



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

“EFECTO DE p53 SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS  
TUMORALES SOMETIDAS A HIPOXIA”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. ILEANA HERNÁNDEZ RESÉNDIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, “IGNACIO CHÁVEZ”

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MA. EUGENIA TORRES MARQUEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS GENÓMICAS, INMEGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**AGRADECIMIENTOS:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS. INSTITUTO DE  
FISIOLOGÍA CELULAR.

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA y TECNOLOGÍA (CONACyT),**

Proyectos: 239930 y 107183

No. de becario: 233316

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, "IGNACIO- CHÁVEZ".**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

## Resumen

Además de la capacidad de proliferación y evasión de la muerte celular, las células tumorales presentan un metabolismo energético que difiere de una célula normal, volviéndolas capaces de sobrevivir en microambientes de estrés y mantener una alta tasa de proliferación, la cual requiere de una gran cantidad de energía en forma de ATP. Las células normales obtienen el ATP de dos vías, la glucólisis y la fosforilación oxidativa. En condiciones de aerobiosis, la obtención de ATP proviene en mayor proporción de la mitocondria; mientras que en anaerobiosis, la obtención de ATP proviene en mayor proporción de la glucólisis. En cambio en células tumorales, el flujo de la glucólisis se encuentra activo aún en condiciones de aerobiosis. Estos cambios son el resultado de la sobreexpresión de oncogenes e inhibición de supresores tumorales involucrados en la regulación de las vías energéticas. Uno de los supresores tumorales más estudiados en el campo del cáncer es la proteína p53, factor de transcripción que responde a diversos tipos de estrés como: estrés genotóxico, daño al DNA por radiación ultravioleta, estrés nutricional e hipoxia. En respuesta, p53 modula procesos de inhibición del crecimiento tumoral, deteniendo el ciclo celular, evitando la inestabilidad genética y regulando el metabolismo energético. En más del 60% de todos los tipos de cáncer, p53 se encuentra mutado o inhibido, provocando la pérdida de sus vías canónicas de supresión tumoral. En este proyecto se evaluó la modulación del metabolismo energético mediado por p53 en células de cáncer cervicouterino: HeLa-L (con niveles muy bajos de p53), HeLa-H (con sobreexpresión de p53) y en células de cáncer de mama: MCF7 (con niveles endógenos de p53) y p53shMCF7 (con un silenciamiento para p53) en condiciones de normoxia (21% de O<sub>2</sub>) e hipoxia (0.1% de O<sub>2</sub>), condiciones en las que p53 es fosforilado para su activación y además, condiciones en las que un tumor sólido se encuentra en crecimiento. Los resultados obtenidos demuestran que p53 responde de una manera diferente dependiendo de la concentración de oxígeno presente en el medio. En normoxia p53 causa: un aumento del 60% en (i) el flujo de la FO, (ii) el potencial transmembranal mitocondrial y (iii) el contenido de proteínas mitocondriales, por otro lado, en condiciones de hipoxia, la activación de p53 causa: i) la disminución del flujo glucolítico y ii) la disminución del flujo de la FO mediante la activación de la autofagia, un proceso que involucra degradación mitocondrial y que es regulado por p53. El análisis del metabolismo

energético en células con sobreexpresión de p53 nos permitió entender la fina regulación del supresor tumoral p53 sobre el metabolismo energético en condiciones semejantes a las de un tumor sólido en crecimiento, y que efecto tendría la pérdida de esta proteína en células tumorales.

## Summary

Besides the ability of proliferation and evasion of cell death, tumor cells have an energy metabolism which differs from a normal cell, rendering them capable to survive in stressful microenvironments maintaining a high proliferation rate, which requires a high amount of energy as ATP. Normal cells obtained ATP from two pathways, glycolysis and oxidative phosphorylation (OxPhos). In aerobic conditions, normal cells obtain ATP mainly from mitochondria; while in anaerobiosis, ATP comes in a greater proportion from glycolysis. In contrast, in tumor cells, the flow of glycolysis is still active under aerobic conditions. These changes are the result of the oncogenes overexpression and tumor suppressor inhibition both involved in the energy pathways regulation. One of the most studied tumor suppressor proteins in cancer field is p53, a transcriptional factor involved in the regulation of a variety of genes linked in cell processes as well as tumor growth inhibition, cell cycle arrest, genetic stability and regulation of energy metabolism; however, it is mutated or inhibited in more than 60% of all cancers types. In this project we evaluated the energy pathways modulation from human tumor cells mediated by p53 in normoxia (21% O<sub>2</sub>) and hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>) conditions in which p53 is phosphorylated for activation and also conditions where a solid tumor is growing. The results suggest that p53 responds differently depending on the oxygen concentration present in the medium. While in normoxia causes a 60% increase in (i) OxPhos flow, (ii) the mitochondrial transmembrane potential and (iii) content of mitochondrial proteins, under hypoxic conditions, activation of p53 causes i) inhibition of increased glycolytic flux by the bind with HIF-1 $\alpha$  (protein-binding protein) and ii) activation of autophagy, a process of mitochondrial degradation. Analysis of energy metabolism in cells with overexpression of p53 facilitate the understanding of the mechanisms of regulation by the tumor suppressor p53 related to energy metabolism, and how changes in the content of this protein have effects on the human tumor energy metabolism.

## ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
1.	Epidemiología del cáncer .....	1
2.	Definición y características del cáncer .....	2
3.	Reprogramación metabólica .....	2
4.	Metabolismo energético de células tumorales en normoxia.....	3
5.	Metabolismo energético de células tumorales en hipoxia.....	4
6.	La proteína p53.....	5
7.	Regulación del metabolismo energético mediado por p53 .....	6
8.	p53 y autofagia.....	9
II.	Hipótesis.....	10
III.	Objetivo general.....	10
1.	Objetivos particulares.....	10
IV.	Material y métodos .....	11
1.	Transfección de células HeLa y MCF7.....	11
2.	Condiciones de cultivo.....	11
3.	Condiciones de cultivo en hipoxia.....	12
4.	Obtención de suspensiones celulares para la medición de flujos energéticos en las condiciones experimentales.....	12
5.	Inmunoensayos.....	14
6.	Análisis de p53 por inmunofluorescencia.....	14
7.	Análisis del contenido de mitocondrias y lisosomas por microscopía confocal.....	15
8.	Determinación del potencial transmembranal mitocondrial .....	15
V.	Resultados.....	16

1.	Nivel de mRNA de p53 en condiciones de normoxia.....	16
2.	Contenido de p53 y de sus proteínas blanco en normoxia e hipoxia.....	16
3.	Localización de p53 en la célula.....	17
4.	Efecto de p53 sobre la proliferación celular.....	18
5.	Efecto de p53 sobre el metabolismo mitocondrial en normoxia.....	20
	a. Contenido del mRNA y proteínas mitocondriales.....	20
	b. Efecto de p53 sobre el flujo de la FO en normoxia.....	22
6.	Efecto de p53 sobre el metabolismo glucolítico en normoxia.....	25
	a. Contenido de proteínas de la glucólisis .....	25
	b. Efecto de p53 sobre el flujo de la glucólisis.....	25
7.	Efecto de p53 sobre el metabolismo energético en hipoxia.....	26
	a. Contenido de mRNA y proteínas mitocondriales en hipoxia.....	26
	b. Efecto de p53 sobre el flujo de la FO en hipoxia.....	28
8.	Mecanismo de degradación mitocondrial.....	28
9.	Efecto de p53 sobre el contenido de proteínas de la glucólisis en hipoxia.....	31
10.	Efecto de p53 sobre el flujo glucolítico en hipoxia.....	33
VI.	Discusión.....	35
VII.	Conclusión.....	39
VIII.	Referencias.....	40
IX.	Artículos publicados durante el doctorado.....	46



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Epidemiología del cáncer

En el 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 8.2 millones de defunciones relacionadas con cáncer, representando en la actualidad la segunda causa de muerte a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2012). El cáncer es una enfermedad multifactorial que afecta diversos órganos y tejidos; dependiendo del tipo de cáncer será la calidad y sobrevida del paciente. Por ejemplo, en el cáncer de páncreas, glioma, pulmón y colorectal, la sobrevida a 5 años es menor del 50% además de presentar una baja calidad de vida.

En México, los tipos de cáncer con mayor porcentaje de mortalidad en varones son los de próstata (16%) y de tráquea/bronquios/pulmón (13%). En mujeres, los tipos de cáncer de mayor porcentaje son de mama (14.5%), de cérvix (10.12%) y de hígado/vías biliares (8.25%) (INEGI, 2013) (Fig. 1).

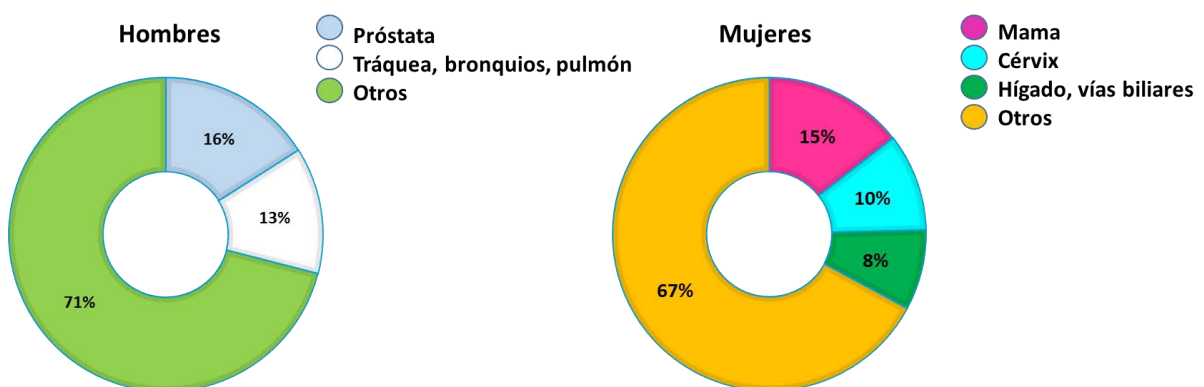


Figura 1. Porcentaje de mortalidad por cáncer en hombres y mujeres.

## **2. Definición y características del cáncer**

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que involucra células en crecimiento acelerado con potencial de invasión a diversos órganos y tejidos. Las células que originan el cáncer presentan al menos seis características que comparten independientemente del tejido de origen y las cuales se adquieren durante el desarrollo y transformación celular (Hanahan y Weinberg, 2000).

Según Hanahan y Weinberg (2000) las características del cáncer son la proliferación descontrolada, la evasión de los mecanismos de supresión tumoral, la resistencia a muerte celular por apoptosis, la inducción de angiogénesis, la evasión del sistema inmune y la reprogramación metabólica.

Aunque todas estas características han sido materia de estudio en los últimos años, la reprogramación metabólica ha sido una de las características menos estudiadas y se analiza a continuación.

## **3. Reprogramación metabólica**

Una característica fundamental para las células tumorales es la capacidad de mantener su proliferación acelerada. Las células de los tejidos normales ajustan su velocidad de proliferación promoviendo la represión/activación de algunas proteínas del ciclo celular. En el cáncer, las proteínas p21 y p27 están reprimidas mientras que las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) se encuentran activas con la finalidad de aumentar el número de duplicaciones celulares tanto en condiciones normales como cuando sobreviene algún tipo de estrés (Meek, 2009).

La proliferación crónica y poco controlada del cáncer involucra no solo cambios sobre la regulación de la proliferación celular, sino también, provoca ajustes en el metabolismo energético. En condiciones aerobias, las células normales oxidan la glucosa citosólica hacia piruvato (glucólisis aeróbica); posteriormente, el piruvato es transportado hacia la matriz mitocondrial para la generación de NADH+H, FADH<sub>2</sub> e intermediarios metabólicos que alimentan vías anapleróticas mitocondriales como el ciclo de Krebs. El NADH+ H es sustrato de la cadena transportadora de electrones, cuya oxidación promueve el transporte de

protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. Los protones son entonces sustrato de la ATP sintetasa para la producción de ATP.

En condiciones anaerobias, el piruvato es preferentemente transformado hacia lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Sin embargo, en las células cancerosas ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, la velocidad de glucólisis es mayor con respecto a una célula normal como se explica a continuación.

#### **4. Metabolismo energético de células tumorales en normoxia**

En 1942, Otto Warburg describió por primera vez que la célula tumoral mantenía una alta actividad glucolítica comparada con la célula normal aún en condiciones aeróbicas (efecto Warburg). Recientemente se ha propuesto que la activación de la glucólisis está ligado a la sobreexpresión y activación de oncogenes (h-RAS, k-RAS o c-MYC) o la presencia de mutaciones en genes supresores de tumor (*TP53*) que regulan directa o indirectamente a las enzimas glucolíticas (Jones y Thompson, 2009; Gatenby, 2004). La familia de proteínas RAS comprende proteínas de tipo GTPasa ancladas a la membrana plasmática, la cual forma parte de la vía de señalización de MAPK/ERK1/2 involucradas en la proliferación y el metabolismo celular. El proto-oncogen c-MYC codifica para un factor de transcripción involucrado en proliferación, crecimiento celular y aumento de la transcripción de proteínas glucolíticas como la lactato deshidrogenasa A (Dang et al. 1999), la sobreexpresión de estas proteínas en diversos tipos de cáncer causan efectos de supervivencia y cambios en el metabolismo celular.

Las células cancerosas también presentan cambios a nivel de mitocondria. Recientemente se reportó en ciertos tipos de cáncer que enzimas involucradas en la vía de la FO como la isocitrato deshidrogenasa (IDH) del ciclo de Krebs, presenta mutaciones que cambian los parámetros cinéticos de esta enzima (Yen et al., 2010); además, en algunas células cancerosas se ha observado un aumento en el contenido de la glutaminasa (GA) mitocondrial, lo que indica una oxidación activa de glutamina en la mitocondria (Wise et al., 2008).

## 5. Metabolismo energético de células tumorales en hipoxia

La hipoxia se define como una condición alejada de los vasos sanguíneos y en la que crecen la mayoría de los tumores sólidos. Se ha estimado que la concentración de oxígeno presente en el microambiente tumoral oscila entre los 10-14  $\mu\text{M}$  (considerado hipoxia severa,  $\sim 0.1\%$  de  $\text{O}_2$ ). La concentración de oxígeno limitante se asocia con activación de la glucólisis y el abatimiento de la FO.

*Glucólisis.* La hipoxia promueve la sobreexpresión de proteínas altamente modulables por la concentración de oxígeno intracelular como las prolin hidroxilasas (PH). Estas enzimas tienen dominios estructurales sensibles a oxígeno y activan vías de señalización involucradas en la defensa antioxidante y en la estabilización de algunos factores de transcripción que modulan al metabolismo glucolítico (Cummins et al., 2006; Wang et al., 1995). Por ejemplo, el factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), el cual tiene como blanco a los transportadores de glucosa (GLUT 1 y 2), la hexocinasa 1 y 2 (HKI y II), la hexosa fosfato isomerasa (HPI), la fosfofructocinasa 1 (PFKI), la aldolasa (ALD), la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la enolasa (ENO) y la lactato deshidrogenasa (LDH) (Semenza, 1994). Al parecer, la activación glucolítica en hipoxia tiene como función aparte de la síntesis de ATP, la producción de intermediarios metabólicos que son sustratos de otras vías catabólicas como son la vía de las pentosas fosfato (PPP), la síntesis de aminoácidos (alanina, serina, glicina), la síntesis de glicerol; todas ellas requeridas durante la duplicación celular.

*Fosforilación Oxidativa:* En hipoxia, el trabajo mitocondrial disminuye considerablemente, esto por la disminución en la actividad de algunas enzimas involucradas en el aporte de sustratos para la cadena respiratoria como la 2OGDH y la GA (Rodríguez- Enríquez, 2010). Aunque podría sugerirse que la disminución del trabajo mitocondrial es debido a la baja concentración de oxígeno presente en el microambiente, se ha reportado que la concentración en regiones hipóxicas es aún suficiente para la activación del complejo IV de la cadena transportadora de electrones ( $K_m$  de COXIV por  $\text{O}_2 = 0.4 \mu\text{M}$ ) (concentración estimada = 10-14  $\mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$ ). Otro proceso probablemente involucrado en esta respuesta ante la hipoxia es la disminución del número de

mitocondrias derivada de la activación mitofágica; sin embargo, hasta el momento no se ha correlacionado la disminución en el flujo con la activación de este proceso.

Al igual que los oncogenes, como c-Myc, H-Ras y HIF-1 $\alpha$ , que confieren estas propiedades a la célula tumoral, existen proteínas denominadas “supresoras tumorales”; como su nombre lo indica, son proteínas que inhiben o contrarrestan las adaptaciones de una célula tumoral a ambientes hostiles. Una de las proteínas más importantes en este grupo es p53, un supresor tumoral que se encuentra mutado o inactivo en la mayoría de los tipos de cáncer.

## **6. La proteína p53**

p53 es una proteína que pertenece al grupo de los factores de transcripción que regula procesos celulares involucrados en la estabilidad genética y la muerte celular (Meek, 1998). Recientemente se demostró que p53 también es capaz de regular las vías energéticas, modificando los niveles de transcritos de algunos genes o interaccionando directamente con proteínas involucradas en esta vía, por lo que se ha propuesto como una proteína esencial en el desarrollo y metabolismo intermediario del cáncer (Assaily et al., 2006).

Desde su descubrimiento en 1979 por el grupo de Arnold Levine, p53 ha sido estudiado en diversos modelos experimentales, incluyendo líneas celulares tanto normales como cancerosas y modelos animales, por lo que se ha recopilado información esencial sobre sus múltiples funciones.

p53 está formado por cinco dominios estructurales: 1) un dominio de transactivación o dominio N- terminal donde se regula su fosforilación/desfosforilación en los residuos de activación; 2) un dominio rico en prolina vinculado al proceso de muerte celular programada o apoptosis; 3) un dominio de unión al DNA y lugar de reconocimiento de sus elementos de respuesta; 4) un dominio de tetramerización, donde se lleva a cabo la oligomerización de los monómeros de p53 y 5) un dominio de regulación/acetilación que confiere estabilidad en la unión de p53-DNA (Römer et al., 2006; Vousden 2006; Meek et al., 1998).

En diversos tipos de cáncer como el de pulmón, colorectal, ovario y glioma, esta proteína tiene un alto porcentaje de mutación (40-70% dependiendo del tipo de cáncer), siendo el dominio de unión al DNA el sitio con mayor índice de mutabilidad (Hollstein et al., 1991). Diversos estudios clínicos han demostrado una correlación entre la presencia de estas mutaciones con el grado de malignidad y baja prognosis de pacientes con cáncer (Muller and Vousden 2014). En pacientes con cáncer de mama, subtipo triple negativo, se ha encontrado un alto porcentaje de p53 mutado, este subtipo es el que presenta mayor malignidad y baja supervivencia a 5 años; otro ejemplo es la correlación de la presencia de mutaciones en p53 y la baja supervivencia en pacientes con cáncer de ovario, en ambos casos, la expresión de p53 mutado o deletado fue significativamente mayor en pacientes con baja respuesta al tratamiento (Tommasino et al., 2003; Erickson et al., 2004; Langerod et al., 2007). Desde el punto de vista metabólico, varias mutaciones de p53 activan la glucólisis tumoral (cáncer de colon y mama) promoviendo la translocación de los transportadores de glucosa y la sobreexpresión de la HKII y la PGAM (Goel et al., 2003; Zhang et al., 2014), lo que podría indicar un aumento en el flujo glucolítico. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si la modulación que tiene p53 no mutado sobre las enzimas del metabolismo energético, realmente se ve reflejado en el flujo total de ambas vías energéticas. Por lo anterior nuestro estudio resulta de interés ya que sienta las bases bioquímicas de los cambios metabólicos asociados con p53 no mutado, para su futura extrapolación en un modelo más cercano a lo observado en la clínica, células con p53 mutado.

## **7. Regulación del metabolismo energético mediado por p53**

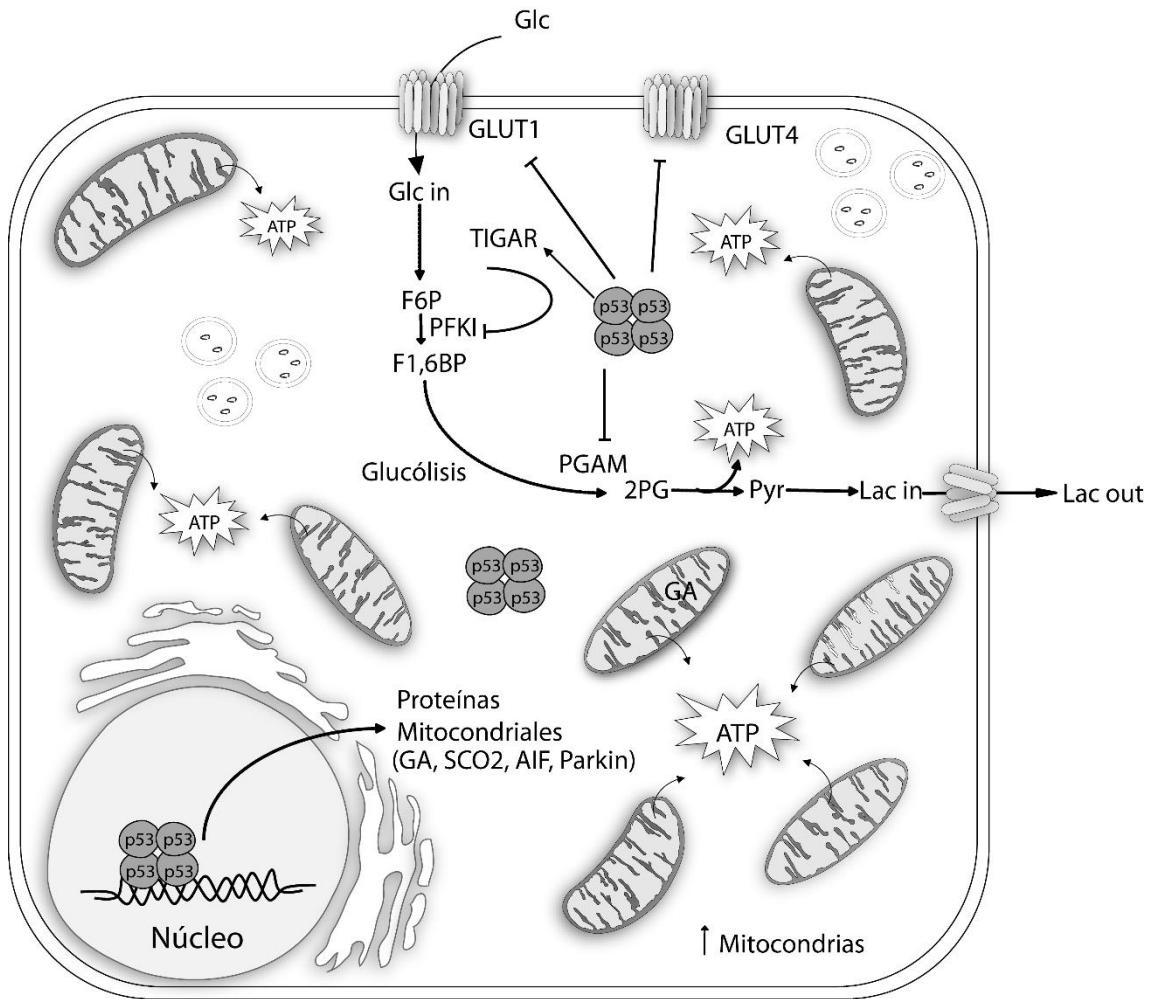
La relación de p53 con el metabolismo energético se describió en el 2004, cuando se demostró en osteosarcoma SaOS-2 y rhabdomyosarcoma CCL-136 que su sobreexpresión correspondía con una disminución (a) en los niveles (40-50%) de algunos transcritos de proteínas glucolíticas (GLUT1, GLUT3, GLUT4, PGAM) (Schwartzenberg et al., 2004; Kawuuchi et al., 2008); (b) en el consumo (30%) de glucosa externa y (c) en el contenido de fructosa 2,6 bisfosfato, un activador alostérico de la PFK-I (Vousden et al., 2009; Bensaad et al., 2006) (Fig. 2). Estos resultados sugirieron que p53 podría afectar negativamente a la glucólisis tumoral, contrarrestando el “Efecto Warburg” (Vousden et al., 2009);

sin embargo, los flujos glucolíticos no fueron medidos experimentalmente (Fig. 2).

Por otro lado, p53 también modula genes y proteínas involucradas en el metabolismo mitocondrial. En comparación con lo que se ha publicado para la glucólisis, p53 activa el flujo de la FO mediante la activación de la transcripción de genes que codifican para proteínas mitocondriales (Zhou et al., 2003). En células de cáncer de colon HCT116 y en fibroblastos de embrión de ratón MEFs, p53 aumentó 2-12 veces el transcrito de la proteína SCO2, involucrada en la síntesis de la citocromo oxidasa y de la glutaminasa (GA) (Matoba et al., 2006; Hu et al., 2010) (Fig. 2). SCO2 es un cofactor esencial para la transcripción de la subunidad I del complejo IV de la cadena transportadora de electrones y la GA es una enzima involucrada en el metabolismo de la glutamina, lleva a cabo la reacción de desaminación de la glutamina hacia glutamato. Otra enzima mitocondrial que ha sido descrita como posible blanco de p53 es la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), la cual es inhibida transcripcionalmente por p53 de una forma directa; la PDK fosforila a la piruvato deshidrogenasa (PDH) inactivándola y evitando la oxidación de piruvato (Contractor et al., 2012) (Fig. 2).

Existen otras proteínas mitocondriales reguladas por p53 como son el factor inducible por apoptosis (AIF) y la proteína Parkin. Al parecer, AIF confiere estabilidad al complejo I de la cadena transportadora de electrones, mientras que Parkin de una manera no tan clara favorece la FO y disminuye la glucólisis (Stambolsky et al., 2006; Zhang et al., 2011).

Desafortunadamente en todos estos trabajos, el análisis de p53 sobre el metabolismo energético se ha analizado midiendo únicamente los niveles de los transcritos y los contenidos de algunas proteínas. En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se demostró que el cambio en el contenido de transcrito no siempre correlaciona con cambios en los niveles de proteína, en sus actividades enzimáticas ni en el flujo total de la vía en la que participa (Moreno-Sánchez et al. 2016). Por lo que resulta de nuestro interés realizar un análisis global donde varios de los parámetros como contenido de proteínas, actividades y flujos sean medidos simultáneamente.



