



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DEL SEÑALAMIENTO CANÓNICO DE LA VÍA

WNT POR p53

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

EDUARDO ALVARADO ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. JESÚS CHIMAL MONROY

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (TUTOR INVITADO)

CD. MX. , AGOSTO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DEL SEÑALAMIENTO CANÓNICO DE LA VÍA

WNT POR p53

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

EDUARDO ALVARADO ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. JESÚS CHIMAL MONROY

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (TUTOR INVITADO)

MÉXICO, CD. MX. AGOSTO, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/431/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de (Indicar campo de Conocimiento) del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de Enero 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **ALVARADO ORTIZ EDUARDO** con número de cuenta **518002691** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DEL SEÑALAMIENTO CANÓNICO DE LA VÍA WNT POR p53"**, realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCÁ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
Vocal: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
Secretario: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESHA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 06 de agosto de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México agradezco la oportunidad de formarme en este programa de alta calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el estímulo económico brindado con número de becario 854365.

A las fuentes de financiación que me permitieron realizar este proyecto, SEP-CONACyT No. 179894, No. 0253804, A1-S-40601 a la Fundación Miguel Alemán, A.C. así como al apoyo del Instituto Nacional de Cancerología, SS.

A mi tutor principal, Dr. Alejandro M. García Carrancá y al comité tutor formado por la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez (tutor invitado), Dra. Martha Robles Flores y el Dr. Jesús Chimal Monroy, los cuales contribuyeron a favorecer mi formación académica y del presente trabajo experimental.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Resulta difícil expresar a todos los que en diferentes niveles permitieron y contribuyeron a que este tiempo fuera una etapa de crecimiento personal y académico.

Al Dr. Alejandro García Carrancá, por permitirme aprender en su laboratorio, su paciencia para conmigo, la libertad en la ejecución de este trabajo y su inspiración para dar el siguiente paso. Parte de mi formación la debo a usted y estoy inmensamente agradecido por ello.

A la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, por su confianza en mis capacidades, en no permitirme bajar la guardia y en la libertad otorgada para aprender.

Al comité y miembros del jurado por sus observaciones al presente trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Virus y Cáncer, amigos y compañeros que han hecho cada día único.

A Mariel, Karen, Marco, Luis y Helga, por hacer ameno el trabajo de cada día, ser comprensibles con mis defectos y hacer los días especiales con cada tarde de café. De cada uno me llevo un aprendizaje único.

A Mike, por la camaradería, confianza y amistad que han hecho memorable esta etapa. A Heriberto, por la confianza y aprecio personal. A Leny y Luz, por su convivencia. Gracias chicos por su amistad más allá de las puertas del laboratorio.

A todos los que en mayor o menor medida agradezco haber compartido un espacio con ustedes: a Carlos, Grace, Gabrielle, Ángel, Melanie, Jared, Marisol, Juan, Fer, Brenda, Yake, Pablo, Raque, Miriam, Rocío, Humberto, Silvia.

A aquellos que, aunque no frecuento sigo teniendo un aprecio especial. A Chayito, Vale e Isa. Y no dejo de lado a Lalo C., Carmen, Bam, Fredy y Javier.

A la Dra. Sofia González, por su aprecio personal y motivación.

A todos aquellos que omito pero que han contribuido en mi formación y aprendizaje diario.

DEDICATORIA

A mi familia.

A mis papás. Por su sacrificio y trabajo para seguir adelante. Por su comprensión y apoyo en mis decisiones.

A mi hermana Alondra.

Los quiero.

INDICE

Contenido

INDICE	i
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
ANTECEDENTES	3
Biología del cáncer: epidemiología y definición.....	3
Funciones de p53 como supresor tumoral	6
Mecanismos de inducción de p53.....	7
Funciones oncogénicas atribuidas a p53 mutado (p53-Mut)	11
Participación de la vía Wnt como regulador de la homeostasis celular	15
Señalamiento canónico dependiente de β -Catenina.....	16
Regulación de GSK3 β	21
La vía Wnt como regulador de la estabilidad de proteínas.....	23
Relación entre la vía Wnt y p53	26
Planteamiento del problema	27
HIPOTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
MATERIALES Y METODOS.....	29
Cultivo de células en monocapa	29
Formación de esferas.....	30
Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT	30
Tratamiento farmacológico	31
Ensayo de Western Blot	31
Evaluación de la actividad ALDH	32
Inmunofluorescencia.....	32
Ensayos de transfección y evaluación de actividad luciferasa	33
Extracción de RNA.....	34
Reacción de transcripción reversa.....	34

PCR en tiempo real (qPCR)	35
Análisis estadístico	35
RESULTADOS	36
Ensayos de sobreexpresión de p53-Wild type y p53-Mutado	36
Participación de vía Wnt canónica en el modelo de monocapa vs esferas	42
Efecto de p53-Wt y p53-Mut en el modelo de generación de esferas	45
p53-Mut ejerce un efecto de ganancia de función a través de la vía PI3K/AKT	48
DISCUSIÓN	54
Regulación de la vía Wnt canónica por p53	54
Modelo de monocapa vs esferas	56
Efecto de p53-Mut en el modelo de generación de esferas	58
CONCLUSIÓN	61
PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ABREVIATURAS

ABC	ATP-Binding Cassette, por sus siglas en inglés.
ALDH	Aldehído deshidrogenasa.
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP.
ANOVA	Análisis de la varianza.
APC	Adenomatosis Polipomatosis Coli.
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutado.
ATP:AMP	Trifosfato de adenosina:Adenosín monofosfato.
ATR	Proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3.
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2.
BCL-XL	Protooncogén B-cell lymphoma 2, por sus siglas en inglés.
BIM	Proteína similar a BCL-2.
BMF	Factor modificador de BCL-2.
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina Proteína cinasa I.
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas.
cDNA	ADN complementario.
CK1	Caseína cinasa 1.
COX	Citocromo oxidasa.
CTC	Células Troncales Cancerosas.
DBS	Ruptura de doble cadena.
DEAB	N,N-dietilaminobenzaldehído.
DKK	Dickkopf.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
Dvl	Dishevelled.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares.
ESCRT	Complejo de transporte endosomal.
FAK	Cinasa de adhesión focal.
FBPasa	Fosfatasa de fructosa 6 fosfato.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
FZD	Frizzled.
GLS	Glutaminasa.
GLUT	Transportadores de glucosa.
GSH	Glutation S-transferasa.
GSK3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta.
Hif-1 α	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia.
Krm	Kremen.
LC3	Proteína asociada a microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3.
LRP6	Proteína relacionada a LDL tipo 6.
MDM2	Murine doble Minute 2, por sus siglas en inglés.
MiT/TFE	Factor de transcripción asociado a microftalmia.
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero.
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
p62/SQSTM1	Secuestome 1.
PAI1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1.
PCP	Polaridad Celular Planar.
PFK-2	Fosfofructocinasa.
PHD	Prolilhidroxilasas.
PI3K/AKT	Vía fosfatidilinositol 3 cinasa.

PKA	Proteína cinasa A.
PKC α	Proteína cinasa C α .
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.
qPCR	PCR en tiempo real.
RCP	Proteína acoplador de Rab.
Rheb	Proteína homóloga de Ras enriquecida en cerebro.
Rho/ROCK	Proteína cinasa asociada a Rho.
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RTK	Receptores de tipo tirosina cinasa.
Ryk	Receptor similar a tirosina cinasa.
SFB	Suero Fetal Bovino.
Shh	Sonic hedgehog.
SSC	Dispersión lateral.
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta.
TIGAR	TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator.
TSC1/2	Tuberous sclerosis protein.
WIP	Proteína que interactúa con WASP.
β -TrCP	Proteínas que contienen repeticiones Beta-transducina.

RESUMEN

La regulación de la homeostasis celular está basada en la integración de diferentes vías de señalización, la vía Wnt es una de ellas y su desregulación contribuye al desarrollo de diferentes tipos de enfermedades como el cáncer. La activación canónica de la vía Wnt regula los niveles, estabilidad y localización de β -Catenina. Es bien conocido que la progresión maligna es consecuencia de la activación de oncogenes y/o la pérdida en la funcionalidad de supresores de tumores, en este sentido se ha reportado que *TP53* es uno de los genes más frecuentemente mutados en los diferentes tipos de cáncer y más aún, la presencia de algunas mutaciones puede contribuir de manera importante a favorecer la activación de vías oncogénicas. Por ello, el objetivo del presente trabajo es evaluar los mecanismos a través de los cuales p53-wild type (p53-Wt) y p53 mutado (p53-Mut) pueden regular la activación de la vía Wnt dependiente de β -Catenina. Para ello, empleamos como modelo de estudio la línea celular derivada de cáncer de pulmón H1299, la cual es nula para p53, y realizamos ensayos de sobreexpresión de p53-Wt y las versiones mutadas p53-R175H/p53-R273H. Observamos que la versión p53-Wt parece ejercer una regulación negativa sobre elementos de activación de la vía canónica Wnt, particularmente β -Catenina y el co-receptor LRP6, y que este mecanismo puede ser atribuido de manera específica a la inducción de miR-34a. El efecto de la sobreexpresión de p53 fue evaluado también en esta línea celular, en un modelo de generación de esferas. En estas condiciones observamos una disminución en la forma activa autofosforilada de GSK3 β (Y216), así como un incremento en la actividad TCF/LEF. De manera interesante, en este modelo observamos que la sola presencia de p53-Mut promueve una ganancia de función que favorece la inactivación de GSK3 β por su fosforilación en la Ser9. La inhibición farmacológica de la vía PI3K/AKT sugiere que el efecto de p53-Mut es regulado por AKT. Nuestros resultados destacan la importancia de p53-Wt y la ganancia de función de p53-Mut en la regulación de vías de señalización asociadas a la progresión oncogénica.

ABSTRACT

The canonical Wnt pathway regulates the cellular homeostasis by controlling the levels and localization of β -Catenin; its dysregulation contributes to development of different diseases, including cancer. It is well known that the *TP53* tumour suppressor gene is frequently mutated in different types of cancer and even more, the presence of some mutants contributes to the malignant progress. Since different elements regulate the activity of the canonical Wnt pathway, we sought to determine the role of p53 as well as two of its mutants, p53-R175H and p53-R273H (p53-Mut). Thus, the aim of this work was to determine the effect of p53-Wt and p53-Mut in the regulation of the canonical Wnt pathway. We employed as study model the cell line derived from lung cancer H1299 which is null to p53, and transfection assays to express either p53-Wt or p53-Mut were done. We observed a negative regulation of β -Catenin and LRP6 by p53-Wt that can be attributed to the induction of miR-34a. When we measure the effect of expression of p53-Wt or p53-Mut in a spheroid model of these cells, we observed a decrease of the active form of GSK3 β (Y216), and an increase of TCF/LEF activity. Interestingly, we observed that the sole presence of p53-Mut promotes a Gain of Function that favours the inactivation of GSK3 β by phosphorylation at Ser9. The pharmacological inhibition of PI3K/AKT axis suggests that the effect of p53-Mut is regulated by AKT. These results highlight the importance of the functionality of p53-Wt and the gain-of-function of p53-Mut in the regulation of pathways associated to oncogenic progression.

ANTECEDENTES

La constitución de los tejidos y órganos requiere de un balance y versatilidad celular que lleva en la mayoría de los tipos celulares a crecer y llevar a cabo procesos de división celular. Esta plasticidad y organización favorecen la autonomía y mantenimiento de los tejidos. Sin embargo, al corromperse esta homeostasis, se pueden favorecer procesos patológicos. A principios del siglo XX, el zoólogo alemán Theodor Boveri llegó a una conclusión fascinante para su época, al estudiar los huevos de erizo de mar, observó que las fecundaciones múltiples producen alteraciones en el desarrollo normal, y estas alteraciones en los cromosomas tendrían consecuencias importantes que podrían explicar parte de la transformación neoplásica. Con el estudio de los virus, los cuales algunos promueven la capacidad oncogénica esta teoría fue cobrando cada vez menos importancia, sin embargo, actualmente la teoría génica ha establecido que el cáncer es la consecuencia de eventos que involucran la activación de oncogenes y pérdida en la funcionalidad de genes supresores de tumores (Manchester, 1995). Una visión más actualizada ha permitido establecer los sellos o “Hallmarks” en los cuales se definen características y mecanismos comunes del cáncer independientemente del tejido en donde resida (Figura 1) (Boveri, 2008; Hanahan y Weinberg, 2011).

En este nuevo enfoque, se debe tomar en consideración que en el cáncer, no sólo son señales que promueven o inhiben la proliferación, sino que bajo estos procesos patológicos se debe entender cómo los genes llevan a la organización de las células en los tejidos. En este sentido, existe un conjunto de mecanismos desregulados en cáncer que favorecen la progresión maligna que no se limitan a receptores tipo tirosina cinasa. La homeostasis celular se regula en gran medida por el aumento en las señales de EGF, Wnt, la vía TGF- β , Notch o Shh (Edwards, 1999). Es bien conocido que este conjunto de señales no actúa de manera aislada, sino en algunos casos a manera de gradiente, regulando distintos procesos celulares. Por ello, el entender las bases moleculares y los mecanismos en que las alteraciones genéticas promueven el desbalance de estas señales es uno de los retos a entender en la oncología moderna.

Biología del cáncer: epidemiología y definición

Con base en los datos epidemiológicos recientes GLOBOCAN, se estimaron 18.1 millones de nuevos casos de cáncer en el año 2018. Su frecuencia en diagnóstico e incidencia es principalmente el cáncer de pulmón (11.6%), seguido por el cáncer de mama (11.6%), próstata (7.1%) y cáncer colorectal (6.1%) (Bray et al., 2018). En México, los nuevos casos considerando

ambos

sexos

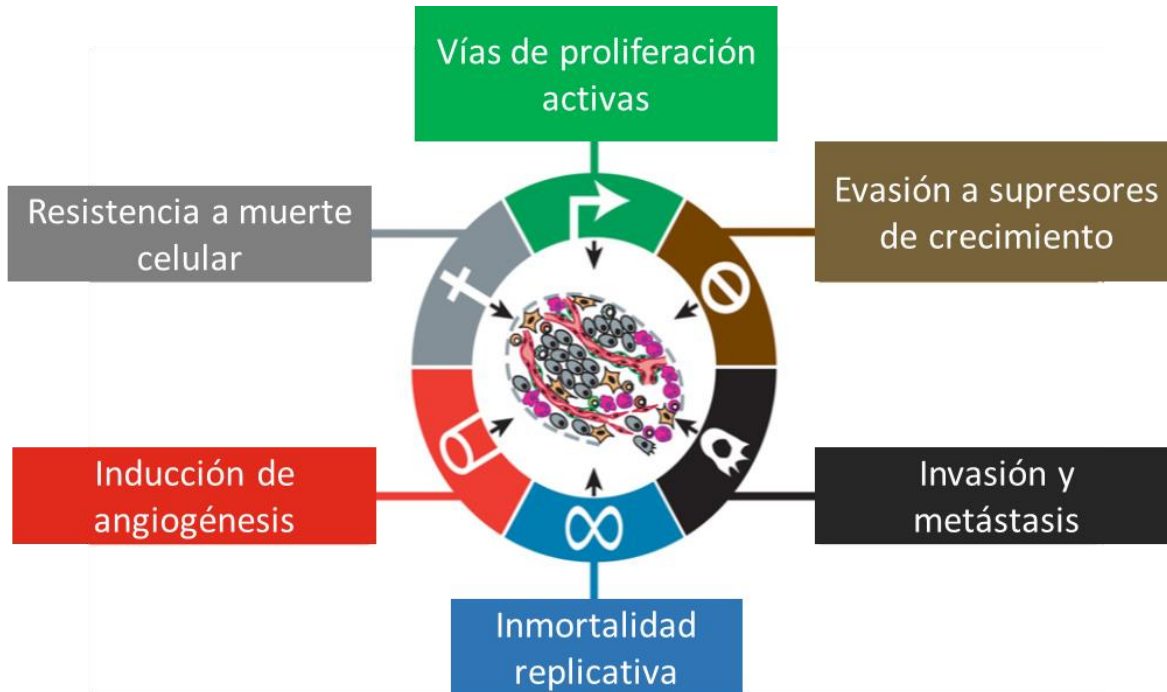


Figura 1. Sellos distintivos del cáncer. Se proponen seis características biológicas que contribuyen al desarrollo de un tumor, éste incluye un incremento en los mecanismos de proliferación, evasión a supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular por apoptosis, inducción de una actividad metastásica, angiogénesis y establecimiento de un programa replicativo que lleva al desarrollo macroscópico de un tumor (modificado de Hanahan and Weinberg, 2011).

se encuentran principalmente el cáncer de mama, próstata, colon, tiroides y cervicouterino. Es importante señalar que la incidencia lejos de disminuir se encuentra en incremento, por lo que representa la segunda causa de muerte a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud, 2015 (GICRD, 2015) (Figura 2).

Desde el punto de vista celular y molecular, el cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por tener una proliferación sostenida, mismas que les confieren características de generar metástasis e invasión a tejidos distantes. Con base en esta definición, se ha establecido por Hanahan y Weinberg características o mecanismos comunes que favorecen el desarrollo de tumores. Estas características son compartidas independientemente del tejido del cual se estudie, e incluye mecanismos de proliferación sostenida, evasión a supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular por apoptosis, inducción de angiogénesis, activación de programas de invasión y metástasis e inmortalidad replicativa (Hanahan y Weinberg, 2011). En años recientes, se han agregado a estas características la reprogramación metabólica y la evasión del sistema inmune.

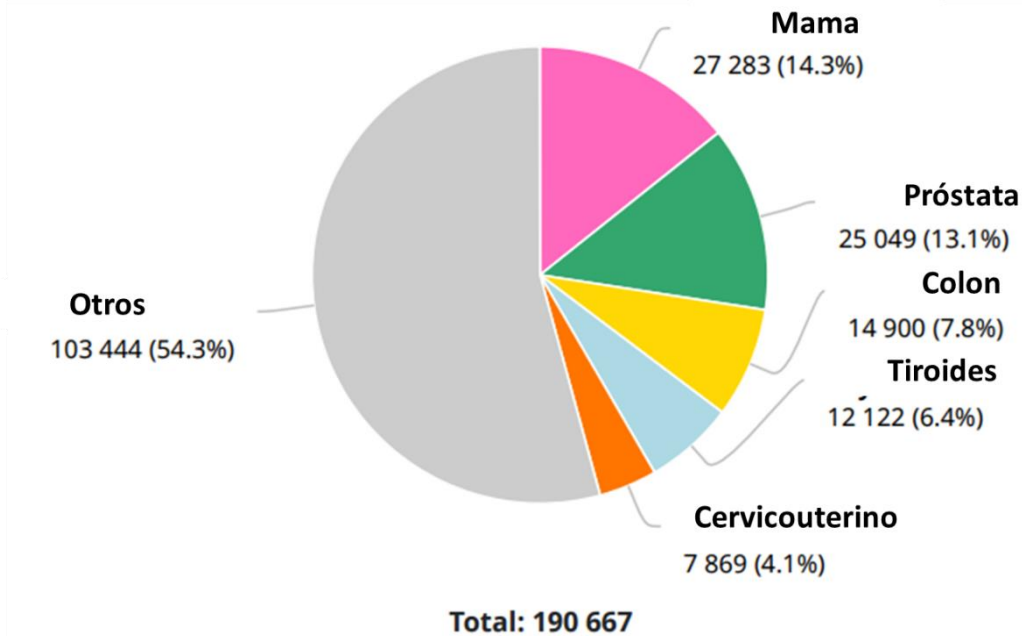


Figura 2. Datos epidemiológicos respecto a la prevalencia de cáncer en México. Número de nuevos casos en México en 2018. Recopilado de Bray et. al., 2018.

