50 µM por 24 h). Se realizó el conteo celular con la cámara Neubauer. Los valores graficados son el promedio con su error estándar de tres experimentos independientes (n=3), (***) el valor de $p^{***} \leq 0.001$.

# DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón constituye una de las principales causas de muerte dentro de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. A pesar de que existen tratamientos quimioterapéuticos para el cáncer de pulmón, cuyo objetivo principal es la inhibición de la proliferación celular exacerbada en las células tumores. Sin embargo muchos de estos agentes terapéuticos, como lo es el Paclitaxel, con frecuencia tienden al fracaso debido a la resistencia que las células tumorales desarrollan a la quimioterapia **(Xu *et al*., 2024).**

Cafeína se ha correlacionado con la mejora el estado de ánimo, la preservación de la memoria y la función cognitiva ha mostrado ser un agente preventivo para la depresión y la demencia, esta última debido a que ralentiza la producción de péptidos β-amiloides y tau característicos de la enfermedad de Alzheimer. Además, colabora previniendo la osteopenia y osteoporosis. **(Lopes & Cunha, 2024)**. Dentro de las aplicaciones terapéuticas con gran relevancia de cafeína se encuentra su uso como tratamiento en la enfermedad neurológica del Parkinson, en el que actúa disminuyendo la formación de los cuerpos de Lewys, característico de dicha enfermedad. En el sistema endocrino, se ha correlacionado con la prevención de la Diabetes Mellitus tipo 2, al generar el aumento de la actividad de las células β-pancreáticas **(Song et al., 2024).** Cabe mencionar que a cafeína se le atribuye un importante efecto antiinflamatorio, es capaz de reducir factores proinflamatorios como IL-8, IL-6 y prostaglandinas E2 **(Pauwels & Volterrani, 2021).**

En cuanto al ámbito del cáncer, investigaciones recientes han relacionado a la cafeína con la reducción del riesgo de padecer cáncer, en algunos de los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial, como el cáncer de mama, hígado **(Pauwels & Volterrani, 2021)** y colorrectal **(Mackintosh et al., 2020)** incluso en un cáncer poco frecuente, como lo es la policitemia vera **(Podoltsev et al., 2020).**

Por lo tanto, ha cobrado un gran interés enfocar los esfuerzos en la investigación con el objetivo de dilucidar el papel de la cafeína en la actividad antitumoral proporcionada por su capacidad para inhibir la reparación del ADN, de manera que

repercute directamente sobre la proliferación e induce la apoptosis celular **(Tej & Nayak, 2018; Sabisz & Skladanowski, 2008;).**

Algunos de los estudios en los que se ha demostrado la eficacia del tratamiento con cafeína de diferentes tipos específicos de cáncer, incluyen a la línea celular SK-MEL-28, un tipo de cáncer de piel, en la que se observó que cafeína reduce la expresión de CD39 y CD73 al implementar dosis de 2 mM hasta 6 mM. Siendo su mecanismo de acción mostrado la interferencia de la hidrolisis de ATP y la posterior formación de adenosina, como resultados se obtuvo una reducción de la viabilidad celular y un aumento de la apoptosis al implementar dosis de cafeína desde 0.5 mM durante 24 horas **(Manica et al., 2024).**

Además, se ha propuesto que otro posible mecanismo de acción de la cafeína, pude ser a través de los receptores de adenosina, lo cual resultaría en una estimulación del aumento en el número de linfocitos T citotóxicos, lo que se puede traducir como una mejora de la respuesta inmune **(Venkata et al., 2019).**

La importante reducción de la viabilidad celular se observó también en cáncer colorrectal, al implementar una dosis de cafeína de 5 mM durante 24 horas, en las líneas celulares HCT116 y HEK293, sin embargo solo se obtuvo una reducción de la capacidad migratoria en la línea celular HER293 **(Khavari et al., 2024).** En el tratamiento del cáncer de esófago, cuello y cabeza de las líneas celulares KYSE-30 y HN5 respectivamente se obtuvo una reducción de la viabilidad celular con dosis >1mM de cafeína durante 72 horas **(Tonkaboni et al., 2021)**.

Se ha propuesto que el efecto reductor de la viabilidad celular inducido por cafeína es explicado por su capacidad para inhibir la reparación del ADN, de manera que se mantiene el daño adquirido, esto mecanismo ha sido observado y respaldado en las líneas celulares HCT116 y HT29 de cáncer colorrectal, al implementar la misma concentración de cafeína que en nuestro trabajo, pero durante 4 horas **(Yoon et al., 2023)**. En contraste, al emplear dosis menores de cafeína, en una escala <100 µM, no se ha encontrado evidencia de afectación a la viabilidad de las células

cancerosas, tales conjeturas se han realizado en experimentos sobre la línea celular NCI-H23 de cáncer de pulmón **(Meisaprow et al., 2021).**

Nuestros resultados iniciales apoyan estas observaciones pues, en nuestro modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas observamos una reducción significativa en la viabilidad celular, aunada a una reducción de la capacidad migratoria. Derivado de ello, nos interesamos en elucidar si cafeína, al igual que otros modelos, pudiese tener un efecto potenciador de la efectividad de fármacos usados en el tratamiento de esta enfermedad, reduciendo así el potencial metastásico que presenta.