**Figura 2. Efecto de p53 sobre el metabolismo energético en normoxia (21% O<sub>2</sub>).** p53 inhibe a GLUT1, GLUT3 y GLUT4 y a la fosfoglicerato mutasa (PGAM); a su vez p53 activa a TIGAR, un inhibidor indirecto de la glucólisis el cual baja los niveles del activador glucolítico de la PFKI, fructosa 2,6 bisfosfato. En paralelo, p53 aumenta los transcritos de proteínas de la FO como la glutaminasa (GA), la enzima de ensamblaje de la citocromo oxidasa (SCO2), el factor inducible por hipoxia (AIF) y Parkin. Lo reportado sugiere un efecto contrario mediado por p53, una disminución de la glucólisis y un aumento en la fosforilación oxidativa.



## **8. p53 y autofagia**

La autofagia es un proceso de autodegradación, que sirve como fuente de energía en condiciones de estrés nutricional; también juega un papel importante en la remoción de proteínas no empaquetadas o agregados proteicos y eliminación de organelos dañados como mitocondrias, retículo endoplásmico, peroxisomas etc. (Glick et al., 2010). Múltiples genes que transcriben proteínas involucradas en este proceso son reguladas por p53, por ejemplo, DRAM, BNIP3 y Beclina1 (Azad et al. 2010). P53 tiene un papel dual sobre la activación autofágica dependiendo de su localización intracelular. La localización nuclear de p53 permite la activación la transcripción de genes de autofagia, mientras que su localización citosólica inhibe la autofagia mediante su unión con la membrana mitocondrial (Tasdemir et al., 2008).

Además del estrés nutricional, la hipoxia también activa la autofagia mediada por p53; sin embargo, hasta el momento se desconoce la vía por la cual se enciende este proceso en condiciones de hipoxia. Se ha reportado en diversas líneas celulares tumorales (HEK-293, MDA-MB231, U87, ZR-75) que la hipoxia severa aumenta la degradación mitocondrial a través del aumento en la transcripción de las proteínas mitofágicas BNIP3, beclina 1 y DRAM que además son blanco de p53 (Azad et al., 2010). Por lo tanto, la activación de este proceso puede verse reflejada en el metabolismo energético mitocondrial.

## **II. Hipótesis.**

La presencia de p53 afectará el metabolismo energético aumentando la sensibilidad de la fosforilación oxidativa a la hipoxia mediante la activación mitofágica.

## **III. Objetivo general**

Determinar el efecto de p53 sobre el flujo de la glucólisis y la FO en condiciones de hipoxia en células tumorales.

### **1. Objetivos particulares.**

- Determinar la funcionalidad de p53 en células HeLa-L (células carentes de p53) y HeLa-H (células con sobreexpresión de p53) en normoxia e hipoxia.
- Determinar el efecto de p53 en el crecimiento y proliferación de células HeLa-L y HeLa-H en normoxia e hipoxia.
- Evaluar el efecto de p53 sobre los niveles de proteínas glucolíticas y mitocondriales así como el potencial transmembranal mitocondrial y el flujo de ambas vías.
- Evaluar el efecto de p53 en el metabolismo energético de células MCF7 (con expresión endógena de p53) y p53shMCF7 (con un silenciamiento de p53).
- Evaluar el efecto del inhibidor de p53, pifitrin-  $\alpha$ , sobre la modulación del metabolismo energético en las diferentes líneas celulares.
- Identificar la autofagia como posible mecanismo de regulación del metabolismo mitocondrial.

## **IV. Material y métodos**

Las células HeLa- L (L, del inglés “low” o concentración baja de p53) son las células obtenidas de la ATTC. Las células HeLa- H (H, del inglés “high” o alto contenido de p53) fueron transfectadas establemente con un vector que sobreexpresa el gen de p53 de una forma constitutiva) tal como se describe a continuación.

### **1. Transfección de células HeLa y MCF7.**

La transfección de células HeLa con p53 y el silenciamiento de p53 en las células MCF7 se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Patricio Gariglio del laboratorio de genética molecular del CINVESTAV.

Para la transfección de p53 en células HeLa se sembraron aproximadamente 50,000 células en cajas de petri de 60 mm y se incubaron con 0.5 µg de plásmido pCMV- Neo- Bam WT (donado por el Dr. Bert Vogelstein de la Universidad de Johns Hopkins, Baltimore, USA), y se utilizó lipofectamina 2000, marca Invitrogen, siguiendo las especificaciones por el fabricante. Después de la transfección, las células se seleccionaron con 1200 µg/mL antibiótico G418 y se mantuvieron en medio DMEM completo más 800 µg/mL de G418 para mantener una transfección estable.

Para el silenciamiento de p53 en células MCF7 se utilizó un kit de silenciamiento (Sure Silencing RNA Interference Plasmid Based; SA Bioscience); se utilizaron 0.5 µg de plásmido de silenciamiento y lipofectamina 2000™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, se añadieron 800 µg/mL de antibiótico G418 para mantener una transfección estable.

### **2. Condiciones de cultivo**

Las diferentes líneas celulares se sembraron ( $5 \times 10^6$  células/mL) en cajas de Petri de 60 mm en 5 mL de medio Dulbecco MEM (Gibco; ThermoFisher, scientific, MD, USA) condicionado con 25 mM glucosa, 4 mM glutamina, 40 mM piruvato y una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales (0.2- 4 mM) suplementado con 5-10% de suero fetal bovino y 10,000 U de

penicilina/estreptomicina. Posteriormente fueron incubadas en 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire (21% de O<sub>2</sub>) a 37°C.

La genotipificación de las líneas celulares se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) Cd de México, indicando que las células HeLa presentan 15 de los 16 alelos canónicos que tiene la clona original del ATCC, mientras que las células MCF7 presentaron 16 de 16 alelos; estos alelos marcadores no se modificaron por el proceso de sobreexpresión o silenciamiento de p53.

### **3. Condiciones de cultivo en hipoxia**

La hipoxia se generó en una cámara modular Billups- Rothenberg, MIC-101. Las cajas de cultivo con medio DMEM fresco se colocaron dentro de la cámara junto con un recipiente que contenía 50 mL de agua destilada (para mantener la humedad), se cerró herméticamente y se desplazó el oxígeno interno con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>, 95% de nitrógeno y 0.1% de O<sub>2</sub>, durante 15 minutos a un flujo de 15-20 Lmp hasta alcanzar una concentración interna de O<sub>2</sub> de 0.1-0.2% (10-14 µM de oxígeno). Los experimentos se llevaron a cabo en la fase exponencial de crecimiento de las células (72 horas) para las determinaciones (Hökel y Vaupel, 2001).

### **4. Obtención de suspensiones celulares para la medición de flujos energéticos en las condiciones experimentales.**

Después de 24 horas, las células se cosecharon con 2 mL de tripsina, se lavaron con 10 mL de Ringer Krebs (RK) (125 mM NaCl, 5 mM de KCl, 25 mM de HEPES, 1.4 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) y se centrifugaron a 1500 rpm por 3-4 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 0.5-1 mL de RK. Se midió la concentración de proteína por el método de Biuret y la viabilidad mediante la tinción con azul de tripano al 1%. Las suspensiones obtenidas se utilizaron para las mediciones experimentales.

Para medir el flujo de la FO y la glucólisis se utilizaron suspensiones celulares frescas de ambas líneas celulares provenientes de normoxia e hipoxia.

La FO se midió polarográficamente registrando el consumo de oxígeno sensible a oligomicina 5 µM (Rodríguez- Enríquez et al., 2010) con un electrodo tipo

Clark. En 1.9 mL de RK se añadieron 4 mg de proteína total celular/mL a 37°C. Una vez obtenido el estado estacionario de respiración celular total se adicionó de oligomicina (inhibidor de la ATP sintetasa) para revelar la FO puesto que en las células existen otras enzimas que consumen oxígeno y podrían sobreinterpretarse los datos.

Los cálculos de la velocidad se realizaron considerando que la altura de la Ciudad de México a 37°C hay disueltos 380 nanogramo átomos de oxígeno (ngAtO)/mL (~190  $\mu$ M de O<sub>2</sub>). Para los cálculos, se trazó la pendiente que marca el consumo de la muestra por unidad de tiempo, tomando en cuenta 100 segundos, posteriormente se hizo una determinación de consumo de oxígeno de la muestra normalizando a 60 segundos, normalizando posteriormente por mg de proteína presente.

La glucólisis se midió por ensayo enzimático como se describe a continuación. En tres viales de plástico se colocaron 5 mg de proteína celular/mL de RK en un volumen total de 2.5 mL y se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 37°C. Después de 10 minutos de incubación se adicionó glucosa a cada una de las muestras hasta obtener una concentración final de 5mM. En el segundo vial se añadió además 10 mM de 2 desoxiglucosa (2DOG), inhibidor de la enzima exosa fosfato isomerasa (HPI) (Pelicano et al., 2006) y al tercero se añadió 1 $\mu$ M de rotenona para descartar la generación de lactato a partir de glutaminólisis. La adición de los inhibidores se realizó para determinar el lactato que proviene de la oxidación de la glucosa externa y el lactato generado por la vía de la glutaminólisis. Al minuto 0, 5 y 10 se detuvo la reacción con 10% (v/v) de ácido perclórico frío. A las muestras se le añadió 50  $\mu$ l de indicador Kodak para neutralizarlas a pH 7 con 50- 80 $\mu$ l de una solución de 3 M de KOH, 0.1 M Tris, posteriormente se congelaron a -70°C. El lactato formado se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm midiendo el NADH formado en una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en medio Hidrazina (0.4 M)- Glicina (0.5 M), pH 9. La velocidad de la glucólisis se calculó por la diferencia de absorbancias mediante la generación de NADH+H, el coeficiente de extinción molar del NADH y el tiempo de reacción (Marín- Hernández et al., 2006).

## **5. Inmunoensayos**

Los extractos de proteína empleados para los inmunoensayos se obtuvieron con 200-400  $\mu$ L de RIPA. Las muestras obtenidas se separaron en condiciones desnaturalizantes por SDS-PAGE al 10% (electroforesis en geles de poliacrilamida a 250 mV). Las proteínas fueron transferidas (15 V, 297 mA) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Una vez hecha la transferencia, la membrana fue incubada con 5% de leche libre de grasa y 0.1% Tween- 20 en TBS 1x por una hora, se incubó con el anticuerpo primario: ND1, COXIV, ATPase, GA, PHD ANT, 2OGDH, GLUT1, GLUT3, HKII, PFKI, LDH-A, p53, P-p53, FOXO3A, P-FOXO3A, HIF, TIGAR, LAMP1, Atg3, BNIP3, actina, marca santa cruz en una dilución 1:1000 en TBS 1x y 5% leche para cada anticuerpo.

El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche en refrigeración (4-8° C). Posteriormente, se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos con TBS 1x- Tween-20 y se incubó con el anticuerpo secundario anti- ratón, anti- cabra o anti- conejo, según sea el caso, marca santa cruz, en una dilución 1:2000 durante 2 horas en refrigeración y posteriormente se lavó 3 veces durante 15 minutos con TBS 1x- Tween-20. Se añadieron 500  $\mu$ L de solución de quimioluminiscencia y se reveló usando papel fotográfico (Kodak). Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría con el software Image J. Los resultados se presentan por doble normalización con respecto al control de carga y a normoxia.

## **6. Análisis de p53 por inmunofluorescencia**

Se sembraron 300,000 células en cajas petri de 35 mm las cuales fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con 0.1% (w/w) de tritón X- 100 a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpo primario de p53 o P-p53 (ser-15) (Abcam; Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:200, así como con 15  $\mu$ g DAPI/mL (Abcam) y fueron revelados con Alexa488 (Abcam). Las imágenes de fluorescencia fueron detectadas con el sistema EVOSFL Auto Cel Imaging (Life Technologies; Grand Island, NY, USA).

## **7. Determinación de mitocondrias y lisosomas por microscopía confocal**

Para la determinación del contenido mitocondrial y lisosomal por microscopía confocal, se sembraron 30,000 células en cajas Petri de 35mm de fondo de vidrio marca Matek corning en 5 mL de DMEM empleado en las condiciones citadas anteriormente. Después de 24 horas de hipoxia, ambas líneas celulares bajo las diferentes condiciones experimentales se lavaron con PBS y se añadió medio DMEM más 500 nM de Mitro-tracker green (MTR) para el marcaje de mitocondrias y LysoTracker red (LTR) para el marcaje de lisosomas se incubaron a 37° C durante una hora; transcurrido el tiempo, se lavaron dos veces con PBS y se añadió DMEM con 160 nM más de cada uno de los fluoróforos para su análisis en el microscopio confocal. El microscopio utilizado fue un ZEISS-LSM 510 META. La fluorescencia del MTR se midió a 516 nm y el LTR a 590 nm, se utilizó un láser de helio/neón para excitar el LTR y un láser de argón para MTR. El análisis de las imágenes obtenidas se llevó a cabo mediante el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

## **8. Determinación del potencial transmembranal mitocondrial**

Para los ensayos de determinación del potencial transmembranal mitocondrial, se incubó 0.25  $\mu$ M de Rhodamina-6-G en 2 mL de RK a 37°C durante aproximadamente 15 minutos hasta llegar una estabilización de la fluorescencia y descartar disminución de la fluorescencia inespecífica, posteriormente se inició el experimento con la adición de 0.25 mg de proteína total. El cambio en la fluorescencia de la Rhodamina 6-G se determinó con un espectrofluorómetro RF-5301PC (Tokyo, Japón) a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 565 nm. Al final de cada experimento, se añadió 5  $\mu$ M de CCCP (desacoplante mitocondrial) para establecer la magnitud del cambio en la señal de fluorescencia derivada de la mitocondria.

## **V. Resultados**

### **1. Nivel de mRNA de p53 en condiciones de normoxia**

Una vez obtenidas las líneas celulares transfectadas, se determinó la expresión del RNA mensajero (mRNA) de p53 HeLa-L (bajo contenido de p53) y en HeLa-H (con p53 sobre-expresado) (nuestro principal modelo experimental).

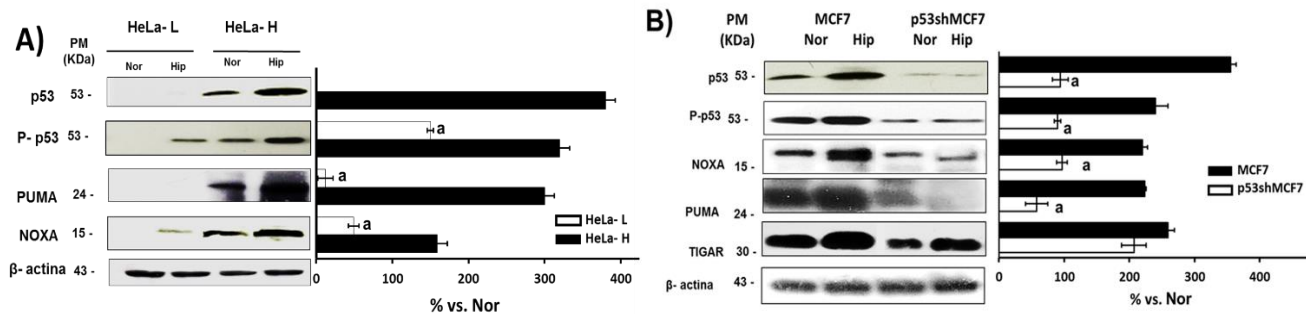
Al evaluar el mRNA de p53 en HeLa-H no se obtuvo un aumento significativo comparado con HeLa-L (tabla 1). El cambio en el contenido del mRNA de p53 solo fue significativo en condiciones de hipoxia, donde se aumentó 3.3 veces con respecto a HeLa-L en normoxia (tabla 1). A partir de estas clonas obtenidas, se llevó a cabo el análisis general del metabolismo energético en ambas condiciones.

### **2. Contenido de p53 y de sus proteínas blanco en normoxia e hipoxia**

En normoxia, el contenido de p53, P- p53 (ser 15, estado fosforilado y activo) así como sus blancos canónicos involucrados en la muerte celular por apoptosis, PUMA y NOXA aumentaron significativamente (2-5 veces) en HeLa-H vs. HeLa-L en normoxia (Fig. 3A). Este patrón también se evaluó en condiciones de hipoxia (0.1% O<sub>2</sub>, 24 h); como respuesta a esta condición, aumentó el contenido de p53 y de su fosforilación en serina 15 (-p53) y en el contenido de PUMA y NOXA en HeLa-H vs. HeLa-L en normoxia. En células HeLa-L, la hipoxia provocó cambios en el contenido de P- p53 y en NOXA pero PUMA no fue detectado, los cambios fueron más sutiles que en células HeLa-H (Fig. 3, A).

Al evaluar el contenido de éstas proteínas en células MCF7 y shp53MCF7 en normoxia, en células shp53MCF7 se observó una disminución del 50- 60% en el contenido de los blancos canónicos de p53 NOXA, PUMA y TIGAR con respecto a células MCF7 en normoxia. Al evaluarse en condiciones de hipoxia, mientras que en células MCF7 hay un aumento de 2- 3 veces en el contenido de sus blancos canónicos, en células shp53MCF7, no hubo cambios para el contenido de NOXA, TIGAR aumentó y una disminución en el contenido de PUMA. (figura 3, B).

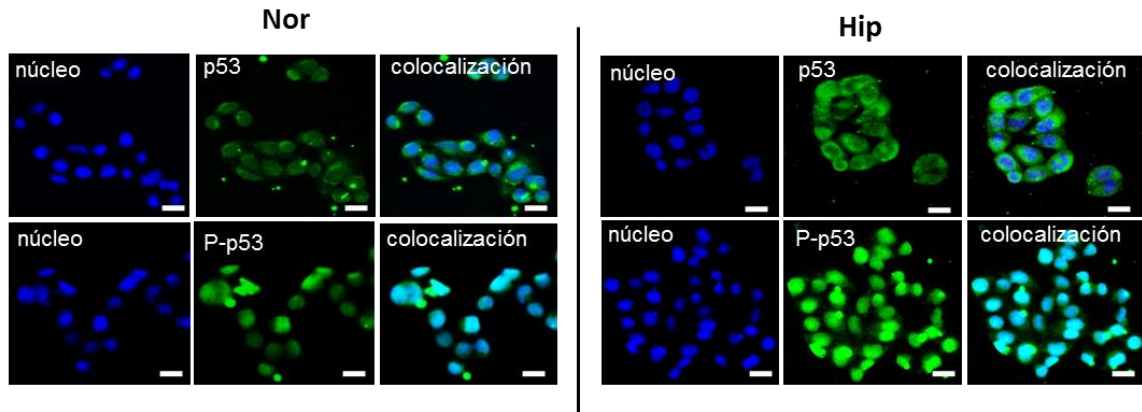




**Figura 3. Análisis del contenido de proteínas reguladas por p53 en normoxia e hipoxia mediante Western Blot.** P53, P-p53, PUMA, NOXA y TIGAR, fueron evaluadas para determinar la funcionalidad de p53 en el modelo experimental. A) Contenido de blancos de p53 en normoxia e hipoxia en células HeLa-L y HeLa-H, imagen representativa de al menos tres experimentos independientes, doble normalización vs. actina, vs. normoxia. <sup>a</sup> P < 0.01 vs. HeLa-L en normoxia. B) Contenido de blancos de p53 en normoxia e hipoxia en células MCF7 y shp53MCF7, imagen representativa de al menos tres experimentos independientes, doble normalización vs. actina, vs. normoxia. <sup>a</sup> P < 0.01 vs. MCF7 en normoxia.

### 3. Localización de p53 en la célula

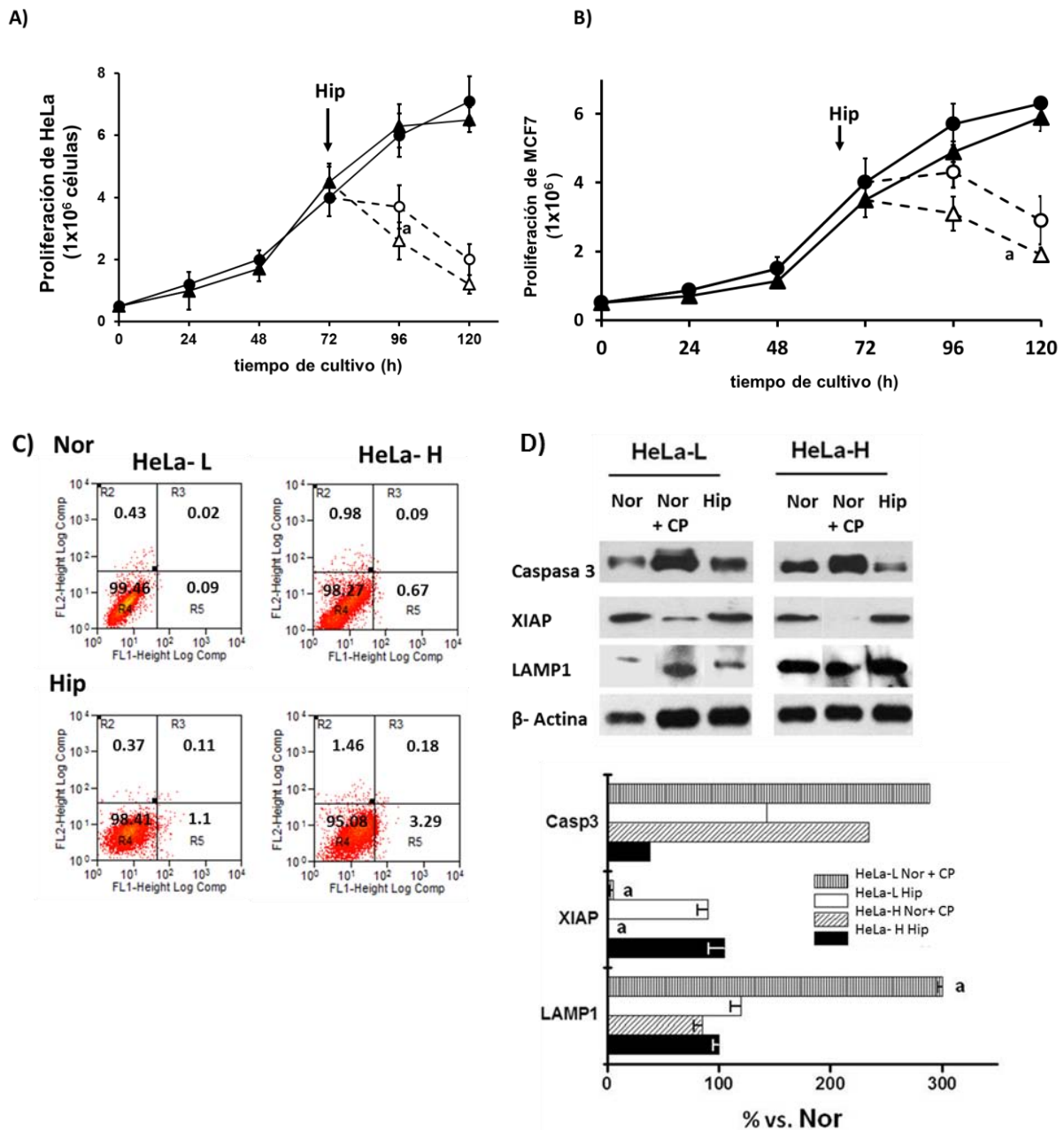
Para la activación o represión de genes, p53 se transloca al núcleo en forma de tetrámero y cumple su función como factor de transcripción junto con sus cofactores p300 y CBP. Para determinar la localización de p53 en el modelo experimental propuesto, se evaluó mediante inmunofluorescencia la localización de p53 en las células HeLa-H en normoxia e hipoxia. Los resultados obtenidos revelan que en normoxia, p53 se encuentra preferentemente en el citosol, aunque también se encuentra fosforilado en el núcleo en una porción menor. En hipoxia, el contenido de P-p53 aumenta su localización nuclear, mientras que solo una porción se encuentra en el citosol (Fig. 4), lo que sugiere que en las células HeLa-H, p53 es capaz de activarse y trasladarse al núcleo, cumpliendo su función como factor de transcripción (Fig. 4).



**Figura 4. Localización subcelular de p53 y P-p53 (ser 15) en células HeLa-H en normoxia e hipoxia (0.1% de O<sub>2</sub>).** Las células fueron marcadas con DAPI (núcleo) y anticuerpo primario para p53 o P- p53 y Alexa 488. (Nor, normoxia; Hip, hipoxia; P-53, p53 fosforilado en serina 15). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

#### 4. Efecto de p53 sobre la proliferación celular

p53 es uno de los supresores tumorales por excelencia, capaz de inhibir el crecimiento tumoral así como de activar la apoptosis; por esto, la inhibición o inactivación de esta proteína en cáncer permite la resistencia a la muerte celular aún en microambientes de estrés. Para conocer el efecto que tiene la presencia de p53 sobre la proliferación, se llevó a cabo una curva de crecimiento de las diferentes líneas celulares en normoxia e hipoxia durante 120 horas (Fig 5, A). En normoxia, el crecimiento de HeLa- H y HeLa- L fue similar; sin embargo, al someter a las células a hipoxia, HeLa-H presenta una mayor sensibilidad, disminuyendo el número de células viables a 24 horas de exposición. Estos resultados fueron reproducibles en células MCF7, donde se observa una alta sensibilidad en células MCF7 ante la hipoxia vs. p53shMCF7, donde no se notó la disminución en el número de células viables (Fig. 5 B). La disminución en las células vivas en HeLa-H y MCF7 puede deberse a la activación de muerte celular por apoptosis; sin embargo, al medir la activación de este proceso mediante citometría de flujo, no se obtuvieron cambios significativos; esto sugiere, que la muerte celular presente en HeLa-H y MCF7 en hipoxia es mediante otro proceso no ligado a la apoptosis, pero que igualmente, está regulado por p53 (Fig. 5 C, D). Como control positivo, se utilizó cisplatino (CP) 10 $\mu$ M durante 24 h (Fig. 5 D).



**Figura 5. Efecto de p53 sobre la proliferación y viabilidad celular.** A) Efecto de p53 sobre la proliferación a 120 h en células HeLa. A las 72 horas, fase exponencial de crecimiento, se sometieron a hipoxia y se contabilizó el número de células viables 24 y 48 h posterior al tratamiento, ( $\blacktriangle$ ) HeLa-H en normoxia, ( $\triangle$ ) HeLa-H en hipoxia, ( $\bullet$ ) HeLa-L en normoxia, ( $\circ$ ) HeLa-L en hipoxia. B) Efecto de p53 sobre la viabilidad a 120 h en células MCF7, a las 72 horas, fase exponencial de crecimiento, se sometieron a hipoxia y se contabilizó el número de células viables 24 y 48 h posterior al tratamiento, ( $\blacktriangle$ ) MCF7 en normoxia, ( $\triangle$ ) MCF7 en hipoxia, ( $\bullet$ ) p5sh3MCF7 en normoxia, ( $\circ$ ) p5sh3MCF7 en hipoxia. C) Análisis de muerte celular por apoptosis en células HeLa. Las células HeLa fueron incubadas con Anexina V y yoduro de propidio para revelar la muerte celular por apoptosis. R4= células vivas, R2= necrosis, R3= apoptosis tardía, R5= apoptosis. D) Imagen representativa del contenido de proteínas involucradas en la muerte celular por apoptosis, como control positivo, se utilizó cisplatino (CP) 10 $\mu$ M durante 24 h.