Asimismo, se debe tomar en consideración que el estudio del cáncer no se debe abordar de manera aislada, sino considerando los elementos que contribuyen a generar un microambiente tumoral, que en conjunto favorecen al desarrollo de esta enfermedad.

Esta desregulación implica un proceso reiterativo de expansión clonal y diversidad genética en el tejido donde se encuentra, por lo que un tumor puede estar constituido por diferentes subpoblaciones celulares a pesar de encontrarse en tejidos y microambientes específicos. Dentro de esta heterogeneidad, se encuentran las Células Troncales Cancerosas (CTC), las cuales comparten características comunes a las células troncales normales como la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse, en el caso de las CTC esta subpoblación celular repercute en la capacidad de iniciar y sostener el crecimiento tumoral, generando metástasis y explicando en parte, el bajo pronóstico clínico en pacientes con cáncer (Batlle y Clevers, 2017).

Se ha atribuido a las CTC el generar la población celular que conforma la masa tumoral, esto debido a sus habilidades de tipo troncal compartida con las células troncales normales que les confieren capacidad de auto-renovación. Entre sus características funcionales, se incluye su resistencia a la radiación y quimioterapia (atribuida a la expresión de transportadores ABC), baja tasa de proliferación (debido a su mantenimiento en un estado

de quiescencia) y pérdida de la homeostasis celular, lo que les permite sostener el crecimiento del tumor de manera continua (Clevers, 2016).

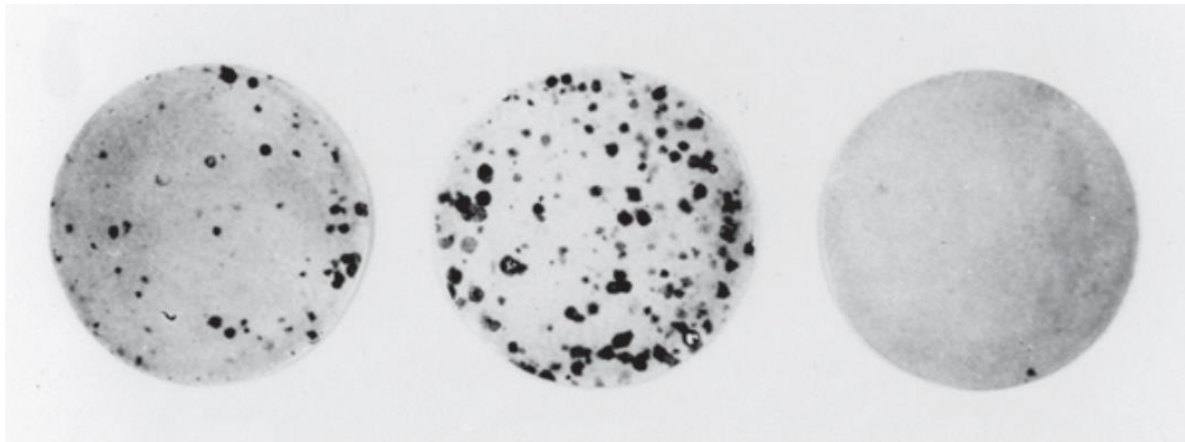
Se ha establecido que las CTC poseen características plásticas que les lleva a adaptarse a diferentes condiciones celulares, parte de estas dependen de señales derivadas del microambiente tumoral. Asimismo, las CTC residen en nichos particulares cuya función es preservar las propiedades funcionales que facilitan su potencial de autorrenovación, sin embargo, también se ha señalado que poseen características que las hacen no depender de un nicho para su mantenimiento (Clevers, 2016; Seino et al., 2018).

Funciones de p53 como supresor tumoral

Las células deben poseer mecanismos que les permita a generar un recambio de las células defectuosas con el propósito de reestablecer y favorecer la homeostasis de los tejidos. En este sentido, la proteína p53, también conocido como el *guardián del genoma* puede regular diferentes procesos con base en señales intrínsecas y extrínsecas en la célula, mismas que pueden incluir, daño al DNA, senescencia, señales de diferenciación, estatus energético, etc. (Bai y Zhu, 2006).

Su descubrimiento se basó en la transformación celular ejercida por el virus tumoral SV40, mismo que al inyectarse a un ratón singénico, generaba en el hospedero una reacción inmune que le permitió generar anticuerpos hacia las células transformadas. Los viriones de SV40 al entrar al núcleo llevan a cabo diferentes procesos de splicing donde les lleva a producir 3 diferentes proteínas de antígeno T (con tamaños de 708, 174 y 135 aminoácidos). La transformación ocurre cuando el genoma viral se integra como consecuencia de la expresión del antígeno T grande. Cuando las células infectadas se inyectan en un ratón singénico (que posee el mismo trasfondo genético al de las células inyectadas), se genera en el hospedero una respuesta inmune donde se producen anticuerpos que reconocen las células transformadas, y por lo tanto se reconocen las proteínas presentes en el virus. De esta manera, el antígeno T pudo ser inmunoprecipitado y de manera adicional una proteína de 53 kDa. Posteriormente, se descubrió que este anti-suero producido podía reconocer a la proteína de 53 kDa presente en otros tipos celulares que no fueron infectados con SV40. Es decir, la proteína T expresada en las células transformadas tenía interacción con la nueva proteína p53 presente en las células (Pipas y Levine, 2001).

Posteriormente, los estudios funcionales revelaron que la transfección de p53 podría favorecer, junto con el oncogen Ras el proceso de transformación maligna. Esto catalogó a



***ras + Delección
de p53***

***ras + p53 val-135
Mutación puntual***

ras + p53 Wt

Figura 3. Participación de p53 en la transformación oncogénica. El efecto de p53 se estudió en fibroblastos embrionarios. La sobreexpresión del oncogen Ras ocasiona que si existe una delección en p53, favorece la capacidad de crecer de manera independiente de anclaje (izquierda), si se expresa una versión mutada de p53 (alanina a valina en la posición 135) a la par del oncogen Ras este efecto se incrementa, pero si se expresa la versión p53-Wt se genera un rescate en la transformación celular (derecha), lo que revela que la función p53 canónica tiene un efecto supresor tumoral. La imagen muestra el crecimiento de focos transformados teñidos con Giemsa (Modificado de Michalovitz, 1990).

p53 como oncogen, sin embargo, el DNAc aislado era proveniente del RNAm de células cancerosas. Posteriormente, al evaluar este mismo efecto a partir de DNAc proveniente de células normales se observó que en realidad p53 contribuía a reprimir el proceso de transformación, por lo que los efectos promotores de la proliferación eran explicados por p53 mutado (p53-A135V) (Michalovitz et al., 1990). Por esta razón fue considerado a la proteína p53 como un supresor tumoral, el cual, al alterarse su función ejerce efectos promotores en la capacidad proliferativa (Figura 3).

Mecanismos de inducción de p53

Existe un gran número de señales que contribuyen a la activación de p53, estas incluyen estrés celular, daño al DNA, hipoxia, daño oncogénico, así como señales de diferenciación (Figura 4). La activación de p53 wild-type (p53-Wt), favorece señales proapoptóticas, de arresto celular, senescencia, etc. Desde el punto de vista estructural, la proteína p53 posee un dominio N-terminal de transactivación, un dominio rico en prolinas, un dominio de unión al DNA y un dominio regulatorio de oligomerización en el C-terminal (Freed-Pastor y Prives, 2012; Humpton y Vousden, 2016). Existe un gran número de genes blancos regulados por p53, por ejemplo, aquellos implicados en arresto en el ciclo celular (p21, miR-34, etc.),

senescencia (PAI1, CDKN1A, etc.), apoptosis (PUMA, BAX, NOXA, etc.), procesos metabólicos (TIGAR, GLS, etc.). Si bien, la vida media de p53 es baja (~20 min), su estabilidad puede ser regulada a través las modificaciones postraduccionales generadas por diferentes tipos de señales (Bai y Zhu, 2006; Misso, 2014).

Entre las señales de activación se encuentra el daño al DNA, ya que puede promover una respuesta de arresto en el ciclo celular, al favorecer la expresión de p21, el cual actúa como un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDK). De esta manera, al acarrear mutaciones que llevan a la pérdida en la funcionalidad canónica de p53, particularmente aquellas presentes en el dominio de unión al DNA puede disminuir su capacidad de

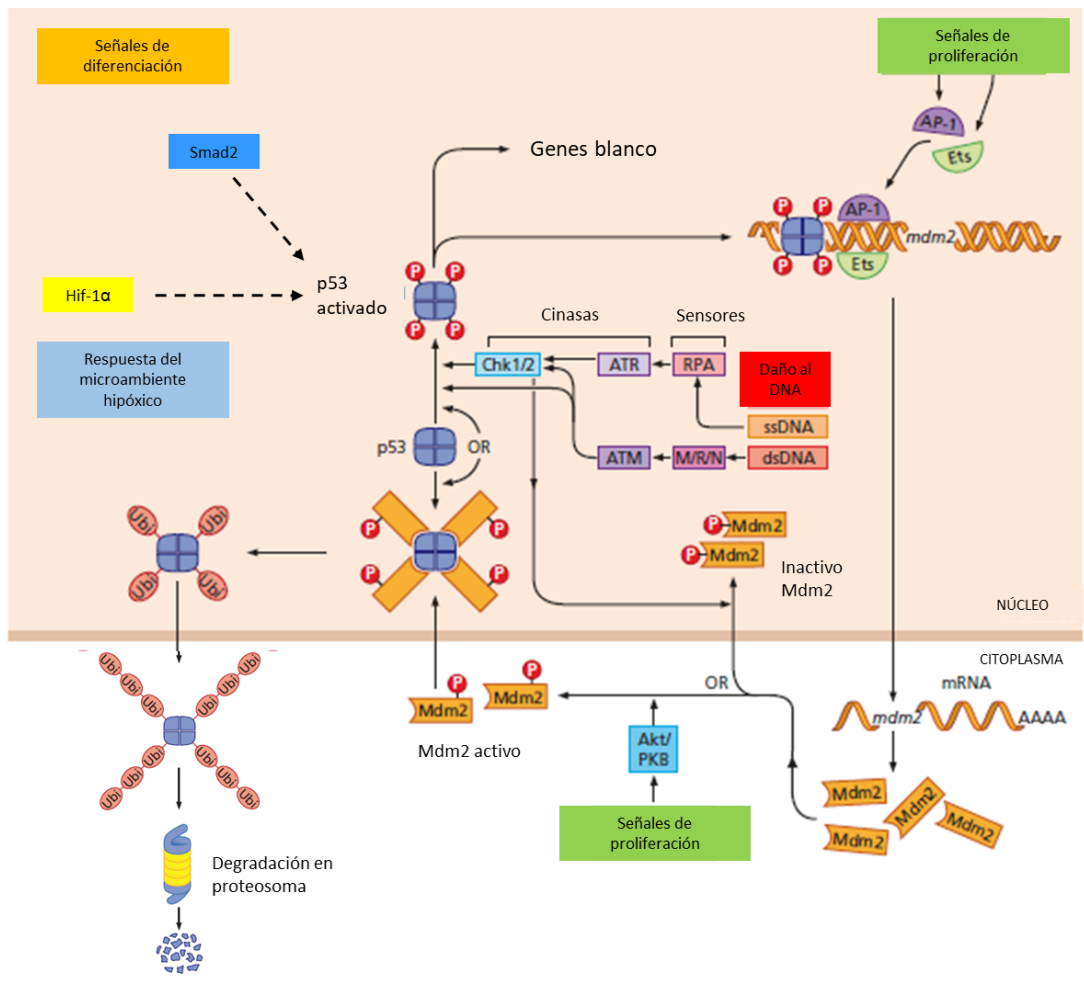


Figura 4. Funciones asociadas a la activación canónica de p53. Se ha descrito ampliamente que los efectos asociados a la presencia de p53-Wt dependen del contexto celular, por ello entre los efectos más comúnmente descritos se encuentra el favorecer procesos pro-apoptóticos, arresto en el ciclo celular, diferenciación celular, adaptación a hipoxia, etc. (modificado de Weinberg, 2014).

responder ante señales de estrés y por lo tanto, favorecer la progresión del crecimiento celular (Kim et al., 2017).

El incremento en los niveles fisiológicos de p53, puede regular la expresión de diferentes tipos de genes como *MDM2*, cuya proteína puede unirse directamente a p53, regular su salida del núcleo y favorecer su degradación en el proteosoma. Esto funciona como un loop de retroalimentación negativa que regula su propia actividad, contribuyendo a mantenerlo en niveles bajos, asegurando su degradación después de su síntesis (Figura 4). Entre las diferentes rutas que se encargan de regular la estabilidad de p53, estas incluyen las señales de respuesta por ruptura de doble cadena (DBS, por sus siglas en inglés), los cuales activan la vía ATM/ATR/Chk1, que conlleva al incremento en la actividad transcripcional de p53 (Figura 4) (Honda y Yasuda, 2000).

Es importante señalar que la activación de p53 es regulada por múltiples procesos y contextos celulares, ante estas señales p53 debe evitar su degradación por MDM2, con el propósito de favorecer su estabilidad. La fosforilación de p53 en parte, bloquea la capacidad de ser regulada por MDM2, en particular aquellas fosforilaciones presentes en el dominio de transactivación, una de ellas es generada por la proteína Chk1, misma que se activa como respuesta de daño al DNA. De esta manera, MDM2 antagoniza las funciones canónicas de p53 (Mendrysa y Perry, 2000; Terzian et al., 2008).

Por otro lado, existen contextos celulares que permiten regular la participación de p53 en procesos de proliferación y supervivencia, por sus efectos ejercidos sobre MDM2. Se ha observado que la vía PI3K/AKT, puede regular la activación de MDM2 por su fosforilación en el residuo Ser183, favoreciendo la ubiquitinación de p53, resultando en la reducción en sus niveles proteicos y su actividad transcripcional. Esto puede explicar, por qué la desregulación de señales mitogénicas resultan, en parte en la pérdida de su funcionalidad canónica (Honda y Yasuda, 2000; Mendrysa y Perry, 2000). Asimismo, el microambiente hipóxico puede jugar un rol importante en la inducción de p53. Se ha señalado que condiciones de estrés celular asociado a hipoxia puede favorecer la acumulación de p53, misma que parece ser dependiente del factor de transcripción Hif-1 α , para esto se han propuesto diferentes modelos de activación. Por ejemplo, se ha sugerido que la función ejercida por Hif-1 α radica en suprimir la regulación de ubiquitinación mediada por MDM2 así como su exporte nuclear (Humpton y Vousden, 2016). Aunque gran parte de los estudios de esta interrelación se han centrado en MDM2, la evidencia apunta a que esta regulación resulta ser mucho más compleja. El eje ATR/Chk1 puede contribuir a la estabilización de

p53 por su fosforilación en la serina 15, activado bajo condiciones de hipoxia y procesos de re-oxigenación, asociado íntimamente a una respuesta de daño al DNA (Hammond et al., 2003; Sermeus y Michiels, 2011). La activación de Hif-1 α se asocia a la disponibilidad de oxígeno, ante esto las enzimas PHD regulan su hidroxilación para favorecer su degradación proteosomal. De una manera consistente, datos recientes revelan que la PHD3 regula la hidroxilación directa de p53 en la prolina 359 (P359) y a partir de ésto su estabilidad por ubiquitinación, lo que destaca la importancia de la disponibilidad de oxígeno para favorecer las acciones supresoras de proliferación y apoptosis que no sólo se limita al efecto ejercido sobre los factores inducidos por hipoxia Hif1/2 α (Rodríguez et al., 2018).

Se ha estudiado de manera importante la influencia de p53 como un regulador maestro de la actividad glucolítica y la fosforilación oxidativa, por lo que la desregulación de vías oncogénicas lleva a cambios en la reprogramación metabólica. Como consecuencia, las células en proliferación deben poseer mecanismos que favorezcan este proceso, en este sentido se ha observado que las células cancerosas sobreactivan vías glucolíticas (aun en condiciones aeróbicas). La proteína p53, siendo un supresor tumoral importante tiene influencia en la regulación de este proceso ya que actúa negativamente regulando la expresión de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, lo que contrarresta el “efecto Warburg”, sin embargo favorece la fosforilación oxidativa (Schwartzenberg-Bar-Yoseph et al., 2004). Este efecto se puede explicar debido a la regulación positiva sobre TIGAR (Regulador de glucolisis y apoptosis inducible por *TP53*), quien a su vez actúa disminuyendo la actividad de PFK-2/FBPasa (fosfofructocinasa y fosfatasa de fructosa 6 fosfato) y de esta manera el flujo glucolítico se ve reducido (Bensaad et al., 2006; Hernández-Reséndiz et al., 2015). En el caso de la fosforilación oxidativa, p53 puede favorecer la utilización de oxígeno por la sobreactividad de COX (citocromo oxidasa) y en regular la glutaminasa, enzima que favorece la desaminación de glutamato, incrementa α -cetoglutarato y la respiración mitocondrial. A partir de esto, pueden promoverse mecanismos de defensa antioxidante como parte de la sobreactivación de p53, incrementando los niveles de GSH (Glutatión reducido), que a su vez incrementa la protección frente a ROS (Puzio-Kuter, 2011).