En primera instancia se propuso que el potencial metastásico, estaba estrechamente ligado a la capacidad inherente de metastatizar, es decir, que las células tumorales estaban facultadas para mantener niveles elevados de proliferación, así como una mayor capacidad de migración por parte de las células cancerosas de un tumor primario, resultando en la formación de lesiones metastásicas secundarias **(Winnard et al., 2008).**

El efecto obtenido tras el tratamiento con cafeína aplicada en las células A549, mostro que la viabilidad de las células cancerosos sufrió una reducción, observándose una reducción de aproximadamente el 65% de la población celular con respecto al grupo control. Este mismo efecto ha sido observado en la línea celular Ovcar-3 de cáncer de ovario, en el cual utilizando la misma dosis de cafeína los investigadores obtuvieron una similar reducción de la viabilidad celular **(Lee et al., 2023).** En concordancia, se ha observado la tendencia hacia una reducción de la viabilidad celular en el tratamiento sobre las líneas celulares MBA-MB-231 y MCF-27 de cáncer de mama, con la misma dosis de cafeína utilizada en nuestra investigación, pero durante 24 horas de tratamiento **(Machado et al., 2021).** Previamente **Kitamoto et al., (2003)** reportaron que al utilizar una dosis de cafeína a 5 mM obtuvieron como resultado la supresión parcial de la viabilidad celular, como consecuencia de una acumulación temprana de las células en la fase G1, con una disminución en las células en las fases G2 y S del ciclo celular, y al utilizar dosis altas de cafeína (20 mM) se suprimió por completo la viabilidad celular, por lo tanto

podemos llegar a la conjetura que el efecto de la cafeína es dependiente de la dosis**.** Inclusive en cáncer de piel en la línea celular Mel 1 y Mel 3 se ha observado una disminución de la viabilidad celular al implementar concentraciones >0.5 mM de cafeína durante 72 horas **(Tabolacci et al., 2021).**

En nuestra investigación se observó, en presencia de cafeína, un aumento de aproximadamente el 10% con respecto a la condición control, en el ARNm que codifica para la expresión de Ki-67, un marcador molecular para la tasa proliferativa, que se ha correlacionado con la metástasis tumoral y un mal pronóstico; y cuya expresión elevada de ARNm después de tratamientos anticancerígenos se ha podido asociar a una reducción en la respuesta a la radioterapia **(Trokic et al., 2021).** Es interesante observar que existe un aumento del marcador de proliferación Ki67, sin embargo, si analizamos la metodología de este estudio, nosotros estamos evaluando la cantidad de ARN total de células que sobrevivieron al tratamiento con cafeína, pensándolo a profundidad, estas células posiblemente están equipadas con la expresión de elementos moleculares que favorecieron su proliferación y supervivencia, probablemente la característica particular que les permitió sobrevivir fue una mayor expresión de este elemento**.**

Además, nos causó gran interés estudiar a los elementos asociados al ciclo celular como lo son Ciclina E y Ciclina B; La Ciclina E es un elemento molecular que promueve la entrada al ciclo celular de la fase G1 a la S, asociada con la progresión del ciclo celular favoreciendo la proliferación celular mediante la activación de Cdc25, que activa a la proteína quinasa dependiente de ciclina CDK2 **(Qin et al., 2004);** Mientras que la expresión de ciclina B está asociada a la entrada a la mitosis, debido a que regula la fase del ciclo celular G2/M, su mayor expresión es en G2 y se ha implicado con la progresión del cáncer de pulmón de células no pequeñas, debido a que se ha correlacionado un nivel de expresión alto de este biomarcador con una menor supervivencia **(Q. Chen et al., 2024; Tan et al., 2023).** Sin embargo, nuestros resultados indican que los tratamientos aplicados no inciden sobre la expresión de ambos elementos. Quizás la proliferación este mediada por otros elementos moleculares que requieren ser estudiados a mayor profundidad.