## 5. Efecto de p53 sobre el metabolismo mitocondrial en normoxia

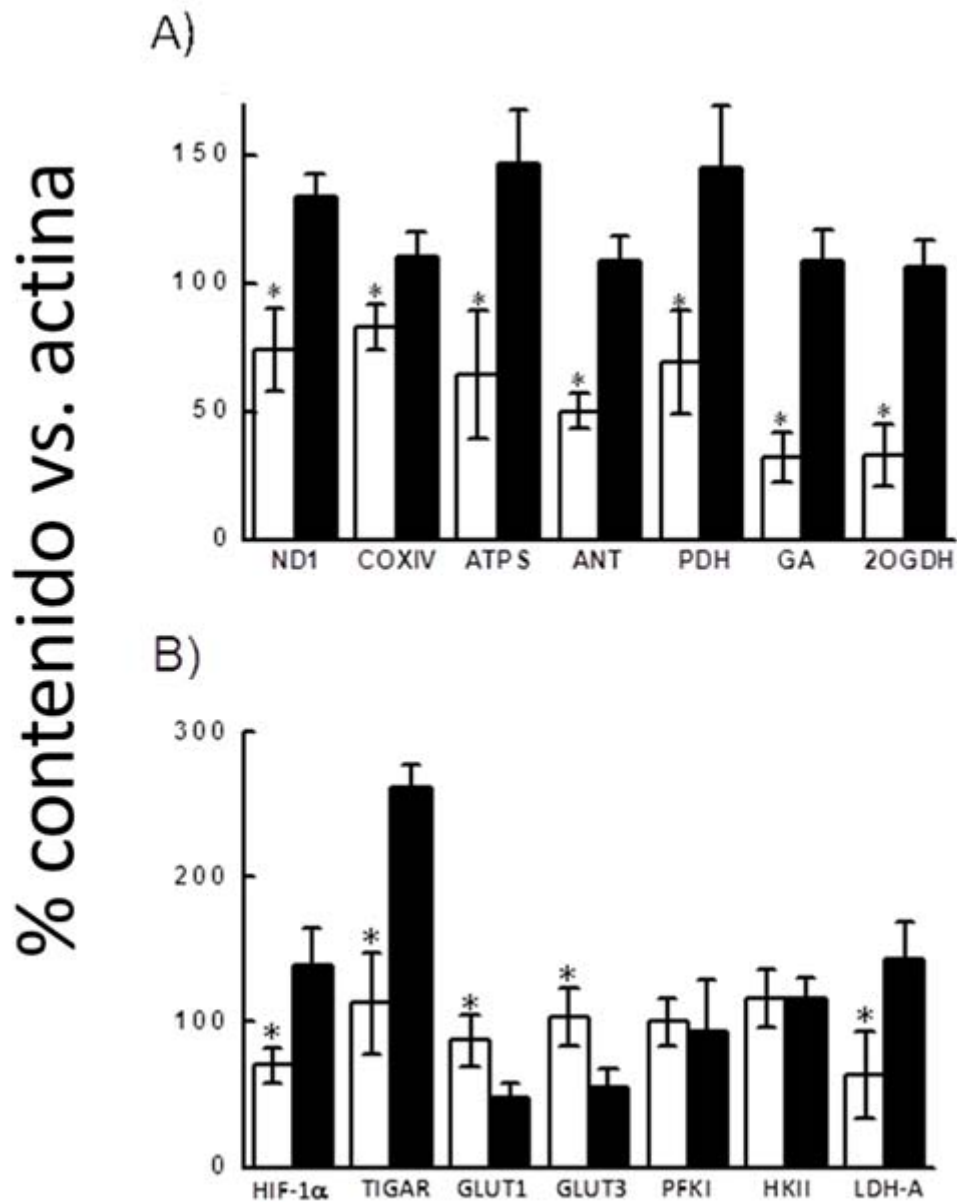
### a. Contenido del mRNA y proteínas mitocondriales.

En normoxia, no hubo cambios en el contenido de mRNA de proteínas mitocondriales en células HeLa-H con respecto a HeLa-L; algunas proteínas como el complejo IV de la cadena respiratoria (COXIV) y 2- Oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH) presentaron un ligero aumento en la expresión vs. HeLa-L; sin embargo este aumento no fue significativo (tabla 1). En cambio, se obtuvo un aumento significativo (30- 60%) en el contenido de proteínas mitocondriales medidas por Western Blot como: ND1, COXIV, ATPasa, ANT, PDH, GA y 2OGDH en células HeLa-H vs. HeLa-L (Fig. 6, A)

	1	2	3	4
Gen	HeLa-L Hip	HeLa-H Nor	HeLa-H Hip	HeLa-H Hip vs. Nor
actina	1.06 ± 0.09	0.99 ± 0.03	1.06 ± 0.11	1.07 ± 0.09
p53	1.64 ± 0.53	1.75 ± 0.42	3.3 ± 0.35 <sup>b</sup>	1.88 ± 0.33 <sup>a</sup>
NDI	1.66 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.14	2.25 ± 0.51 <sup>b</sup>
COX IV	1.62 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.32	2.02 ± 0.79 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.59
2OGDH	0.67 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.31	0.71 ± 0.17	0.7 ± 0.22
ATPS	1.18 ± 0.32	0.89 ± 0.09	1.43 ± 0.35	1.6 ± 0.37 <sup>a</sup>

**Tabla 1. Cambio en la expresión de mRNA de algunos genes mitocondriales.** Los valores presentados están normalizados con respecto a células HeLa-L en normoxia. Los valores son representados el valor promedio y la desviación estándar de al menos 3 muestras independientes. Abreviaturas: ND1, NADH deshidrogenasa; COX IV, citocromo oxidasa, 2 OGDH, 2 oxoglutarato deshidrogenada; ATPS, ATP sintetasa.

Estos resultados demuestran que no hay una correlación directa entre la expresión de genes y contenido de proteína ya que hay muchos procesos postranscripcionales que podría responder a este fenómeno; sin embargo, se puede demostrar y reproducir lo ya descrito en la literatura, p53 causa el aumento del contenido de proteínas mitocondriales y aunque el incremento no fue tan alto como lo reportado (0.6 vs. 20 veces, respectivamente), podemos sugerir que la presencia de p53 causa un aumento en la función mitocondrial (Fig. 6, A).



**Figura 6. Contenido de proteínas de glucólisis y FO en células HeLa-L y HeLa-H en normoxia.** A) Contenido de proteínas mitocondriales en células HeLa-L (barras blancas) y HeLa-H (barras negras), densitometría de tres muestras independientes, se realizó una normalización vs. actina para mayor claridad. \*  $P < 0.01$  vs. HeLa-H en normoxia B) Contenido de proteínas glucolíticas HeLa-L (barras blancas) y HeLa-H (barras negras), densitometría de tres muestras independientes, se realizó una normalización vs. actina para mayor claridad. \*  $P < 0.01$  HeLa-L en normoxia.

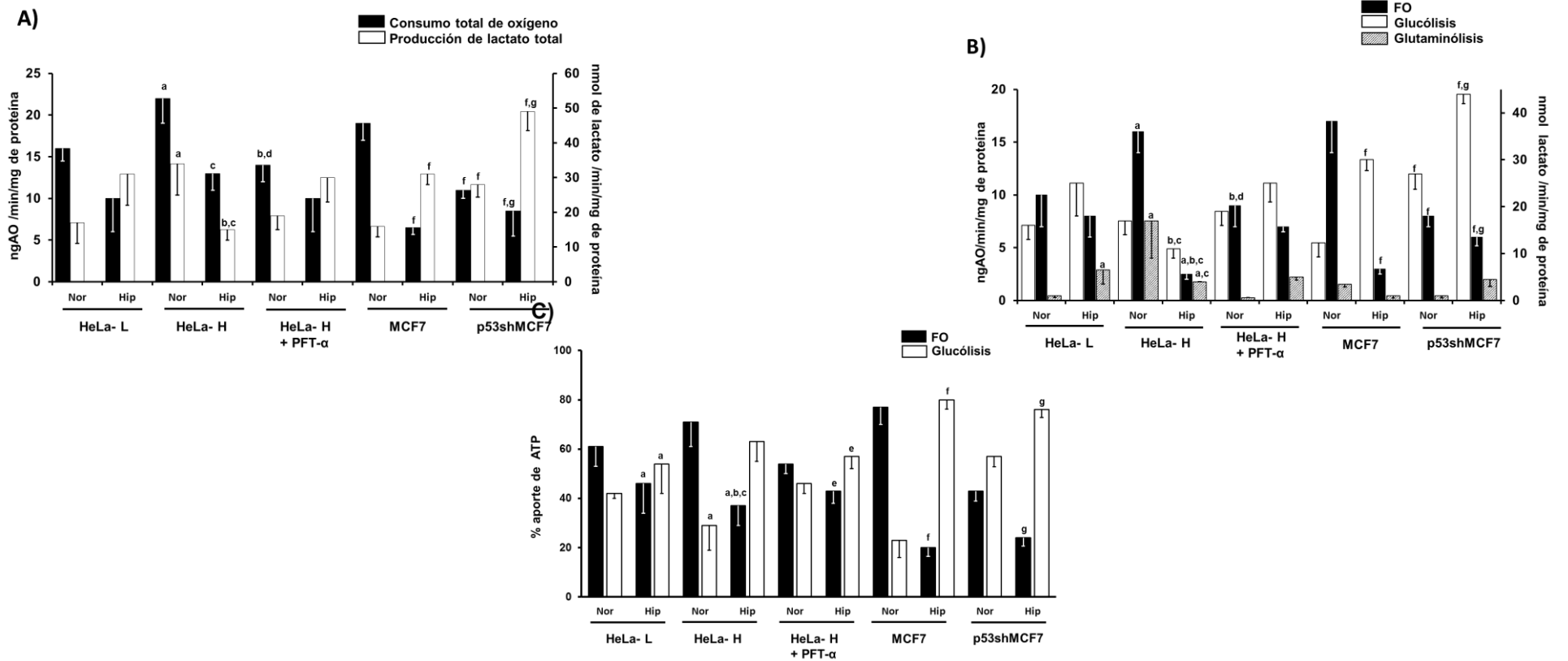
Para determinar si lo observado es reproducible en MCF7 y p53shMCF7, se determinaron las proteínas mitocondriales en ambas líneas celulares en condiciones de normoxia. Los resultados obtenidos demostraron que el silenciamiento de p53 en p53shMCF7 causa la disminución del contenido de proteínas mitocondriales (2OGDH, ND1, COXIV y ANT) vs. MCF7, apoyando los resultados anteriormente observados en HeLa-H (datos no mostrados).

#### **b. Efecto de p53 sobre el flujo de la FO en normoxia**

Los trabajos reportados en la literatura solo muestran el análisis del contenido de proteínas reguladas por p53 o bien, de genes blanco involucrados en el metabolismo mitocondrial; sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si realmente estos cambios causados por la presencia de p53 influyen en la velocidad de flujo total de la vía de la FO. Para evaluar si el aumento en el contenido de proteínas mitocondriales observado en HeLa-H y MCF7 tiene realmente un efecto sobre la vía, se evaluó el flujo de la FO en las diferentes líneas celulares.

En normoxia, la presencia de p53 en HeLa-H causó un aumento del 27% en el consumo de oxígeno total con respecto a HeLa-L (22 ngAtO/min/mg de proteína vs. 16 ngAtO/min/mg de proteína respectivamente). Para descartar el oxígeno que se consume por otras enzimas y determinar únicamente el consumo mitocondrial, se determinaron los flujos en presencia de 4  $\mu$ M de oligomicina, un inhibidor específico de la ATPsintetasa, así, obtener únicamente el consumo de oxígeno relacionado a la producción de ATP (Fig. 7). El flujo total de la FO en células HeLa-H fue 60% mayor que en células HeLa-L en normoxia (16 ngAtO/min/mg de proteína vs. 10 ngAtO/min/mg de proteína respectivamente), correlacionando con el aumento en el contenido de proteínas mitocondriales en esta misma línea (Fig. 6, A,B). Lo mismo se observó en células MCF7, las cuales presentan un mayor flujo de la FO (47%) vs. p53shMCF7 (17 vs. 8 ngAtO/min/mg de proteína respectivamente). Para apoyar los datos obtenidos, se analizaron los flujos en presencia de 10  $\mu$ M de pifithrin alpha (PFT- $\alpha$ ), un inhibidor altamente selectivo para p53. El flujo de la FO disminuyó significativamente en presencia de PFT- $\alpha$ , hasta llegar a los niveles de HeLa-L. PFT- $\alpha$  no tuvo efecto sobre el flujo de HeLa-L en ambas condiciones (Fig. 7, A,B). Estos resultados demuestran

que el cambio en el flujo de la FO, es debido a la presencia de p53 y no a efectos pleiotrópicos derivados de la transfección.



**Figura 7.** A) consumo de oxígeno y producción de lactato total. B) flujos netos de glucólisis, fosforilación oxidativa y glutaminólisis. C) % de aporte de ATP proveniente de cada vía.



## **6. Efecto de p53 sobre el metabolismo glucolítico en normoxia.**

### **a. Contenido de proteínas de la glucólisis**

Como primera aproximación se determinó en células HeLa-H, el contenido del factor inducible por Hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), el cual modula la glucólisis, así como enzimas y transportadores que participan en esta vía. Los resultados obtenidos demuestran que a pesar de que la presencia de p53 causa una disminución en el contenido de los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT 3) vs. HeLa-L en normoxia; otras enzimas como hexocinasa II (HKII) y la fosfofructocinasa tipo 1 (PFKI) no presentaron cambios e incluso otras aumentaron como la lactato deshidrogenasa (LDH-A) (Fig. 6, B). Algo interesante observado en células HeLa-H, fue el incremento en el contenido de HIF-1 $\alpha$  aún en condiciones de normoxia con respecto a HeLa-L. Normalmente, HIF-1 $\alpha$  solo se encuentra estabilizado en condiciones de hipoxia (Fig. 6, B). Los datos sugieren que p53 también puede regular la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  además de las enzimas que participan en la vía antes mencionadas.

Posteriormente se determinaron los contenidos de proteína en el segundo modelo de MCF7. Los resultados demuestran que el silenciamiento de p53 en p53shMCF7 causa un aumento de 2- 4 veces en el contenido de enzimas y transportadores que participan en la glucólisis como GLUT 1, GLUT 3 y HKII vs. MCF7 en normoxia, correlacionando con lo observado en HeLa (Figura 10).

### **b. Efecto de p53 sobre el flujo de la glucólisis**

Para corroborar que p53 disminuye la glucólisis en nuestros modelos experimentales, se determinó el flujo de la vía por medio de la producción de lactato.

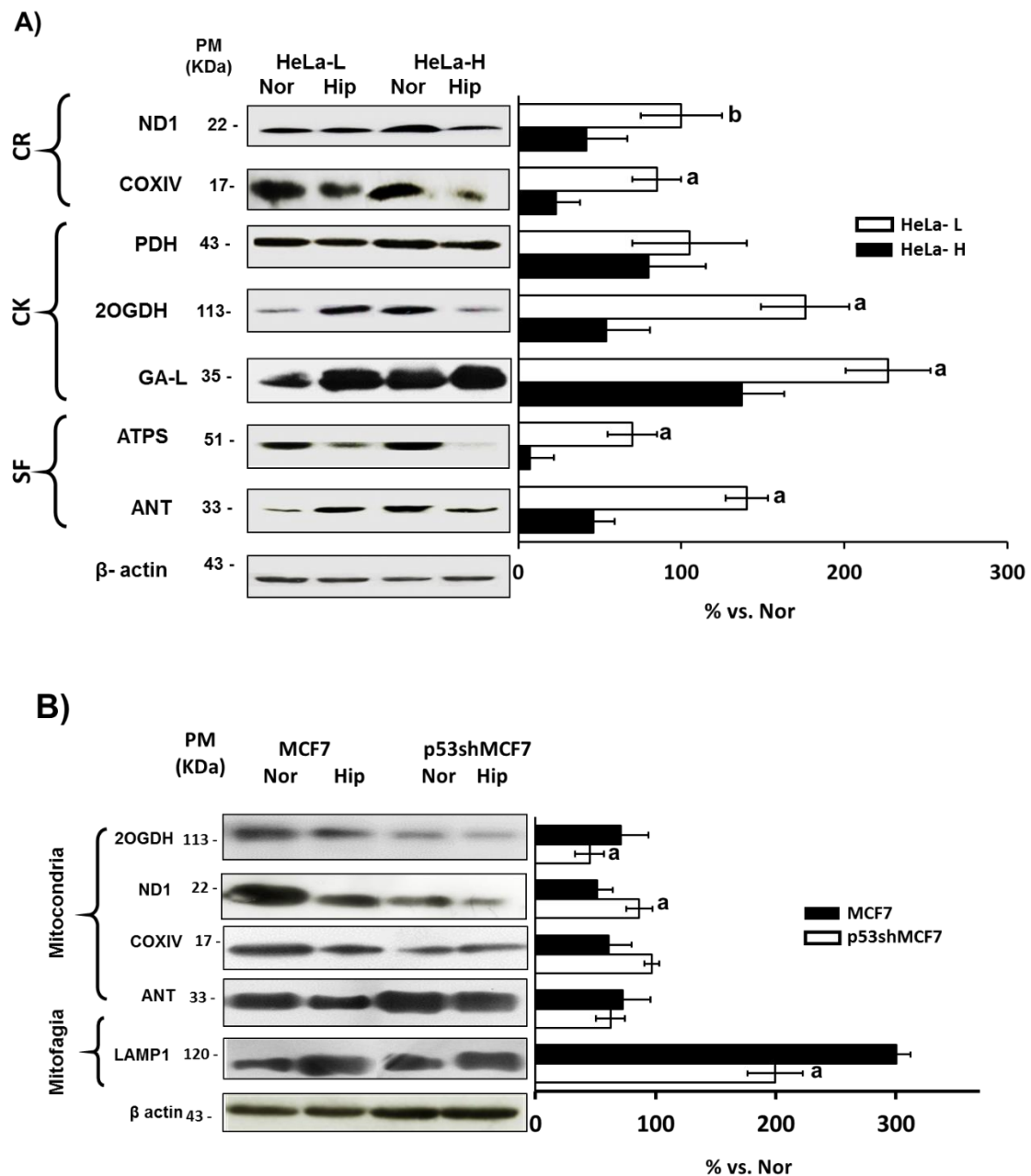
A pesar de que las células HeLa-H presentan un menor contenido de transportadores de glucosa; el lactato total producido en estas células fue el doble vs. células HeLa-L en normoxia (34 vs. 17 nmol de lactato/ min/ mg de proteína respectivamente); sin embargo, al medir los flujos en presencia de 10mM de 2- desoxiglucosa (2- DOG), un inhibidor competitivo de la parte alta de la glucólisis a nivel de la hexosa fosfato isomerasa (HPI), que descarta el lactato producido por la glucólisis y la degradación de glucógeno, se observa que la

producción de lactato exclusiva de la glucólisis es igual en ambas líneas celulares (17nmol/min/mg de proteína) y el lactato producido por la glutaminólisis en células HeLa-H es significativamente mayor vs. HeLa-L (17 vs. 0.8 nmol de lactato/ min/ mg de proteína respectivamente) (Fig. 7 A,B). Los datos demuestran que la presencia de p53 causa una disminución del contenido de algunas enzimas de la glucólisis pero esto no es suficiente para disminuir el flujo total de la vía, mientras que aumenta la glutaminólisis (Fig. 7, A,B).

## **7. Efecto de p53 sobre el metabolismo energético en hipoxia**

### **a. Contenido de mRNA y proteínas mitocondriales en hipoxia**

Los contenidos de mRNA de proteínas mitocondriales en hipoxia no presentaron cambio con respecto a HeLa-H en normoxia, algo similar sucedió en células HeLa-L en las diferentes condiciones (tabla 1); sin embargo, a pesar de que no se encontró diferencia en la expresión de los genes en células HeLa-H, el contenido de proteínas mitocondriales como ND1, COXIV, 2OGDH, APTS y ANT disminuyeron significativamente (20- 80%) con respecto a HeLa-H en normoxia (Fig. 8, A). Los datos obtenidos sugieren que el estrés producido por hipoxia severa causa una respuesta contraria por parte de p53 sobre la mitocondria. En células HeLa-L, el contenido de las proteínas mitocondriales no tuvo un cambio significativo. En células MCF7 se observó un fenómeno similar, mientras que en condiciones de hipoxia, las células MCF7 presentan una disminución del 60% en el contenido de proteínas como 2-OGDH, ND1, COXIV y ANT, en células p53shMCF7, no hubo cambio entre ambas condiciones, haciendo reproducible este fenómeno en ambas líneas celulares (Fig 8, B).



**Figura 8. Proteínas mitocondriales en células HeLa y MCF7 en normoxia e hipoxia.** Imagen representativa de al menos tres experimentos independientes en células A) HeLa-L y HeLa-H en normoxia e hipoxia y B) MCF7 y p53shMCF7 en normoxia e hipoxia. CR= Cadena Respiratoria, CK= Ciclo de Krebs y SF= sistema fosforilante. Para mayor claridad, se realizó una doble normalización vs. actina, vs. normoxia. <sup>a</sup> P< 0.01 vs. HeLa-H, MCF7.

## **b. Efecto de p53 sobre el flujo de la FO en hipoxia**

La disminución de las proteínas mitocondriales en HeLa-H sugiere que en condiciones de hipoxia, el flujo puede verse comprometido importantemente. Para evaluar si esta disminución en proteínas tiene un efecto sobre el flujo de la FO, se llevó a cabo el análisis del consumo de oxígeno en las diferentes líneas en condiciones de hipoxia.

Al evaluar el consumo de oxígeno total de células HeLa-H en hipoxia, se obtuvo una disminución significativa vs. HeLa-H en normoxia (13 vs. 22 ngAtO/min/mg de proteína respectivamente). De igual forma, el consumo de oxígeno total en células HeLa-L en hipoxia disminuyó vs. HeLa-L en normoxia (10 vs. 16 ngAtO/min/mg de proteína respectivamente) (Fig. 7, A). Para obtener el flujo únicamente mitocondrial, se añadió oligomicina.

En hipoxia, el consumo de oxígeno exclusivo de la FO en células HeLa-H disminuyó 85% vs. HeLa-H en normoxia (2.5 vs. 16 ngAtO/min/mg de proteína respectivamente), mientras que en células HeLa-L, a pesar de que se observa una disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial, este cambio no fue significativo con respecto a HeLa-L en normoxia (8 vs. 10 ngAtO/min/mg de proteína) (Fig. 7, B). Los datos fueron reproducibles en células MCF7, donde la ausencia de p53 causa una resistencia ante la hipoxia por parte de la mitocondria puesto que las células MCF7 disminuyeron significativamente el consumo de oxígeno mitocondrial con respecto a MCF7 en normoxia y las células p53shMCF7 no presentaron cambios significativos en ambas condiciones (Fig. 7, B).

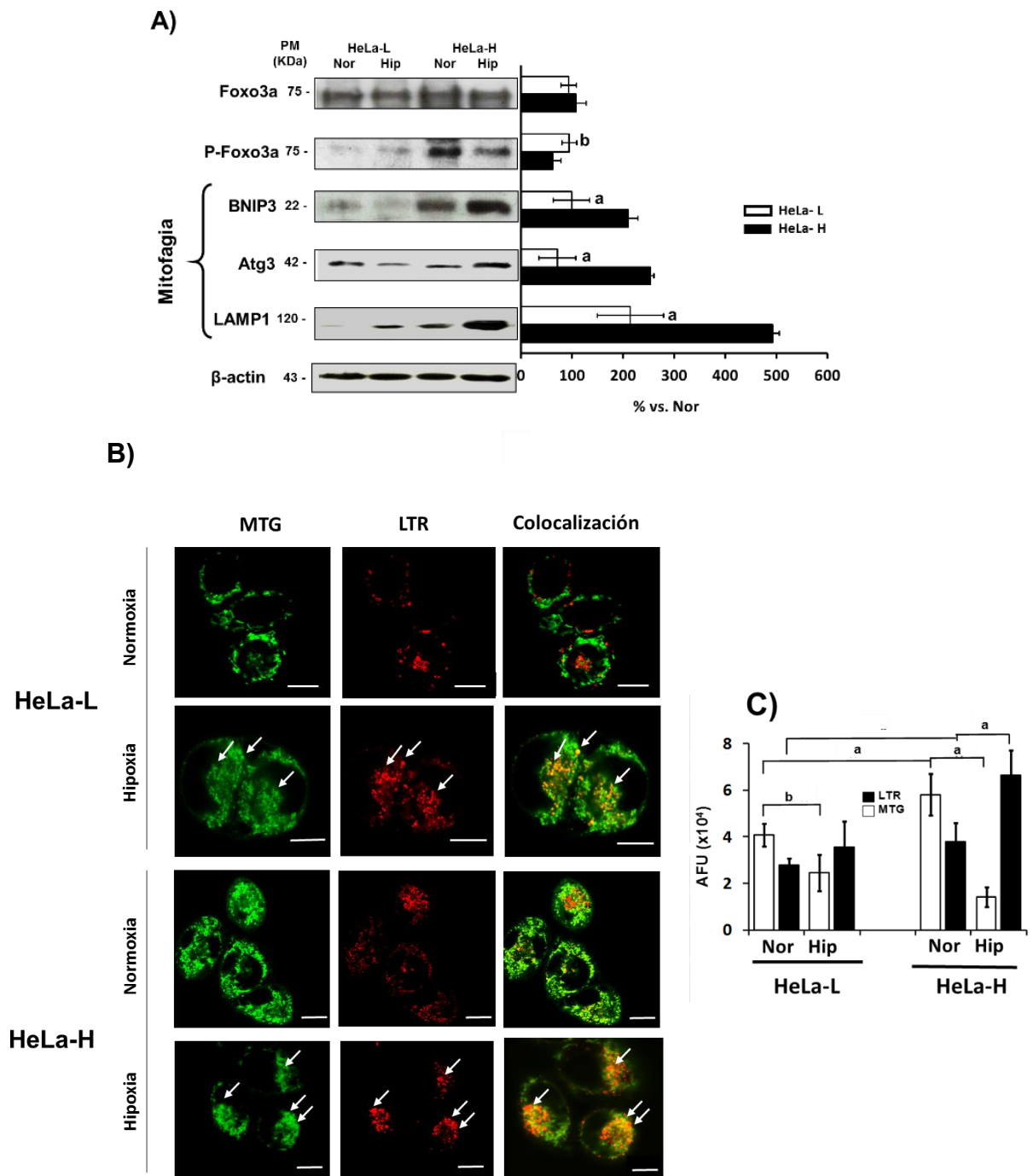
## **8. Mecanismo de degradación mitocondrial**

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la disminución drástica del flujo de la FO en células HeLa-H es la mitofagia, proceso regulado por p53 que involucra la digestión mitocondrial en condiciones de estrés nutricional e hipóxico. Es posible que la disminución observada en la FO de células HeLa-H sea debido a la activación de este mecanismo, por lo que se llevó a cabo el análisis de proteínas y factores de transcripción que participan en este proceso como: FOXO2A3, Atg3, BNIP3 y LAMP1. En células HeLa-H, el contenido de

proteínas de autofagia aumentó significativamente en condiciones de hipoxia vs. HeLa-H en normoxia, mientras que en células HeLa-L, aunque hay una tendencia de aumento en las proteínas como LAMP1, otras como BNIP3 y Atg3 no presentaron cambios (Fig. 9, A). En células MCF7 se reprodujo lo observado en HeLa. En condiciones de hipoxia, las proteínas de autofagia aumentaron en células MCF7 mientras que en células p5sh3MCF7, los contenidos de proteína no presentaron un cambio significativo (Fig. 8, B). Los datos por WB sugieren que hay una activación de la mitofagia mediada por p53 en condiciones de hipoxia, por lo tanto una disminución del contenido de mitocondrias.