Adicionalmente, se ha señalado la existencia de señales extracelulares que pueden contrarrestar la activación de p53 a través del efecto ejercido sobre FAK (cinasa de adhesión focal, por sus siglas en inglés), donde de manera independiente a su actividad

cinasa, puede favorecer la degradación de p53 al promover la interacción de MDM2, específicamente a través del dominio FERM, presente en la proteína FAK. Así, gran parte del mantenimiento indiferenciado puede ser regulado a través del estado de agregación celular, por lo que este efecto resulta ser un elemento importante para el mantenimiento de células troncales embrionarias. De esta manera, los mecanismos de regulación de p53 no son limitados a la respuesta generada por estrés celular o daño al DNA. Los diferentes tipos celulares originados por un proceso de diferenciación a partir de células pluripotentes deben poseer mecanismos que regulen esta transición, en este sentido, la acetilación de p53 en Lys373 puede estabilizar a p53 favoreciendo su acumulación y actividad a través de la inducción de miR-34 y miR-145, que actúan reprimiendo la actividad de los factores de transcripción Oct4 y Sox2, asociados estrechamente a pluripotencia (Jain et al., 2012; Lim et al., 2008; Wang et al., 2017). Asimismo, se ha evidenciado que p53 puede converger con la vía de TGF- β y Ras/MEK/ERK y de esta manera promover junto con la proteína Smad2 procesos de diferenciación a través de la expresión de p21. Este proceso juega un rol importante para favorecer la supresión tumoral a través de señales extracelulares y así contribuir a la homeostasis de los tejidos (Cordenonsi et al., 2003, 2007). A partir de estos mecanismos, puede entenderse el papel de p53 ejerciendo efectos de represión del proceso indiferenciado y a su vez con un rol activo en promover diferenciación celular.

Funciones oncogénicas atribuidas a p53 mutado (p53-Mut)

A partir de estudiar p53, en sus primeros años la evidencia fue contradictoria ya que se pensaba que actuaba como un oncogén. Posteriormente se identificó que gran parte de los modelos estudiados eran provenientes de líneas celulares cancerosas, mismas que tenían una pérdida en la funcionalidad de esta proteína. Al estudiar células no transformadas, se observó que p53 es un supresor tumoral cuyas funciones favorecen gran parte de los efectos ya mencionados. Al estar inactivo p53, ya sea por delección o mutación se pierde su capacidad supresora tumoral. Entre las principales se encuentran mutaciones puntuales y sustitución de pares de bases correspondientes a los aminoácidos R175, G245, R248, R273. Los sitios más frecuentemente mutados se encuentran en el dominio de unión al DNA, la adquisición de mutaciones puede ejercer un efecto de dominancia negativa que le lleva a la versión canónica de p53 de perder su función como supresor tumoral, y más aún, la adquisición de estas mutaciones puede contribuir a favorecer la capacidad proliferativa (Bai y Zhu, 2006; Freed-Pastor y Prives, 2012; Junk et al., 2008).

A pesar de que esta ganancia de función ha sido reportada, son pocos los trabajos que han revelado a nivel mecanístico este efecto. En el presente trabajo se ejemplificarán aquellos que revelan mecanismos de activación comunes y genéricos en base al microambiente tumoral, factores de crecimiento extracelulares y estatus energético.

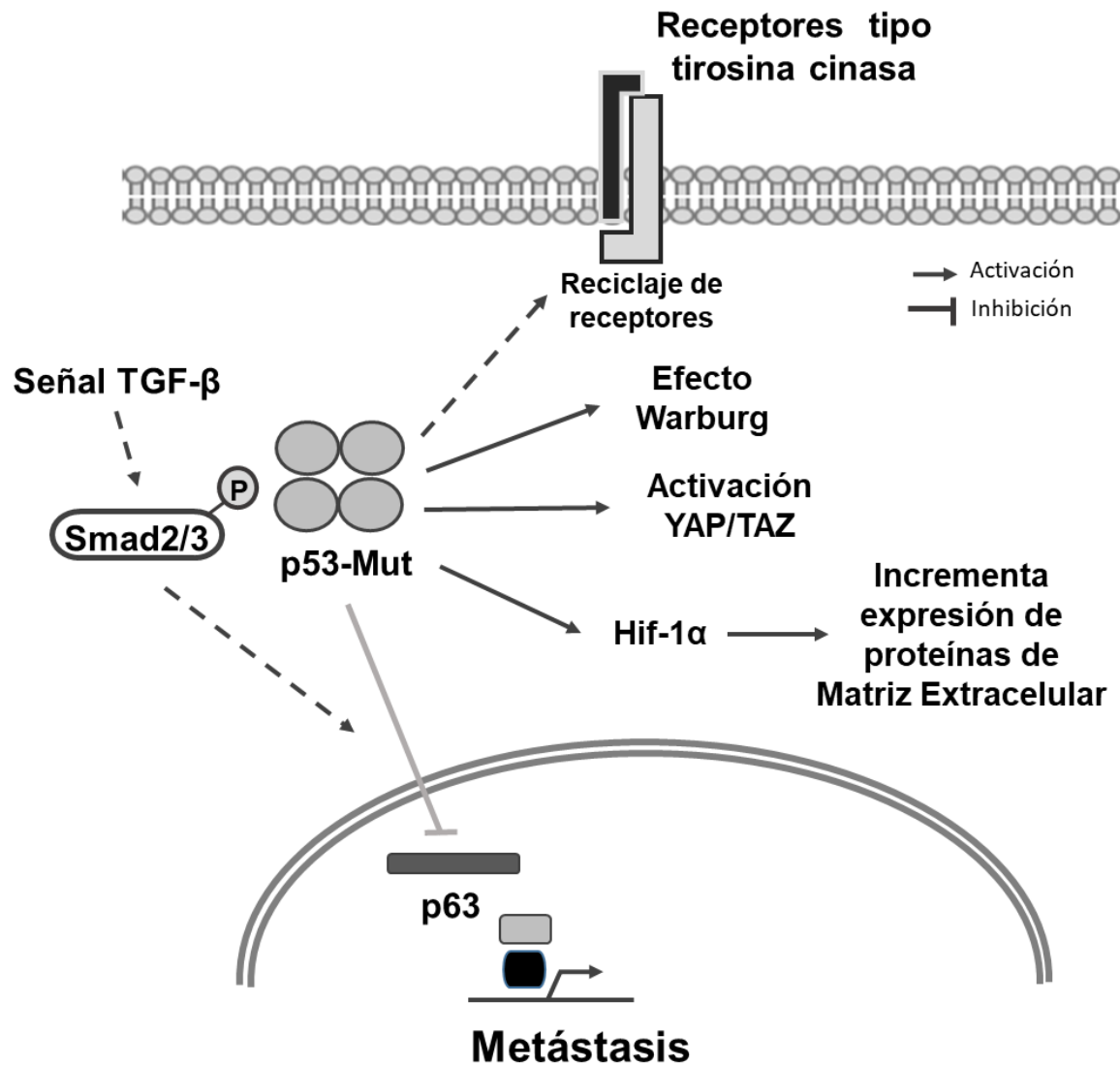


Figura 5. Ganancias de función relacionadas a la presencia de p53-Mut. Imagen representativa de los mecanismos moleculares en que p53-Mut favorece la activación oncogénica, entre los mecanismos descritos se incluye una redistribución de receptores con actividad tirosina cinasa, favorecer la expresión de enzimas glucolíticas (efecto Warburg), estabilización del complejo YAP/TAZ, favorecer la expresión de proteínas que degradan la matriz extracelular a través de Hif1 α , así como en promover la capacidad metastásica a través de la generación de complejos proteicos entre Smad/p53-Mut/p63.

Dentro de las ganancias de función asociadas a proliferación y supervivencia, se ha señalado que a partir de la presencia de p53-Mut (específicamente, R273H) se asocia con resistencia a muerte celular por anoicis, este efecto es explicado por la regulación negativa de la proteína BIM a través de la vía PI3K/AKT. La proteína BIM, favorece la disociación de BIM y BCL-XL, promoviendo la apoptosis a través de la mitocondria, lo que sugiere que p53-Mut disminuye la capacidad de promover muerte celular (Tan et al., 2015). Al incrementar p53-Mut vías asociadas a proliferación, existe una importante participación del receptor EGFR por las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK. Consistente a esta evidencia, se ha estudiado que la presencia de p53-R273H favorece la represión de miR27, mismo que al expresarse regula negativamente EGFR en sus segmentos UTR 3' (Wang et al., 2013). En complemento a esta sobreactivación de receptores, se ha destacado entre las funciones de p53-Mut el favorecer el reciclaje de integrinas y EGFR a través de la proteína RCP. Este efecto parece ser regulado porque la presencia de p53-Mut favorece la interacción de RCP con integrinas y a partir de esta interacción los receptores de tipo tirosina cinasa (RTK) son translocados a la membrana (Muller et al., 2009). Asimismo, se ha estudiado que la ganancia de función de p53-Mut lleva al incremento de WIP, que en parte puede favorecer la estabilización de YAP/TAZ y al establecimiento de un fenotipo maligno. A partir de la presencia de WIP, se puede favorecer la activación de la isoforma de AKT2, el cual regula la translocación de receptores a la membrana (Escoll et al., 2017). Esta evidencia, en parte puede explicar la existencia de vías de proliferación asociadas a factores de crecimiento presentes en tumores con un estatus p53-Mut.

Por otro lado, a pesar de que la presencia de p53-Mut se ha evidenciado ampliamente, el efecto de estas mutaciones en el metabolismo energético no se ha descrito en su totalidad. La presencia de p53-Wt es un elemento importante para favorecer la fosforilación oxidativa, sin embargo, cuando la concentración de oxígeno disminuye como consecuencia del microambiente, la tasa glucolítica y de fosforilación oxidativa disminuye, lo que incrementa la autofagia a través del efecto de p53. De manera interesante, p53-Mut reduce la tasa de fosforilación oxidativa e incrementa la glucólisis, es decir favorece el efecto Warburg (Hernández-Reséndiz et al., 2015, 2019). Este efecto puede deberse al incremento en la tasa glucolítica dado por una translocación de transportadores glucosa GLUT1, al parecer la presencia de p53-Mut incrementa la actividad de la vía Rho/ROCK, necesaria para su translocación (Zhang et al., 2013).

Los mecanismos dinámicos de proliferación celular requieren de un balance anabólico (consumo de ATP y síntesis de macromoléculas) y catabólico (degradación de macromoléculas para producir ATP). La presencia de p53-Mut ha permitido la adaptación a este proceso, una manera de regular esta homeostasis metabólica recae en la proteína AMPK, la cual permite sensor los niveles de ATP:AMP. Su activación estimula vías catabólicas. En este sentido, se ha observado que una manera de favorecer la proliferación y la ganancias de función oncogénica por parte de p53-Mut recae en inhibir la activación de AMPK a través del dominio de unión al DNA (Zhou et al., 2014). Consecuencia de esto, incrementa la capacidad glucolítica y la producción de lípidos, elementos importantes para promover el crecimiento celular. Además, se ha evidenciado que parte del comportamiento maligno asociado a p53-Mut es explicado por la sobreactividad de la ruta del mevalonato, la cual es esencial para promover vías lipogénicas que podrían explicar parte de las modificaciones postraduccionales asociados a proteínas G monoméricas (Ras, Rho, etc.) cuyos eventos de prenilación resultan indispensables para promover su actividad (Ingallina et al., 2018; Parrales et al., 2018).

Asimismo, la influencia del microambiente hipóxico puede reflejarse en una participación dual p53-Mut/Hif-1 α . Esto se asocia a un incremento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular como Colágena VIIa1 y Laminina- γ 2. Este efecto de ganancia de función llevado a cabo en condiciones de estrés por hipoxia contribuye a favorecer la capacidad tumorigénica (Amelio et al., 2018; Kamat et al., 2007). Consistentemente, esta alta capacidad proliferativa se relaciona con la inhibición de la formación de vesículas autofágicas e incremento en la vía mTOR. Funcionalmente, las implicaciones de la inhibición de la autofagia incrementan su daño al DNA por rupturas de doble cadena sugiriendo que el rol de la autofagia permite en parte disminuir el daño al DNA y en reducir procesos oncogénicos. Asimismo, el efecto de p53-Mut posee mayor sensibilidad al efecto de inhibidores de mTOR (Cordani et al., 2016).

Existen diferentes elementos que regulan la homeostasis y los programas de proliferación y arresto celular. De una manera importante, la presencia de p53-Mut puede romper esta homeostasis. Un ejemplo de esto puede deberse a la interacción que ejerce p53-Mut con las señales de TGF- β . Esta vía regula diferentes programas de diferenciación y arresto celular, teniendo una participación como supresor tumoral, el grupo de trabajo de Stefano Piccolo ha realizado contribuciones importantes en este sentido. Por ejemplo, se ha

observado una interacción con p63, la cual es una proteína que coordina la inhibición de la metástasis, sin embargo en presencia de TGF- β y p53-Mut se generan complejos proteicos entre Smad/p53-Mut/p63 que le lleva a perder su funcionalidad y por lo tanto se promueve metástasis (Adorno et al., 2009). Además, se ha observado que la actividad canónica Smad2/Smad3 puede atenuarse a través de la interacción directa de p53-Mut con el dominio MH2 de Smad3, sin que se afecte su fosforilación (Adorno et al., 2009; Ji et al., 2015). Esto destaca, no sólo la naturaleza pleiotrópica de la vía TGF- β en contextos no tumorales y tumorales, sino también que la ganancia de función oncogénica de p53-Mut no parece limitarse a los efectos sobre RTK (Figura 5).

Participación de la vía Wnt como regulador de la homeostasis celular

La regulación de los tejidos requiere de un constante balance de procesos que implican, diferenciación, generación de patrones, organogénesis, regeneración, mantenimiento de células troncales, etc. La vía Wnt permite regular gran parte de estos procesos, y su desbalance en los mecanismos que la rigen puede favorecer diferentes tipos de enfermedades, cáncer es una de ellas. Existen diferentes mutaciones en esta vía en genes como Axina, APC y β -Catenina (CTNNB1), cuyas proteínas promueven su sobreactivación, lo que lleva al incremento en la estabilidad de β -Catenina y favorece su translocación nuclear para promover procesos de proliferación (Clevers y Nusse, 2012).

La vía Wnt fue descubierta por Roel Nusse, a partir de esto se han descrito numerosos efectos biológicos en los que participa, el establecimiento de la polaridad celular, motilidad, especificación de los ejes embrionarios, etc. Los ligandos Wnts, se refieren a una serie conservada de glicoproteínas de ~40 kDa. Una de las modificaciones más importantes es la adición de ácido palmítico, el cual resulta indispensable para su maduración. Esta modificación resulta uno de los puntos más importantes en las señales Wnt, el cual es llevado a cabo por la proteína Porcupina en el retículo endoplásmico. Un ligando prototipo de vía canónica dependiente de β -Catenina es el ligando Wnt3a. Se sabe que la pérdida de Porcupina lleva a su retención en el retículo endoplásmico, lo que genera defectos en su secreción en especies como *Drosophila melanogaster* (Janda et al., 2012).

Este tipo de ligandos liberados se asocian con diferentes respuestas biológicas en las células sobre las que actúa. Existen 19 diferentes tipos de ligandos en mamíferos los cuales

son expresados en diferentes tejidos. Los ligandos se unen a los receptores Frizzled (Fzd) que pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, de los cuales han sido descrito 10 en humanos (Clevers, 2006; Willert y Nusse, 2012). El reconocimiento de Fzd a los respectivos ligandos depende de un dominio rico en cisteínas presente en la región N-terminal de los receptores. Entre los tipos de respuestas en las células efectoras se encuentra la vía “canónica”, cuyo efecto recae en regular los niveles, estabilidad y localización de β -Catenina, mientras que las vías “no canónicas” se encuentra la Polaridad Celular Planar (PCP) y la movilización de calcio. Actualmente, se ha establecido que estas respuestas producidas dependen del tipo de receptores y co-receptores expresados. Para llevar a cabo las respuestas prototípicas dependientes de β -Catenina se encuentra el efecto ejercido sobre el co-receptor LRP5/6, mientras que para las vías no canónicas depende de co-receptores alternos como Ryk o ROR2 (Green et al., 2014; Minami et al., 2009). Asimismo, se encuentran proteínas cuyos efectos son antagónicos, ya que interactúan con los ligandos directamente como Dickkopf (DKK) y Kremen (Krm).

Señalamiento canónico dependiente de β -Catenina

El mecanismo de señalización Wnt dependientemente de β -Catenina (comúnmente denominado canónico) recae en regular su estabilidad y localización (Valenta et al., 2012). La proteína β -Catenina regula una gran cantidad de procesos celulares fisiológicos, entre ellos favorecer adhesión celular y actuar como co-activador transcripcional en la señalización Wnt. Parte de la generación de complejos de adhesión celular dependen de la interacción que tiene β -Catenina con las proteínas γ -Catenina y α -Catenina. Su estructura la constituye 781 aminoácidos, su dominio central posee 12 repeticiones armadillo, estas repeticiones le permiten su unión no sólo a diferentes Cadherinas y Cateninas, sino también a diferentes factores transcripcionales. Se ha establecido que muchas de las proteínas de unión a β -Catenina interactúan a través de las repeticiones “armadillo”, que incluyen cadherinas, TCF/LEF, Axina o el inhibidor transcripcional ICAT (Cruciat, 2014; Mosimann et al., 2009). Asimismo, existen diferentes modificaciones postraduccionales que, a nivel de fosforilación, regulan la capacidad de que β -Catenina forme parte de complejos de adhesión celular. Por ejemplo, las fosforilaciones en el C-terminal se asocian generalmente con un incremento en la actividad transcripcional ya que reducen su afinidad a los complejos de adhesión. Se han identificado diferentes tipos de cinasas que se encargan de regular esta afinidad, entre ellas las proteínas PKA y AKT que fosforilan las serinas 675 y 552

respectivamente (Fang et al., 2007; Hino et al., 2005). A partir de estas fosforilaciones se puede favorecer su capacidad de actuar como co-activador transcripcional, en el caso de la S675 incrementando su importación nuclear, mientras que la S552 por su interacción con 14-3-3 ζ , una proteína de andamiaje implicada en favorecer su estabilización (Figura 6) (Tian et al., 2004).