Por otra parte, de manera paralela nos dimos a la tarea de evaluar la expresión del ARNm que codifica para una proteína pro-apoptótica y una proteína anti-apoptótica; la proteína Bax, una proteína pro-apoptótica de la familia de proteínas Bcl-2 relacionada con la apoptosis **(He et al., 2003)** en las células A549, nuestros resultados muestran que el tratamiento con cafeína aumenta significativamente la expresión de ARNm que codifica para Bax, aproximadamente un 30% con respecto al grupo control. De igual forma concordamos con los resultados obtenidos previamente por **Lee et al., (2023)** donde obtuvieron que la disminución de la viabilidad celular podría verse explicada por la inducción de la apoptosis que causa la cafeína, al obtener un aumento del ARNm que codifica para Bax, asimismo los autores evaluaron con citometría de flujo y tinción de anexina obteniendo resultados favorables que apoyan esta teoría al implementar cafeína a 5 mM en una línea celular de cáncer de ovario. De igual forma se apoya con resultados previos encontrados por **Machado et al., (2021)** observaron un aumento de la apoptosis con la misma concentración de cafeína durante 24 horas en cáncer de mama en dos líneas celulares diferentes MCF-27 y MDA-MB-231.

La proteína BIRC3 es un elemento de supervivencia celular que previene la apoptosis **(Suo et al., 2024)**. En nuestro estudio, al igual que con la evaluación de elementos asociados a la proliferación observamos que no hubo cambios en la expresión de BIRC3 tras el tratamiento planteado con cafeína**.** Por lo que sería de interés investigar otros de elementos de supervivencia propuestos por otros investigadores.

En cuanto a un segundo hallazgo relevante de nuestro trabajo, la capacidad migratoria de las células A549, obtuvimos que, posterior al tratamiento con cafeína, observamos una reducción significativa de dicha capacidad. Estudios relacionados observaron de la misma manera, la reducción de dicha capacidad al implementar cafeína a una dosis de 200 µM en la misma línea celular, los investigadores han atribuido sus resultados a que cafeína aumenta la degradación de Claudina 2 **(Eguchi et al., 2022).** De manera similar **Meisaprow et al., (2021)** también observaron en su estudio una reducción de la migración celular, atribuido a una

reducción de la formación de filopodios, cdc42, integrina αv y β3, obtenida con dosis de cafeína >500 μM durante 24 horas en un modelo de cáncer de pulmón NCI-H23.

Dos elementos moleculares relacionados con la migración son E-Cadherina y Vimentina, el primero es una proteína de adhesión celular, cuya principal función es mantener las uniones adherentes de las células epiteliales, y cuya reducción en el nivel de expresión es asociado a un fenómeno denominado transición epitelio-mesenquimal en las células cancerosas, favoreciendo así la progresión del cáncer **(Hui San & Ching Ngai, 2024).** Se observó que el tratamiento con cafeína no generó cambios en la expresión de E-cadherina, debido a que no se mostró expresión a nivel de ARNm de este elemento fenotipo epitelial asociado. En cuanto a la vimentina, se trata de una proteína fibrosa del citoesqueleto intracelular asociada a una mejora en las capacidades invasivas y metastásicas **(Huangfu et al., 2024)** se mostró que la presencia de cafeína no modifica el nivel de expresión de este marcador molecular de fenotipo evaluado, por lo que se sugiere evaluar la expresión de otros marcadores moleculares relacionados al fenotipo celular.

De forma variante al tratamiento con cafeína sola, investigaciones previas han optado por emplear a cafeína como un coadyuvante. En consecuencia, la evidencia ha arrojado resultados que parecen ser prometedores para el tratamiento de ciertos tumores malignos en órganos como páncreas, mama, próstata, estómago, hígado, cuello uterino, toroides y glioblastoma **( Osarieme et al., 2019; Li et al., 2018; Aliwaini et al., 2017; Pounis et al., 2017; Rosendahl et al., 2015; Kawano et al., 2012; Deplanque et al., 2004).** En un ejemplo concreto, se ha revelado que el pretratamiento con cafeína potencia el efecto de la gentamicina en las células de cáncer de próstata en la línea celular PC-3 **(Hall et al., 2017).**

En contraparte, Xu et al., **(2020)** observaron una inhibición del efecto citotóxico de paclitaxel a raíz del cotratamiento con cafeína, no obstante, es importante señalar que ellos implementaron una dosis baja de cafeína en comparación con nuestro estudio, en donde utilizamos una dosis media, esto significa que los efectos que modifican la viabilidad y migración celular, así como la prevención e inducción de la apoptosis, son dependientes de la dosis y de línea celular con la que se trabaja **(Xu et al., 2020).**

En nuestro trabajo, replicamos el cotratamiento de paclitaxel con cafeína sometiendo a las células A549 a dos condiciones que difieren en tiempo y dosis de paclitaxel, pero manteniendo una dosis de cafeína de 5 mM y en común entre ambas condiciones. El resultado obtenido fue que cafeína no tuvo repercusión alguna sobre el efecto citotóxico de paclitaxel, sugiriéndose como mecanismo responsable de este hallazgo la posible utilización de la misma vía de señalización por ambas partes del cotratamiento, lo que limita el uso de la cafeína como un coadyuvante del paclitaxel en el tratamiento sobre las células A549.