Para corroborar lo anteriormente observado, se llevó a cabo el análisis de la fluorescencia de mitocondrias y lisosomas (marcados con Mitotracker Green y LysoTracker Red respectivamente) mediante microscopía confocal, así como su colocalización para demostrar autofagia y se determinó la intensidad de fluorescencia por cada marcador. En la figura 9, inciso B, se observan las microscopías obtenidas de células HeLa en ambas condiciones así como la intensidad de fluorescencia para cada marcador. En células HeLa-H en normoxia, la intensidad de fluorescencia de las mitocondrias es mayor con respecto a células HeLa-L, correlacionando con los resultados obtenidos de un mayor contenido de proteínas mitocondriales y flujos. El marcaje para lisosomas también presentó un aumento, pero no significativo (Fig. 9, B y C).

En condiciones de hipoxia, la intensidad de fluorescencia mitocondrial en HeLa-H, disminuyó en un 83% y la fluorescencia para LysoTracker aumentó al doble (Fig. 9, B y C). En células HeLa-L, no hubo cambios significativos en ambas condiciones. Con estos datos se demostró que: i) la presencia de p53 aumenta las proteínas involucradas en la autofagia y ii) la disminución en el flujo de la FO en hipoxia de células HeLa-H se debe a la activación de la degradación mitocondrial mediada por la presencia de p53 (Fig. 9).



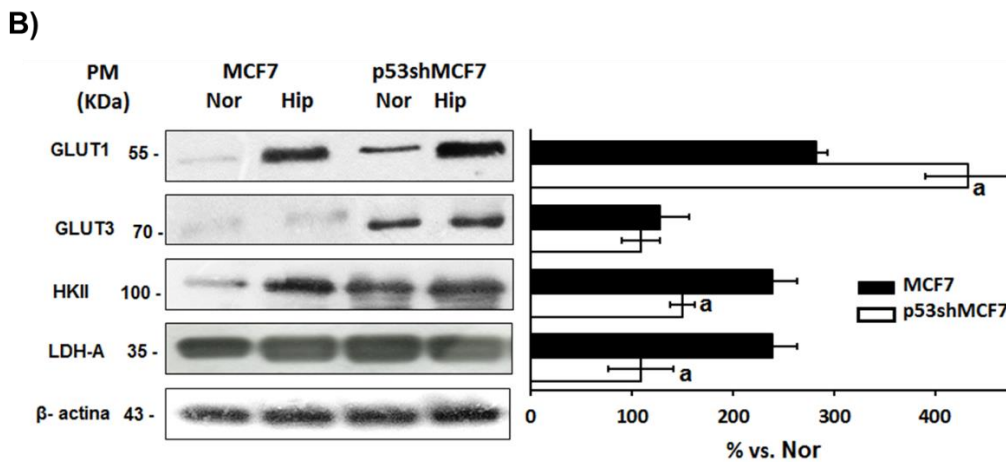
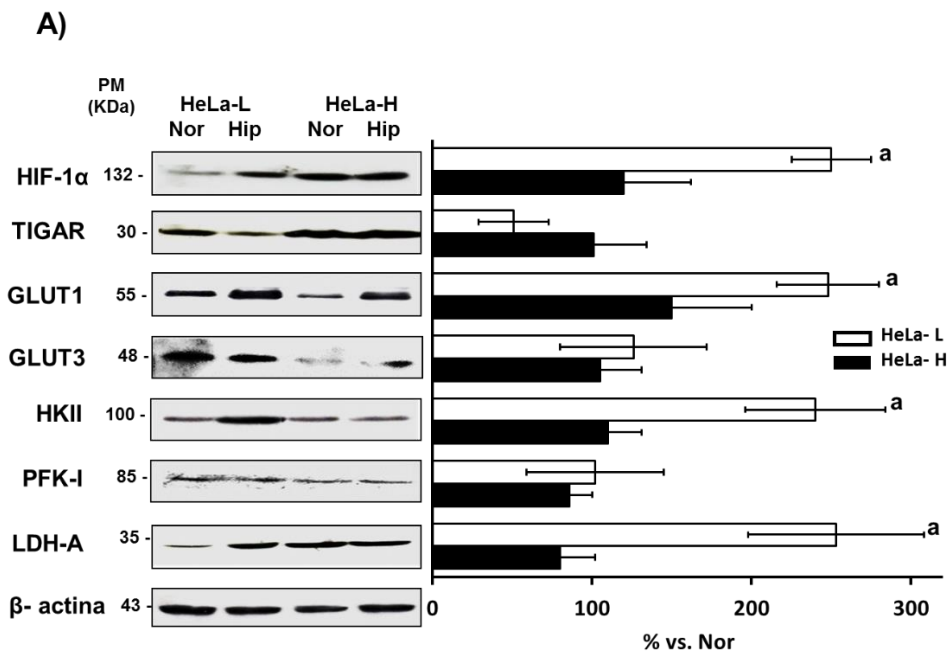
**Figura 9.** Activación de la autofagia en hipoxia mediada por p53. A) contenido de proteínas de autofagia en células HeLa la imagen es representativa de 3 muestras independientes, se llevó a cabo una doble normalización vs. actina, vs. normoxia. <sup>a</sup>P<0.01 vs. HeLa en normoxia, <sup>b</sup>P<0.05 vs. HeLa en normoxia. B) Microscopía confocal de células HeLa en normoxia e hipoxia marcadas con mitotracker green (MTG) para mitocondrias y lysotracker red (LTR) para lisosomas. C) cuantificación de intensidad de fluorescencia de MTG y LTR en células HeLa-L y HeLa-H en normoxia e hipoxia, figura representativa de n= 75 células por cada condición.

## 9. Efecto de p53 sobre el contenido de proteínas de la glucólisis en hipoxia

Ya que p53 no solo modula proteínas que participan en el metabolismo mitocondrial sino que también es capaz de modular enzimas de la glucólisis, se llevó a cabo el análisis del contenido de proteínas y flujos que participan en esta vía, en condiciones de hipoxia.

Aunque no se ha reportado si modula el flujo de la glucólisis en condiciones de hipoxia, p53 es un factor de transcripción que responde a estrés y puede competir por cofactores nucleares con otras proteínas como HIF-1 $\alpha$  (Zhou et al., 2015), por lo que se podría esperar un cambio en el flujo en condiciones de hipoxia.

En células HeLa-L, el contenido de HIF-1 $\alpha$  aumentó significativamente vs. HeLa-L en normoxia, causando un aumento de 2-4 veces el contenido de proteínas de glucólisis como GLUT 1, HKII, PFKI y LDH-A vs. HeLa-L en normoxia (Fig. 10, A), sugiriendo un posible aumento en el flujo. Los datos obtenidos en HeLa-L reprodujeron lo antes descrito en la literatura por este y otros grupos de trabajo. Por otro lado, en células HeLa-H, a pesar de la hipoxia presente, no hubo cambios en el contenido de HIF-1 $\alpha$  con respecto a HeLa-H en normoxia, así como en el contenido de proteínas de glucólisis (HKII, PFKI y LDH-A) (Fig. 10, A). Estos resultados proponen que: i) el aumento de p53 en hipoxia evita la actividad de HIF-1 $\alpha$  por competencia con cofactores o bien, ii) p53 inhibe directamente a HIF-1 $\alpha$  mediante la unión proteína- proteína. Se ha reportado que p53 puede unirse directamente a HIF-1 $\alpha$ ; sin embargo, hasta el momento se desconoce la causa que tiene esta unión sobre la actividad de ambas proteínas. Para dilucidar la posible inhibición de HIF-1 $\alpha$  por p53 en condiciones de hipoxia, se llevó a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación para determinar si p53 está interactuando con HIF-1 $\alpha$  en hipoxia, bloqueando su función como factor de transcripción evitando el aumento de proteínas glucolíticas en estas condiciones (Fig. 11).

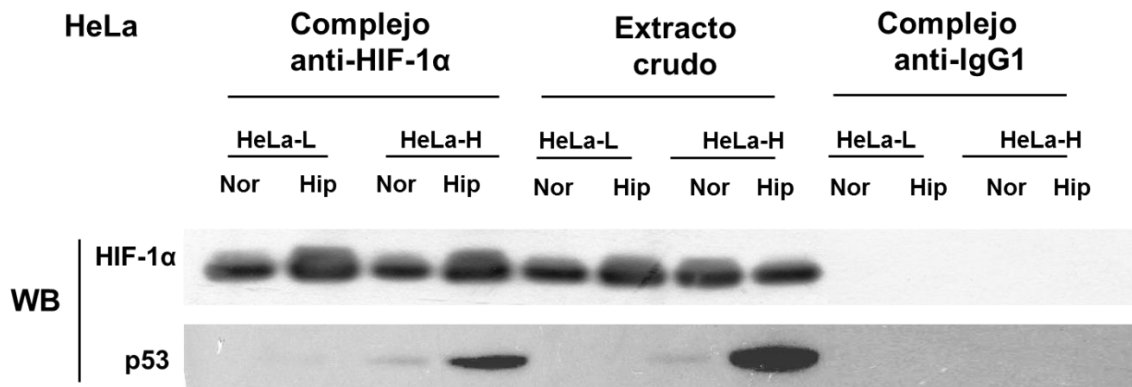


**Figura 10. Proteínas glucolíticas en células HeLa y MCF7 en normoxia e hipoxia.** Imagen representativa de al menos tres experimentos independientes en células HeLa-L, HeLa-H, MCF7 y p53shMCF7. Para mayor claridad, se realizó una doble normalización vs. actina, vs. normoxia. <sup>a</sup> P < 0.01 vs. HeLa-H, MCF7.

Como se observa en la Fig 11, la coimmunoprecipitación mostró que p53 es capaz de unirse a HIF-1α en ambas condiciones, teniendo una mayor proporción en condiciones de hipoxia (Fig. 11). En células HeLa-L, no se observó coimmunoprecipitación en ninguna de las condiciones experimentales. Como control, se utilizó el extracto total (INPUT) y así se demostró que ambas proteínas estaban presentes en nuestro extracto crudo y se añadió un control negativo con anti- IgG1, para descartar la inespecificidad del anticuerpo utilizado (Fig. 11). Los resultados indican que mientras que en células HeLa-L, la hipoxia causa un



aumento en el contenido de proteínas glucolíticas mediante el aumento de HIF-1 $\alpha$ ; en células HeLa-H, HIF-1 $\alpha$  es arrestado por la unión con p53 sugiriendo una inhibición en su actividad como factor de transcripción causando una inhibición en el aumento de proteínas glucolíticas (Fig 10). Los resultados proponen a p53 como un regulador negativo de la glucólisis, únicamente en condiciones de hipoxia.



**Figura 11. Inmunoprecipitación de p53 y HIF-1 $\alpha$ .** Interacción de p53 y HIF-1 $\alpha$  en células HeLa-H en normoxia e hipoxia. La inmunoprecipitación se hizo con anticuerpo de HIF-1 $\alpha$ . Como control positivo se muestra el contenido de proteína en extracto crudo. La adición de anticuerpo anti-IgG1 se utilizó para descartar la interacción inespecífica. Imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.

## 10. Efecto de p53 sobre el flujo glucolítico en hipoxia

Para determinar si los cambios observados en el contenido de proteínas realmente tienen efecto sobre la glucólisis, se analizó el flujo de la vía mediante la producción de lactato en ambas líneas celulares en condiciones de hipoxia. En células HeLa-L el aumento en el contenido de proteínas glucolíticas correlacionó con el aumento del doble en la producción de lactato total (17 vs. 31 nmol lac/min/mg de proteína respectivamente); del cual, el 84% proviene de la oxidación de glucosa externa y solo un 13% de la glutaminólisis (5 nmol lac/min/mg de proteína) (Fig. 7, A y B). Por otro lado, en células HeLa-H en hipoxia, la producción de lactato total disminuyó 56% vs. HeLa-H en normoxia (34 vs. 15 nmol lac/min/mg de proteína) del cual 73% proviene de la degradación de la glucosa externa y solo un 27% de la glutaminólisis (Fig. 7, A y B). Con estos resultados se demostró la correlación que tiene el aumento de proteínas de la glucólisis y el aumento en el flujo total de la vía en células HeLa-L, mientras que

en células HeLa-H, la producción de lactato proveniente de la glucólisis disminuye 35% y el flujo de la glutaminólisis disminuyó un 76%. Estos datos demuestran que en condiciones de hipoxia, la presencia de p53 no solo disminuye el flujo de la FO sino que también afecta a la glucólisis, ya que evita la transcripción de enzimas reguladas por HIF-1 $\alpha$ .

El flujo de la glucólisis y glutaminólisis en condiciones de hipoxia también fue evaluado en el modelo experimental de MCF7 para observar reproducibilidad entre líneas celulares; sin embargo, lo observado en células HeLa en hipoxia no fue reproducible y en células MCF7 ya que al evaluar el flujo de la glucólisis, se obtuvo un aumento tanto en células MCF7wt como en p53shMCF7 (Fig. 7 Ay B). Aunque el aumento en proteínas y en el flujo de la glucólisis fue más evidente en p53shMCF7 que en MCF7wt, el cambio no fue significativo. Los datos proponen que la expresión de p53 endógeno en MCF7wt no es suficiente para inhibir el flujo, o bien, que la modulación de la glucólisis mediada por p53 depende del tipo de tejido de donde provienen las células.

Hasta el momento se demostró en dos modelos diferentes de líneas celulares de cáncer de mama y cérvix que la presencia de p53 estimula positivamente el flujo de la FO en condiciones de normoxia sin provocar cambios sobre la glucólisis, mientras que en hipoxia, p53 se fosforila y cambia su respuesta. La activación por fosforilación causa i) la unión con HIF-1 $\alpha$  para inhibir su capacidad de factor de transcripción y por lo tanto, evitando el aumento de la glucólisis y ii) activa la degradación mitocondrial (mitofagia), causando una disminución significativa en el flujo de la FO (Fig. 7 y 9).

## VI. Discusión

Uno de los supresores tumorales clave en la transformación celular es p53, una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción y que se encuentra inactivo o mutado en diversos tipos de cáncer ya que está involucrado en una gran variedad de procesos celulares que inhiben la transformación y crecimiento de un tumor. La muerte celular por apoptosis, defensa antioxidante, mantenimiento de la estabilidad genética y la modulación del metabolismo energético son algunos de los procesos regulados por p53. A pesar de que se ha descrito que la presencia de p53 es capaz de activar la apoptosis o bien revertir las células tumorales, en nuestro modelo experimental de HeLa-H en condiciones de normoxia, la presencia de p53 no ocasionó ningún cambio en el crecimiento de las células; al parecer, las condiciones en las que son cultivadas las células (alta concentración de nutrientes y de oxígeno) enciende vías de señalización, independientes de p53, involucradas en la activación de la duplicación celular. Para este proyecto se utilizó una concentración de glucosa mayor a la fisiológica (25 mM), lo que causa la activación de factores de transcripción que activan el ciclo celular, como Ciclina D1 y CDKs; además, la respuesta canónica de p53 en condiciones no estresantes no es la detención del ciclo celular, sino el mantenimiento del estrés oxidante y la estabilidad genética. La actividad de inhibición del crecimiento y activación de la muerte celular por parte de p53 se observó únicamente en células HeLa-H en hipoxia; como se ha descrito, p53 es una proteína que responde ante un estímulo de estrés mediante una vía hasta ahora no bien descrita y al parecer la activación de p53 en hipoxia activa la muerte celular de HeLa-H mediante un proceso de muerte celular independiente a la apoptosis, como la autofagia, puesto que no hubo activación de este proceso en estas condiciones.

La gran variedad de procesos celulares regulados por p53 lo posicionan entre una de las proteínas más importantes en la transformación celular. Desde su descubrimiento en 1979, p53 ha sido estudiado ampliamente y se han descubierto cada vez más genes que son regulados por este factor de transcripción. Los procesos celulares más estudiados son: la muerte por apoptosis, el arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA, respuesta antioxidante y la regulación de la estabilidad genética. p53 puede localizarse en

prácticamente todos los compartimentos celulares, se ha reportado que la activación y actividad de esta proteína depende de su localización intracelular; cuando p53 no se encuentra fosforilado en el citosol, es constantemente degradado, mientras que monofosforilado, su localización es mitocondrial y está involucrado con procesos de muerte celular dirigida por la familia Bcl2 (Meek, 1998). Por otro lado, cuando p53 se encuentra en el núcleo, lleva a cabo la función de factor de transcripción, regulando la expresión de genes involucrados en procesos de inhibición de la tumorigénesis (Meek, 2008; Levine and Oren, 2009).

Una de las principales características de las células tumorales es el cambio en el metabolismo energético. Una glucólisis acelerada y una alta producción de lactato aún en condiciones aerobias (efecto Warburg) le confieren a la célula una rápida producción de energía proveniente de la glucólisis y la producción de intermediarios para la biosíntesis de moléculas necesarias para la duplicación celular. Los cambios en el metabolismo son el resultado de la sobreexpresión de oncogenes y factores de transcripción como c-Myc y HIF-1 $\alpha$  que favorecen la expresión o regulación de enzimas metabólicas. Por otro lado, la inhibición de supresores tumorales también juega un papel importante en el cambio del metabolismo celular tumoral.

Recientemente se han descrito nuevos blancos de p53, genes involucrados en el metabolismo energético (glucólisis y FO) que generalmente se encuentran regulados de una forma diferente en células de cáncer. Lo reportado hasta ahora sugiere que, como buen supresor tumoral, p53 inhibe la glucólisis a diferentes niveles y aumenta la fosforilación oxidativa, tratando de contrarrestar el efecto Warburg; sin embargo, en este proyecto se demostró que aunque p53 disminuye el contenido de algunas proteínas de glucólisis como los transportadores y la hexocinasa, al parecer, esto no es suficiente para disminuir el flujo neto de la vía puesto que la presencia de este factor de transcripción no tuvo efecto alguno sobre el flujo total de la vía en condiciones de normoxia, sugiriendo que p53 compite con otras proteínas y factores de transcripción, como HIF-1 $\alpha$ , para la regulación del flujo glucolítico. Una de las principales causas por las cuales p53 no es capaz de contrarrestar el flujo de la glucólisis en normoxia, es la presencia de una alta concentración de nutrientes y de oxígeno. Cuando se rompe el balance en estos procesos o se presenta algún tipo de estrés, p53 interviene

arrestando el ciclo celular, o incluso, activando la muerte celular como se observó en las células HeLa-H cuando son sometidas a hipoxia.

La activación y estabilización de p53 en condiciones de hipoxia induce una disminución del flujo de la fosforilación oxidativa y la inhibición en el aumento del flujo glucolítico, evento observado en diversos tipos de cáncer. La interacción proteína- proteína de p53 con HIF1- $\alpha$  sugiere ser el mecanismo por el cual no se permite un aumento en la glucólisis en células HeLa-H en condiciones de hipoxia. Se ha descrito que la interacción p53-HIF-1 $\alpha$  tiene efecto sobre la actividad de ambos factores, sin embargo, hasta el momento no es del todo claro las consecuencias de esta interacción.

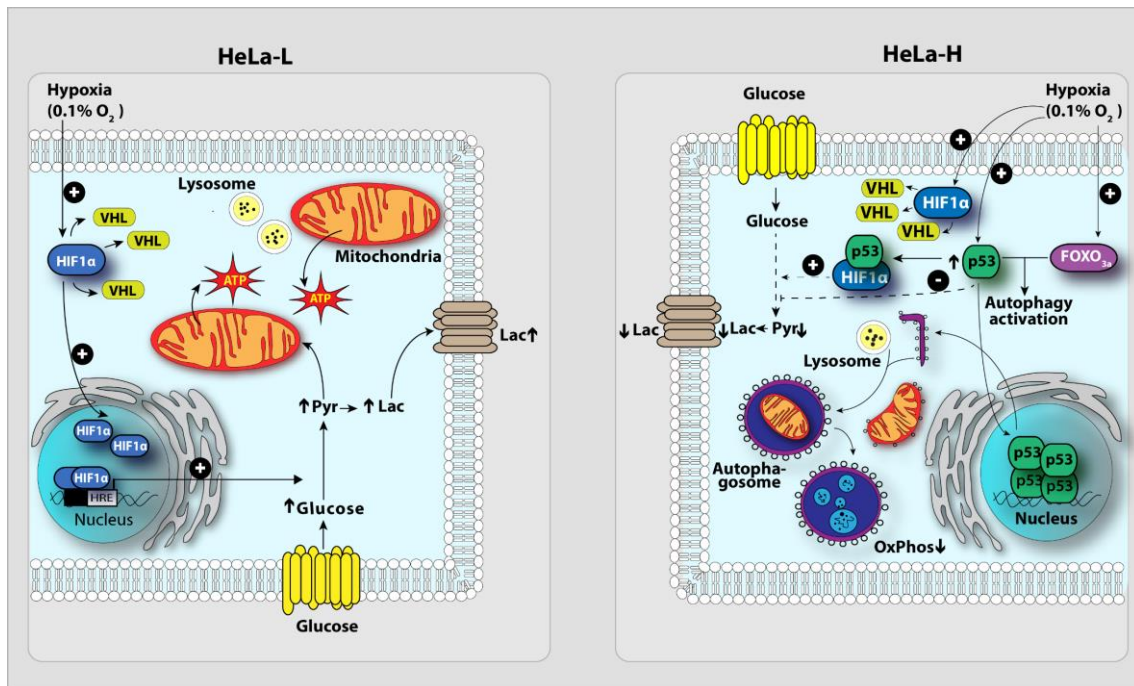
Por otro lado, p53 causa una disminución del flujo de la FO mediante activación de la mitofagia, mecanismo de respuesta que disminuye el número de mitocondrias, volviendo a estas células más susceptibles ante el estrés. Se ha reportado en diversas líneas celulares que bajo condiciones de estrés, la mitofagia se induce de una manera dependiente de Bnip3, una proteína blanco activada por p53; sin embargo en este trabajo se concluyó que p53 es indispensable para la activación de la mitofagia en condiciones de hipoxia, y que la activación de este proceso se da mediante el aumento del contenido de proteínas como LAMP1 y Atg3. Otra de las proteínas que aumentaron como respuesta a la presencia de p53 fue FOXO3A, un factor de transcripción que regula el proceso de biogénesis mitocondrial y autofagia.

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran la compleja regulación de p53 en células tumorales. Se observó que p53 regula el metabolismo dependiendo de la concentración de oxígeno presente en el microambiente, mientras que en condiciones no estresantes promueve un metabolismo altamente oxidativo, la hipoxia causó la fosforilación de p53 y con esto, una respuesta de degradación mitocondrial y disminución de la glucólisis. Por otro lado, se observó que en hipoxia, las células con sobreexpresión de p53, son altamente susceptibles y se sugiere que el proceso de muerte celular es mediante la activación de autofagia ya que no hubo activación de la apoptosis. Este fenómeno fue comprobado por la inhibición de p53 con Pifithrin  $\alpha$  y en células MCF7 con un silenciamiento en p53. Los resultados obtenidos de estos dos modelos experimentales alternos sugieren que la presencia de p53 fue la

causante de estos cambios ya que en ausencia de esta proteína o bien usando inhibidores de p53, los efectos fueron revertidos.

Los resultados obtenidos en este proyecto aportan información importante en el conocimiento de p53 y cómo es que esta proteína regula el metabolismo celular tumoral en diferentes condiciones de microambiente. Esta información representa una plataforma para el conocimiento en el campo del cáncer y para el entendimiento de los cambios celulares y moleculares que ocurren cuando una proteína está ausente o bien es sobreexpresada.

## VII. Conclusión



El análisis bioenergético de dos líneas celulares con un fondo genético idéntico pero con diferentes niveles de p53 reveló una modulación dual sobre el metabolismo glucolítico y mitocondrial dependiendo de los niveles de oxígeno. En normoxia, p53 modula positivamente la función mitocondrial, siendo la fosforilación oxidativa la que aporta el mayor porcentaje de ATP en la célula. En esta condición, las células que sobreexpresan p53 son altamente sensibles a inhibidores mitocondriales. En hipoxia, p53 causa una disminución del flujo de la fosforilación oxidativa y se sugiere que se debe a la activación de la mitofagia. En consecuencia, la principal vía que aporta ATP es la glucólisis.

El análisis del metabolismo energético en células con p53 no mutado facilita el entendimiento de los mecanismos de regulación sobre la glucólisis y la fosforilación oxidativa por parte de p53 y provee una plataforma para el entendimiento de los efectos que producen las mutaciones en p53, sobre el metabolismo energético.

## VIII. Referencias

- Assaily W, Benchimol S. Differential utilization of two ATP-generating pathways is regulated by p53. *Cancer Cell*. 10 (2006): 4–6.
- Azad MB, Gibson SB. Role of BNIP3 in proliferation and hypoxia-induced autophagy: implications for personalized cancer therapies. *Ann. NY Acad. Sci.* 1210 (2010): 8-16.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak M, Calvo M, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden K. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 126(2006): 107-120.
- Contractor T, Harris CR. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res*. 72(2012): 560-567.
- Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF kappa B activity. *Proc Natl Acad Sci*. 103 (2006):18154-18159.
- Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999): 68–72.
- Erickson BK, Kinde I, Dobbin ZC, Wang Y, Martin JY, Alvarez RD, Conner MG, Huh WK, Roden RB, Kinzler KW, Papadopoulos N, Vogelstein B, Diaz LA Jr, Landen CN Jr. Detection of somatic TP53 mutations in tampons of patients with high-grade serous ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 124(2014):881-885.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have a high aerobic glycolysis? *Nat Rev Can*. 4(2004):891–899.



- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 221(2010):3-12..
- Goel A, Mathupala SP, Pedersen PL. Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression. *J Biol Chem.* 17 (2003):15333-15340.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(2000):57–70.
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biological and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 93(2001): 266-76.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 253(1991): 49-53.
- Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p52 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci.* 107(2010): 7455-7460.
- Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23(2009): 537–548.
- Karen H. Vousden and Kevin M. Ryan. p53 and metabolism. *Nature Rev.* 9(2009): 691-700.
- Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF- $\kappa$ B pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 10(2008): 611- 618.
- Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdahl T, Karesen R, Børresen-Dale AL, Jeffrey SS. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9(2007):R30

- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 10 (2009):749-758.
- Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J*. 273 (2006):1975-1988.
- Matoba S, Kang J, Patino W, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley P, Bunz F, Hwang P. p53 Regulates mitochondrial respiration. *Science* 312(2006): 1650-1653.
- Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*. 9(2009):714-723.
- Meek WD. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53, *Cell Signal* 45(1998): 159-166.
- Meek WD. Multisite Phosphorylation and the Integration of Stress Signals at p53. *Cell Signal*. 10(1998): 159-166.
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J*. 2016 Jan;283(1):54-73.
- Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. 25 (2014 ):304-317.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 25 (2006): 4633–4646.

- Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010): 1744-1751.
- Römer L, Klein C, Dehner A, Kessler H, Buchner J p53 a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl* 45(2006): 6440-6460.
- Schwartzberg B F, Armoni A, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* 64(2004): 2627-2633.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 269(1994):757–763.
- Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2 (2010):336-361.
- Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V. Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ.* 13 (2006): 2140-2149.
- Tasdemir E, Maiuri M, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol.* 10(2008): 676–687.

- Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat.* 21(2003):307-312.
- Vousden KH Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. *J Cell Sci* 15(2006): 5015-5020.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci.*92 (1995):5510–5514.
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci.* 105(2008): 18782–18787.
- Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* 29(2010): 6409–6417.
- Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ, Hu W, Feng Z. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect, *Proc Natl Acad Sci.* 108 (2011): 16259-16264.
- Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine A, Hu W, Feng Z, Tumour-Associated Mutant p53 Drives the Warburg Effect, *Nat. Commun.*, 4 (2014):29-35.
- Zhou CH, Zhang XP, Liu F, Wang W. Modeling the interplay between the HIF-1 and p53 pathways in hypoxia. *Sci Rep.* 5(2015):13834.

- Zhou S, Kachhap S, Singh KK. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis*.18(2003): 287–292.
- Zu XL, Guppy M, Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004): 459-465.

## **IX. Artículos publicados durante el doctorado**



ELSEVIER

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamer](http://www.elsevier.com/locate/bbamer)



## Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells

Ileana Hernández-Reséndiz<sup>a</sup>, Alejandra Román-Rosales<sup>b</sup>, Enrique García-Villa<sup>b</sup>, Ambar López-Macay<sup>c</sup>, Erika Pineda<sup>a</sup>, Emma Saavedra<sup>a</sup>, Juan Carlos Gallardo-Pérez<sup>a</sup>, Elizabeth Alvarez-Ríos<sup>b</sup>, Patricia Cariglio<sup>b</sup>, Rafael Moreno-Sánchez<sup>a</sup>, Sara Rodríguez-Enríquez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología, Instituto Nacional de Cardiología, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Zacatepec, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Ligando Simvol, Instituto Nacional de Epidemiología, México

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article history:

Received 11 June 2015

Received in revised form 25 September 2015

Accepted 30 September 2015

Available online 3 October 2015

#### Keywords:

Hypoxia  
Oxidative phosphorylation  
Glycolysis  
p53  
Tumour cells

The role of p53 as modulator of OxPhos and glycolysis was analyzed in HeLa-L (cells containing negligible p53 protein levels) and HeLa-H (p53-overexpressing) human cervix cancer cells under normoxia and hypoxia. In normoxia functional p53, mitochondrial enzyme contents, mitochondrial electric potential ( $\Delta\psi_m$ ) and OxPhos flux increased in HeLa-H vs. HeLa-L cells, whereas their glycolytic enzyme contents and glycolysis flux were unchanged. OxPhos provided more than 70% of the cellular ATP and proliferation was abolished by antimetochontrial drugs in HeLa-H cells. In hypoxia, both cell proliferations were suppressed, but HeLa-H cells exhibited a significant decrease in OxPhos protein contents,  $\Delta\psi_m$  and OxPhos flux. Although glycolytic function was also diminished vs. HeLa-L cells in hypoxia, glycolysis provided more than 60% of cellular ATP in HeLa-H cells. The energy metabolism phenotype of HeLa-H cells was reverted to that of HeLa-L cells by incubating with pifithrin- $\alpha$ , a p53-inhibitor. In normoxia, the energy metabolism phenotype of breast cancer MCF-7 cells was similar to that of HeLa-H cells, whereas p53siRNAMCF-7 cells resembled the HeLa-L cell phenotype. In hypoxia, autophagy proteins and lysosomes contents increased 2–5 times in HeLa-H cells suggesting a mitophagy activation. These results indicated that under normoxia p53 up-regulated OxPhos without affecting glycolysis, whereas under hypoxia, p53 down-regulated both OxPhos (severely) and glycolysis (weakly). These p53 effects appeared mediated by the formation of p53-HIF-1 $\alpha$  complexes. Therefore, p53 exerts a dual and contrasting regulatory role on cancer energy metabolism, depending on the  $O_2$  level.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

p53 is a key transcriptional factor modulating different cellular processes associated with tumor suppression mechanisms i.e., DNA and genotoxic damages; cell cycle regulation and proliferation; apoptosis; and nutritional stress [1]. An additional role of p53 as a glycolytic and oxidative phosphorylation (OxPhos) key modulator has recently emerged [2]. For glycolysis under normoxia, it has been described that p53 (i) increases (70%) the TIGAR mRNA content (whose enzyme

activity decreases the PKC-1 activator, Fru2,6BP) in colon HCT116 carcinoma, and U2OS osteosarcoma [3]; and (ii) decreases (30–50%) the GLUTs and PCAM mRNA and protein contents in p53-transformed mouse embryonic fibroblast and osteosarcoma cells [4,5], which is associated with a moderate diminution (20–40%) in the glucose uptake and glycolytic flux. Also p53 promotes the ubiquitination and degradation of several glycolytic proteins such as PCAM and GLUTs in mouse embryo fibroblasts [6].

On the contrary, p53 increases expression of several genes coding for mitochondrial proteins such as the cytochrome c oxidase assembling protein SCO2 (6–10 times) and glutaminase 2 (12 times) in HepG2 and HCT116 tumor cell lines, increasing (37–50%) their oxygen consumption rates [7,8]. Also, p53 represses the transcription of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PKC2) involved in PDH inactivation in MCF-7 and HCT116 cancer cell lines [9]. In addition, two proteins directly regulated by p53, AIF (apoptosis inhibitor factor) and Parkin (a RBR E3 ubiquitin protein ligase) are involved in protein expression and functioning of NADH dehydrogenase (respiratory chain complex I) and PDH activation (35%) [10,11] which in turn, increase OxPhos flux.

*Abbreviations:* ANT, Adenine nucleotide translocase;; ATPs, ATP synthase; Fru2,6BP, Fructose 2,6-bisphosphate; GA-1, Glutaminase-1; GLUT, Glucose transporter; HeLa-H, p53 over-expressed HeLa cells; HeLa-L, Constitutive and low p53 HeLa cells; MD1, NADH dehydrogenase; OxPhos, Oxidative phosphorylation; PKC-1, Phosphoinositide kinase 1; PFT- $\alpha$ , Pifithrin- $\alpha$ ; PDH, Pyruvate dehydrogenase; PCAM, Phosphoglycerate mutase; TRCAK, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator; 2OGC/IDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase;  $\Delta\psi_m$ , The electrical potential difference across the inner mitochondrial membrane.

\* Corresponding author at: Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Biología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpam, México 14080 México.  
E-mail address: [sarenri@iicn.com.mx](mailto:sarenri@iicn.com.mx) (S. Rodríguez-Enríquez).

Although the action mechanisms associated with the p53 activation on energy pathways have not been elucidated in tumor cells, it has been suggested for non-tumor cells that p53 increases mtDNA stabilization and transcription of several mitochondrial genes (COX I, II and III subunits, ATPS subunit 6 and cytochrome b) codified by mtDNA [12].

It was recently found in breast MCF-7 carcinoma (*i.e.*, cells with wild type-p53 protein content) that acute and severe hypoxia (0.1% atmospheric O<sub>2</sub>, 24 h) induced (i) a significant decrement (20–70%) in the contents and activities of several OxPhos enzymes (COXIV, 20GDH and glutaminase-L) and flux; and (ii) p53 overexpression. However, in cervix HeLa cells (*i.e.*, cells with negligible p53 protein content) acute and severe hypoxia did not significantly affect mitochondrial metabolism. These observations suggested that OxPhos transcriptional regulation by p53 was dependent on the O<sub>2</sub> level [13].

Therefore, to assess the hypothesis that the O<sub>2</sub> status influences p53 regulation of cancer energy metabolism, the mitochondrial and glycolytic metabolism was evaluated in two human cancer cell lines, cervix carcinoma stage IV HeLa cells and breast cancer stage III MCF-7, by performing an integral analysis of the mRNA and protein contents, and pathway fluxes. The HeLa parental strain (here referred as HeLa-L cells) has a constitutively negligible p53 protein content due to the specific proteolytic activity of HPV E1 [14]; these cells were transfected to overexpress the wild type sequence of p53 (HeLa-H cells). On the other hand, the wild type MCF-7 cells, which express non-mutated p53, were subjected to p53 down-regulation by antisense methods (p53shMCF7 cells). Besides genetic manipulation, selective chemical inhibition of p53 function with pifithrin- $\alpha$  was also performed in both HeLa-H and HeLa-L as well as in MCF7 cells. The results of the present study contribute to the understanding of the cancer energy metabolism changes associated with p53 function, providing guidance in the design of more appropriated targeted clinical treatment strategies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

All cell types were grown in Dulbecco-MEM medium (Gibco; Rockville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Genotyping of the parental strains at INMEGEN, México, indicated that the HeLa cell line shared 15 of 16 canonic allelic markers with the original HeLa clone from the ATCC, whereas the MCF-7 cell line shared 16 of 16 canonic allelic markers with the original clone from the same collection. These markers were not changed after p53 overexpression or downregulation in HeLa-H and p53shMCF-7 cells, respectively. For hypoxia, cells were placed in a humidified hypoxic incubator chamber (BillupsRothenberg; CA, USA) at 0.1% atmospheric O<sub>2</sub> and incubated for 24 h [13].

### 2.2. p53 expression in HeLa cells and p53 silencing in MCF-7 cells (p53shMCF-7 cells)

p53 was overexpressed in HeLa-L cells with 0.5  $\mu$ g of the plasmid pCMV-Neo-Bam WT (provided by Dr. Bert Vogelstein at Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA), and a commercial cell transfection assay (SA Biosciences; Ontario, Canada) following the manufacturer instruction. After transfection, 1200  $\mu$ g G418 antibiotic/mL was added for selection of stably-transfected cells.

Specific RNA silencing kit (Sure Silencing RNA Interference Plasmid-Based; SA Biosciences) was employed. p53 silencing in MCF-7 cells was performed with the silencing plasmid (0.5  $\mu$ g) and lipofectamine 2000™, following the manufacturer instructions. After transfection, 800  $\mu$ g G418 antibiotic/mL was added for selection of stably-p53shRNA cells.

### 2.3. mRNA content analyses

Total RNA was extracted by using the RNeasy Protect Cell Mini Kit (Qiagen; Valencia, CA, USA) according to the manufacturer instructions. The RNA (4  $\mu$ g) was converted to cDNA by using a Super Script First-Strand Synthesis System (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). The QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) was used for qRealTime-PCR analysis using 600 ng of template cDNA, the primers showed in Table S1 and following the manufacturer instructions. PCR was performed in a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Grand Island, NY, USA) with the following cycling conditions: 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. Actin was used as a house-keeping reference gene. Analysis was performed in at least three independent biological samples for each experimental condition. Folds of mRNA content changes in HeLa-H cells vs. HeLa-L cells under normoxia were determined by the 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  method [15].

### 2.4. Protein content and immunoprecipitation analyses

To determine protein contents by Western blot, cellular extracts were processed and analyzed as it was described in [13] using antibodies for p53, p53 (P-Ser 15), NOXA, PUMA, HIF-1 $\alpha$ , TIGAR, GLUT1, GLUT3, HK-II, PFK-1, LDH-A, ND-1, COX-IV, PDH, 20GDH, GA-L, ATPS, ANT, BNIP3, Foxo3a, P-Foxo3a, Atg3, LAMP1, XIAP, active caspase 3 and  $\beta$ -actin (Santa Cruz; CA, USA) at 1:1000–2000 dilutions. The corresponding secondary antibodies (at 1:2000 dilutions) and ECL-plus detection system (Amersham; Buckinghamshire, UK) were used for detection. Densitometric analysis was performed using the Image J Software (NIH; Bethesda, MD, USA).

To assess the p53-HIF1 $\alpha$  interaction, both proteins were immunoprecipitated with antibodies against HIF-1 $\alpha$  or IgG1 (1  $\mu$ g) for 1 h plus protein A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). p53 was detected with anti-p53 antibody (Santa Cruz) following manufacturer instructions.

### 2.5. OxPhos and glycolysis fluxes

For glycolysis and OxPhos, cells were incubated in Krebs-Ringer buffer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) with 5 mM glucose at 37 °C. Produced lactate was determined as previously described in [16]. Oxygen consumption sensitive to oligomycin (5  $\mu$ M) was determined with a Clark-type O<sub>2</sub> electrode as previously described [13].

### 2.6. Mitochondrial transmembrane electrical potential ( $\Delta\Psi_m$ )

$\Delta\Psi_m$  was determined in cells incubated with 0.25  $\mu$ M rhodamine 6G at 37 °C in air-saturated Krebs-Ringer buffer and monitored with a Shimadzu spectrofluorophotometer RF-5301PC (Tokyo, Japan) at  $\lambda_{excitation}$  of 480 nm and  $\lambda_{emission}$  of 565 nm [17]. At the end of each experiment, the uncoupler CCCP (5  $\mu$ M) was added to establish the magnitude of the fluorescence signal derived from mitochondria.

### 2.7. Mitochondrial and lysosomal contents

Cells were cultured in glass bottom microwell 35-mm Petri dishes (MatTek; Ashland, MA, USA) with MitoTracker Green (MTG, 0.5  $\mu$ M) and LysoTracker Red (LTR, 0.5  $\mu$ M). Time series of confocal images were collected every 1 to 2 min with a Zeiss LSM 510 meta inverted laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss; Oberkochen, Germany) using 63X oil 1.4 N.A. plan apochromat objective lens. LTR  $\lambda_{excitation}$  543 nm was provided by a helium/neon laser and  $\lambda_{emission}$  of 560 nm was used. MTG  $\lambda_{excitation}$  488 nm was provided by an argon laser and  $\lambda_{emission}$  of 500–550 nm was used. Laser excitation energy was attenuated 1000-fold to minimize photobleaching and photodamage [18].



## 2.8. Nuclear p53 localization by immuno-fluorescence

Cells were fixed with cold 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% (w/w) Triton X-100 at room temperature. Afterwards, cells were incubated with p53 or p53 (P-Ser 15) primary antibodies (Abcam; Cambridge, MA, USA) at 1:200 dilution, as well as with 15  $\mu$ g DAPI/mL (Abcam) and revealed with Alexa488 (Abcam). p53 fluorescence was detected by using an EVOS<sup>FL</sup> Auto Cell Imaging System (Life Technologies; Grand Island, NY, USA).

## 2.9. Apoptosis assays

Cellular apoptosis was monitored with 25 ng Annexin V-FITC plus 250 ng propidium iodide and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson; San Jose, CA, USA). Analysis was carried out for 10 000 events using the Summit V4.3 software (Beckman Coulter Inc.; Fullerton, California, USA).

## 3 Results

### 3.1. Overexpressed p53 in HeLa-H cells is active

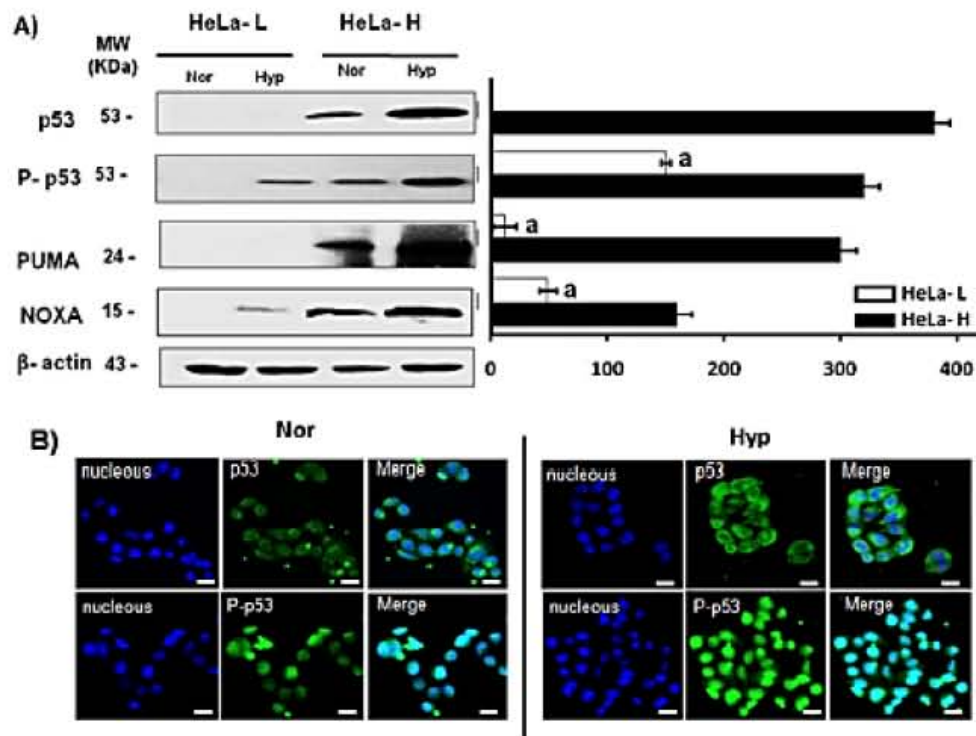
To assess for the presence of p53 in HeLa-H cells, the p53 mRNA (Table S2) and protein contents (Fig. 1A) were determined and compared with those of HeLa-L cells in both normoxia and hypoxia. Indeed, the p53 mRNA (2-times) and both phosphorylated (3-times) and non-phosphorylated (4-times) p53 protein levels were significantly higher in HeLa-H than in HeLa-L cells. Thus, HeLa-H cells overexpressing p53 were able to overcome the inhibition of endogenous p53 engendered by HPV infection. In addition, immunofluorescence staining of HeLa-H cells showed that phosphorylated p53 was exclusively localized into the nucleus, its site of transcriptional action, whereas non-phosphorylated p53 was preferentially localized in the cytosol under both normoxia and hypoxia (Fig. 1B).

To further demonstrate that overexpressed phosphorylated-p53 (at Ser 15) was active, the p53-downstream protein targets PUMA, NOXA (Fig. 1A) and TIGAR (Fig. 3A) were determined. As expected, these protein contents were several times higher in HeLa-H than in HeLa-L cells. As p53 and the p53-targets PUMA and NOXA (under normoxia) were undetectable in HeLa-L cells, the data suggested that the increased level of phosphorylated p53 in HeLa-H cells actually corresponded to increased p53 activity despite the presence of the E6 oncoprotein. Therefore, these observations indicated that overexpressed p53 is phosphorylated and functionally active in HeLa-H cells [19,20].

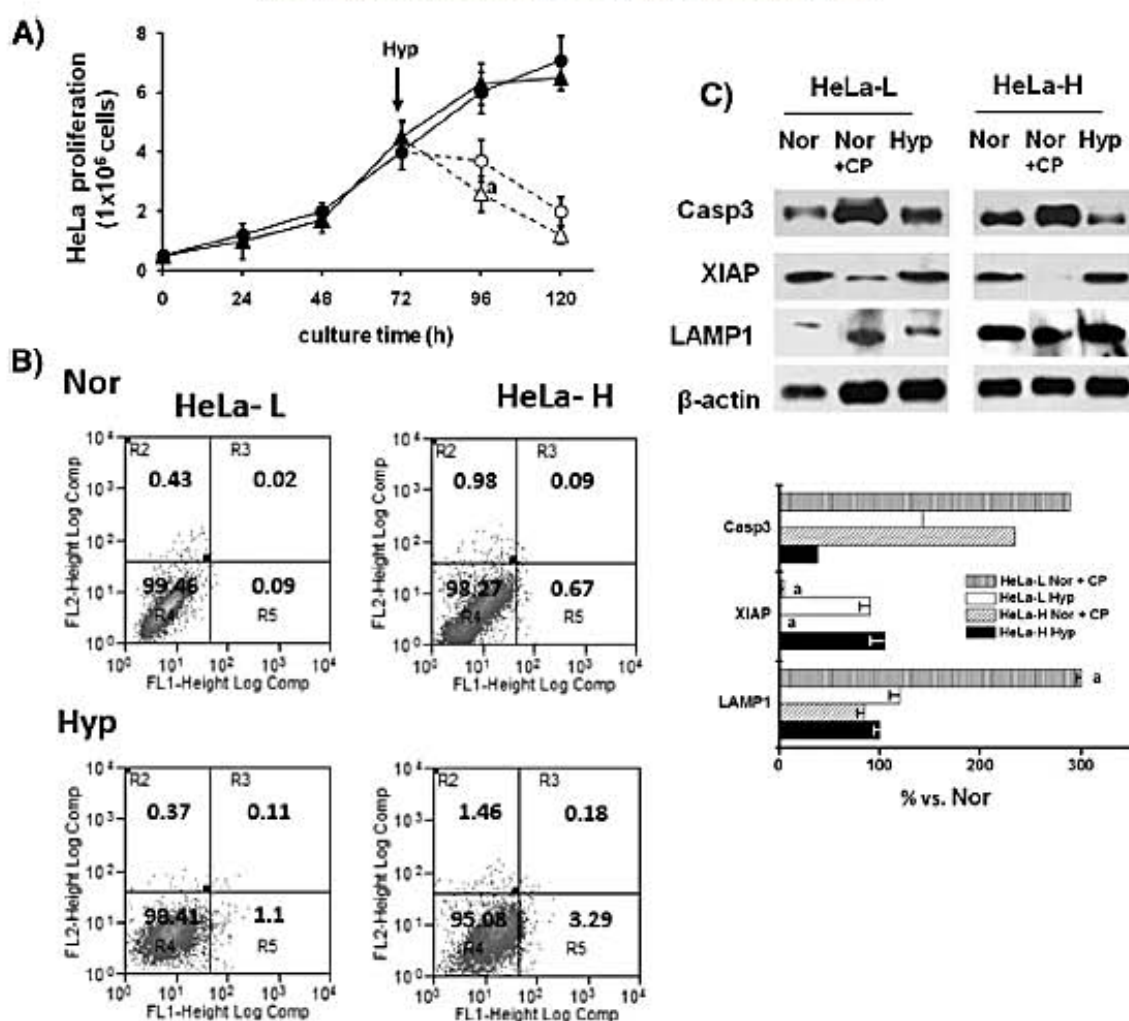
### 3.2. Effect of p53 on HeLa-L and -H cell growth under hypoxia and normoxia

Although phosphorylated p53 is involved in the cell cycle regulation, assays of growth in normoxia, with both cells, revealed no statistically significant changes in the specific growth rates, cellular yields and population doubling time (Fig. 2A). Under hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>), cellular proliferation of both tumor cells was arrested (Fig. 2A), as previously described for MCF7 and HeLa cells [13]. Significant cell death was apparent under hypoxia after 24 h for HeLa-H and after 48 h for HeLa-L. Flow cytometry assays revealed that 24 h hypoxia did not lead to significant cell death by apoptosis (less than 5%) in both cells (Fig. 2B).

To further support the last conclusion both cells were exposed to cisplatin (CP, 10  $\mu$ M/24 h), a well-known apoptotic inducer under normoxia [21]. Indeed, the content of the apoptosis marker active caspase 3 increased (2–3 times) whereas that of the anti-apoptotic XIAP protein decreased (70–100%) in CP-treated cells vs. nontreated cells (Fig. 2C). Moreover, the level of caspase 3 under hypoxia in both HeLa-L and HeLa-H cells was significantly lower than that found in CP-treated cells, suggesting that the arrest of HeLa cell proliferation observed under hypoxia did not involve apoptosis onset, although PUMA and NOXA protein levels were significantly increased in HeLa-H cells (Fig. 1A). These results clearly indicated that other cell death processes such as mitophagy were also involved in the lowering of viable cells



**Fig. 1.** p53 overexpression in HeLa-H cells is functionally active (A) Representative Western blot of at least three different, independent experiments in HeLa-L and HeLa-H cells in normoxia (Nor) and 24 h hypoxia (Hyp). For clarity, double normalization vs. actin and normoxia was performed. \* $P < 0.01$  vs. HeLa-H. Abbreviations: PUMA, p53 up-regulated modulator of apoptosis; TIGAR, T153-induced glycolysis and apoptosis regulator. (B) Subcellular localization of phosphorylated-p53 (ser 15; P-p53) and non-phosphorylated p53 in HeLa-H cells. p53 and DAPI-loaded nuclear immuno-fluorescence signals were determined as described in the Material and Methods section under normoxia (21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>).



**Fig. 2.** HeLa-L and HeLa-H cell growth and non-apoptotic incidence under normoxia (21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>). (A) HeLa-L (●) and HeLa-H (▲) cells (5 × 10<sup>5</sup> cells/mL) were grown in Dulbecco-MEM medium at 37 °C and 21% O<sub>2</sub>. After 72 h (black arrow), both HeLa cell cultures were exposed to hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>, open symbols), or kept under normoxia, for additional 48 h. Viabilities in normoxic and hypoxic conditions were 75–90% for HeLa-H and HeLa-L cells; n = 3, \*P < 0.05 vs. HeLa-H at 72 h, Nor. The population doubling level (n), or total number of times the cells in the population have doubled, was calculated with the following equation:  $n = 0.332(\log N_t - \log N_0)$  where N<sub>t</sub> represents the number of cells harvested at the end of the growth period and N<sub>0</sub> represents the number of inoculated cells at the beginning of the growth curve [66]. (B) Cytometry flux analysis: R2 area represents the percentage of cells undergoing necrosis; R3 area represents the percentage of cells in late apoptosis; R4 area represents the percentage of living cells; and R5 area represents the percentage of cells initiating apoptosis. Apoptosis was determined by using the Annexin V-ITC assay. (C) Representative Western blot of at least three different independent experiments in HeLa-L and HeLa-H cells in normoxia (Nor) and 24 h hypoxia (Hyp), except for Casp3 (n = 2). Cisplatin (CP) was added at 10 μM for 24 h only under normoxia. For clarity, double normalization vs. actin and normoxia was performed. \*P < 0.01 vs. Nor. The contents of XIAP and LAMP1 were revealed and analyzed in the same PVDF-membrane, like all other Western blots performed in the present paper. However, for clarity in this particular case, spliced images of these proteins are shown, to keep the same sequence of cell type and experimental condition.