Para entender la base molecular de la vía Wnt canónica dependiente de β -Catenina, es necesario tomar en consideración los mecanismos que regulan la estabilidad de β -Catenina

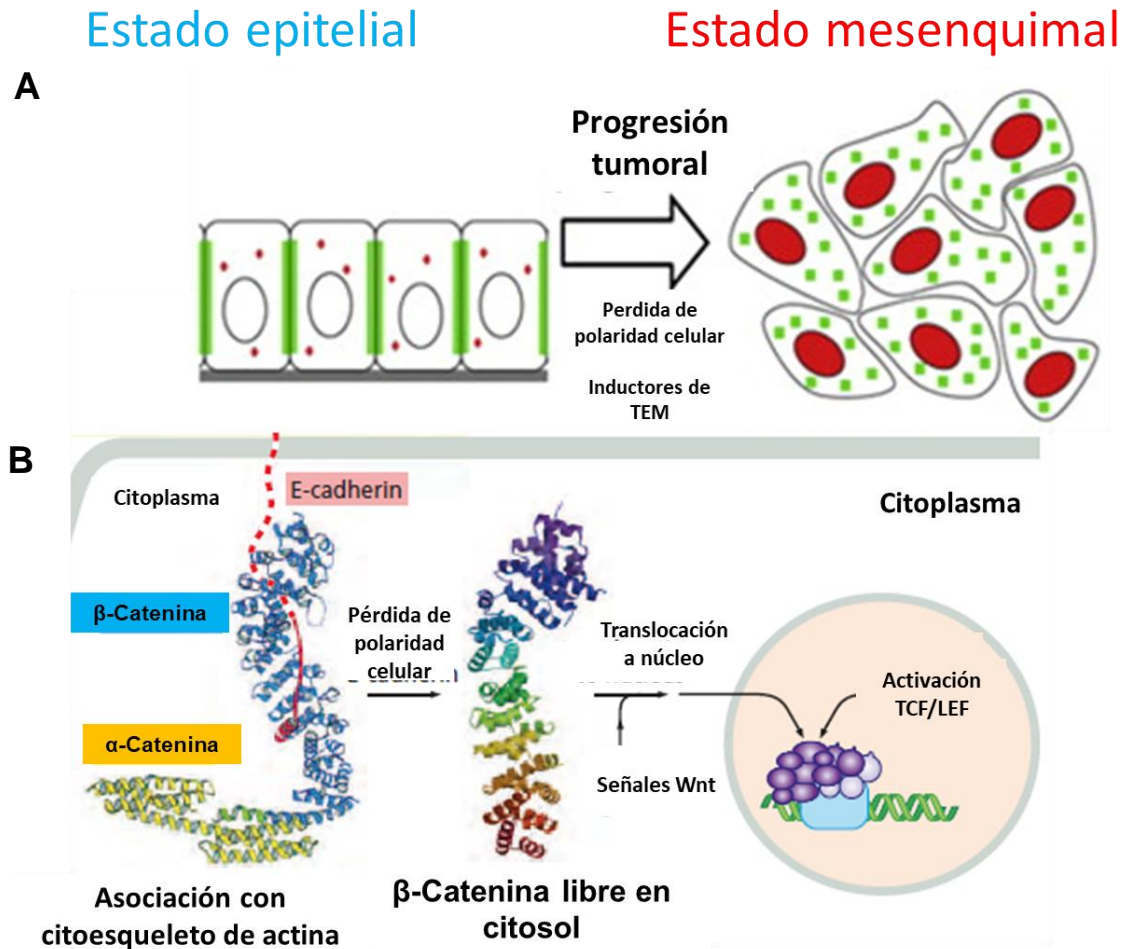


Figura 6. Distribución de β -Catenina en células cancerosas. **A.** La proteína β -Catenina tiene una expresión constitutiva y en condiciones no cancerosas se encuentra generalmente en la membrana celular favoreciendo las uniones adherentes con E-Cadherina y α -Catenina, sin embargo, al perderse las uniones adherentes durante la progresión maligna, su distribución tiende a favorecerse en citoplasma y en el núcleo, donde bajo diferentes señales, su estabilidad incrementa evitando su degradación proteosomal. **B.** La presencia de señales Wnt u otros factores de crecimiento regulan la estabilidad de β -Catenina a nivel de sus modificaciones postraduccionales que le favorecen su capacidad de actuar como co-activador transcripcional (modificado de Weinberg, 2014).

cuando hay una ausencia de ligandos Wnt. Existen diferentes componentes que regulan su estabilidad, para ello existe un complejo multiprotéico que se encarga de favorecer su degradación. Mutaciones en estos componentes pueden llevar a una activación aberrante de la actividad basal de β -Catenina. Entre las proteínas que constituyen este complejo se encuentra CK1 (caseína cinasa 1), Axina, APC, GSK3 β y la proteína E3 ubiquitin ligasa. Las modificaciones por fosforilación en el N-terminal de β -Catenina regulan su degradación, por ejemplo, la proteína CK1 lleva a la fosforilación de la Ser45, la cual favorece la fosforilación adicional de los residuos 41, 37 y 33 por GSK3 β . A partir de esta secuencia de fosforilaciones se genera un sitio de unión a β -TrCP (proteína que contiene repeticiones β -transducina) que lleva a su degradación proteosomal (Acebron y Niehrs, 2016; Beurel et al., 2015).

Los ligandos Wnt se unen a los receptores Frizzled y al co-receptor LRP5/6, ante esta unión se recluta la proteína Dishevelled (Dvl) la cual es fosforilada como consecuencia de la unión ligando-receptor. Después de esta fosforilación, el complejo Axina-GSK3 β se recluta a la membrana a través del dominio DIX presente en Dvl. Posteriormente, como parte de la activación basal constitutiva la proteína GSK3 β fosforila la cola citoplásmica del LRP (Piao et al., 2008). Ante este evento, el conjunto de proteínas Axina, GSK3 β , CK1 y APC son reclutados a la membrana plasmática, llevando a la disociación del complejo proteico que lleva a la degradación de β -Catenina. Este mecanismo lleva a favorecer su acumulación y por lo tanto puede entrar al núcleo, donde dependiendo del contexto celular, puede actuar como co-activador transcripcional de la familia de factores transcripcionales TCF/LEF. Los genes blanco típicos que son regulados como consecuencia del incremento de la actividad transcripcional mediada por β -Catenina son aquellos involucrados en procesos de proliferación, autorrenovación, migración, etc., tales como c-myc, ciclina D, entre otros (Mosimann et al., 2009) (Figura 7).

Asimismo, se ha establecido que la presencia de vías no canónicas pueden ejercer un efecto antagónico sobre la actividad dependiente de β -Catenina, esto puede ser explicado por una regulación ejercida por PKC α . Se ha reportado que los sitios Ser33/Ser37/Ser45 de β -catenina son fosforilados por esta enzima, estos sitios lo marcan para llevar a degradación, lo que explica la regulación negativa ejercida PKC α sobre su actividad transcripcional (Gwak et al., 2006). Esta evidencia resulta distinta al efecto ejercido ante la ausencia de ligando, donde su degradación es dependiente de la actividad de GSK3 β .

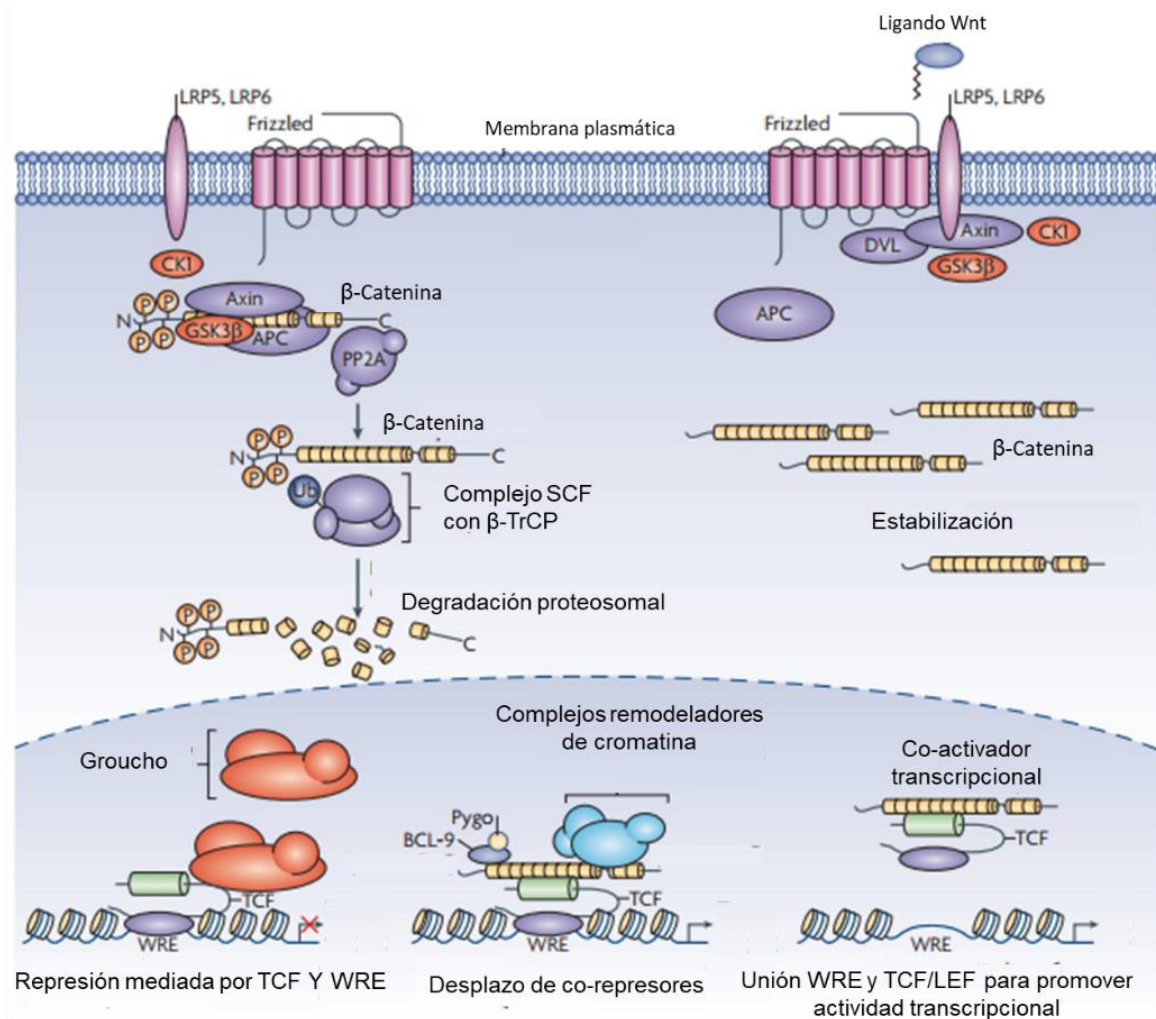


Figura 7. Mecanismos generales de activación de la vía Wnt. En ausencia de ligandos Wnt, β -Catenina es blanco de fosforilación por parte del complejo de degradación que inducen su ubiquitinación y degradación al proteosoma (izquierda). En presencia del ligando Wnt, se induce la disociación del complejo de degradación de β -Catenina y a partir de esto, se acumula y transloca al núcleo activando a la familia de factores de transcripción de la familia TCF/LEF y promueve la expresión de genes blanco (derecha) (modificado de Mosimann, 2009).

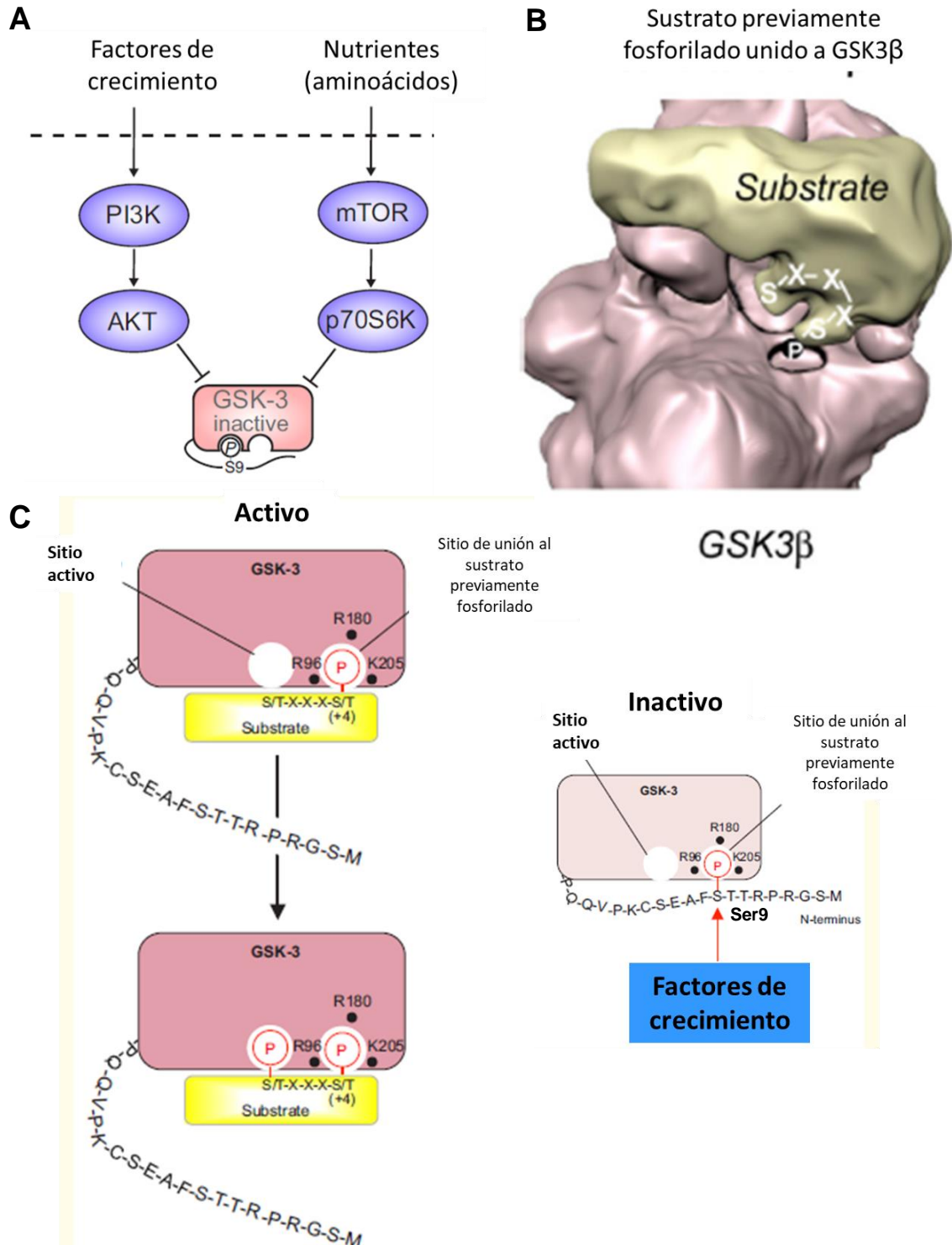


Figura 8. Mecanismos que regulan el estado de activación de GSK3 β . **A.** Vías de señalización que regulan la actividad de GSK3. **B.** Imagen representativa de la enzima GSK3 unida a los sustratos previamente fosforilados sobre los que generalmente actúa. **C.** Inactivación de GSK3 por señales generadas por factores de crecimiento implicadas en favorecer la progresión del ciclo celular, entre ellas la fosforilación de la serina 9 (modificado de Maurer, 2014).

De esta manera, resulta interesante recalcar que por sí misma β -Catenina no posee actividad catalítica, sino que ejerce diferentes funciones dependiendo de su distribución celular. Experimentalmente, la co-expresión de β -Catenina/TCF favorecen su localización nuclear, mientras que la co-expresión β -Catenina/Axina la distribuye en citoplasma, por lo que los mecanismos que rigen esta distribución pueden llevar a efectos específicos (Bilic et al., 2007; Faux et al., s. f.; Tolwinski y Wieschaus, s. f.; van de Wetering et al., s. f.). Una de los efectos principales a los que lleva las señales Wnt/LRP es favorecer la inactivación de GSK3 β , este efecto parece regular y reclutar al 70% de la actividad de GSK3 β , el cual está unido a la enzima Axina, lo que sirve como un elemento común requerido para las señales Wnt (Acebron y Niehrs, 2016) (Figura 8).

Una de las consecuencias principales de las señales Wnt/LRP6 es favorecer la progresión del ciclo celular a través de múltiples niveles, por lo que su señalización aberrante dado a diferentes niveles no sólo favorece procesos de proliferación, sino que bajo este contexto, le lleva a favorecer una inestabilidad cromosómica, la cual es uno de los “hallmarks” característicos en cáncer (Acebron y Niehrs, 2016).

Regulación de GSK3 β

Un punto de convergencia en las señales Wnt es su efecto inhibitorio sobre la proteína GSK3 β . Para entender las funciones pleiotrópicas favorecidas por la vía Wnt se deben conocer los mecanismos que regulan la actividad de esta cinasa, dado los múltiples sustratos sobre los que actúa. La proteína GSK3 (Glucógeno sintasa cinasa) fue inicialmente descrita como un regulador negativo de la enzima que favorece la formación de glucógeno. Su caracterización se basó en el efecto de la insulina, y de la participación de receptores de tipo tirosina cinasa, los cuales llevan a la inactivación de esta enzima. GSK3 tiene dos isoformas α y β (51 y 47 kDa respectivamente) codificada con dos genes distintos. Se ha establecido una gran cantidad de blancos sobre los que actúa esta cinasa, un número atípico respecto a las cinasas convencionales (Kim y Kimmel, 2006; McCubrey et al., 2014). Asimismo, diferentes autores revelan que hasta un 20% de las proteínas totales podrían ser blanco de regulación por esta enzima. Dada su promiscuidad para poder actuar sobre múltiples sustratos, la especificidad se ve regida por diferentes fosforilaciones, tanto en GSK como en los blancos sobre los que actúa, lo que va a determinar la localización subcelular de GSK. Funcionalmente, para regular su actividad esta enzima

posee un dominio de unión al sustrato previamente fosforilado sobre el cual actuará y el dominio cinasa que llevará a cabo la fosforilación. GSK3 fosforila 4 residuos hacia la región N-terminal adyacentes a una fosforilación previa (S/T-X-X-X-S/T) (Maurer et al., 2014). Las acciones de GSK3 pueden regularse por sus fosforilaciones inhibitorias que regulan la habilidad de reconocer sustratos. En el caso de la isoforma α , es su fosforilación en la serina 21, mientras que en la β en la serina 9. Esta modificación le lleva a actuar como un sustrato previamente fosforilado y así a inhibir su propia actividad (Figura 8) (Beurel et al., 2015).

La inactivación por esta fosforilación es regulada por diferentes tipos de cinasas asociadas con la activación de factores de crecimiento. Asimismo, para una completa activación de esta enzima se requiere no sólo de la ausencia de la fosforilación GSK3 β en ser9, sino de la presencia del residuo Y216 fosforilado, que se da por una autofosforilación ya que a partir de esta, se aumenta la actividad enzimática de esta cinasa hasta 100 veces (Beurel et al., 2015). De esta manera, parte del efecto ejercido por las señales Wnt tiende a malinterpretarse, ya que es bien conocido que el efecto de GSK3 sobre sus sustratos va a depender de su unión a la proteína Axina. Gran parte de la capacidad de reconocer un sustrato particular se determina por el complejo proteico unido a estos sustratos. En el caso de β -Catenina es su proximidad a la proteína APC y la proteína de andamiaje Axina, asimismo, quien determina su estado pre-fosforilado es la proteína CK1 α . (Cruciat, 2014) Sin embargo, se han descrito sustratos adicionales de GSK3 β unidos a Axina, ya que este último actúa favoreciendo su proximidad, entre ellos se encuentran proteínas como Smad3, TSC1/2 o TAZ (Guo et al., 2008; Huang et al., 2012; Inoki et al., 2006).