Nuestros resultados son prometedores debido a que observamos una reducción tanto de la migración como de la viabilidad celular, así como elementos asociados a estos. Su relevancia radica en que la cafeína, actúa como un coadyuvante favorece el efecto quimioterapéutico de paclitaxel sin embargo aún faltan elucidar los mecanismos por los cuales cafeína hace este efecto.

# CONCLUSIONES

- Cafeína reduce la capacidad proliferativa de las células A549, incrementando el nivel de expresión del ARNm que codifica para la proteína pro-apoptótica Bax.

- La capacidad migratoria de las células A549 se ve reducida por la presencia de cafeína.

- La cafeína no potencia el efecto citotóxico del paclitaxel sobre las células A549.

# BIBLIOGRAFÍA


Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (2024). *Nuevo informe sobre la carga mundial del cáncer en 2022 por región del mundo y nivel de desarrollo humano*. https://www.iarc.who.int/news-events/new-report-on-global-cancer-burden-in-2022-by-world-region-and-human-development-level/

Ahmadpour, S. T., Orre, C., Bertevello, P. S., Mirebeau-Prunier, D., Dumas, J.-F., & Desquiret-Dumas, V. (2023). Breast Cancer Chemoresistance: Insights into the Regulatory Role of lncRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(21). https://doi.org/10.3390/ijms242115897

Alexander, M., Kim, S. Y., & Cheng, H. (2020). Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*, *198*(6), 897–907. https://doi.org/10.1007/s00408-020-00407-5

Aliwaini, S. H., Dawas, S. A., Tayem, H., Aljoujou, S. H., & Al-Qatati, A. S. (2017). Combined Caffeine and Cisplatin Treatment Induces Synergistic Cytotoxicity in Hela Cell Line. *IUG Journal of Natural Studies*, *25*(2), 250–256.

Alqahtani, F. Y., Aleanizy, F. S., El Tahir, E., Alkahtani, H. M., & AlQuadeib, B. T. (2019). Paclitaxel. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, *44*, 205–238. https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.11.001

Bermúdez, A., Serrano, N. B., Teruel, R., Leyva, M. de los Á., & Naranjo, A. A. (2019). Biología del cáncer. En *Correo Científico Médico* (Vol. 23, pp. 1394–1416). scielocu.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. https://doi.org/10.3322/caac.21834

Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *24*(4), 553–562. https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X

Chen, D., Xu, J., Zhao, Y., Han, B., & Zhong, R. (2024). Prognostic value of pretreatment procalcitonin and neutrophil-lymphocyte ratio in extensive-stage small-cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *25*(1), 2331273. https://doi.org/10.1080/15384047.2024.2331273

Cheng, Y.-C., Ding, Y.-M., Hueng, D.-Y., Chen, J.-Y., & Chen, Y. (2016). Caffeine suppresses the progression of human glioblastoma via cathepsin B and MAPK signaling pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *33*, 63–72. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.004

de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, *41*(3), 374–403. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016

Deplanque, G., Céraline, J., Lapouge, G., Dufour, P., Bergerat, J.-P., & Klein-Soyer, C. (2004). Conflicting effects of caffeine on apoptosis and clonogenic survival of human K1 thyroid carcinoma cell lines with different p53 status after exposure to cisplatin or UVc irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *314*(4), 1100–1106. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.006

Du, W., Tang, Z., Du, A., Yang, Q., & Xu, R. (2024). Bidirectional crosstalk between the epithelial-mesenchymal transition and immunotherapy: A bibliometric study. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *20*(1), 2328403. https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2328403

Dubin, S., & Griffin, D. (2020). Lung Cancer in Non-Smokers. *Missouri Medicine*, *117*(4), 375–379.

Eguchi, H., Kimura, R., Onuma, S., Ito, A., Yu, Y., Yoshino, Y., Matsunaga, T., Endo, S., & Ikari, A. (2022). Elevation of Anticancer Drug Toxicity by Caffeine in Spheroid Model of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Mediated by Reduction in Claudin-2 and Nrf2 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24). https://doi.org/10.3390/ijms232415447

Gatti, L., & Zunino, F. (2005). *Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanisms BT - Chemosensitivity: Volume II: In VIVO Models, Imaging, and Molecular Regulators* (R. D. Blumenthal (ed.); pp. 127–148). Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-889-7:127

Genovese, I., Carinci, M., Modesti, L., Aguiari, G., Pinton, P., & Giorgi, C. (2021). Mitochondria: Insights into Crucial Features to Overcome Cancer Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9). https://doi.org/10.3390/ijms22094770