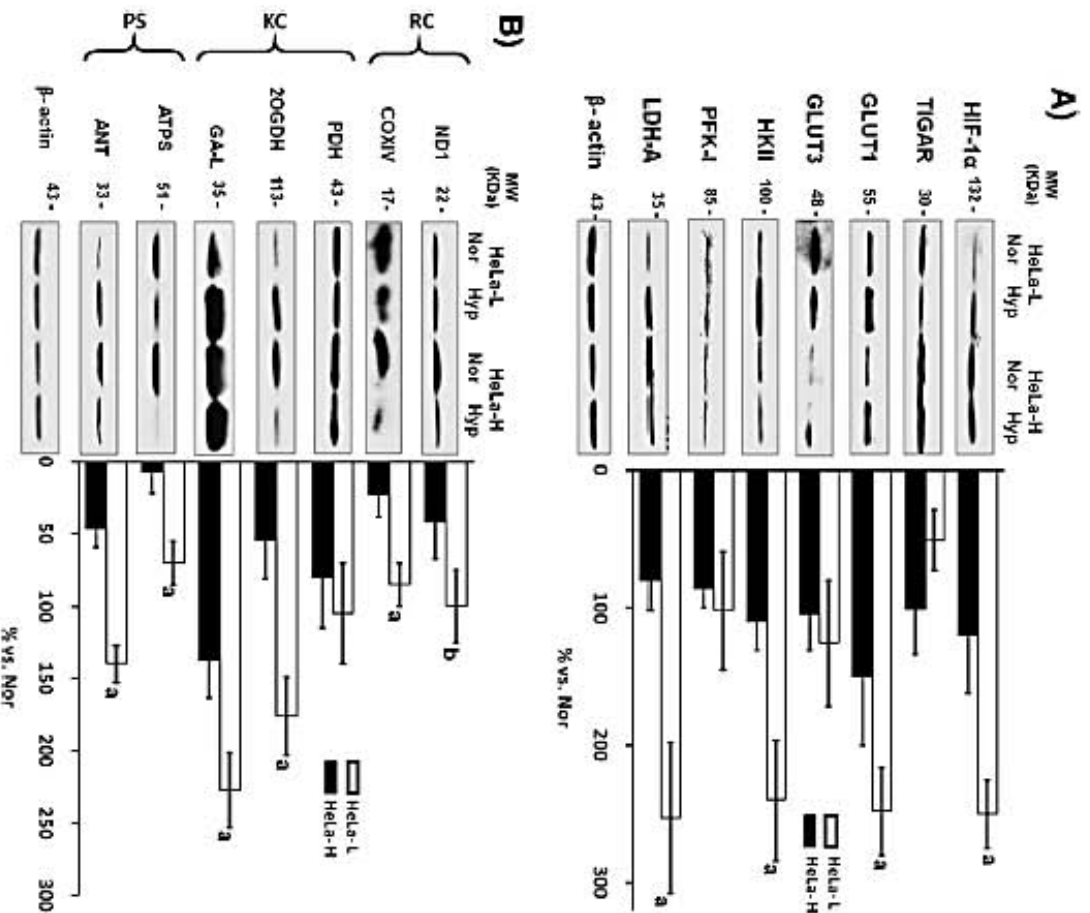
under hypoxia. Interestingly, the increase in some autophagy proteins such as LAMP1 suggested that apoptosis induction by CP was also accompanied by autophagy activation in HeLa-L and HeLa-H cells (Fig. 2C).

### 3.3. Effect of p53 expression on mRNA and protein contents, and fluxes of OxPhos and glycolysis in HeLa cells under normoxia

Under normoxia, the presence of phosphorylated p53 in HeLa-H cells (vs. HeLa-L cells) induced a doubling in the protein contents of HIF-1α and LDH-A (Figs. 3A and S1A), which correlated with an increase (2-times) in the total lactate production (Fig. 4A), despite significant decrements in GLUT1 and GLUT3 contents (Figs. 3A and S1A). However, after correcting for lactate production in the presence of the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose (2DG), the true glycolytic flux was similar in both HeLa-L and HeLa-H cells (Fig. 4B). It is noted that the non-glycolytic lactate production (i.e., lactate produced in the presence of 2DG) was markedly higher in HeLa-H cells (Fig. 4B) and was

abolished (>95%) by the respiratory complex 1 inhibitor rotenone, suggesting that this lactate was generated via glutaminolysis. It is worth recalling that glutaminolysis fully depends on mitochondrial metabolism where NAD(P)H, generated by glutamine oxidation at the glutamate and 2-oxoglutarate dehydrogenases and malic enzyme levels, is further re-oxidized by the respiratory complex 1 [22,23].

Regarding OxPhos under normoxia, significant increments in the contents of several proteins (Figs. 3B and S1B), flux (1.6-fold; Fig. 4B) and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ , 1.4-fold; Fig. S2) were detected under normoxia in HeLa-H cells vs. HeLa-L cells. The mRNA levels (Table S2) were unvaried (COXIV, 2OGDH, and ATP5) or significantly lower (ND1) in HeLa-H vs. HeLa-L cells showing no correlation with the protein contents (Fig. S1B). The rate of oligomycin-resistant respiration (i.e., O<sub>2</sub> consumption not associated to OxPhos) was similar for both cell types, and was almost completely blocked by cyanide (data not shown), indicating that the majority of total cellular O<sub>2</sub> consumption (Fig. 4A) was associated to the respiratory chain activity but not to extramitochondrial reactions.



**Fig. 3.** Energy pathways-related proteins in HeLa-L and HeLa-H cells. (A) Representative Western blot of transcription factors and glycolytic-related proteins in HeLa-L and HeLa-H cells under normoxia (Nor, 21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>); double normalization vs. actin and normoxia was performed. n = 3. \* p < 0.01 vs. HeLa-H (Nor, 21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>), double normalization vs. actin and normoxia was performed. Not of OxPhos-related proteins in HeLa-L and -H cells under normoxia (Nor, 21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>). Abbreviations: ATPS, ATP synthase; ANT, adenine nucleotide translocator; COXIV, cytochrome c oxidase; GA-L, glutamine-L; GLUT1, glucose transporter-1; GLUT3, glucose transporter-3; HIF-1α, hypoxia inducible factor-1α; HKII, hexokinase-II; KC, Krebs cycle; LDH-A, lactate dehydrogenase-A; ND1, NADH dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PFK-1, phosphofruktokinase-1; PS, phosphorylation system; RC, respiratory chain; TIGAR, TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator; ZOGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase.

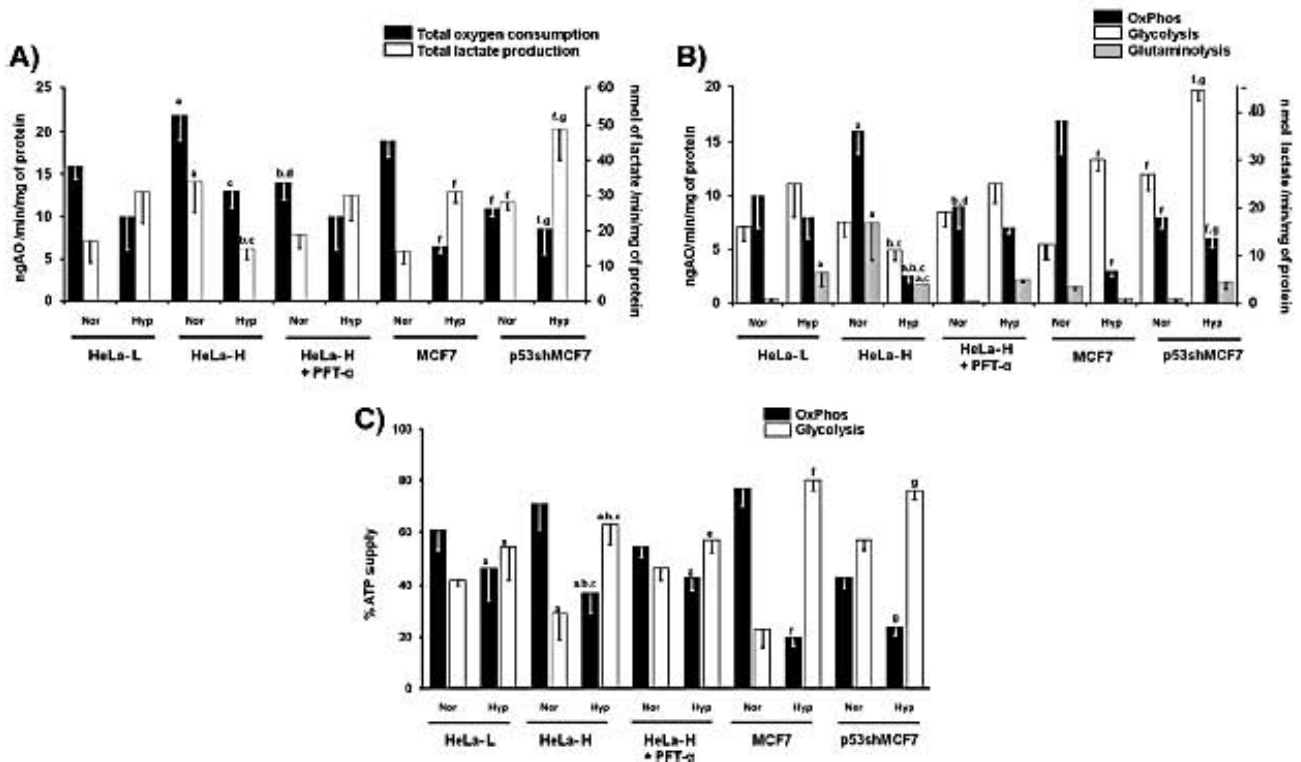
### 3.4. Effect of p53 expression on mRNA and protein contents, and fluxes of OxPhos and glycolysis in HeLa under hypoxia

Under severe and acute hypoxia HeLa-L cells showed (a) increased contents of HIF-1α and glycolytic proteins GLUT1, HKII, and LDH-A, a decreased TIGAR content, and unchanged GLUT3 and PFK-1 levels (Fig. 3A); and (b) increased glycolysis flux (Fig. 4B) vs. normoxia. Similar observations have also been documented for several cancer cell lines such as MCF-7, MDA-MB-453, HeLa, AS-30D hepatoma, and sarcoma 37 [24,25]. In marked contrast, in HeLa-H cells under hypoxia the HIF-1α and glycolytic protein contents were unchanged, except for GLUT1 which increased (Fig. 3A), and pathway flux actually decreased (Fig. 4B) vs. normoxia.

Furthermore, the presence of a high level of functional and phosphorylated p53 in HeLa-H cells sensitized OxPhos to hypoxia-induced damage as revealed by (a) the decrease in the protein contents (30–93%) of several enzymes of the respiratory chain (ND1, COXIV), Krebs cycle and anaerobic reactions (ZOGDH, PDH), and OxPhos phosphorylation

system (ANT, ATPS) (Fig. 3B), as also documented for MCF-7 carcinoma, a breast cancer cell line harboring relatively high p53 levels [13]; and (b) the severe decrease in OxPhos flux and  $\Delta\psi_m$  (Figs. 4B and S2). On the contrary, in HeLa-L cells OxPhos protein contents (Fig. 3B), and pathway flux (Fig. 4B) were unchanged (ND1, COXIV, PDH, ATPS) or even increased (ZOGDH, GA-L, ANT) (vs. normoxia); in these last cells, a pronounced decrease in  $\Delta\psi_m$  (Fig. S2) was the only detected change in the mitochondrial function induced by hypoxia. Under hypoxia, the rate of oligomycin-resistant respiration changed from 2 nanogram atoms oxygen/min/mg protein in HeLa-L cells to 8 nanogram atoms oxygen/min/mg protein in HeLa-H cells, and again was almost completely blocked by cyanide in both cell types (data not shown).

The changes in the OxPhos and glycolysis protein contents,  $\Delta\psi_m$ , and fluxes in HeLa-H and HeLa-L under hypoxia, as well as normoxia, did not correlate with their corresponding mRNA contents determined after 24 h (Table S2), suggesting that transcriptional changes occurred at an early time whereas post-translational changes occurred after 24 h, independently of the O<sub>2</sub> level. Similar observations have been



**Fig. 4.** Energy metabolism profile in HeLa-L and HeLa-H cells. (A) Total oxygen consumption and lactate production. (B) OxPhos, Glycolysis and glutaminolysis fluxes. OxPhos flux represents the 5  $\mu$ M oligomycin-sensitive respiratory rate. The glycolysis flux was calculated as the lactate production in the presence of 10 mM 2DG (the glucose concentration in the incubation medium was 5 mM); glutaminolysis flux was determined as the lactate production resistant to 2DG and sensitive to 5  $\mu$ M rotenone. PFT- $\alpha$  was 10  $\mu$ M in incubations for 24 h. (C) ATP supply. For calculations, it was assumed that 1 mol ATP is produced per mol glycolytic lactate formed; and the rate of OxPhos flux was multiplied by a P/O ratio of 2.5. The data shows the mean  $\pm$  SD of three independent preparations assayed, except where otherwise indicated. <sup>a</sup> $P < 0.01$  vs HeLa-L, Nor; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HeLa-H, Nor; <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs HeLa-L, Hyp; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HeLa-H, Hyp; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs HeLa-H, Nor + PFT- $\alpha$ ; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs MCF7, Nor; <sup>g</sup> $P < 0.01$  vs p53shMCF7, Nor. Abbreviations: OxPhos, oxidative phosphorylation; 2DG, 2-deoxyglucose; PFT- $\alpha$ , pifithrin- $\alpha$ ; p53shMCF7, p53-silenced MCF-7 cells; Nor, normoxia; Hyp, hypoxia (0.1%  $O_2$ , 24 h).

documented for different cancer cell types and under different experimental conditions [26].

### 3.5. Role of p53 on the regulation of the cellular ATP supply

The analysis of the energy pathway flux rates revealed that, under normoxia, p53 increased the energy dependence on OxPhos (61% in HeLa-L, 70% in HeLa-H; Fig. 4C) with glycolysis playing a minor role. Interestingly, a significant fraction of the ATP supplied by OxPhos in HeLa-H cells very likely derived from glutaminolysis (Fig. 4B, C), whereas the glutaminolysis contribution in HeLa-L cells was negligible, indicating higher dependence on glutamine oxidation in HeLa-H cells vs. HeLa-L cells. In contrast, under hypoxia, p53 promoted a higher energy dependence on glycolysis (55% in HeLa-L, 64% in HeLa-H; Fig. 4C). It should be noted that, although glycolysis was diminished by hypoxia in HeLa-H cells (vs. normoxia; Fig. 4B), this pathway prevailed as the principal ATP supplier under hypoxia for these p53-enriched cells (Fig. 4C).

In agreement with the above-described data under normoxia, growth of HeLa-H cells was significantly more sensitive (7.5-fold vs. HeLa-L cells) to several anticancer and anti-mitochondrial drugs such as the copper-based drug casiopeinall-gly (CasII-gly),  $\alpha$ -tocopherylsuccinate ( $\alpha$ -TOS) and  $\alpha$ -tocopheryloxyacetate ( $\alpha$ -TEA) as well as the classical ATPs inhibitor oligomycin; and less sensitive to the glycolytic inhibitors 2DG, iodoacetate and gossypol (Table 1). CasII-gly is a potent OxPhos inhibitor primarily diminishing the PDH, 2OGDH and SDH activities [27,28]; at high concentrations ( $\geq 100 \mu$ M), CasII-gly also behaves as a glycolytic inhibitor mainly affecting HK activity.  $\alpha$ -TOS is an ubiquinone/succinate analog inhibiting succinate dehydrogenase (respiratory complex II) activity and affecting the growth of several breast cancer cells [29].  $\alpha$ -TEA

is a vitamin E analog with strong inhibitory effect on the growth of breast cancer MDA-MB-435 cells and cancer xenografts in nude mice [30]. 2DG is a glucose analog that inhibits HPI, HK and GLUT activities diminishing glycolytic flux [27], iodoacetate primarily reacts with the reactive Cys<sup>149</sup> present in GAPDH catalytic center, and gossypol inhibits the NAD<sup>+</sup>-dependent enzymes such as GAPDH and LDH [31]. It should be noted that the oligomycin IC<sub>50</sub> value found in both HeLa-L and

**Table 1**  
IC<sub>50</sub> values of the cell growth for glycolytic and OxPhos inhibitors in HeLa-L and HeLa-H cells.

Anti-mitochondrial drugs	HeLa-L	HeLa-H
CasII-gly (nM)	300 $\pm$ 20 (6)	40 $\pm$ 8* (6)
Oligomycin ( $\mu$ M)	57 $\pm$ 5 (6)	30 $\pm$ 2.5* (3)
$\alpha$ -TOS ( $\mu$ M)	>100 (3)	46 $\pm$ 22 (3)
$\alpha$ -TEA ( $\mu$ M)	23 $\pm$ 2 (3)	19 $\pm$ 5 (3)
Anti-glycolytic drugs		
2DG (mM)	7 $\pm$ 3 (6)	15 $\pm$ 5** (6)
Gossypol ( $\mu$ M)	268 $\pm$ 56 (3)	307 $\pm$ 106 (3)
IAA ( $\mu$ M)	504 $\pm$ 66 (3)	814 $\pm$ 96* (3)

CasII-gly (0.05–1  $\mu$ M), oligomycin (1–100  $\mu$ M),  $\alpha$ -TOS (1–100  $\mu$ M),  $\alpha$ -TEA (1–100  $\mu$ M); gossypol (0.1–1 mM), IAA (0.1–5 mM) or 2DG (1–30 mM) were added at the beginning of the normoxic HeLa-L and HeLa-H cell cultures and the inhibitor concentration required to inhibit by 50% the cell growth (IC<sub>50</sub>) was determined at the 96 h-time point. The external glucose concentration in the culture media was 25 mM. The data shown represent the mean  $\pm$  S.D. of 3 or 6 different assayed preparations.

Abbreviations: CasII-gly, casiopeinall-gly; IAA, iodoacetate; 2DG, 2-deoxyglucose;  $\alpha$ -TEA,  $\alpha$ -tocopheryloxyacetate;  $\alpha$ -TOS,  $\alpha$ -tocopherylsuccinate.

\*  $P < 0.01$  vs. HeLa-L.

\*\*  $P < 0.05$  vs. HeLa-L.

HeLa-H (Table 1) was 6–11 times higher than the oligomycin concentration (5  $\mu\text{M}$ ) required to reveal the OxPhos flux (Fig. 4B). The total cellular respiration, assayed in a saline medium, was 80–90% sensitive to 5  $\mu\text{M}$  or higher oligomycin concentrations. However, in cell proliferation assays, culture medium with high fetal bovine serum (i.e., albumin) is used, which masks the oligomycin effect.

### 3.6. Energy metabolism in cancer cells with blockage of p53 activity

To further support the role of p53 as an energy metabolism modulator, glycolysis and OxPhos were assessed in (i) HeLa-H cells incubated with the selective p53 inhibitor, pifithrin- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ) [32], and (ii) p53 silenced shMCF-7 cells.

In HeLa-H cells, PFT- $\alpha$  decreased the contents of both phosphorylated and non-phosphorylated p53 under hypoxia and normoxia (Fig. 5A), being phosphorylated p53 more sensitive. The p53-target TIGAR was also decreased by PFT- $\alpha$ , whereas p27 (a non-p53 target) level was unaltered (Fig. 5A). For all proteins assayed, only one band was observed except for TIGAR (in normoxia) suggesting protein degradation. Under normoxia, the presence of PFT- $\alpha$  did not affect the proliferation rate and yield of HeLa-H cells (Fig. 5B). The severe effect of 24 h hypoxia arresting HeLa-H proliferation was further enhanced by the presence of PFT- $\alpha$  (Fig. 5B). PFT- $\alpha$  also decreased OxPhos and glutaminolysis fluxes (Fig. 4B) and  $\Delta\Psi_m$  (Fig. S2) in HeLa-H cells to levels similar to those of HeLa-L cells under normoxia, whereas glycolysis remained unchanged. In contrast, under hypoxia PFT- $\alpha$  restored OxPhos and glycolytic fluxes, and  $\Delta\Psi_m$ , in HeLa-H cells (Figs. 4B, S2) to levels similar to those of HeLa-L cells. The re-establishment of the glycolytic flux observed in PFT- $\alpha$  treated HeLa-H cells correlated with significant increases in the levels of HIF-1 $\alpha$  and its glycolytic-targets GLUT1, HKII and LDH (Fig. 5C) under hypoxia. As a control PFT- $\alpha$  was also assayed in HeLa-L cells, showing no effects on OxPhos flux and  $\Delta\Psi_m$  (Table S3), as expected.

On the other hand, in human breast cancer MCF-7 cells, which have a relatively high p53 content compared to HeLa-L cells (Figs. 1A and 6A),

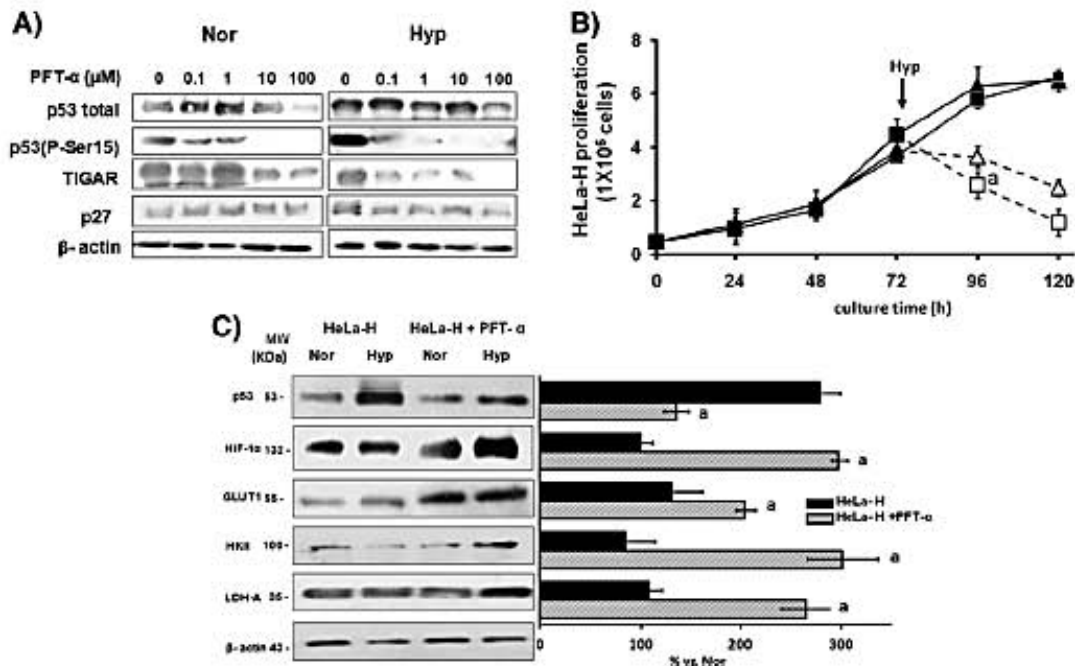
hypoxia significantly (a) diminished the cellular growth (Fig. S3), (b) increased the glycolytic flux (Fig. 4B) correlating with increased HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, HKI and LDH contents (Fig. 6A); and (c) decreased OxPhos flux, glutaminolysis,  $\Delta\Psi_m$  (Figs. 4B and S2), and mitochondrial protein contents (2OGDH, ND1, COXIV and ANT; Fig. 6B) versus normoxia, in agreement with previous works [13].

Under normoxia, silencing of p53 to generate p53shMCF-7 cells (a) induced significant lowering in the NOXA, PUMA and TIGAR contents, as expected (Fig. 6A); (b) led to higher glycolytic flux (Fig. 4B) correlating with higher levels of HIF-1 $\alpha$  and glycolytic protein targets (Fig. 6A); and (c) decreased OxPhos flux,  $\Delta\Psi_m$ , and mitochondrial protein contents except for ANT (Fig. 6B), vs. parental MCF-7 cells. Under hypoxia, silencing of p53 also led to higher glycolytic flux (Fig. 4B), correlating with enhanced HIF-1 $\alpha$  and GLUT1 levels (Fig. 6A) vs. normoxia, and as occurs in HeLa-L cells. On the contrary, hypoxia significantly diminished the OxPhos flux and  $\Delta\Psi_m$  in MCF-7 cells (Figs. 4B and S2) vs. normoxia, like in HeLa-L cells.