Es necesario recalcar que la participación de esta enzima y la especificidad en la regulación de las múltiples vías sobre las cuales actúa dependen del tipo de complejo proteico al cual se encuentra unido, en el caso de la regulación de β -Catenina, es por su unión a APC y Axina. En los últimos años, se ha propuesto que una de las respuestas principales a lo que lleva la señal Wnt/LRP radica en la inactivación de GSK3 β . Sin embargo, el mecanismo con que se lleva a cabo esta inactivación es controversial. Parte de esta evidencia se ha basado en que la evaluación de la actividad enzimática de GSK3 aún se sigue observando en lisados que contienen el detergente Triton X-100, donde de manera sorprendente la actividad enzimática no se inhibe. Este efecto es explicado porque como parte de la unión del ligando Wnt al co-receptor LRP, incrementa el proceso de microautofagia que lleva al secuestro y falta de accesibilidad de GSK3/Axina a sus sustratos por su mantenimiento en cuerpos

multivesiculares. Por tal motivo, los sustratos sobre los que generalmente actúa ya no son regulados, entre ellos β -Catenina (Acebron y Niehrs, 2016; Taelman et al., 2010).

La vía Wnt como regulador de la estabilidad de proteínas

A partir del estudio de la vía Wnt en diferentes modelos experimentales se ha podido establecer que el efecto del señalamiento de esta vía no se limita a las acciones sobre β -Catenina, sino a un efecto generalizado en el aumento de la estabilidad en las proteínas ocasionado por la inhibición/reclutamiento de GSK3 β . ¿Cómo entender la naturaleza pleiotrópica de las señales Wnt?, a continuación se ejemplifica la evidencia experimental sobre algunos de los efectos generados por la regulación de GSK3.

Se ha observado que el efecto en la progresión del ciclo celular generado por las señales Wnt incrementa de manera importante el tamaño de las células y aumenta la estabilidad generalizada de las proteínas durante las fases G2/M, lo que prepara a las células para la división celular. Una de ellas es c-Myc, un blanco transcripcional típico de la vía Wnt canónica y blanco importante de GSK3 β para su ubiquitinación. A este efecto se le ha denominado en años recientes como Wnt/STOP (Acebron et al., 2014; Acebron y Niehrs, 2016; Kim et al., 2015).

Asimismo, en el contexto de señales mitogénicas y crecimiento celular, se ha observado que las señales Wnt incrementan la vía TSC2-mTOR y favorece la síntesis de proteínas. La activación de este eje es dependiente de GSK3 porque la activación de mTOR es regulado por el estado de activación de TSC2. El complejo mTOR puede ser activo por la proteína Rheb, ya que actúa como una GTPasa que la lleva a un estado inactivo. La

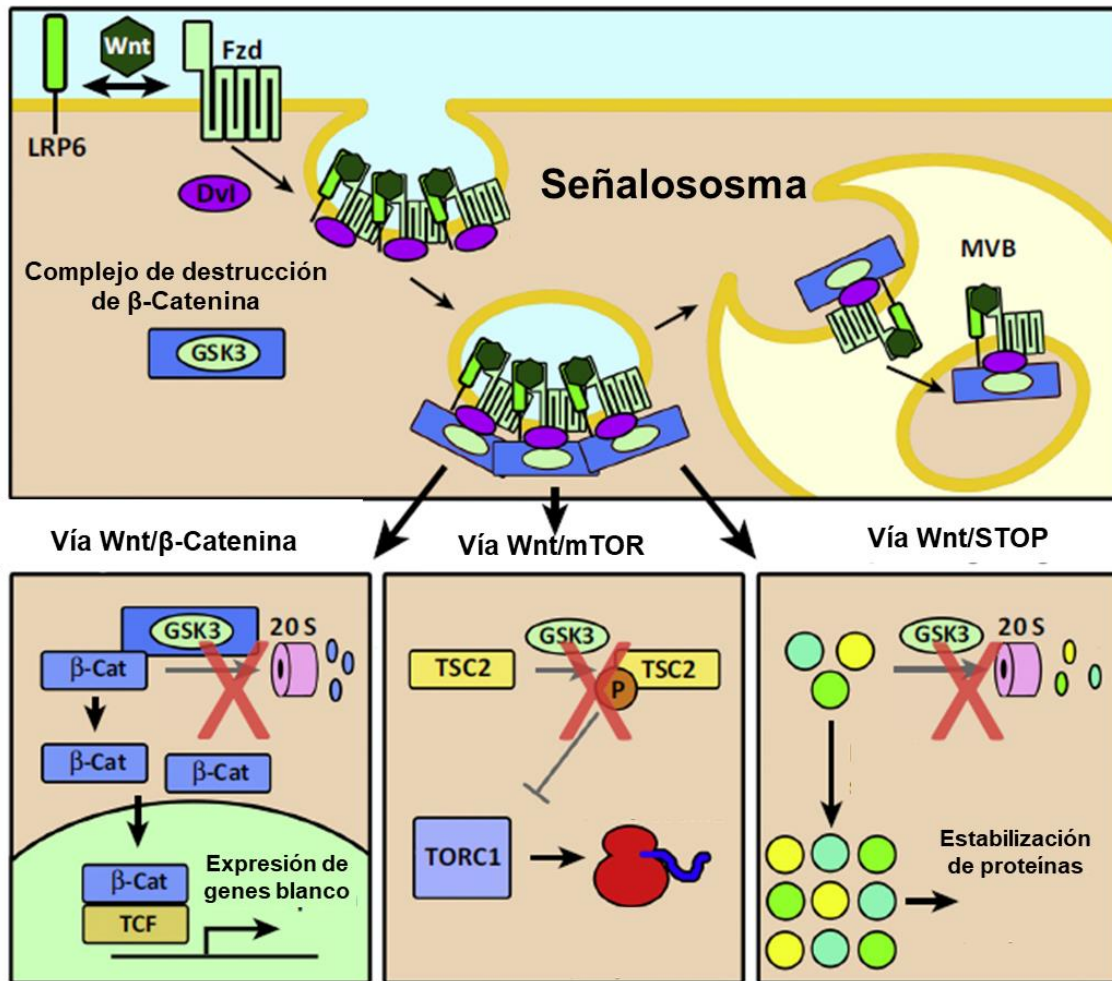


Figura 9. Regulación de la vía Wnt sobre GSK3. Las señales Wnt inactivan a GSK3 por su reclutamiento en cuerpos multivesiculares(MVB). Como consecuencia se ha definido que la respuesta de las señales Wnt/LRP6 promueven la estabilización de diferentes proteínas que regulan la proliferación celular, entre ellas incrementa la actividad transcripcional de β -Catenina, favorecer la síntesis de proteínas por la vía mTORC1 así como de diferentes blancos implicados en la regulación del ciclo celular. Modificado de Acebrón, 2016.

regulación y activación de TSC2 involucra una regulación dual de AMPK (que lleva a un estado pre-fosforilado) y GSK, de esta manera TSC2 se activa y lleva a la inhibición de mTOR. Como parte de las señales Wnt/LRP6 se inactiva GSK3 y por lo tanto TSC no ejerce su función, por lo que incrementa la actividad de mTOR y por lo tanto el crecimiento celular y síntesis de proteínas (Figura 9) (Inoki et al., 2006).

Adicionalmente, entre los sustratos descritos se ha señalado a Smad4 como uno de los elementos regulados directamente por GSK3, esto a través de las señales conjuntas de FGF. Esta evidencia establece que la señal Wnt al inactivar GSK3 potencia las funciones de Smad4 y por lo tanto reduce su capacidad de actuar como supresor de la proliferación. En la embriogénesis de *Xenopus*, este mecanismo tiene una relevancia importante por el efecto antagónico ejercido por la señal Wnt/TGF- β (Demagny et al., 2014; Demagny y De Robertis, 2016).

Otro de los blancos regulados negativamente por GSK3 se encuentra el transductor TAZ, una proteína que, en respuesta a diferentes elementos, como la adhesión celular permite regular el crecimiento de los órganos y tejidos por su translocación nuclear. De manera interesante, se ha observado que diferentes cinasas pueden regular su estado de activación debido a sus fosforilaciones previas ejercidas (entre ellas por LATS) que pueden ser reconocidas por GSK3 para favorecer su degradación (Huang et al., 2012). En condiciones donde existen mutaciones que llevan a la sobreactivación de PI3K o en PTEN, se puede inactivar GSK3 y por lo tanto a favorecer la transducción de TAZ.

Asimismo, las señales Wnt no sólo se limita a β -Catenina, un ejemplo de esto se ha comprobado en la maduración de espermatozoides, donde los ligandos Wnt liberados como exosomas por el epidídimo llevan a la estabilización de proteínas reguladas por GSK3, entre ellas, Septina 4 y a partir de este efecto, se promueve su estabilidad y capacidad de motilidad espermática (De Robertis y Ploper, 2015; Koch et al., 2015).

Uno de los efectos principales generados por las señales Wnt implica el favorecer la actividad del complejo de transporte endosomal (ESCRT) que lleva al secuestro de GSK3, de manera sorprendente el incremento en la estabilidad de proteínas dado por la inactivación de GSK3 favorece la poliubiquitinación en Lys48 de diferentes proteínas, tales como β -Catenina, Smad1 y Smad4. Esto las lleva a su transporte endolisosomal, lo que sugiere que los ligandos Wnt constituyen un punto de regulación importante para favorecer procesos de microautofagia (Kim et al., 2015). De esta manera, las señales Wnt pueden ejercer roles fisiológicos a través de mecanismos que controlan la estabilidad de proteínas, esto incluye, la elección fisiológica de degradación lisosomal y proteosomal (Figura 9).

Relación entre la vía Wnt y p53

Uno de los trabajos que ha señalado la existencia de una interrelación entre la vía Wnt y p53 es sobre la diferenciación celular. En el modelo de *Xenopus* se ha reportado que la activación canónica de la vía Wnt dependiente de β -Catenina constituye un elemento importante en el centro organizador de Spemann, donde actúa como un gradiente donde se generan células indiferenciadas mismas que llevan a la formación del eje embrionario en la porción dorsal (Kim et al., 2011). La proteína p53-Wt es considerada maestra de la diferenciación y constituye un elemento central para antagonizar el efecto sobre células poco diferenciadas y así, en conjunto con las señales de TGF- β y FGF promueve la diferenciación al mesodermo (Cordenonsi et al., 2003, 2007). Además, resulta interesante señalar que gran parte del estado indiferenciado de las células durante la gastrulación en *Xenopus laevis* depende de la capacidad de ser regulado por p53 (Kim et al., 2011; Q. Wang et al., 2017). Funcionalmente, la vía Wnt canónica dependiente de β -Catenina se ha evaluado en ensayos de duplicación del eje embrionario, donde la estimulación de la vía Wnt canónica en el polo contrario al centro organizador de Spemann (ventral) genera células indiferenciadas que pueden llevar a la formación de un nuevo eje. De manera particular, se ha establecido que la capacidad de promoverse este proceso de diferenciación depende de p53 y su efecto ejercido sobre miR-34a, así la vía Wnt canónica se reprime y promueve la diferenciación celular. En este sentido, diferentes elementos como TCF/LEF4, Wnt1, Wnt3, LRP6 y β -Catenina poseen en sus segmentos UTR 3' sitios de unión a miR-34a (Kim et al., 2011). Este mecanismo destaca que el miR-34a, además de ser un blanco transcripcional de p53 puede regular el establecimiento indiferenciado de las células. Por ejemplo, se ha señalado que la división que determina la autorrenovación de células troncales de cáncer de colon depende de la ausencia de miR-34a, ya que al expresarse este microRNA se suprimen vías implicadas en la autorrenovación (Bu et al., 2013a). Además, evidencia reciente reporta que la presencia de p53 puede suprimir el proceso de transformación de células de cáncer de colon dado por la pérdida del supresor tumoral APC (Jiang y Hermeking, 2017). Por ello, la presencia de miR-34a constituye un elemento importante en la regulación de la vía Wnt canónica, sin embargo, aún no está completamente establecido su relevancia en el proceso de transformación, ya que la vía Wnt posee diferentes mecanismos de activación que dependen del tipo de modelo de cáncer en estudio.

Planteamiento del problema

El entendimiento de los mecanismos en que se puede regular la activación de la vía Wnt es un campo que no está completamente entendido. Básicamente, una de las respuestas principales a las que lleva la vía Wnt canónica es favorecer procesos que implican proliferación celular, pero también el mantenimiento del estado indiferenciado, a medida que las células llevan a cabo procesos de diferenciación celular, la dependencia a esta vía puede disminuir. Es necesario recalcar que la vía Wnt y el mecanismo de activación dependiente de β -Catenina puede poseer mecanismos de activación que no se limitan a la distribución de receptores Frizzled y del co-receptor LRP, sino que existen mecanismos de regulación adicional que se encargan de modular la activación de la vía Wnt (Acebron y Niehrs, 2016). En este trabajo nos propusimos entender los mecanismos de p53 para regular la activación de la vía Wnt dependiente de β -Catenina. Es bien conocido que p53 es un supresor tumoral importante, que además entre sus múltiples funciones se encuentra reprimir el estado indiferenciado de las células. Por ejemplo, la presencia de p53 puede actuar de manera antagónica a la autorrenovación de células troncales, activando programas inductores de la diferenciación celular (Bu et al., 2013a; Kim et al., 2011). Sin embargo, en cáncer existe una pérdida en la homeostasis celular favorecida por un proceso de transformación, lo que ocasiona una pérdida en la funcionalidad canónica de p53 dado por la acumulación de diferentes tipos de mutaciones. Intrínsecamente, esto le implica las células transformadas la readquisición de propiedades asociadas a las de las células indiferenciadas y más aún, que la presencia de estas mutaciones en p53 son elementos permisivos para promover la actividad oncogénica. Sin embargo, los mecanismos en que se puede favorecer esta participación no están completamente entendidos (Muller et al., 2009). Por ello, el objetivo del presente trabajo es entender los mecanismos en que p53/p53-Mut pueden regular la activación de la vía Wnt dependiente de β -Catenina.

HIPOTESIS

Existirá una señalización opuesta entre la vía de señalización Wnt canónica con la actividad de p53 y p53-Mut, misma que podría correlacionar con la activación de vías implicadas en promover la progresión maligna.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos en que p53-Wt y p53-Mut pueden modular el señalamiento Wnt dependiente de β -Catenina y sus posibles consecuencias funcionales.

OBJETIVOS PARTICULARES

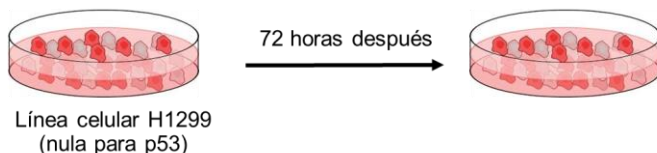
- Evaluar si la sobreexpresión de la versión p53-Wt y sus mutantes p53-R175H/p53-R273H ejercen efectos sobre elementos de la vía Wnt en cultivos de monocapa de la línea celular H1299 (nula para p53).
 - Determinación del efecto sobre la viabilidad celular por el método de MTT.
 - Evaluación de la expresión de las proteínas p53, β -Catenina, LRP6 y p21 mediante western blot.
 - Evaluación de la localización celular de p53-Wt y p53-Mut por inmunofluorescencia.

- Evaluar el efecto de p53-Wt/p53-Mut sobre un modelo de generación de esferas y su regulación en la vía Wnt.
 - Participación de la vía Wnt en un modelo de generación de esferas.
 - Estudiar el rol ejercido sobre elementos moduladores de la vía Wnt, particularmente sobre GSK3 β y su estado de activación.

DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Cultivo de monocapa

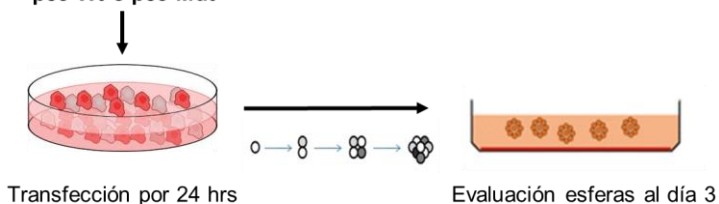
Ensayos de sobreexpresión p53-
Wt/p53-Mut



- Estandarización de ensayos de sobreexpresión p53/p53-Mut.
- Evaluación de efecto sobre viabilidad celular por MTT.
- Efecto ejercido sobre β -Catenina total y LRP6 por Western Blot.
- Localización intracelular de p53/p53-Mut por inmunofluorescencia.
- Análisis de expresión de miR34a por PCR en tiempo real.

B. Cultivo de esferas

Sobreexpresión de
p53-Wt o p53-Mut



- Participación de la vía Wnt en modelo de monocapa vs esferas.
- Evaluación de actividad enzimática ALDH por citometría de flujo.
- Evaluación de la sobreexpresión de p53 o p53-Mut sobre la vía Wnt dependiente de β -Catenina.

Figura 10. Estrategia experimental para estudiar el efecto de p53-Wt/p53-Mut en la regulación de la vía Wnt canónica. Diseño planteado para sobreexpresar p53/p53-Mut en la línea celular H1299 nula para p53. A) Metodología propuesta para la sobreexpresión de p53 y sus mutantes en modelos de monocapa y técnicas evaluadas en este modelo experimental. B) Metodología para generar cultivos de esferas que sobreexpresan p53 y p53-Mut, la evaluación de las diferentes técnicas fueron evaluadas al tercer día de crecimiento.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de células en monocapa

Se utilizó como modelo de estudio la línea celular H1299 derivada de cáncer de pulmón humano, la cual es una línea inmortalizada que posee una delección parcial homocigótica en el gen *TP53* (c.181C>A) que lleva como resultado a la no expresión de la proteína p53. Esta línea fue cultivada en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute). Esta línea celular fue suplementada con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y antimicótico al 1% de (100

Unidades/mL Penicilina G, 100 µg/mL Estreptomicina y 25 µg/mL Anfotericina B, Thermo Fisher Scientific). Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire. El sembrado de esta línea celular se realizó retirando el medio de cultivo, y lavando con PBS 1X, posteriormente, las células fueron tripsinizadas con una solución al porcentaje 0.05% por 3 minutos e inactivadas con la adición de medio suplementado. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante se retiró y se resuspendieron en medio suplementado para su posterior manipulación en experimentos correspondientes en monocapa o esferas.

Para los ensayos de transfección, las células se sembraron con el propósito de obtener una confluencia ideal del 60%, mientras que, para ensayos farmacológicos, la densidad cercana antes del tratamiento fue de 60-80%.