GLOBOCAN. (2022a). *Cancer Today*. Mortality. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&types=1

GLOBOCAN. (2022b). *Cancer Today*. incidence. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer

Guo, Q., Liu, L., Chen, Z., Fan, Y., Zhou, Y., Yuan, Z., & Zhang, W. (2022). Current treatments for non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, *12*, 945102. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.945102

Hall, S., Anoopkumar-Dukie, S., Grant, G. D., Desbrow, B., Lai, R., Arora, D., & Hong, Y. (2017). Modulation of chemotherapy-induced cytotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells by caffeine and chlorogenic acid. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *27*(5), 363–369. https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1296049

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V, Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J. J., Wu, Y.-L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet (London, England)*, *389*(10066), 299–311. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8

Hu, D., Li, X., Lin, C., Wu, Y., & Jiang, H. (2023). Deep Learning to Predict the Cell Proliferation and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer Based on FDG-PET/CT Images. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *13*(19). https://doi.org/10.3390/diagnostics13193107

Instituto Nacional del Cáncer. (2023). *¿Cómo se diagnóstica el cáncer?* https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/diagnostico

Kawano, Y., Nagata, M., Kohno, T., Ichimiya, A., Iwakiri, T., Okumura, M., & Arimori, K. (2012). Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *35*(3), 400–407. https://doi.org/10.1248/bpb.35.400

Khavari, F., Taheri, M., Manoochehri, H., Molaei, P., & Nouri, F. (2024). Evaluation of the Combined Effect of Caffeine and 5-Fluorouracil on Colorectal Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *25*(4), 1419–1424. https://doi.org/10.31557/APJCP.2024.25.4.1419

Kitamoto, Y., Sakurai, H., Mitsuhashi, N., Akimoto, T., & Nakano, T. (2003). Caffeine diminishes cytotoxic effects of paclitaxel on a human lung adenocarcinoma cell line. *Cancer Letters*, *191*(1), 101–107. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00591-8

Lee, S. J., Park, S. Y., Bak, S., Lee, M. W., Lim, D. J., Kim, H. D., Kim, D. G., & Kim, S. W. (2023). Synergistic Effect of Saccharin and Caffeine on Antiproliferative Activity in Human Ovarian Carcinoma Ovcar-3 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19). https://doi.org/10.3390/ijms241914445

Li, N., Zhang, P., Kiang, K. M. Y., Cheng, Y. S., & Leung, G. K. K. (2018). Caffeine Sensitizes U87-MG Human Glioblastoma Cells to Temozolomide through Mitotic Catastrophe by Impeding G2 Arrest. *BioMed Research International*, *2018*, 5364973. https://doi.org/10.1155/2018/5364973

Lian, J., Hua, T., Xu, J., Ding, J., Liu, Z., & Fan, Y. (2021). Interleukin-1β weakens paclitaxel sensitivity through regulating autophagy in the non-small cell lung cancer cell line A549. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(4), 293. https://doi.org/10.3892/etm.2021.9724

Liu, F., Liu, D., Yang, Y., & Zhao, S. (2013). Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncology Letters*, *5*(4), 1261–1265. https://doi.org/10.3892/ol.2013.1154

Lopes, C. R., & Cunha, R. A. (2024). Impact of coffee intake on human aging: Epidemiology and cellular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, *102*(August), 0–3. https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102581

Louis, T., Lucia, F., Cousin, F., Mievis, C., Jansen, N., Duysinx, B., Le Pennec, R., Visvikis, D., Nebbache, M., Rehn, M., Hamya, M., Geier, M., Salaun, P.-Y., Schick, U., Hatt, M., Coucke, P., Lovinfosse, P., & Hustinx, R. (2024). Identification of CT radiomic features robust to acquisition and segmentation variations for improved prediction of radiotherapy-treated lung cancer patient recurrence. *Scientific Reports*, *14*(1), 9028. https://doi.org/10.1038/s41598-024-58551-4

Machado, K. L., Marinello, P. C., Silva, T. N. X., Silva, C. F. N., Luiz, R. C., Cecchini, R., & Cecchini, A. L. (2021). Oxidative Stress in Caffeine Action on the Proliferation and Death of Human Breast Cancer Cells MCF-7 and MDA-MB-231. *Nutrition and Cancer*, *73*(8), 1378–1388. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1795693

Mackintosh, C., Yuan, C., Ou, F.-S., Zhang, S., Niedzwiecki, D., Chang, I.-W., O'Neil, B. H., Mullen, B. C., Lenz, H.-J., Blanke, C. D., Venook, A. P., Mayer, R. J., Fuchs, C. S., Innocenti, F., Nixon, A. B., Goldberg, R. M., O'Reilly, E. M., Meyerhardt, J. A., & Ng, K. (2020). Association of Coffee Intake With Survival in Patients With Advanced or Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA Oncology*, *6*(11), 1713–1721. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.3938