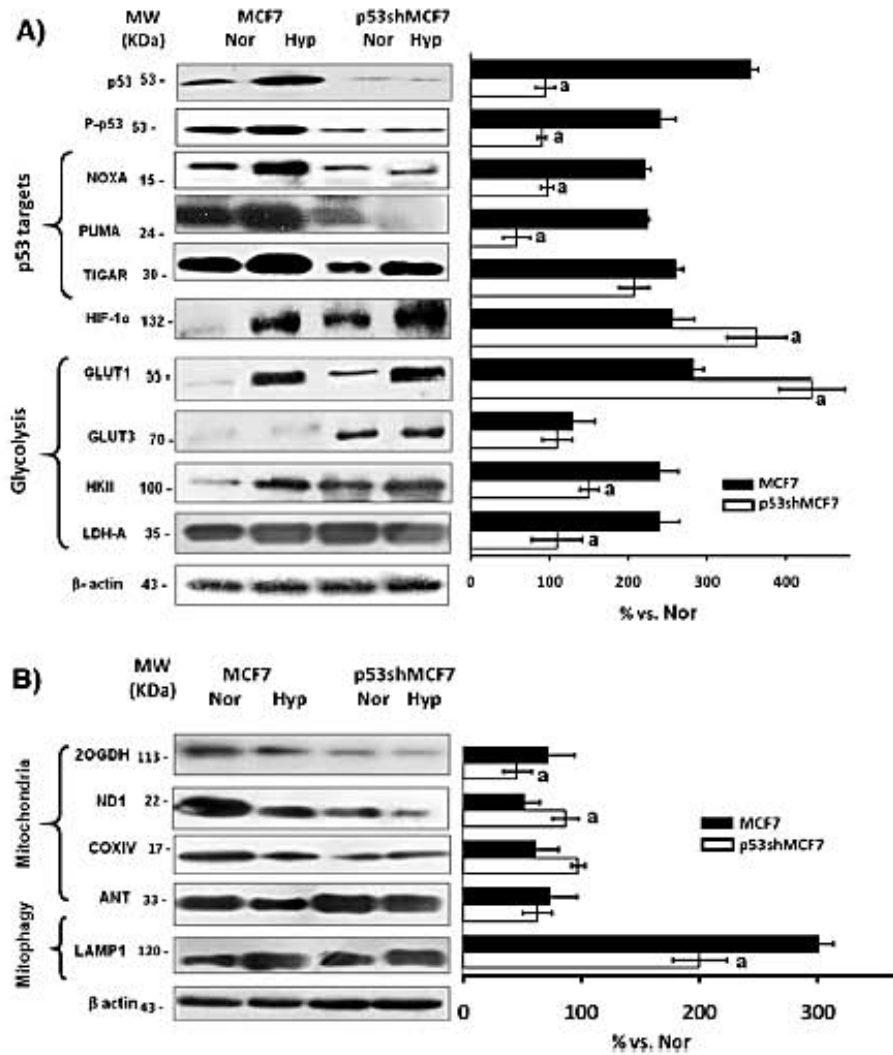
PFT- $\alpha$  also lowered the endogenous phosphorylated p53 content in MCF-7 cells (data not shown), which in turn decreased OxPhos (from 17 to 7  $\pm$  2 ngAt O/min/mg cell protein; n = 3) and increased glycolysis (from 14 to 20 nmol/min/mg cell protein; n = 1). The OxPhos and glycolysis fluxes in MCF-7 cells treated with PFT- $\alpha$  were similar to those found in p53shMCF-7 cells (Fig. 4B). These results indicate that, independently of the O<sub>2</sub> concentration, the lack of p53 promotes that HIF-1 $\alpha$  can tightly up-regulate the glycolytic flux. On the other hand, growth of MCF-7 and p53shMCF-7 cells under normoxia was similar (Fig. S3) indicating the lack of p53 control on the MCF-7 cell cycle.

### 3.7. p53 antagonizes HIF-1 $\alpha$ activity in HeLa-H cells

Under hypoxia, the over-expression of p53 in HeLa-H cells (Fig. 1A) led to inhibition of the glycolytic flux (Fig. 4B) and a lower HIF-1 $\alpha$  content compared to HeLa-L. It has been established that HIF-1 $\alpha$  directly interacts with wild-type p53 [33] impairing HIF-1 $\alpha$  associated functions



**Fig. 5.** Effect of pifithrin- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ) on p53 function in HeLa-H cells (A) Protein contents of phosphorylated and non-phosphorylated p53, and p53-target TIGAR. Representative Western blot (3 assays made with independent cell samples) for total p53, phosphorylated-p53, and TIGAR in HeLa-H cells after PFT- $\alpha$  treatment. (B) Cellular growth. Growth curve of HeLa-H cells (n = 3) in the absence ( $\blacktriangle$ ) or in the presence ( $\blacksquare$ ) of 10  $\mu\text{M}$  PFT- $\alpha$ . Full symbols represent normoxic conditions; empty symbols represent hypoxia (Hyp). \*P < 0.05 vs. HeLa-H/Nor at 72 h. (C) HIF-1 $\alpha$  and glycolysis-related protein contents. Western blotting analysis of HIF-1 $\alpha$  and its glycolytic targets in HeLa-H cells after PFT- $\alpha$  (10  $\mu\text{M}$ ) treatment. Normalization vs. actin was performed. n = 3, <sup>a</sup>P < 0.01 vs. HeLa-H cells.



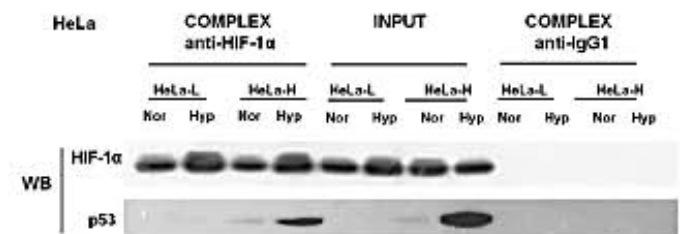
**Fig. 6.** p53, p53-targets, HIF-1 $\alpha$  and energy pathways-related proteins in MCF-7 and p53shMCF-7 cells (A) The figure shows a representative Western blot of p53, p53-protein targets, HIF-1 $\alpha$  and its glycolytic-related proteins in MCF-7 and p53shMCF-7 cells cultured under normoxia (Nor, 21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>); double normalization vs. actin and normoxia was performed. n = 3, \*P < 0.01 vs. MCF7; <sup>#</sup>P < 0.05 vs. MCF7. (B) Representative Western blot of OxPhos-related proteins MCF-7 and p53shMCF-7 cells under normoxia (Nor, 21% O<sub>2</sub>) and 24 h hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>), double normalization vs. actin and normoxia was performed. n = 3, \*P < 0.01 vs. MCF7.

[34]. Therefore, the degree of p53-HIF1 $\alpha$  interaction, as a possible regulatory mechanism of the p53 function, was evaluated in HeLa-H cells under both normoxia and hypoxia. p53 was indeed detected in immunoprecipitates with HIF-1 $\alpha$  antibody of normoxic (mildly) and hypoxic (strongly) HeLa-H cells (Fig. 7). Immunoprecipitation with IgG1 (control antibody) of HeLa-H cells did not result in p53 or HIF-1 $\alpha$  co-precipitation (Fig. 7). Similarly, immunoprecipitation with HIF-1 $\alpha$  antibody of normoxic or hypoxic HeLa-L cells did not result in p53 co-precipitation (Fig. 7). Then, it seemed that p53 may interfere with the HIF-1 $\alpha$  function only when a relatively high content is reached (in HeLa-H cells) but not with a negligible level (in HeLa-L cells).

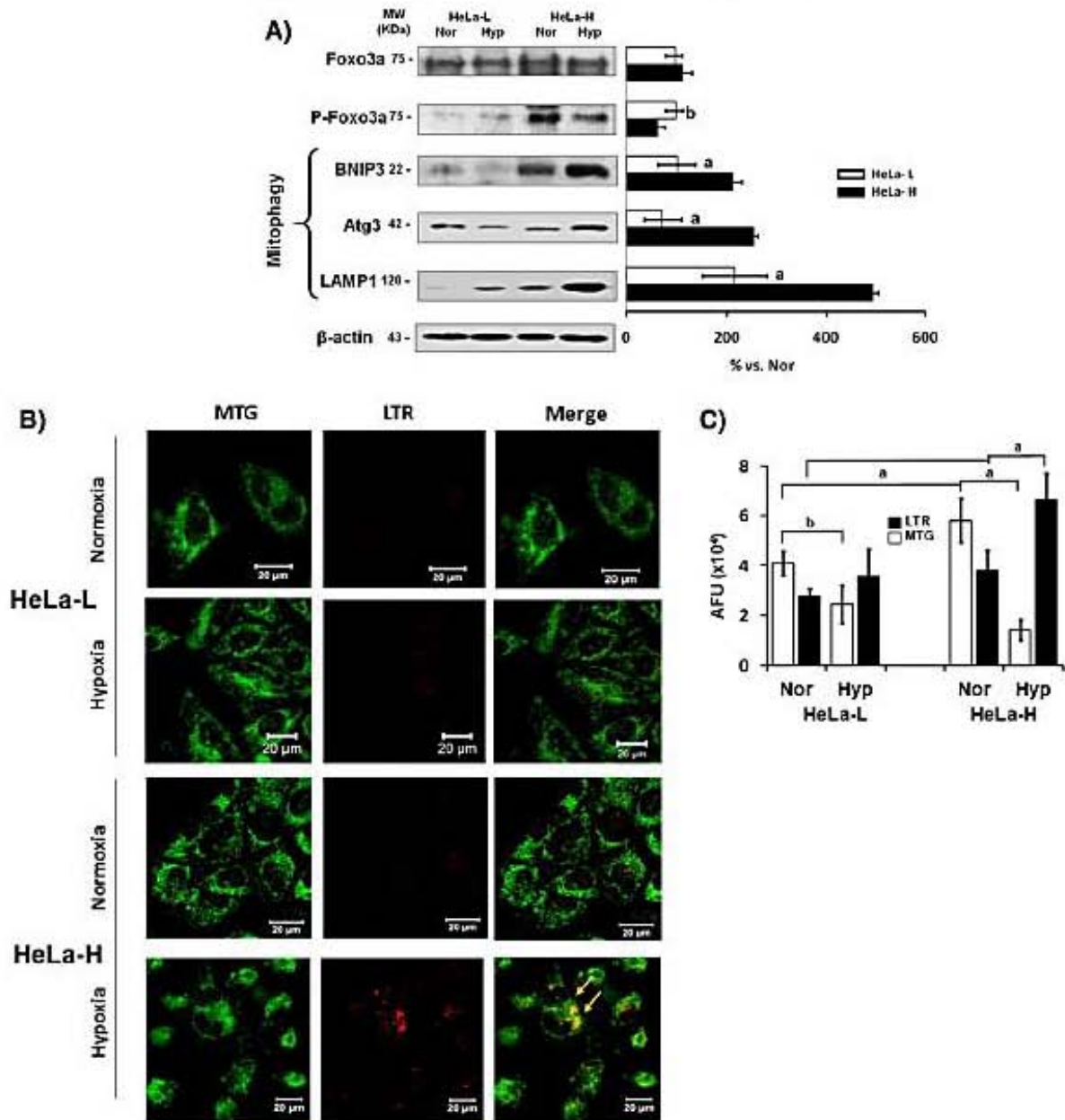
### 3.8. p53-induced mitophagy activation in hypoxic HeLa-H cells

It has been documented that acute hypoxia (24 h) activates mitochondrial degradation (mitophagy) in several tumor cell lines such as Hek-293, MDA-MB231, U87, U373, U251, and ZR-75 [35]. Therefore, to assess the hypothesis that the harmful effect of hypoxia on OxPhos of HeLa-H cells was mediated by p53-regulated mitophagy, several key proteins of this process as well as the formation of autophagic vesicles were determined in HeLa-L and HeLa-H cells as well as in MCF-7 and

p53shMCF-7 cells. Indeed, increased contents in the BNIP3 mRNA (Table S2) as well as in the protein contents of BNIP3, Atg3 (hypoxia) and LAMP1 were observed for HeLa-H cells (vs. HeLa-L cells; Fig. 8A).



**Fig. 7.** Formation of p53-HIF-1 $\alpha$  complexes in HeLa-H cells. Representative co-immunoprecipitation blots of p53 and HIF-1 $\alpha$ . Protein A-agarose beads were overnight preincubated at 4 °C with HIF-1 $\alpha$  antibody or IgG. Then, the beads were further incubated with RIPA buffer permeabilized cells for 90 min at 4 °C. Thereafter, the bead-cell mixtures were centrifuged. The supernatants containing unbound proteins (INPUT) were removed, whereas the sediments were heated to release the bead-bound proteins (COMPLEX). Both fractions, COMPLEX and INPUT, were subjected to Western blotting with antibodies against HIF-1 $\alpha$ , followed by anti-p53. n = 3 different preparations. Abbreviations: Nor, normoxia; Hyp, hypoxia.



**Fig. 8.** Autophagy activation in HeLa-L and HeLa-H cells (A) Representative Western blot of autophagy and OxPhos-related-protein contents in HeLa-L and HeLa-H cells under normoxia (Nor, 21% O<sub>2</sub>) and 24 h-acute hypoxia (Hyp, 0.1% O<sub>2</sub>). *n* = 3, <sup>a</sup>*P* < 0.01 vs. HeLa-L, <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. HeLa-L. (B) Confocal microscopy of HeLa-L and HeLa-H cells exposed to hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>) for 24 h. Both cell types were harvested, washed and loaded with mito-tracker green (MTG, 500 nM) and lysotracker red (LTR, 500 nM) for 60 min at 37 °C in complete DMEM medium. The arrows indicate the mitophagy incidence (α-loading) in each image; *n* = 25 different cells. (C) The relative MTG and LTR-fluorescence intensities of loaded-HeLa-L and HeLa-H cells are plotted. <sup>a</sup>*P* < 0.01; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. Nor, *n* = 25. Abbreviations: AFU, arbitrary fluorescence units; Foxo3a, Fork head transcription factor O class; BNIP3, BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3; Atg3, autophagy-associated protein 3; LAMP1, lysosome-associated membrane protein 1.

Similarly, a significant increment in the contents of LAMP1 (Fig. 6B) as well as BNIP3 and Atg3 (data not shown) was observed in MCF-7 cells (vs. p53shMCF-7 cells) under normoxic and particularly under hypoxic conditions. The phosphorylation (*i.e.*, inactivation) of Foxo3a was evident in HeLa-H cells under normoxic conditions as it has been demonstrated in mouse embryonic p53<sup>+/+</sup> fibroblasts [36]; however, after the hypoxic stress, inactivated Foxo3a decreased by 38% correlating with autophagy activation (Fig. 8A). Moreover, hypoxia induced a significant increase in the contents of the mitophagic proteins in HeLa-H cells (vs. normoxia), except for P-Foxo3a, but not in HeLa-L cells (vs. normoxia), except for LAMP1.

The mitophagy activation was also assessed by determining the co-localization of mitochondria inside lysosomes by confocal microscopy (Fig. 8B). Under normoxia, higher contents of mitochondria and

lysosomes were observed in HeLa-H cells compared to HeLa-L, but mitochondria/lysosomes co-localization was not detected (Fig. 8B). On the contrary, although hypoxia increased mitochondria/lysosome co-localization in both HeLa cell types, the number of co-localizations was greater in HeLa-H cells, corresponding with higher lysosomes content (> 50% vs. HeLa-L) and lower mitochondrial content (<80% vs. HeLa-L) (Fig. 8C).

#### 4. Discussion

##### 4.1. Normoxia, tumor energy metabolism and p53 levels

Most of the previous studies on p53 and cancer energy metabolism have been performed under normoxic conditions assessing the contents

of glycolytic (GLUTs, PCAM1) or mitochondrial (SCO2, PDK2) proteins or gene transcripts [6,7], all which however are not always indicative of pathway functionality. Functions should be directly evaluated. On the other hand, the glycolytic and OxPhos fluxes have been determined from total lactate production [3,6,9] and total O<sub>2</sub> consumption [7,8], respectively, without correcting for glutaminolysis-derived lactate, and extra-mitochondrial and mitochondrial O<sub>2</sub> uptake not associated to OxPhos. In the present study, glycolytic flux was properly determined by adding 2DG, a glycolytic inhibitor, whereas OxPhos flux was accurately determined from total O<sub>2</sub> consumption by adding oligomycin, a specific and potent inhibitor of ATPs. Using these straightforward biochemical strategies, the p53 contribution to energy metabolism regulation could be comprehensively analyzed.

#### 4.1.1. p53 activates mitochondrial function in normoxic conditions without affecting glycolytic metabolism

The over-expression of p53 in HeLa-H cells brought about, under normoxia, decreased GLUT1 and GLUT3 protein levels as well as a significant increase in TGAR, the latter leading to diminished levels of the PK-1 activator Fru2,6BP. Similarly, p53 overexpression in HCT116 and U2OS tumor cells correlated with a significant diminution in gene expression and protein contents of GLUT1, GLUT3, PCAM1, and Fru2,6BP [3,5,6]. Although the transcriptional glycolytic activator HIF-1 $\alpha$  and its target LDH-A significantly increased in HeLa-H cells, no changes were observed in their HKII and PK1 contents as well as glycolytic flux versus HeLa-L cells. These results suggested that the glycolytic flux was not increased because the activities of the main controlling steps (*i.e.*, GLUT, HK, HP) were not simultaneously enhanced [16]. A mechanistic explanation for this behavior is that the interaction between p53 and HIF-1 $\alpha$  prevented glycolytic gene up-regulation by *free* HIF-1 $\alpha$  [37].

On the other hand, the increased OxPhos flux induced by the higher p53 content in HeLa-H cells under normoxia correlated with the higher OxPhos flux of MCF-7 cells vs. that of p53shMCF-7 cells, indicating that the presence of functional p53 leads to the activation of mitochondrial metabolism through enhancing OxPhos protein contents, total oxygen consumption, and  $\Delta\psi_m$ . The stimulation of the total cellular oxygen consumption in HeLa-H cells (37.5%), vs. HeLa-L cells, correlated with a similar increment in the total oxygen consumption found in p53(+/-+) human colon cancer HCT116 cells compared to p53(-/-)-HCT116 cells [7]. The enhanced OxPhos capacity in HeLa-H cells under normoxia correlated with the increased levels of both p53 and HIF-1 $\alpha$ . However, HIF-1 $\alpha$  has no regulatory role on the OxPhos machinery, except for up-regulation of PDK and one COX small subunit [38,39], which have a minor impact in the control of OxPhos. Thus, HIF1 $\alpha$  – independent mechanisms are most likely involved in the p53 up-regulation of OxPhos in normoxia. The activation of OxPhos by p53 may be associated with the trans-activation (COX, glutaminase-1) and repression (PDK2) of several genes coding for mitochondrial enzymes [9,40].

#### 4.1.2. p53 sensitizes tumor cell growth to anti-mitochondrial drugs

The notion that HeLa-H cells became highly dependent on the mitochondrial function under normoxia (*i.e.*, OxPhos contribution to cell ATP supply was higher than 80%) was further supported by the marked effect of anti-mitochondrial inhibitors on tumor cell proliferation, which has also been demonstrated for other oxidative cancer cell lines [41–43]. Interestingly, Cas-1gly showed higher potency to abolish cervix cancer cell growth than  $\alpha$ -TEA,  $\alpha$ -TOS and oligomycin. Cas-1gly potency on tumor cells is very likely associated with its multi-target effect. Cas-1gly is also a more water-soluble molecule than the other three drugs. Relatively low doses of Cas-1gly promote apoptosis, ROS burst, mitochondria activation and decreased anti-oxidant system in different tumor cell lines such as HeLa, CHP-212 neuroblastoma, and C6 glioma with apparent negligible effects on non-tumor cells [44].

p53 arrests the cell cycle in fibroblasts and HCT116 colon cancer cells growing as xenografts [33]. However, this p53 role was not evident in

HeLa-H cells growing in bi-dimensional cultures under normoxia, in agreement with data described for other aggressive carcinomas (p53<sup>+/+</sup> HCT116 colon and A549 lung) cultured as monolayers [34,45, 46]. The mechanisms associated with the lack of p53 effect on the normoxic growth of 2D-cultured cells have not been elucidated. However, high glucose concentrations ( $\geq 10$  mM), like those commonly used in standard tumor cell cultures, increase the expression of several genes (cyclins A1 and E2; and cell cycle factor E2F) involved in the activation of the cell cycle in tumor cell lines including those containing p53-wild type levels such as MCF-7 cells [47]. Thus, the high glucose content (25 mM) used in the culture media of HeLa and MCF-7 cells probably counteracted the inhibitory effect of p53 on cellular proliferation.

#### 4.2. Hypoxia, tumor energy metabolism and p53 levels

##### 4.2.1. p53 sensitizes HeLa cells to hypoxia-induced cellular death

After 24 h hypoxia, p53 promoted a further significant diminution in HeLa-H cellular density, which was mediated by autophagy as it has also been reported for p53-containing glioblastoma (U87, U373); human embryo kidney (HEK293), and breast (MDA-MB-231, ZR75) carcinoma cells [35]. Apoptosis was not detected in HeLa-H cells after 24 h hypoxia as similarly documented for MDA-MB-231, ZR75 and lymph node (H1299) cells [35,48]. Although the mechanism associated with this presumed p53 protection against apoptosis has not been elucidated, it has been documented for human fibroblasts, which contain functional p53, an enhanced DNA repair capacity and increased mRNA synthesis after UV light exposure compared with p53-deficient fibroblasts [49]. After 48 h hypoxia, autophagy plus apoptosis appeared to contribute to the significant cellular death observed in both HeLa cell types.

##### 4.2.2. p53 decreases the glycolytic and OxPhos metabolism in hypoxic conditions

The role of p53 on cancer cell energy metabolism under hypoxic conditions has not been elucidated. Previous studies have demonstrated that severe hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>, 24h) decreases the mitochondrial function in MCF-7 and HeLa carcinomas [13], and other human cancer cells, correlating with the arrest of cell proliferation [50]. On the contrary, severe hypoxia promotes enhanced glycolytic protein and HIF-1 $\alpha$  contents, enzyme activities and flux in many cancer cell lines [25,51].

This apparently common energy metabolism pattern was here reproduced by MCF-7 cells, in which hypoxia decreased OxPhos and increased glycolysis. Down-regulation of p53 in p53shMCF-7 cells avoided depression of OxPhos under hypoxia, whereas glycolysis was still stimulated. Likewise, HeLa-L cells exhibited unaltered OxPhos and increased glycolysis under hypoxia. Indeed, hypoxia slightly (10–20%) diminished in HeLa-L cells the contents of only a few mitochondrial enzymes (COXIV and ATPs), whereas for others no changes (ND1, PDH) or even increments (CA-L, ANT, 20GDH) were attained.

In contrast, the over-production of total and phosphorylated p53 in HeLa-H cells led to depression of both OxPhos and glycolysis under hypoxia, correlating with a negligible up-regulation of HIF-1 $\alpha$ . The treatment with PFT- $\alpha$  allowed these cells to increase both OxPhos and glycolysis under hypoxia because PFT- $\alpha$  prompted decreased phosphorylated p53 (90%) and increased HIF-1 $\alpha$  (3-times) levels, thus reverting to a phenotype similar to that of HeLa-L cells. In consonance, hypoxia induced in HeLa-H cells a decrease of 30–75% in the contents of mitochondrial proteins (ND1, COXIV, PDH, 20GDH, ATPs and ANT) except for CA-L.

Therefore, HeLa-H cells were unable to increase the contents of free HIF-1 $\alpha$  and its glycolytic protein targets because p53 strongly interacted with it. In addition, it appeared that p53 strongly down-regulated OxPhos under hypoxia through HIF1 $\alpha$ -independent mechanisms. Glycolysis can also be moderately down-regulated by p53 under hypoxia only when high levels of this transcriptional factor are present; however, at low or negligible levels such as those found in



MCF-7 cells and HeLa-L cells, respectively. p53 cannot counteract the up-regulation of glycolysis induced by hypoxia (and HIF-1 $\alpha$ ).

Like HIF-1 $\alpha$ , p53 is stabilized and over-expressed under hypoxia [21, 52]. The mechanism involved in the p53 stabilization by hypoxia is not well-understood, although it has been proposed that p53 directly interacts with HIF-1 $\alpha$  inducing p53 stabilization [53] and its endogenous accumulation [33]. In addition, it has been suggested that the p53/HIF-1 $\alpha$  interaction diminishes the HIF-1 $\alpha$  up-regulation of glycolysis. As the p53 content was higher (4-times vs. normoxia) in HeLa-H cells than in MCF-7 cells (1.8-fold vs. normoxia; [13]), it seemed that p53 was unable to fully block HIF-1 $\alpha$  in MCF-7 cells. To test this hypothesis, co-immunoprecipitation assays were performed in hypoxic HeLa-L and HeLa-H cells (Fig. 7). Specific interaction between HIF-1 $\alpha$  and p53 was observed in HeLa-H cells but not in HeLa-L, indicating that the formation of p53-HIF-1 $\alpha$  complexes promoted HIF-1 $\alpha$  loss-of-function, mainly under hypoxic conditions. As a control, no interaction of p53 and/or HIF-1 $\alpha$  with IgG1 was observed, supporting a specific HIF-1 $\alpha$ /p53 complex formation.

The severe decrease in OxPhos, glycolysis and cellular growth in HeLa-H cells under hypoxia suggested a possible cytotoxic effect induced by a high functional level of p53. However, the PFT- $\alpha$  treatment of HeLa-H cells restored, under hypoxia, the glycolysis and OxPhos fluxes and elicited an increase in the HIF-1 $\alpha$  level and activity, without modifying the high p53 total content. Then, it seemed that the p53 regulatory effects on the energy metabolism pathways were not related to synergistic cytotoxicity with hypoxia.

#### 4.2.3. Elucidating the mechanism associated with the p53-induced differential OxPhos response towards hypoxia in HeLa-H cells

Several mechanisms could be involved in the OxPhos impairment induced by hypoxia in the presence of high p53 levels. For instance, increased mitochondrial ROS levels induced by hypoxia exert deleterious effects on mtDNA, as mtDNA encodes subunits of OxPhos enzymes, the oxidative stress-induced mtDNA damage may impair OxPhos functioning [54]. In addition, it has been described that p53 down-regulates MINSOD2

gene expression diminishing protein content and activity in MCF-7 cells [55], or up-regulates MINSOD2 increasing activity in lymphoblasts and fibroblasts [56]. Moderate or severe hypoxia (0.1–1% O<sub>2</sub> for 8–24 h) per se activates the degradation of several organelles including mitochondria [57], in cancer cells with high p53 levels such as MCF-7 and intrahepatic cholangiocarcinoma cells [58]. In order to maintain nutrients supply. Likewise, the present study demonstrates that the hypoxia-induced autophagy in HeLa cells was further enhanced by the presence of high p53 levels, contributing to the OxPhos suppression in these conditions.

It has also been demonstrated that high p53 levels (a) down-regulates [59,60] several transcription factors associated with the de novo synthesis of respiratory chain components (p32 and H-RAS),  $\beta$ -oxidation (PGC-1 $\alpha$ ) and mitochondrial biogenesis (c-MYC) [61]; and (b) binds to and inactivates mTERP2, which is involved in the up-regulation of OxPhos [62]. As p53 is further activated under hypoxia, these two OxPhos-repressing mechanisms might become active under hypoxic conditions. A decreased OxPhos under hypoxia in cells with high p53 could be related to apoptosis induction [19], as it has been reported for p53 overexpressed-MCF-7 cells [63], colon cancer cells (RKO), lung cancer (NCI-H1299) and transformed fibroblasts (MENS) [64]. However, apoptotic onset was not observed in HeLa-H cells. Moreover, it has been demonstrated in lymphoid and myeloid cells with regular p53 contents that radiation promotes activation of several genes associated to apoptotic onset. In contrast, in fibroblasts also with regular p53 content, radiation promotes cell cycle arrest with no associated cell death [49, reviewed in 65]. Then, it seems that p53 overexpression is not always linked to apoptosis activation because not all genes associated with p53-dependent apoptosis are turned on at the same time to induce DNA damage [65]. An alternative explanation of the severe OxPhos depression under hypoxia of HeLa-H and MCF-7 cells, which might not involve downregulation by high p53, is that cells with high OxPhos rates are more susceptible to O<sub>2</sub> depletion because they express OxPhos enzymes with higher affinities, particularly respiratory complex IV. However, data on differential expression of OxPhos isoenzymes have not been described.