Formación de esferas

El ensayo de formación de esferas fue realizado a partir de células H1299 provenientes de cultivos en monocapa partiendo de una confluencia aproximada de 60-75%. En el caso de las células transfectadas, el ensayo fue realizado a partir de cajas p35 en monocapa, mismas que se transfectaron por un periodo de 24 horas. Se usaron placas de baja adherencia, mismas que fueron preparadas previamente usando 2-hidroxietil metacrilato, poly (HEMA). Las células se crecieron en medio MammoCult Human Medium Kit (Stem Cell Technologies) con suplemento proporcionado por el kit al 10% y 4 µg/mL de heparina. La densidad celular empleada para el sembrado fue de 8000 cel/mL y el tiempo en que se evaluaron los ensayos correspondientes fue al tercer día de crecimiento. Las esferas generadas se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ y humedad del 70%. Al ser cosechadas, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm por 4 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron con PBS 1X. Se realizó nuevamente la centrifugación a 4000 rpm por 4 minutos, el PBS removido y las células se emplearon para análisis posteriores.

En el caso de la generación de esferas transfectadas con los plásmidos de interés, las células se transfectaron en la condición de monocapa por 24 horas y se realizó el sembrado correspondiente.

Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT

Para la evaluación de la viabilidad celular se realizó por el método de MTT en cajas de cultivo de 12 pozos a las cuales se les removió el medio y se lavaron 2 veces con PBS 1X.

Posteriormente, se agrega 1 mL de PBS y 100 µl de solución MTT (5 mg/ml). Se incubó a 37°C por un periodo de 2 hrs y a partir de ello se agregó 1 mL de DMSO con el propósito de resuspender. La lectura se realizó en espectrofotómetro a 570 nm.

Tratamiento farmacológico

Se realizó la inhibición de la vía PI3K/AKT mediante el tratamiento con wortmanina (Sigma #19545-26-7), este fue realizado en el modelo de esferas utilizando una concentración de 150 nM, que fue agregado al medio al momento en que las células fueron sembradas, como control se agregó DMSO. La evaluación de los blancos regulados por el eje PI3K/AKT fue realizada al tercer día, las células se incubaron en estas condiciones a 37°C, con 5% de CO₂ y 70% de humedad.

Ensayo de Western Blot

Las células fueron lisadas usando buffer de lisis (50 mM Tris Base, 5 mM EDTA, 133 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 e inhibidor de fosfatasa 1X) y fueron mantenidos a -70°C hasta su utilización. Posteriormente, los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y cuantificado mediante el reactivo comercial Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Para la electroforesis, se cargaron de 20-50 µg de proteína en un gel de poliacrilamida de 8-12% SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente con leche libre de grasa TBS/Tween/Leche (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween-20 al 0.05% v/v, 5% de leche). La incubación con el anticuerpo primario fue a su dilución respectiva en TBS/Tween/Leche durante toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS/Tween durante 5 minutos cada una en agitación moderada. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario preparado en TBS/Tween durante 1 hora. Al término de esta incubación, las membranas se lavaron 3 veces con TBS/Tween. El revelado se realizó usando el sustrato Immobilon quimioluminisciente de HRP (Millipore) y la detección fue mediante el equipo C-DiGit (Li-COR Biosciences). La cuantificación densitométrica fue llevada a cabo mediante el software ImageJ.

La condiciones de dilución de los anticuerpos fueron las siguientes: p53 DO1 (sc-126) a 1:1000, LRP6 (GTX 62901 GeneTex) a 1:500, β -Catenina activa (Cell Signalling #8814) a 1:2000, β -Catenina (14-2567-82 eBioscience) a 1:3000, p-AKT1/2/3 ser-473 (sc-7965) a 1:200, AKT total (sc-1618) a 1:1000, p-GSK3 β (sc-373800) a 1:200, GAPDH (sc-48167) a 1:5000, GSK3 α/β Y279/216 (sc-135653) a 1:1000, SQSTM1/p62 (abcam #56416) a 1:1000, LC3 (NB100-2220 Novus) a 1:1000, p21WAF1/Clip1 (Dako #SX118) a 1:500. En el caso de los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-Rabbit IgG-HRP (sc-1313) a 1:5000, anti-Mouse IgG (sc-2005) a 1:3000, anti-Goat IgG-HRP (sc-2020) a 1:10,000. La abreviación sc hace referencia a Santa Cruz Biotechnology.

Evaluación de la actividad ALDH

La medición de la actividad ALDH se realizó utilizando el kit ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies). Las células se cosecharon, lavaron y contaron para mantenerlas a una densidad celular de 1×10^6 células/mL en el amortiguador. Para 1×10^6 células se adicionó 2.5 μ M del sustrato de ALDEFLUOR e inmediatamente se tomó la mitad de volumen para agregar 2.5 μ M de DEAB, un inhibidor de ALDH (control negativo). Ambas condiciones se incubaron por 45 minutos a 37°C en oscuridad. Después, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 300 μ l de amortiguador ALDEFLUOR. El análisis se realizó en el citómetro BD FACSCalibur con 10,000 eventos registrados.

Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en portaobjetos y fueron transfectadas al alcanzar una confluencia de 60%. A las 72 horas postranfección se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos y se realizaron lavados con PBS y 3 lavados con PBS /BSA al 0.1%. Cada lavado fue en agitación leve durante 5 minutos. Después, las células fueron permeabilizadas y bloqueadas con solución de bloqueo (PBS/BSA 0.1%/SFB al 10%). La dilución para p53 DO1 (sc-126) fue de 1:100 durante un periodo de 12 horas en cámara húmeda a 4°C.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS/SFB al 10% en agitación moderada. El anticuerpo secundario fue diluido en PBS/BSA 0.1%/SFB al 10%

manejando una dilución de 1:200 para Fluorescein Horse anti-Mouse IgG Antibody (No. FI-2000, Vector Laboratories Inc.). La tinción de núcleos se realizó incubando en una solución de 0.5 μ M de yoduro de propidio durante 5 minutos a temperatura ambiente. La captura de imágenes fue en el Microscopio Confocal Nikon A1R+STORM.

Ensayos de transfección y evaluación de actividad luciferasa

Los plásmidos usados en el presente trabajo fueron p53-Wt, p53-R175H, p53-R273H donados generosamente por el Dr. Daniel Menendez (NIH). Los ensayos de transfección se realizaron usando Lipofectamina 3000 (Invitrogen) y Opti-MEM (Gibco) en base a las condiciones dadas por el protocolo, 3.75 μ l de Lipofectamina y 7.5 μ l de P3000 para cajas de formato p35. Se sembraron 2×10^5 células, después de 24 horas se realizó la transfección. Las concentraciones de DNA empleadas fueron 1, 2.5 y 5 μ g en cajas de cultivo p35. El medio de cultivo fue cambiado 24 horas después, y el procedimiento de lisado fue realizado en los tiempos especificados más adelante.

Para el caso de la transfección del reportero TopFlash/FopFlash, se realizó en cajas p35 usando concentraciones de TopFlash o FopFlash y β -Galactosidasa (200 ng y 40 ng respectivamente), mismas que en el caso de las esferas generadas, fueron utilizadas para realizar el ensayo de formación de esferas en base al protocolo descrito. Para el caso de monocapa, esta se realizó en cajas de 24 pozos transfectando 40 y 10 ng de TopFlash o FopFlash y β -Galactosidasa. La actividad luciferasa evaluada en los lisados fue utilizando el protocolo Luciferase Reporter System (Promega). El lisado fue realizado agregando buffer de lisis 1X, incubando durante 10 minutos, posteriormente fue raspado, recuperado y mantenido a -70°C hasta su utilización. Las muestras fueron descongeladas, vortexeadas por 15 segundos y centrifugadas 2 min a 12,000 rpm, y el sobrenadante fue recuperado. Posteriormente, se agregaron 30 μ l de lisado a cada pozo de lectura y se agregó 30 μ l del sustrato. La actividad fue evaluada mediante el programa GLIOMAX. Posteriormente se agregó 50 μ l del sustrato Galacton y se incubó durante 20 minutos. Se agregó 50 μ l de solución aceleradora y el equipo fue programado para la evaluación de la actividad β -Galactosidasa.

Extracción de RNA

Se retiró el medio de cultivo y el lisado se realizó mediante el uso de TRIzol (200 µl para una caja p35). Las células fueron despegadas mediante pipeteo, se transfirió a un tubo eppendorf y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se agregó 40 µl de cloroformo. Se mezcló por vortex durante 15 segundos y después se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. La mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm a 4 °C por 15 minutos, donde se obtuvieron 3 fases. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y posteriormente se agregó 100 µl de isopropanol, la muestra fue mezclada por inversión y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se desechó y se lavó 3 veces con etanol 100% y 80% para posteriormente mezclar y centrifugar por 10,000 rpm en cada lavado. El sobrenadante fue desechado y el tubo se secó y resuspendió en H₂O. El RNA obtenido fue cuantificado con el equipo NanoDrop.

Reacción de transcripción reversa

En base a las condiciones establecidas en el protocolo Applied Biosystems, se utilizó 10 ng de RNA para un volumen de cDNA de 15 µl. Los componentes de kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems No. 4366596) se descongelaron y usaron por muestra las cantidades siguientes:

Componente de reacción	Volumen utilizado
100 mM dNTPs	0.15 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1.0 µl
10x Reverse Transcriptor Buffer	1.5 µl
RNAse inhibitor (20 U/µl)	0.19 µl
Agua libre de nucleasas	4.16 µl
Oligonucleotidos	3.0 µl
Muestra de RNA	5.0 µl

El volumen final se mezcló gentilmente y centrifugó. Posteriormente se incubó durante 5 minutos en hielo. Las condiciones de transcripción reversa en el termociclador fueron 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y finalmente ∞ a 4°C.

PCR en tiempo real (qPCR)

Una vez obtenida la retrotranscripción, se descongelaron los componentes de reacción correspondientes al Kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, No. 4304437).

Componente de reacción	Volumen
TaqMan RNA assay (20X)	1.0 μ l
Producto RT	1.33 μ l
TaqMan 2X Universal Master mix NoAmp	10.0 μ l
H2O libre de RNAsas	7.67 μ l
Volumen final	20.0 μ l

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes en base a los parámetros AmpliTaq Gold Enzyme Activation PCR. La cantidad de ciclos 40, 10 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, extensión 60 segundos a 60°C con 15 segundos de desnaturalización a 95°C entre cada ciclo.

Análisis estadístico

Los datos graficados representan la media \pm error estándar de la media de cada grupo experimental. Para el análisis de PCR tiempo real, se realizó mediante el método $2^{-\Delta Ct}$, siendo ΔCt la diferencia de los valores Ct de miR-34 – Ct de U6 de referencia (Schmittgen y Livak, 2008). Se graficó el número de veces de cambio normalizando respecto al grupo no transfectado. En los ensayos con el reportero la actividad se reportó mediante el cociente de unidades obtenidas del reportero sobre las unidades de β -galactosidasa, el grupo Fop permitió la normalización. Para la comparación de 3 o más grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Bonferroni, así como la prueba post hoc de Dunnett cuando se consideró pertinente. En el caso de la comparación de 2 grupos se utilizó la prueba t de Student. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, para ello se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA).

RESULTADOS

Ensayos de sobreexpresión de p53-Wild type y p53-Mutado

Como un primer paso para evaluar la relevancia de p53 en la regulación de la señalización canónica de la vía Wnt, se realizaron ensayos de sobreexpresión de p53-Wt y p53-Mut, para ello y con el objetivo de discernir el posible efecto de la vía con la presencia endógena de p53, se empleó la línea celular H1299 (nula para p53), la cual es una línea inmortalizada derivada de carcinoma de pulmón y además, posee una delección parcial homocigóta en p53, por lo que no produce su proteína. En base a las condiciones de transfección establecidas, se realizó una curva dosis respuesta (1 a 5 μ g) de la versión p53-Wt y se evaluó el efecto ejercido sobre dos proteínas clave en la señalización canónica de la vía Wnt, β -Catenina y LRP6 (co-receptor del ligando Wnt) mediante Western Blot. Como grupo control se empleó el vector vacío (referido en adelante como Empty) en estas mismas concentraciones, así como un correspondiente grupo no transfectado (N/T). El efecto de esta sobreexpresión fue evaluado 72 horas postransfección. Como consecuencia de esta sobreexpresión se observa una marcada disminución en los niveles de cambio de la proteína LRP6 y β -Catenina ($p < 0.05$), lo que apunta a una regulación negativa sobre estos dos elementos que participan en la activación canónica de la vía Wnt (Figura 11A). Es importante recalcar, que, pese a que la transfección por si misma genera una reducción en los niveles de estas dos proteínas, el efecto de p53-Wt fue notorio a diferencia de su control Empty en esa misma concentración cuando se realizó el análisis densitométrico (Figura 11B).

Con el objetivo de establecer si esta regulación negativa era ejercida de manera particular por p53-Wt, se transfectaron bajo la concentración de 5 μ g los plásmidos de p53-Mut, correspondientes a p53-R175H y p53-R273H. Bajo estas condiciones se evaluó el efecto ejercido sobre β -Catenina posterior a 72 horas de transfección, y de igual manera se observa la regulación negativa sobre sus niveles totales, mismo que fue significativo respecto a las condiciones Empty y N/T ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente) (Figura 12A-B). Las formas mutadas de p53 no ejercen esta regulación negativa, asimismo, se evaluó p21, uno de los blancos clásicos de p53-Wt y se corroboró su expresión en el caso de la sobreexpresión de p53-Wt, lo que sugiere la especificidad del mecanismo ejercido por p53-Wt.

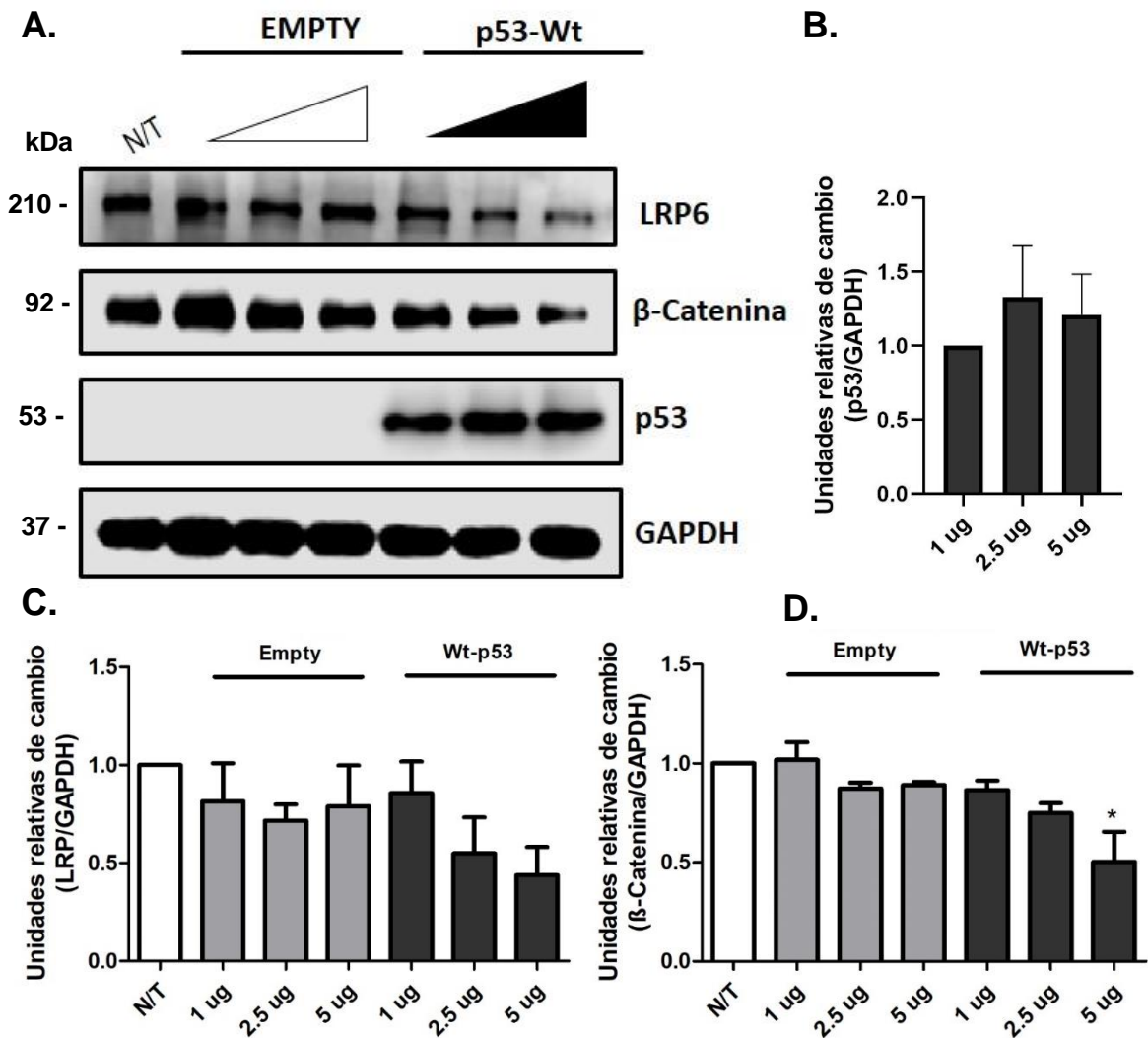


Figura 11. La sobreexpresión de p53-Wt ejerce una disminución de elementos regulatorios de la vía Wnt canónica. A. Western Blot representativo de las proteínas LRP6, β-Catenina y p53 evaluado 72 horas postransfección, como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. B-D. Densitometría de las proteínas p53, LRP6 y β-Catenina normalizando las unidades de cambio respecto al control no transfectado (N/T) y utilizando como control la proteína GAPDH. En los gráficos representados se observa la media ± D.E. (n=3), el análisis estadístico empleado consistió en una comparación de medias por t de student de cada concentración empleada (p53-Wt vs Empty). $p < 0.05$ fue considerado significativo (*).

De manera consistente, se evaluó el efecto ejercido sobre la viabilidad celular por el método de reducción de MTT, donde de manera consistente se observó menos viabilidad por parte de la sobreexpresión de p53-Wt evaluado posterior a 72 horas de transfección, el efecto de la transfección por si misma tiende a afectar la viabilidad celular ($p < 0.05$), por lo que la comparación incluida fue respecto al grupo Empty, mismo que tiende a mostrar niveles similares a p53-Mut, el hecho de que exista menor viabilidad por parte de p53-Wt es consistente con los efectos a los que generalmente se le asocia la presencia de p53, incluyendo disminución de la viabilidad celular, arresto del ciclo celular, apoptosis, etc. Con el objetivo de establecer el punto de tiempo en que se ejerce la disminución en los niveles totales de β -Catenina se realizó una comparación en dos puntos de tiempo distintos postransfección, 24 y 72 horas, donde se observa una reducción significativa en los niveles totales de β -Catenina a las 72 horas ($p < 0.05$), ya que a las 24 horas, los niveles son similares respecto al grupo Empty (72 horas) y al no transfectado es decir, esta reducción no parece ser inmediata (Figura 12C).