Manica, D., da Silva, G. B., de Lima, J., Cassol, J., Dallagnol, P., Narzetti, R. A., Moreno, M., & Bagatini, M. D. (2024). Caffeine reduces viability, induces apoptosis, inhibits migration and modulates the CD39/CD73 axis in metastatic cutaneous melanoma cells. *Purinergic Signalling*, *20*(4), 385–397. https://doi.org/10.1007/s11302-023-09967-6

Meisaprow, P., Aksorn, N., Vinayanuwattikun, C., Chanvorachote, P., & Sukprasansap, M. (2021). Caffeine Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Inhibits Migration through Integrin αv, β3, and FAK/Akt/c-Myc Signaling Pathway. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(24). https://doi.org/10.3390/molecules26247659

Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. A., Shenkier, T., Cella, D., & Davidson, N. E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, *357*(26), 2666–2676. https://doi.org/10.1056/NEJMoa072113

Mondal, P., & Meeran, S. M. (2021). microRNAs in cancer chemoresistance: The sword and the shield. *Non-Coding RNA Research*, *6*(4), 200–210. https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2021.12.001

Nassif, S., Wichmann, J., Strube, D., Vassis, S., Christiansen, H., & Steinmann, D. (2022). Cisplatin

Versus Carboplatin and Paclitaxel in Radiochemotherapy for Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *In Vivo (Athens, Greece)*, *36*(2), 821–832. https://doi.org/10.21873/invivo.12769

National Foundation for Cancer Research. (2020). *Small Cell Lung Cancer vs. Non-small Cell Lung Cancer: What's the Difference?* https://www.nfcr.org/blog/small-cell-lung-cancer-vs-non-small-cell-lung-cancer-whats-the-difference/

Ngoi, N. Y., Syn, N. L., Goh, R. M., Goh, B. C., Huang, R. Y.-J., Soon, Y. Y., James, E., Cook, A., Clamp, A., & Tan, D. S. (2022). Weekly versus tri-weekly paclitaxel with carboplatin for first-line treatment in women with epithelial ovarian cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2*(2), CD012007. https://doi.org/10.1002/14651858.CD012007.pub2

Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16). https://doi.org/10.3390/ijms22168661

O'Callaghan, D. S., O'Donnell, D., O'Connell, F., & O'Byrne, K. J. (2010). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *5*(12), 2024–2036. https://doi.org/https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f387e4

Organización Mundial de la Salud. (2023). *Cáncer de pulmón*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer

Osarieme, E. D., Modupe, D. T., & Oluchukwu, O. P. (2019). The anticancer activity of caffeine-a review. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, *3*(5), 326–342.

Padinharayil, H., Varghese, J., John, M. C., Rajanikant, G. K., Wilson, C. M., Al-Yozbaki, M., Renu, K., Dewanjee, S., Sanyal, R., Dey, A., Mukherjee, A. G., Wanjari, U. R., Gopalakrishnan, A. V., & George, A. (2023). Non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Implications on molecular pathology and advances in early diagnostics and therapeutics. *Genes & Diseases*, *10*(3), 960–989. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.07.023

Pascua, S. M., McGahey, G. E., Ma, N., Wang, J. J., & Digman, M. A. (2020). Caffeine and Cisplatin Effectively Targets the Metabolism of a Triple-Negative Breast Cancer Cell Line Assessed via Phasor-FLIM. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7). https://doi.org/10.3390/ijms21072443

Pauwels, E. K. J., & Volterrani, D. (2021). Coffee Consumption and Cancer Risk: An Assessment of the Health Implications Based on Recent Knowledge. *Medical Principles and Practice*, *30*(5), 401–411. https://doi.org/10.1159/000516067

Podoltsev, N. A., Wang, X., Wang, R., Hofmann, J. N., Liao, L. M., Zeidan, A. M., Mesa, R., & Ma, X. (2020). Lifestyle factors and risk of myeloproliferative neoplasms in the NIH-AARP diet and

health study. *International Journal of Cancer*, *147*(4), 948–957. https://doi.org/10.1002/ijc.32853

Pounis, G., Tabolacci, C., Costanzo, S., Cordella, M., Bonaccio, M., Rago, L., D'Arcangelo, D., Filippo Di Castelnuovo, A., de Gaetano, G., Donati, M. B., Iacoviello, L., & Facchiano, F. (2017). Reduction by coffee consumption of prostate cancer risk: Evidence from the Moli-sani cohort and cellular models. *International Journal of Cancer*, *141*(1), 72–82. https://doi.org/10.1002/ijc.30720