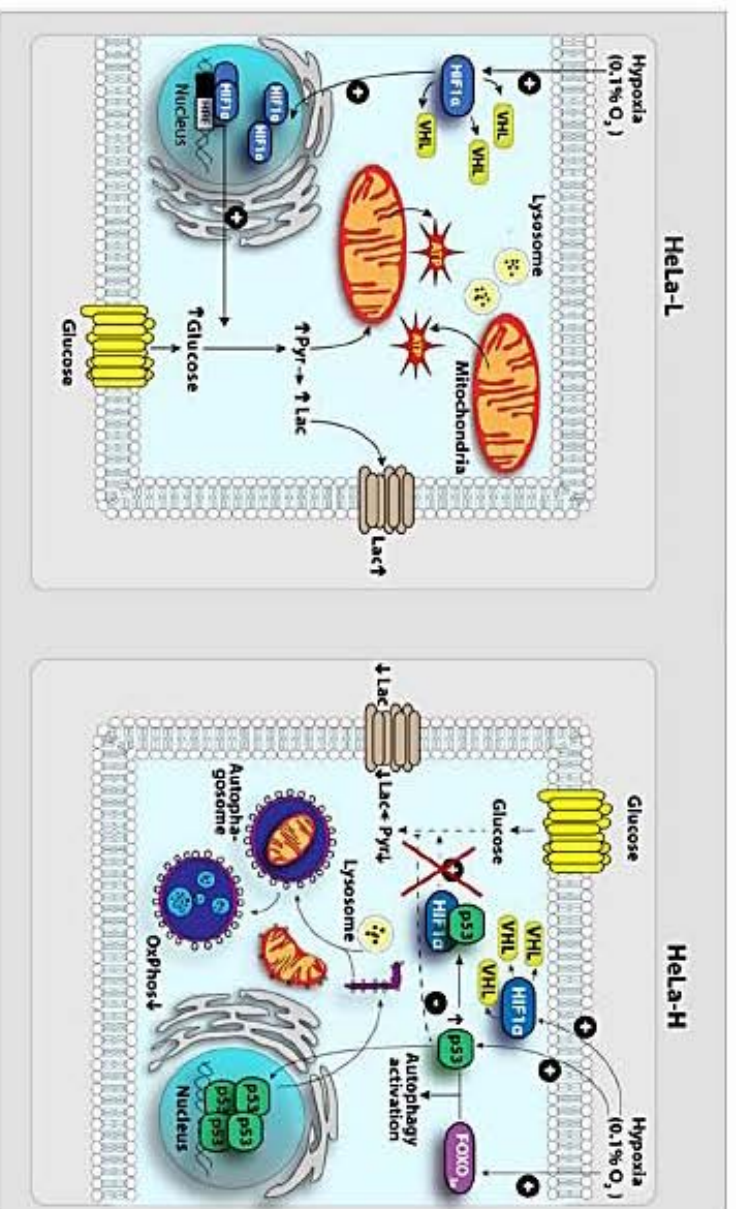


Fig. 9. The interaction p53-HIF-1 $\alpha$  under hypoxia induces loss of HIF-1 $\alpha$  function in HeLa-H cells. High p53 counteracts HIF-1 $\alpha$  activation. In turn, excess of p53 stimulates autophagy progression for mitochondrial digestion. Abbreviations: HRE, hypoxia responsive elements; Lac, lactate; Pyr, pyruvate; VHL, von-Hippel Lindau protein.

## 5. Concluding remarks

The bioenergetics analysis of two tumor lines with essentially identical genetic background, but different p53 levels, revealed a dual p53 regulatory behavior on mitochondrial and glycolytic metabolism, depending on the O<sub>2</sub> level (Fig. 9). Under normoxia (i.e., condition observed for solid tumor cells near to blood vessels), p53 up-regulates mitochondrial function being OxPhos the predominant ATP supplier. In this condition, p53-high cells were highly sensitive to anti-mitochondrial drugs. Under hypoxia (i.e., condition observed for solid tumor cells distant from blood vessels), p53 down-regulates OxPhos and activates mitophagy. In consequence, glycolysis becomes the predominant ATP supplier (Fig. 9).

The analysis of energy metabolism in mutation-free p53 cells facilitates the elucidation of the p53 regulatory mechanisms on OxPhos and glycolysis, and provides a platform for understanding the effects on energy metabolism of the numerous p53 mutations.

## Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Author contributions

SRE and RMS: experimental conception and design, analysis and interpretation of data; IHR, ES, EP, ARR, EGV, ALM, EP, EAR and JCGP: acquisition and statistical analysis of data and development of methodology; SRE, RMS and ES: writing of the manuscript; SRE, RMS, PG and ES: discussion on analysis and interpretation of data and manuscript revision. SRE and RMS: obtained funding. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

The present work was partially supported by grants from CONACyT-México (Nos. 107183, 239930, 178638) and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. PICS08-5) to SRE, RMS and ES. IHR was supported by a CONACyT-México fellowship (No. 233316). This work was part of the Ph. D. thesis of IHR in the Doctorado en Ciencias Biomédicas program at the Universidad Nacional Autónoma de México.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2015.09.033>.

## References

- W.D. Meek, Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53, *Cell. Signal.* 45 (10) (1998) 159–166.
- K.H. Vousden, K.M. Ryan, p53 and metabolism, *Nat. Rev. Cancer* 9 (10) (2009) 691–700.
- K. Bensaad, A. Tsuruta, M. Selak, M. Calvo, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb, K.H. Vousden, TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis, *Cell* 126 (1) (2006) 107–120.
- J.E. Chipuk, D.J. Green, p53 and metabolism: inside the TIGAR, *Cell* 126 (1) (2006) 30–32.
- K. Kawasumi, K. Araki, K. Tobiume, N. Tanaka, p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF- $\kappa$ B pathway and inhibits cell transformation, *Nat. Cell Biol.* 10 (5) (2008) 611–618.
- H. Kondoh, M.E. Leonart, J. Gil, J. Wang, P. Degan, G. Peters, D. Martinez, A. Camero, D. Beach, Glycolytic enzymes can modulate cellular lifespan, *Cancer Res.* 65 (1) (2005) 177–185.
- S. Matoba, J. Kang, W. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P.J. Hurley, F. Bunz, P.M. Huang, p53 regulates mitochondrial respiration, *Science* 312 (5780) (2006) 1650–1653.
- W. Hu, C. Zhang, R. Wu, Y. Sun, A. Levine, Z. Feng, Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (16) (2010) 7455–7460.
- T. Contractor, C.R. Harris, p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2, *Cancer Res.* 72 (2) (2011) 560–567.
- P. Stambolsky, L. Weisz, I. Shats, Y. Klein, N. Goldfinger, M. Oren, V. Rotter, Regulation of AIF expression by p53, *Cell Death Differ.* 13 (12) (2006) 2140–2149.
- C. Zhang, M. Lin, R. Wu, X. Wang, B. Yang, A.J. Levine, W. Hu, Z. Feng, Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (39) (2011) 16299–16284.
- G. Achanta, R. Sasaki, L. Feng, J.S. Carew, W. Lu, H. Pelicano, M.J. Keating, P. Huang, Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma, *EMBO J.* 24 (19) (2005) 3482–3492.
- S. Rodríguez-Enríquez, L. Garreño-Fuentes, J.C. Gallardo-Pérez, E. Saavedra, H. Quezada, A. Vega, A. Marín-Hernández, V. Olin-Sandoval, M.E. Torres-Márquez, R. Moreno-Sánchez, Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (10) (2010) 1744–1751.
- M. Thomas, D. Pim, I. Banks, Role of the E6–p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV, *Oncogene* 18 (53) (1999) 7690–7700.
- K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-delta delta CT)</sup>, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- A. Marín-Hernández, S. Rodríguez-Enríquez, P.A. Vital-González, F.L. Flores-Rodríguez, M. Macías-Silva, M. Sosa-Garrocho, R. Moreno-Sánchez, Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase, *FEBS J.* 273 (9) (2006) 1975–1988.
- M. Mandala, G. Serck-Hassen, G. Martino, K.B. Helke, The fluorescence cationic dye rhodamine 6G as a probe of membrane potential in bovine aortic endothelial cells, *Anal. Biochem.* 274 (1) (1999) 1–6.
- S. Rodríguez-Enríquez, Y. Kai, E. Makdonado, R.T. Currin, J.J. Lemasters, Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes, *Autophagy* 5 (8) (2009) 1089–1106.
- T.G. Graeber, J.F. Peterson, M. Tsai, K. Monica, A.J. Giaccia, Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status, *Mol. Cell. Biol.* 14 (9) (1994) 6264–6277.
- C. Koumenis, R. Alarcon, E. Hammond, P. Sutphin, W. Hoffman, M. Murphy, J. Derr, Y. Taya, S.W. Lowe, M. Kastan, A. Giaccia, Regulation of p53 by hypoxia: dislodgement of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation, *Mol. Cell. Biol.* 21 (4) (2001) 1297–1310.
- L.N. Putral, M.J. Bywater, W. Gu, N.A. Saunders, B.G. Gabrielli, G.R. Leggatt, N.A. McMillan, RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin, *Mol. Pharmacol.* 68 (5) (2005) 1311–1319.
- R.W. Moreadith, A.L. Lehninger, The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-dependent malic enzyme, *J. Biol. Chem.* 259 (10) (1984) 6215–6222.
- S. Rodríguez-Enríquez, L. Hernández-Esquivel, A. Marín-Hernández, M. El-Hafidi, J.C. Gallardo-Pérez, L. Hernández-Reséndiz, J.S. Rodríguez-Zavala, S.C. Pacheco-Velázquez, R. Moreno-Sánchez, Mitochondrial free fatty acid  $\beta$ -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65 (2015) 209–221.
- X.L. Zou, M. Guppy, Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (3) (2004) 459–465.
- A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, S.J. Ralph, S. Rodríguez-Enríquez, R. Moreno-Sánchez, HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms, *Mini-Rev. Med. Chem.* 9 (9) (2009) 1084–1101.
- R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, J.C. Gallardo-Pérez, F. Rumjanek, S. Rodríguez-Enríquez, Beyond the limits of current omics analyses: metabolic and cellular function and regulation are also required to understand the cancer cell phenotype, *FEBS J.* (2015) (in press).
- A. Marín-Hernández, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, R. Moreno-Sánchez, Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopinas) on mitochondrial functions, *Biochem. Pharmacol.* 65 (12) (2003) 1979–1989.
- L. Hernández-Esquivel, A. Marín-Hernández, N. Pavón, K. Carvajal, R. Moreno-Sánchez, Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs Casiopinas is related to inhibition of energy metabolism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212 (1) (2006) 79–88.
- L.F. Dong, P. Low, J.C. Dyason, X.F. Wan, L. Prochazka, P.K. Witting, R. Freeman, E. Swettenham, K. Valis, J. Liu, R. Zabalova, J. Turanek, D.J. Spitz, F.E. Domann, I.E. Scheffler, S.J. Ralph, J. Neuzl,  $\alpha$ -Tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II, *Oncogene* 27 (31) (2008) 4324–4335.
- S. Zhang, K.A. Lawson, M. Simmons-Menchaca, L. Sun, B.G. Sanders, K. Kline, Vitamin E analog  $\alpha$ -TEA and celecoxib alone and together reduce human MDA-MB-435-FL-GFP breast cancer burden and metastasis in nude mice, *Breast Cancer Res. Treat.* 87 (2) (2004) 111–121.
- A.M. Lamber, A.M. Loiseau, D.A. Kuntz, F.M. Vellieux, P.A. Michels, F.R. Oppendoer, The cytosolic and glycosomal glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic properties and comparison with homologous enzymes, *Eur. J. Biochem.* 198 (2) (1991) 429–435.
- P.G. Komarov, E.A. Komarova, R.V. Kondratov, K. Kristov-Tselkov, J.S. Coon, M.V. Chernon, A.V. Gudkov, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy, *Science* 285 (5434) (1999) 1733–1737.
- W.G. An, M. Kanekal, M.C. Simon, E. Maltepe, M.V. Blagosklonny, L.M. Neckers, Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *Nature* 392 (6674) (1998) 405–408.
- R. Ravi, B. Mookerjee, Z.M. Bhujwala, C.H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L.E. Dillehay, A. Mafán, G.L. Semenza, A. Bedi, Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *Genes Dev.* 14 (1) (2000) 34–44.

- [35] M.B. Azad, S.B. Gibson, Role of BDNF in proliferation and hypoxia-induced autophagy: implications for personalized cancer therapies, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1210 (2010) 8–16.
- [36] H. You, Y. Jang, A.I. You-Ten, H. Okada, J. Liepa, A. Wakeham, K. Zaugg, T.W. Mak, p53-dependent inhibition of FKHRL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (39) (2004) 14057–14062.
- [37] M.V. Blagosklonny, W.G. An, L.Y. Romanova, J. Trepel, T. Fojo, L. Neckers, p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription, *J. Biol. Chem.* 273 (20) (1998) 11995–11998.
- [38] J.W. Kim, I. Tchernystyov, G.L. Semenza, C.V. Dang, HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia, *Cell Metab.* 3 (3) (2006) 177–185.
- [39] R. Fukuda, H. Zhang, J.W. Kim, L. Shimoda, C.V. Dang, G.L. Semenza, HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells, *Cell* 129 (1) (2007) 111–122.
- [40] E. Kolobova, A. Tuganova, I. Boulatnikov, K.M. Popov, Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites, *Biochem. J.* 358 (Pt 1) (2001) 69–77.
- [41] S.J. Ralph, R. Moreno-Sánchez, J. Neuzil, S. Rodríguez-Enríquez, Inhibitors of succinate: quinone reductase complex II regulate production of mitochondrial reactive oxygen species and protect normal cells from ischemic damage but induce specific cancer cell death, *Pharm. Res.* 28 (11) (2011) 2695–2730.
- [42] E.A. Mandujano-Tinoco, J.C. Gallardo-Pérez, A. Marín-Hernández, R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (3) (2013) 541–551.
- [43] R. Moreno-Sánchez, A. Marín-Hernández, E. Saavedra, J.P. Pardo, S.J. Ralph, S. Rodríguez-Enríquez, Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50 (2014) 10–23.
- [44] C. Trejo-Solis, D. Jimenez-Farfan, S. Rodríguez-Enríquez, F. Fernández-Valverde, A. Cruz-Salgado, L. Ruiz-Azuara, J. Sotelo, Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation, *BMC Cancer* 12 (2012) 156.
- [45] J.L. Schwartz, Y. Tamura, R. Jordan, J.R. Grierson, K.A. Krohn, Effect of p53 activation on cell growth, thymidine kinase-1 activity, and 3'-deoxy-3'-fluorothymidine uptake, *Nucl. Med. Biol.* 31 (4) (2004) 419–423.
- [46] O.D. Maddocks, C.R. Berkens, S.M. Mason, L. Zheng, K. Blyth, E. Gottlieb, K.H. Vousden, Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodeling in cancer cells, *Nature* 493 (7433) (2013) 542–546.
- [47] K. Masur, C. Vetter, A. Hinz, N. Tomas, H. Henrich, B. Niggemann, K.S. Zanker, Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation, *Br. J. Cancer* 104 (2) (2011) 345–352.
- [48] E. Madan, R. Gogna, U. Pati, p53 Ser15 phosphorylation disrupts the p53-RPA70 complex and induces RPA70-mediated DNA repair in hypoxia, *Biochem. J.* 443 (3) (2012) 811–820.
- [49] B.C. McKay, M. Ljungman, Role of p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light, *Neoplasia* 1 (3) (1999) 276–284.
- [50] C. Schmalz, P. Harrigan-Hardenbergh, A. Wells, D.E. Fisher, Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia, *Mol. Cell Biol.* 18 (5) (1998) 2845–2854.
- [51] G.L. Semenza, HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20 (1) (2010) 51–56.
- [52] Y. Pan, P.R. Oprysko, A.M. Asham, C.J. Koch, M.C. Simon, p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment, *Oncogene* 23 (29) (2004) 4975–4983.
- [53] A. Sermeaux, C. Michiels, Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways, *Cell. Death. Dis.* 2 (5) (2011), e164.
- [54] H. Cui, Y. Kong, H. Zhang, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging, *J. Signal Transduct.* 2012 (2012) 646354.
- [55] P. Drane, A. Bravard, V. Bouvard, E. May, Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis, *Oncogene* 20 (4) (2001) 430–439.
- [56] S.P. Hussain, P. Amstad, P. He, A. Robles, S. Lupold, I. Kanenko, M. Ichimiya, S. Sengupta, L. Mechanic, S. Okamura, L.J. Hofseth, M. Moake, M. Nagashima, K.S. Forrester, C.C. Harris, p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis, *Cancer Res.* 64 (7) (2004) 2350–2356.
- [57] M.M. Hippert, P.S. O'Toole, A. Thorburn, Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res.* 66 (19) (2006) 9349–9351.
- [58] W.S. He, X.F. Dai, M. Jin, C.W. Liu, J.H. Ren, Hypoxia-induced autophagy confers resistance of breast cancer cells to ionizing radiation, *Oncol. Res.* 20 (5–6) (2012) 251–258.
- [59] M. Li, F.L. Gu, W.B. Li, Y.S. Song, A.R. Zhou, Y.L. Guo, Introduction of wild-type p53 gene downregulates the expression of H-Ras gene and suppresses the growth of bladder cancer cells, *Urol. Res.* 23 (5) (1995) 311–314.
- [60] S. Telang, A.N. Lane, K.K. Nelson, S. Arumugam, J. Chesney, The oncoprotein H-Ras V12 increases mitochondrial metabolism, *Mol. Cancer* 6 (2007) 77.
- [61] E.H. Jeninga, K. Schoonjans, J. Auwerx, Reversible acetylation of PGC-1 $\alpha$ : connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility, *Oncogene* 29 (33) (2010) 4617–4624.
- [62] T. Wenz, C. Luca, A. Torrao, C.T. Moraes, mTERF2 regulates oxidative phosphorylation by modulating mtDNA transcription, *Cell Metab.* 9 (6) (2009) 499–511.
- [63] M. Alkhalaf, A.M. El-Mowafy, Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone, *J. Endocrinol.* 179 (1) (2003) 55–62.
- [64] H.L. Maecker, C. Koumenis, A.J. Giaccia, p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance, *Cancer Res.* 60 (16) (2000) 4638–4644.
- [65] S.A. Amundson, T.G. Myers, A.J. Fornace, Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress, *Oncogene* 17 (25) (1998) 3287–3299.
- [66] J.A. McAtter, J. Davis, Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines, in: J.M. Davis (Ed.), *Basic Cell Culture. A practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York 1994, pp. 93–147.

## Canonical and new generation anticancer drugs also target energy metabolism

Sara Rodríguez-Enríquez · Juan Carlos Gallardo-Pérez ·  
Ileana Hernández-Reséndiz · Alvaro Marín-Hernández · Silvia C. Pacheco-Velázquez ·  
Sayra Y. López-Ramírez · Franklin D. Rumjanek · Rafael Moreno-Sánchez

Received: 3 April 2014 / Accepted: 15 April 2014 / Published online: 4 May 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Significant efforts have been made for the development of new anticancer drugs (protein kinase or proteasome inhibitors, monoclonal humanized antibodies) with presumably low or negligible side effects and high specificity. However, an in-depth analysis of the side effects of several currently used canonical (platin-based drugs, taxanes, anthracyclines, etoposides, antimetabolites) and new generation anticancer drugs as the first line of clinical treatment reveals significant perturbation of glycolysis and oxidative phosphorylation. Canonical and new generation drug side effects include decreased (1) intracellular ATP levels, (2) glycolytic/mitochondrial enzyme/transporter activities and/or (3) mitochondrial electrical membrane potentials. Furthermore, the anti-proliferative effects of these drugs are markedly attenuated in tumor rho (0) cells, in which functional mitochondria are absent; in addition, several anticancer drugs directly interact with isolated mitochondria affecting their functions. Therefore, several anticancer

drugs also target the energy metabolism, and hence, the documented inhibitory effect of anticancer drugs on cancer growth should also be linked to the blocking of ATP supply pathways. These often overlooked effects of canonical and new generation anticancer drugs emphasize the role of energy metabolism in maintaining cancer cells viable and its targeting as a complementary and successful strategy for cancer treatment.

**Keywords** Energy metabolism · Humanized monoclonal antibodies · Metabolic therapy · Protein kinase inhibitors · Tumor cells

### Abbreviations

ETC Electron transport chain  
OxPhos Oxidative phosphorylation  
2-OGDH 2-Oxoglutarate dehydrogenase complex

### Introduction

Despite considerable advances in biomedical research and clinical applications in the field, cancer remains a leading cause of mortality worldwide. The severe side effects caused by the frequent use of conventional chemotherapeutics diminish, unfortunately, the patients' quality of life. Therefore, the development of safe and efficacious alternatives with well-known mechanism of action is mandatory. First-line anticancer drugs such as antibody–drug conjugates and protein kinase (PK) small-molecule inhibitors have become widely used in the clinical treatment of cancer presumably because they are designed to be selective for one protein or cellular process (Ott and Adams 2011; Li et al. 2013; Miller et al. 2013). However, as occurs with other canonical and traditional chemotherapy drugs

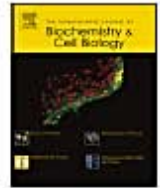
S. Rodríguez-Enríquez (✉) · J. C. Gallardo-Pérez ·  
I. Hernández-Reséndiz · A. Marín-Hernández ·  
S. C. Pacheco-Velázquez · S. Y. López-Ramírez ·  
R. Moreno-Sánchez (✉)

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología,  
Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 Mexico,  
Mexico  
e-mail: saren960104@hotmail.com

R. Moreno-Sánchez  
e-mail: rafael.moreno@cardiologia.org.mx

S. Rodríguez-Enríquez  
Laboratorio de Medicina Traslacional, Instituto Nacional de  
Cancerología, San Fernando, Mexico

F. D. Rumjanek  
Centro de Ciências de Saúde, Instituto de Bioquímica Médica,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



## Mitochondrial free fatty acid $\beta$ -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells

Sara Rodríguez-Enríquez<sup>a,b,\*</sup>, Luz Hernández-Esquivel<sup>a</sup>, Alvaro Marín-Hernández<sup>a</sup>, Mohammed El Hafidi<sup>c</sup>, Juan Carlos Gallardo-Pérez<sup>a</sup>, Ileana Hernández-Reséndiz<sup>a</sup>, José S. Rodríguez-Zavala<sup>a</sup>, Silvia C. Pacheco-Velázquez<sup>a</sup>, Rafael Moreno-Sánchez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Col. Sección 16, Tlalpan, México D.F., 14080, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Medicina Traslacional, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, D.F., México

<sup>c</sup> Departamento de Medicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México, D.F., México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 February 2015

Received in revised form 29 May 2015

Accepted 8 June 2015

Available online 11 June 2015

#### Keywords:

Cancer cells

Tumor mitochondria

Perhexiline

$\beta$ -Oxidation

Anti-mitochondrial therapy

### ABSTRACT

Oxidative phosphorylation (OxPhos) is functional and sustains tumor proliferation in several cancer cell types. To establish whether mitochondrial  $\beta$ -oxidation of free fatty acids (FFAs) contributes to cancer OxPhos functioning, its protein contents and enzyme activities, as well as respiratory rates and electrical membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) driven by FFA oxidation were assessed in rat AS-30D hepatoma and liver (RLM) mitochondria. Higher protein contents (1.4–3 times) of  $\beta$ -oxidation (CPT1, SCAD) as well as proteins and enzyme activities (1.7–13-times) of Krebs cycle (KC: ICD, 2OGDH, PDI, ME, GA), and respiratory chain (RC: COX) were determined in hepatoma mitochondria vs. RLM. Although increased cholesterol content (9-times vs. RLM) was determined in the hepatoma mitochondrial membranes, FFAs and other NAD-linked substrates were oxidized faster (1.6–6.6 times) by hepatoma mitochondria than RLM, maintaining similar  $\Delta\psi_m$  values. The contents of  $\beta$ -oxidation, KC and RC enzymes were also assessed in cells. The mitochondrial enzyme levels in human cervix cancer HeLa and AS-30D cells were higher than those observed in rat hepatocytes whereas in human breast cancer biopsies, CPT1 and SCAD contents were lower than in human breast normal tissue. The presence of CPT1 and SCAD in AS-30D mitochondria and HeLa cells correlated with an active FFA utilization in HeLa cells. Furthermore, the  $\beta$ -oxidation inhibitor perhexiline blocked FFA utilization, OxPhos and proliferation in HeLa and other cancer cells. In conclusion, functional mitochondria supported by FFA  $\beta$ -oxidation are essential for the accelerated cancer cell proliferation and hence anti- $\beta$ -oxidation therapeutics appears as an alternative promising approach to deter malignant tumor growth.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** AAT, aspartate aminotransferase; AcAc, acetoacetate; ANT, adenine nucleotide translocase; COX, cytochrome c oxidase; CPT1, carnitine palmitoyl transferase I; LCHAD, long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; GA, glutaminase; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, glutamine; Glut, glutamate; ICD, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; Mal, malate; ME, malic enzyme; ND, NADH-ubiquinone oxidoreductase; OxPhos, oxidative phosphorylation; PDH, pyruvate dehydrogenase; Pyr, pyruvate; RLM, rat liver mitochondria; ROS, radical oxygen species; SCAD, short-chain acyl CoA dehydrogenase; SDH, succinate dehydrogenase; 2OG, 2-oxoglutarate; 2OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase;  $\beta$ -OHBuT,  $\beta$ -hydroxybutyrate.

\* Corresponding author at: Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica, Juan Badiano No. 1, Col. Sección 16, Tlalpan, 14080 Mexico, Mexico. Tel.: +52 55 55 73 29 11.

E-mail address: [saren960104@hotmail.com](mailto:saren960104@hotmail.com) (S. Rodríguez-Enríquez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.06.010>

1357-2725/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Enhanced glycolysis is one of the most important cancer metabolic hallmarks (Cantor and Sabatini, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). It has been suggested that tumor cells permanently maintain an impaired oxidative phosphorylation (OxPhos) which promotes an increased glycolysis (Warburg, 1956). In consequence, OxPhos flux, and mitochondrial enzyme activities and contents are not usually determined in studies of cancer energy metabolism (Owens et al., 2011; Putignani et al., 2012). Several proposals on the possible mechanisms associated with the OxPhos impairment in cancer cells have emerged. Some of these proposed mechanisms are: mutations in the Krebs cycle enzymes (fumarate hydratase, succinate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenases) (Xekouki and Stratakis, 2012; Yang et al., 2012); absence (Mayr et al., 2008) of one of the principal enzyme controlling