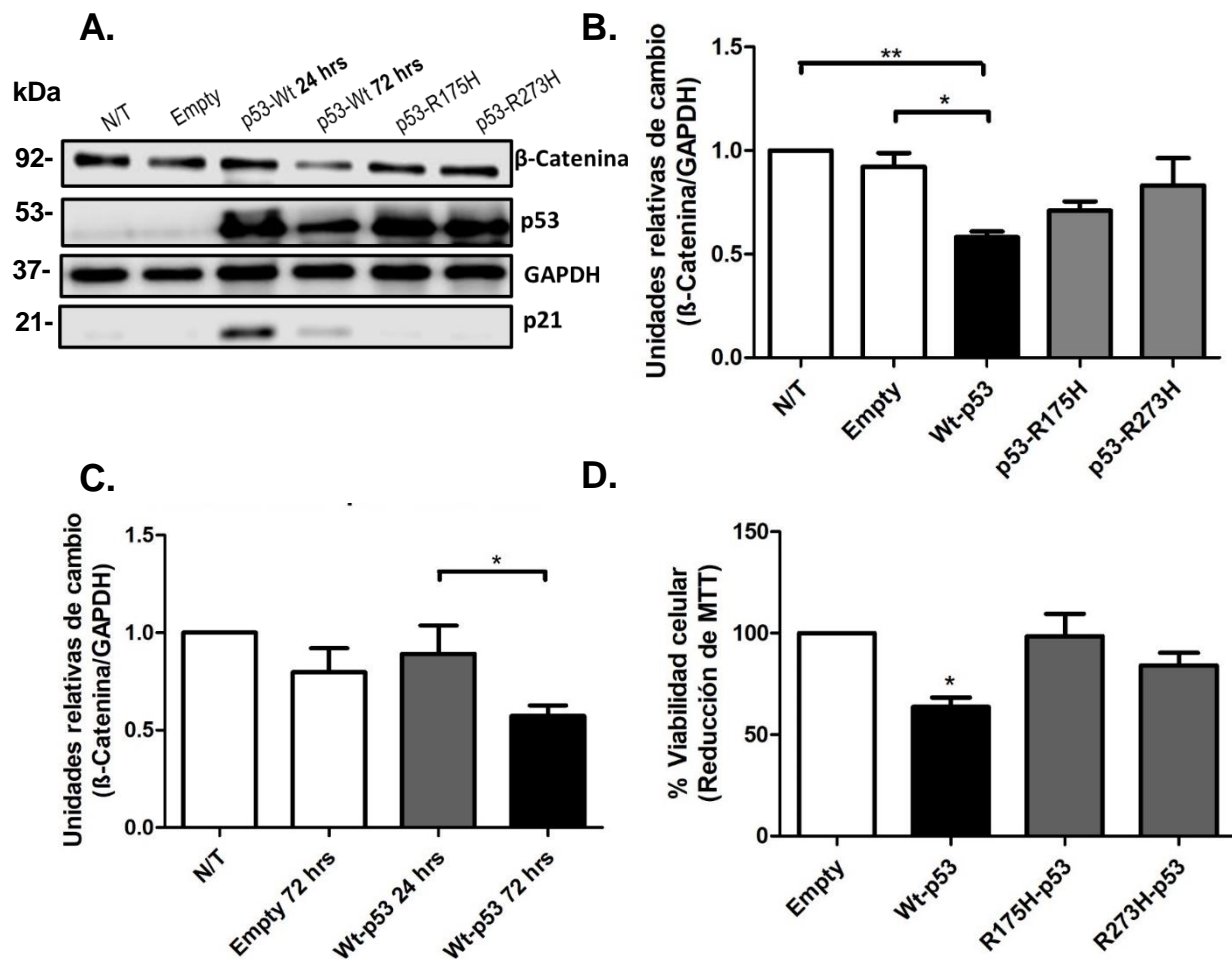


Figura 12. La versión p53-Wt pero no las versiones p53-Mut (p53-R175H y p53-R273H) reducen los niveles de cambio de elementos asociados a la activación canónica de la vía Wnt. **A.** Se observa el Western Blot representativo de las proteínas β -Catenina, p53 y p21 evaluadas 24 y 72 horas postransfección, como control de carga se utilizó la proteína GAPDH usando 5 μ g de plasmido para cada condición experimental. **B.** Densitometría de β -Catenina normalizando las unidades de cambio respecto al control no transfectado (N/T) y utilizando como control la proteína GAPDH. En el gráfico se observa la media \pm D.E. (n=5), el análisis estadístico empleado consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni. **C.** Densitometría comparativa del tiempo efectuado sobre β -Catenina normalizando las unidades de cambio respecto al control no transfectado (N/T) y utilizando como control la proteína GAPDH. En el gráfico representado se observa la media \pm D.E. (n=3), el análisis estadístico empleado consistió en una comparación de medias por t de student (p53-Wt 24 hrs vs p53-Wt 72 hrs). $p < 0.05$ fue considerado significativo (*). **D.** Gráfica que señala el efecto de Emp/p53-Wt/p53-Mut sobre la viabilidad celular evaluada por el método de reducción de MTT, se observa la media \pm D.E. (n=3), el análisis estadístico empleado consistió en un ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Dunnett. Valores de $p < 0.05$ fue considerado significativo (*) y $p < 0.01$ (**).

Posteriormente, con el objetivo de entender los mecanismos que nos permitan explicar la regulación negativa ejercida sobre la vía Wnt, se evaluó la expresión miRNA-34a, íntimamente señalado su desregulación con funciones supresoras de la proliferación celular. En primer lugar, se evaluó por PCR en tiempo real la expresión de miRNA-34a empleando como control la expresión endógena del microRNA U6, como constitutivo. Se empleó el método de cuantificación Δ Ct comparativo entre las condiciones experimentales no transfectado, Empty, p53-Wt, p53-R175H, p53-R273H. Pese a tratarse de una línea nula para p53, existen niveles endógenos de miRNA-34a cuya expresión podría explicarse por mecanismos independientes de p53, el efecto en estos niveles de expresión fue evaluado 72 horas postransfección (al igual que el efecto evaluado para proteínas) (Figura 13 A-B). Se observa que la versión p53-Wt incrementa de forma significativa los niveles de expresión de miRNA-34a, efecto no observado por parte de los grupos Empty, p53-R175H y en menor medida p53-R273H. Adicionalmente, se realizó una co-transfección de p53-Wt con un anti-miR34a empleado a una dosis de 200 nM, donde se observa que no se afecta la presencia en los niveles de expresión de este microRNA. Con el objetivo de evaluar si una co-transfección de p53-Wt y anti-miRNA34a restablece los niveles de β -Catenina y LRP6, se emplearon 2 concentraciones distintas de transfección de anti-miRNA34a (150 nM y 200 nM), donde se observa una tendencia a restablecer los niveles de LRP6 y β -Catenina,

este efecto no fue significativo con una $n=3$, por lo que son necesarios más ensayos para observar un efecto evidente en el análisis densitométrico, sin embargo es evidente el efecto ejercido sobre sus blancos, pese a que no se observan cambios en el microRNA. Asimismo, se observa que la co-transfección de p53-Wt+AntimiRNA no afecta los niveles de p53 (Figura 13D).

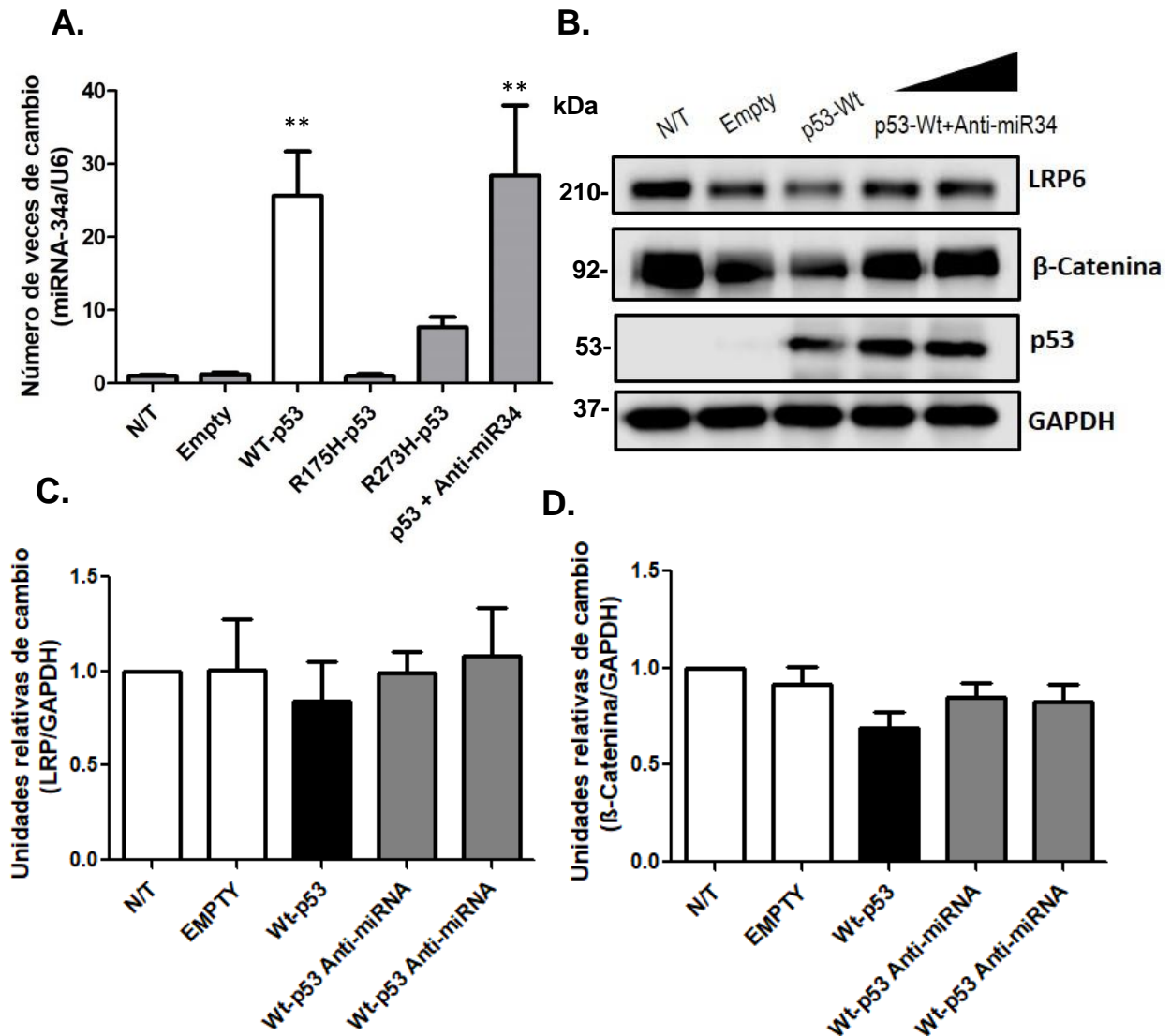
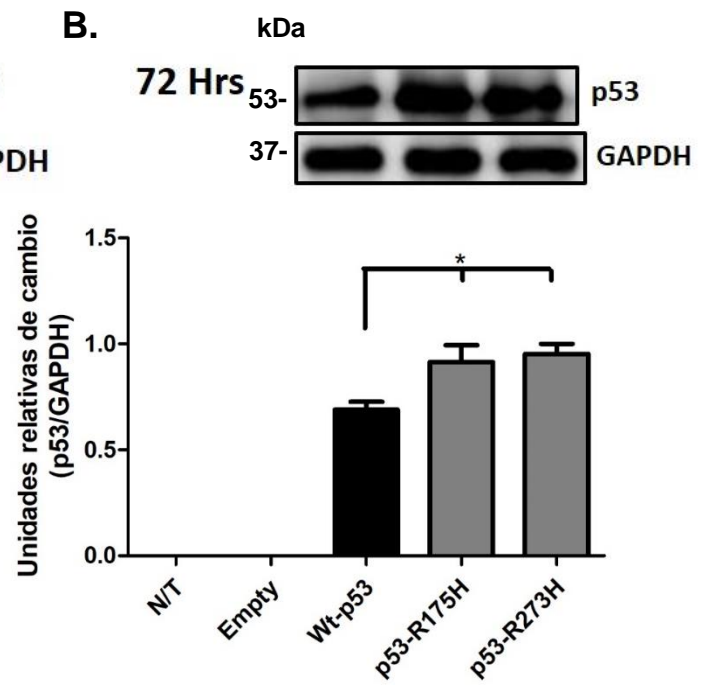
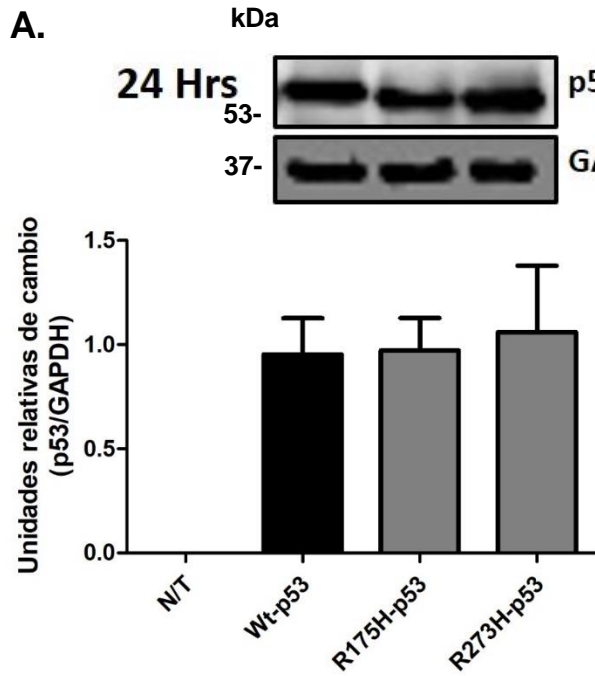


Figura 13. La presencia de p53-Wt ejerce una regulación negativa sobre LRP6 y β-Catenina a través del microRNA34a. A. Análisis del microRNA34a evaluado 72 horas postransfección de Empty, p53-Wt y p53-Mut, la gráfica señala el número de veces de cambio normalizado al grupo N/T, el microRNA U6 fue empleado como control constitutivo. B. Western Blot representativo de LRP6 y β-Catenina donde se analizan los grupos Empty, p53-Wt y una cotransfección p53-Wt+antimiRNA34a (150 nM y 200 nM). C-D. Análisis densitométrico de LRP6 y β-Catenina donde se grafican las unidades relativas de cambio normalizado respecto al grupo no transfectado ($n=3$).



C.

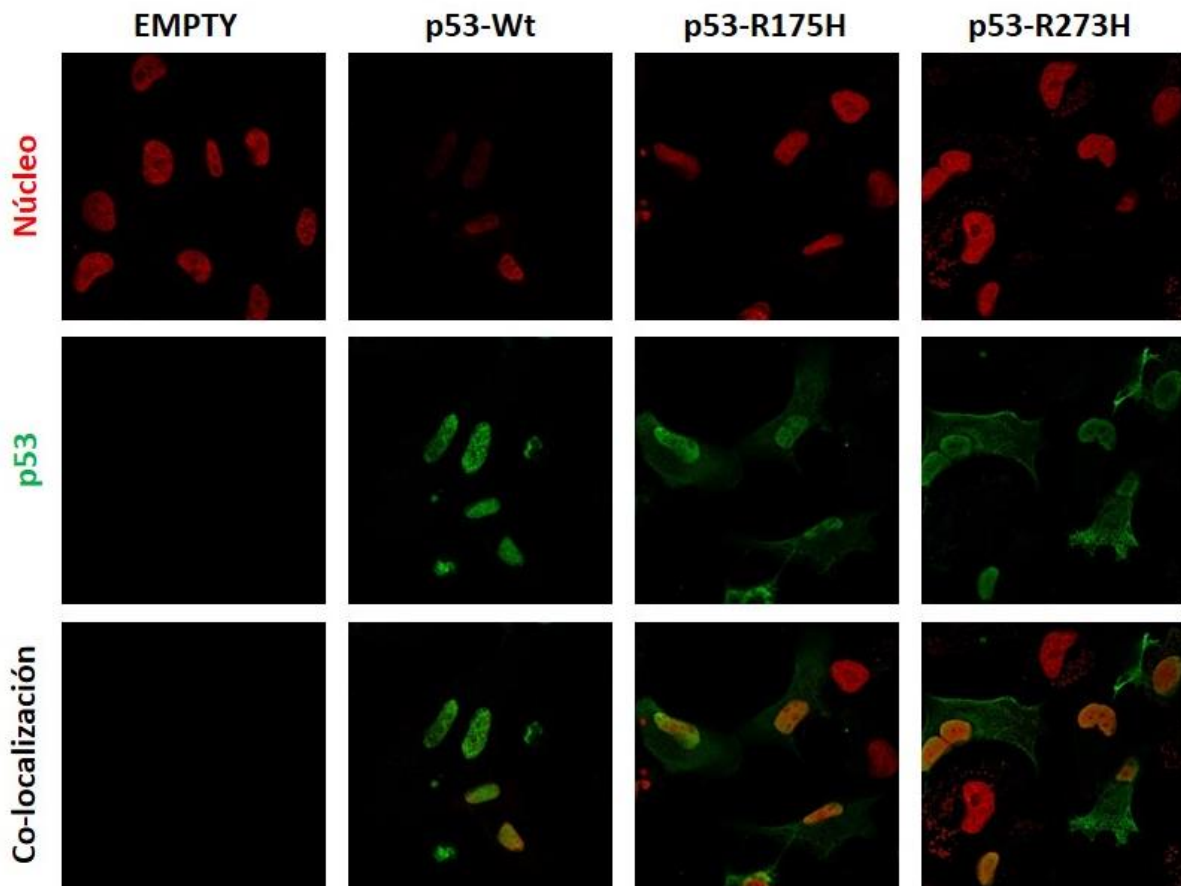


Figura 14. Existe mayor presencia de p53-Mut respecto a p53-Wt. A-B. Análisis densitométrico de p53-Wt y p53-Mut evaluada 24 y 72 horas postransfección donde se grafican las unidades relativas de cambio considerando como control de carga a la proteína GAPDH, se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet considerando como control al grupo p53-Wt, el valor $p < 0.05$ fue considerado significativo. C. Localización intracelular de p53-wt y p53-Mut evaluada por microscopia de fluorescencia en la línea celular H1299 72 horas postransfección, la tinción nuclear con IP se observa en rojo y p53 en verde.

Es importante recalcar que existen diferencias en los niveles evaluados de p53-Wt y p53-Mut al evaluar su efecto 72 horas postransfección. Con el objetivo de discernir entre los efectos ejercidos sobre la regulación canónica de la vía Wnt sea explicado por el efecto particular de la versión p53-Wt y no por la diferencia en sus niveles totales, se realizó un análisis de 2 diferentes puntos de tiempo, 24 y 72 horas postransfección.