Ramos, A., Sadeghi, S., & Tabatabaeian, H. (2021). Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17). https://doi.org/10.3390/ijms22179451

Rodak, K., Kokot, I., & Kratz, E. M. (2021). Caffeine as a Factor Influencing the Functioning of the Human Body-Friend or Foe? *Nutrients*, *13*(9). https://doi.org/10.3390/nu13093088

Rosendahl, A. H., Perks, C. M., Zeng, L., Markkula, A., Simonsson, M., Rose, C., Ingvar, C., Holly, J. M. P., & Jernström, H. (2015). Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(8), 1877–1887. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1748

Sabisz, M., & Skladanowski, A. (2008). Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *9*(4), 325–336. https://doi.org/10.2174/138920108785161497

Salud, O. M. de la. (2022). *Cáncer*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer

Satoh, T., Xu, R.-H., Chung, H. C., Sun, G.-P., Doi, T., Xu, J.-M., Tsuji, A., Omuro, Y., Li, J., Wang, J.-W., Miwa, H., Qin, S.-K., Chung, I.-J., Yeh, K.-H., Feng, J.-F., Mukaiyama, A., Kobayashi, M., Ohtsu, A., & Bang, Y.-J. (2014). Lapatinib Plus Paclitaxel Versus Paclitaxel Alone in the Second-Line Treatment of HER2-Amplified Advanced Gastric Cancer in Asian Populations: TyTAN—A Randomized, Phase III Study. *Journal of Clinical Oncology*, *32*(19), 2039–2049. https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.6136

Schabath, M. B., & Cote, M. L. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *28*(10), 1563–1579. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221

Song, X., Singh, M., Lee, K. E., Vinayagam, R., & Kang, S. G. (2024). Caffeine: A Multifunctional Efficacious Molecule with Diverse Health Implications and Emerging Delivery Systems.

*International Journal of Molecular Sciences*, *25*(22). https://doi.org/10.3390/ijms252212003

Stapelfeld, C., Dammann, C., & Maser, E. (2020). Sex-specificity in lung cancer risk. *International Journal of Cancer*, *146*(9), 2376–2382. https://doi.org/10.1002/ijc.32716

Sugawara, S., Lee, J.-S., Kang, J.-H., Kim, H. R., Inui, N., Hida, T., Lee, K. H., Yoshida, T., Tanaka, H., Yang, C.-T., Nishio, M., Ohe, Y., Tamura, T., Yamamoto, N., Yu, C.-J., Akamatsu, H., Namba, Y., Sumiyoshi, N., & Nakagawa, K. (2021). Nivolumab with carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab for first-line treatment of advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *32*(9), 1137–1147. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.004

Suo, F., Wu, Y., Zhou, Q., Li, L., & Wei, X. (2024). BIRC3-HSP90B1 Interaction Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Progression through the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *ACS Omega*, *9*(17), 19148–19157. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10274

Tabolacci, C., Cordella, M., Rossi, S., Bonaccio, M., Eramo, A., Mischiati, C., Beninati, S., Iacoviello, L., Facchiano, A., & Facchiano, F. (2021). Targeting melanoma-initiating cells by caffeine: In silico and in vitro approaches. *Molecules*, *26*(12), 1–15. https://doi.org/10.3390/molecules26123619

Tej, Venkata Charan Naga, G., Neogi, K., Verma, S. S., Chandra Gupta, S., & Nayak, P. K. (2019). Caffeine-enhanced anti-tumor immune response through decreased expression of PD1 on infiltrated cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Pharmacology*, *859*, 172538. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172538

Tej, G. N. V. C., & Nayak, P. K. (2018). Mechanistic considerations in chemotherapeutic activity of caffeine. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *105*, 312–319. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.144

Tempero, M. A., Pelzer, U., O'Reilly, E. M., Winter, J., Oh, D.-Y., Li, C.-P., Tortora, G., Chang, H.-M., Lopez, C. D., Bekaii-Saab, T., Ko, A. H., Santoro, A., Park, J. O., Noel, M. S., Frassineti, G. L., Shan, Y.-S., Dean, A., Riess, H., Van Cutsem, E., … Reni, M. (2023). Adjuvant nab-Paclitaxel + Gemcitabine in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Results From a Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *41*(11), 2007–2019. https://doi.org/10.1200/JCO.22.01134

Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, *25*(1), 45–52. https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829

Tolaney, S. M., Guo, H., Pernas, S., Barry, W. T., Dillon, D. A., Ritterhouse, L., Schneider, B. P., Shen, F., Fuhrman, K., Baltay, M., Dang, C. T., Yardley, D. A., Moy, B., Marcom, P. K., Albain, K. S., Rugo, H. S., Ellis, M. J., Shapira, I., Wolff, A. C., … Winer, E. P. (2019). Seven-Year Follow-Up Analysis of Adjuvant Paclitaxel and Trastuzumab Trial for Node-Negative, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *37*(22), 1868–1875. https://doi.org/10.1200/JCO.19.00066

Tolaney, S. M., Tayob, N., Dang, C., Yardley, D. A., Isakoff, S. J., Valero, V., Faggen, M., Mulvey, T., Bose, R., Hu, J., Weckstein, D., Wolff, A. C., Reeder-Hayes, K., Rugo, H. S., Ramaswamy, B., Zuckerman, D., Hart, L., Gadi, V. K., Constantine, M., … Krop, I. (2021). Adjuvant Trastuzumab Emtansine Versus Paclitaxel in Combination With Trastuzumab for Stage I HER2-Positive Breast Cancer (ATEMPT): A Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *39*(21), 2375–2385. https://doi.org/10.1200/JCO.20.03398

Tonkaboni, A., Lotfibakhshaiesh, N., Danesh, P., Tajerian, R., & Ziaei, H. (2021). Evaluation of Inhibitory Effects of Caffeine on Human Carcinoma Cells. *Nutrition and Cancer*, *73*(10), 1998–2002. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1819344

Wang, Z., Zhang, L., Wan, Z., He, Y., Huang, H., Xiang, H., Wu, X., Zhang, K., Liu, Y., Goodin, S., Du, Z., & Zheng, X. (2020). Atorvastatin and Caffeine in Combination Regulates Apoptosis, Migration, Invasion and Tumorspheres of Prostate Cancer Cells. *Pathology Oncology Research : POR*, *26*(1), 209–216. https://doi.org/10.1007/s12253-018-0415-7

Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(18), 2677–2681. https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916

Winnard, P. T. J., Pathak, A. P., Dhara, S., Cho, S. Y., Raman, V., & Pomper, M. G. (2008). Molecular imaging of metastatic potential. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *49 Suppl 2*(Suppl 2), 96S-112S. https://doi.org/10.2967/jnumed.107.045948

Xu, H., Du, Z., Li, Z., Liu, X., Li, X., Zhang, X., & Ma, J. (2024). MUC1-EGFR crosstalk with IL-6 by activating NF-κB and MAPK pathways to regulate the stemness and paclitaxel-resistance of lung adenocarcinoma. *Annals of Medicine*, *56*(1), 2313671. https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2313671

Xu, H., Wang, L., Shi, B., Hu, L., Gan, C., Wang, Y., Xiang, Z., Wang, X., & Sheng, J. (2020). Caffeine inhibits the anticancer activity of paclitaxel via down-regulation of α-tubulin acetylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *129*, 110441. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110441

Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *246*(16), 1791–1801. https://doi.org/10.1177/15353702211005390

Yoon, S., Lee, B. K., & Kim, K. P. (2023). Caffeine enhances chemosensitivity to irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Phytomedicine*, *121*(September), 155120. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155120

You, M., Xie, Z., Zhang, N., Zhang, Y., Xiao, D., Liu, S., Zhuang, W., Li, L., & Tao, Y. (2023). Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 196. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01442-3

Zajdel, A., Nycz, J., & Wilczok, A. (2021). Lapatinib enhances paclitaxel toxicity in MCF-7, T47D, and MDA-MB-321 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*, *75*, 105200. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105200

Zhang, X., Ren, X., Tang, J., Wang, J., Zhang, X., He, P., Yao, C., Bian, W., & Sun, L. (2020). Hyaluronic acid reduction-sensitive polymeric micelles achieving co-delivery of tumor-targeting paclitaxel/apatinib effectively reverse cancer multidrug resistance. *Drug Delivery*, *27*(1), 825–835. https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1770373

Zheng, W., & Xu, S. (2020). Analysis of Differential Expression Proteins of Paclitaxel-Treated Lung Adenocarcinoma Cell A549 Using Tandem Mass Tag-Based Quantitative Proteomics. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 10297–10313. https://doi.org/10.2147/OTT.S259895

Zhu, L., & Chen, L. (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *24*, 40. https://doi.org/10.1186/s11658-019-0164-y

Zhu, Z., Chen, D., Zhang, W., Zhao, J., Zhi, L., Huang, F., Ji, H., Zhang, J., Liu, H., Zou, L., & Wang, Y. (2018). Modulation of alternative splicing induced by paclitaxel in human lung cancer. *Cell Death & Disease*, *9*(5), 491. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0539-4

Zou, J. (2023). Site-specific delivery of cisplatin and paclitaxel mediated by liposomes: A promising approach in cancer chemotherapy. *Environmental Research*, *238*, 117111. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117111