En la figura 14 A-B se observa su comparación, misma que a las 24 horas muestran niveles similares en su presencia p53-Wt y p53-Mut, mientras que al evaluar su presencia 72 horas postransfección se muestra mayor estabilidad por parte de las versiones p53-Mut, mismas que fueron significativas ($p < 0.05$), lo que señala que muestran mayor estabilidad a través del tiempo. Adicionalmente, se realizó el análisis de su localización celular por inmunofluorescencia, donde de manera evidente se señala un efecto localizado en el núcleo, mientras que p53-Mut se encuentra tanto en núcleo como citoplasma (Figura 14C).

Participación de vía Wnt canónica en el modelo de monocapa vs esferas

Evaluamos el efecto de p53-Wt y p53-Mut en un modelo de estudio de generación de esferas en medio Mammocult, el cual es ampliamente reportado para el establecimiento de un fenotipo con características asociadas al “stemness”.

Como una primera aproximación para el estudio de la activación de la vía Wnt dependiente de β -Catenina, se realizó una comparación en los niveles totales de β -Catenina en el modelo de monocapa vs esferas, donde se observa una disminución que no fue significativa al realizar el análisis densitométrico en la presencia de β -Catenina en las esferas del día 3 y 5 de crecimiento. Adicionalmente, se analizó la presencia de la proteína p21 (blanco de p53), misma que está presente en el modelo de esferoides respecto a su monocapa, lo que apunta a que el modelo de generación de esferas incrementa su expresión de manera

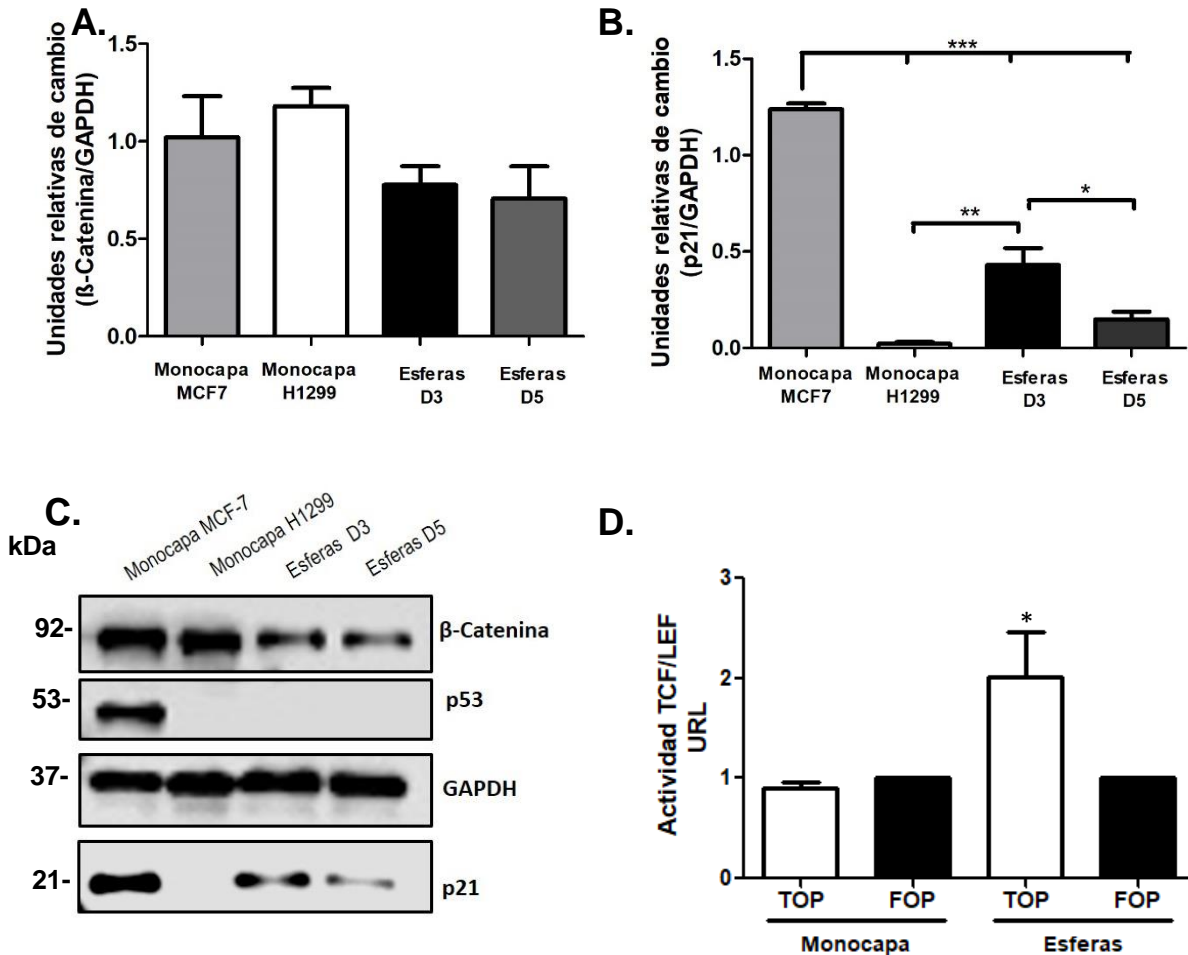


Figura 15. Presencia de elementos de regulación dependiente de β -Catenina en un modelo de monocapa y esferas. A-B. Análisis densitométrico de β -Catenina y p21 en el modelo de monocapa y esferas en dos puntos de tiempo distintos de crecimiento, día 3 y día 5, la línea celular MCF7 fue considerada como control de presencia de las proteínas p53 y p21, se grafican las unidades relativas de cambio considerando como control de carga a la proteína GAPDH, se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con post hoc de Bonferroni. C. Western Blot representativo de la presencia de β -Catenina, p53, p21 y GAPDH como control de carga. D. Se grafica la actividad luciferasa representada en las unidades relativas de luz en las condiciones de monocapa y esferas, el control Fop fue empleado como control negativo de actividad., se empleó una comparación de medias por t de student (TOP monocapa vs TOP esferas). $p < 0.05$ fue considerado significativo (*).

independiente de p53 ($p < 0.05$), sugiriendo la existencia de elementos que generan una disminución en su capacidad proliferativa, ya que p21 está implicada generar un arresto del ciclo celular. La línea celular MCF-7 (con estatus p53-Wt) fue empleado como control de p53 y p21 (Figura 14 A-C). Al evaluar la actividad transcripcional de β -Catenina mediante el reportero Top/Fop Flash, que posee los sitios de unión al factor de transcripción TCF/LEF

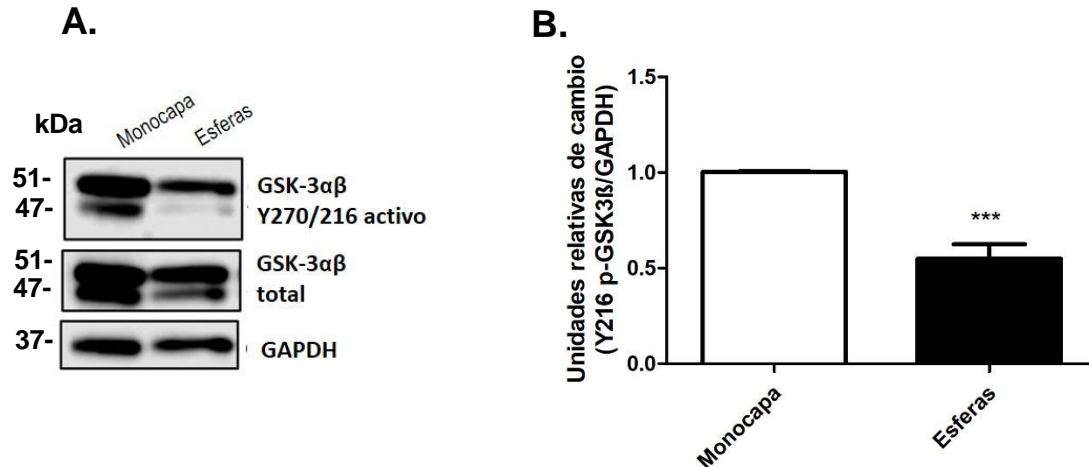


Figura 16. El modelo de esferoides posee bajos niveles de GSK3α/β Y270/216 activo. **A.** Western Blot representativo de la presencia de GSK3α/β Y270/216 activo, y GSK3α/β total, la proteína GAPDH fue utilizada como control de carga **B.** Análisis densitométrico de GSK3α/β Y270/216 activo, se grafican las unidades relativas de cambio considerando como control de carga a la proteína GAPDH, se empleó una comparación de medias por t de student (Monocapa vs Esferas), n=3. $p < 0.001$ (***)).

se observa un incremento en la actividad luciferasa, misma que fue significativa en el grupo de esferas respecto a la monocapa, el control Fop, que posee los sitios de unión TCF/LEF mutados, por lo que no incrementa su actividad en ambas condiciones. La actividad de β -Galactosidasa fue empleado como control de transfección normalizado en cada condición. En las gráficas se señala las unidades relativas de luz correspondiente a la actividad luciferasa (Figura 15C). Una de las enzimas involucradas en la regulación de β -Catenina es la enzima GSK3, misma que lleva a su hiperfosforilación y consecuente degradación al proteosoma. Determinamos tanto en el modelo de monocapa como de esferas la presencia de una forma activa de GSK3α/β Y270/216, estrechamente relacionada con la capacidad de reconocer sustratos previamente fosforilados sobre los cuales actúa. Observamos una marcada disminución en el modelo de esferas, tanto en su versión fosforilada α y β así como en sus niveles totales ($p < 0.001$), lo que es consistente con el efecto reflejado en el incremento en la actividad transcripcional dependiente de β -Catenina (Figura 16 A-B). Aunado a esto, se llevó a cabo la evaluación de células con alta actividad enzimática ALDH, el cual ha sido asociado con procesos como “stemness”, bajo pronóstico y alta capacidad proliferativa, así como bajo diferentes modelos se ha implicado su regulación como un blanco de actividad mediada por β -Catenina. Se observa que en el modelo de esferoides esta población celular con alta actividad se ve incrementada, sugiriendo la importancia en la activación ejercida bajo este tipo de modelo de estudio (Figura 17 A-B).

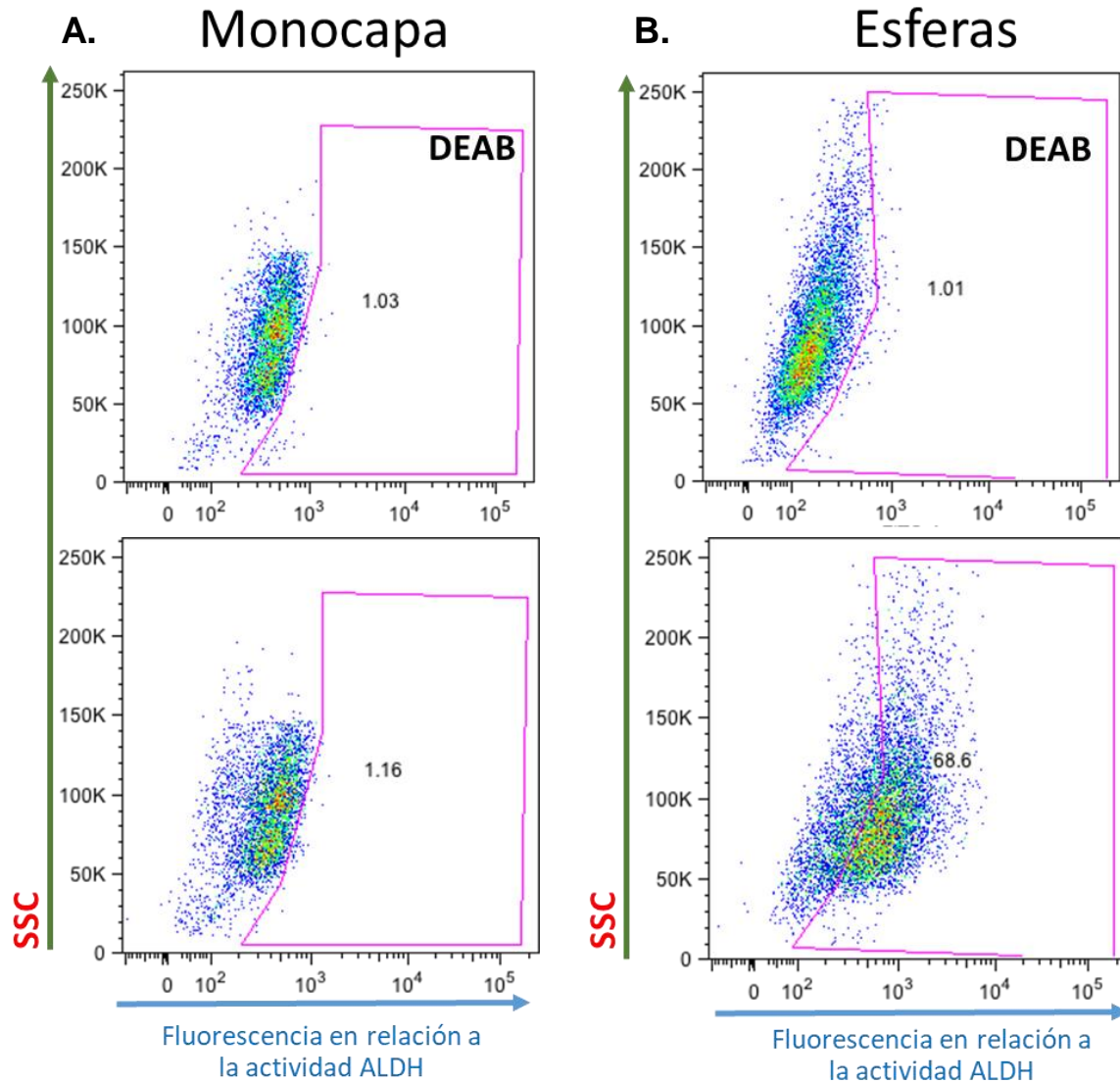


Figura 17. El modelo de esferoides posee alta actividad ALDH. A-B. Diagrama de comparación del modelo de monocapa vs cultivo de esferas evaluado por citometría de flujo. Se utilizó el inhibidor DEAB como control de fluorescencia basal de cada condición. Los valores en el diagrama representan las células con alta actividad ALDH. SSC. Dispersión lateral.

Efecto de p53-Wt y p53-Mut en el modelo de generación de esferas

Con el objetivo de evaluar el posible efecto de p53-Wt y p53-Mut sobre elementos regulatorios de la vía Wnt canónica, se realizó la transfección de células en monocapa, las cuales a partir de esta transfección fueron realizados los ensayos convencionales de generación de esferas a una densidad de 8000 células/mL usando el medio comercial

Mammocult. En primer lugar, se observó su efecto en el tamaño de las esferas generadas en aquellas condiciones donde las células fueron transfectadas, estas muestran un promedio menor en su tamaño respecto a la condición no transfectada, en el caso de aquellas que sobreexpresan p53-Wt, su tamaño se ve reducido de manera significativa respecto a las condiciones Empty, p53-R175H y p53-R273H ($p < 0.001$). Para propósito del presente ensayo, se considera esfera a aquellas generadas con un tamaño superior a 50 μm (Figura 18 A-B).

Posteriormente, se evaluó al día 3 de cultivo la presencia de p53 y β -Catenina por Western Blot. La presencia de p53 fue corroborada, misma que muestra una presencia mayor en el caso p53-Mut respecto a p53-Wt, este efecto no fue significativo, sin embargo, apuntan a una estabilidad mayor por parte de p53-Mut, un efecto similar a lo observado en monocapa. En el caso de la evaluación de los niveles totales de β -Catenina, no existen cambios

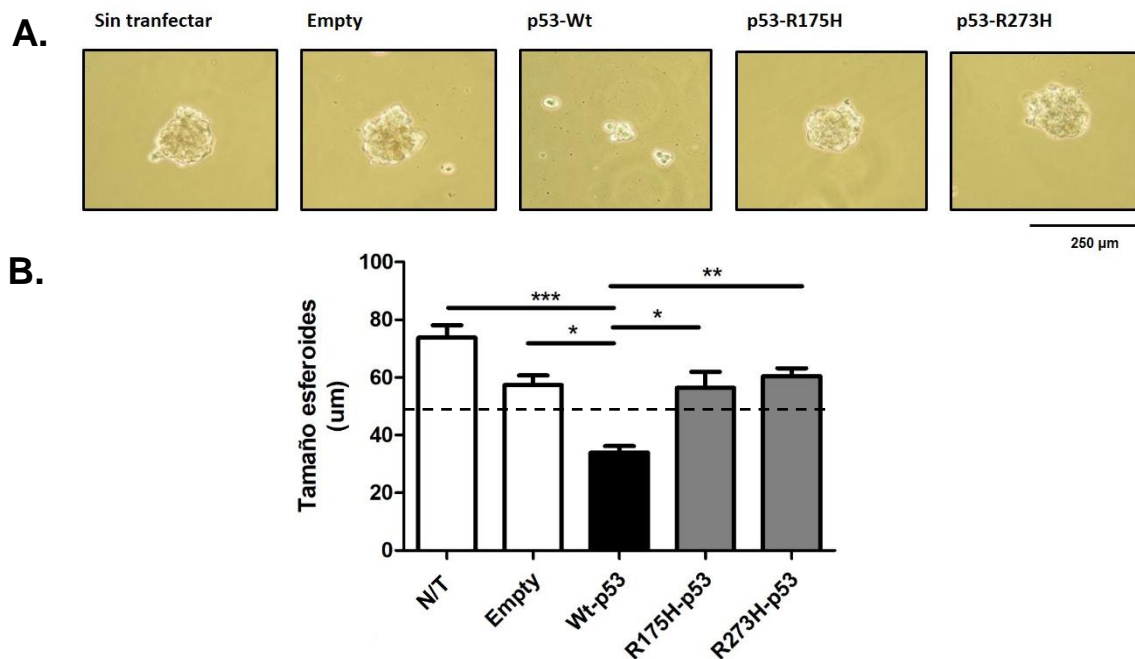


Figura 18. La proteína p53-Wt reduce la capacidad de formar esferas.

A. Imagen representativa de las esferas generadas a partir de células transfectadas p53-Wt y p53-Mut (R175H y R273H), el grupo Empty es considerado como control. **B.** Grafica del tamaño de esferas generadas en las diferentes condiciones experimentales Empty, p53-Wt, y p53-Mut (R175H y R273H), la condición no transfectada (N/T) representa el grupo no transfectado, se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con post hoc de Bonferroni. La línea punteada representa el promedio mínimo necesario para que se considere esfera. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***).

significativos entre las condiciones experimentales como consecuencia de la sobreexpresión de p53-Wt y p53-Mut (Figura 19 A-C).

Con el propósito de entender el efecto de p53-Wt y p53-Mut sobre elementos de regulación de β -Catenina, nos interesamos en estudiar el efecto ejercido sobre la forma activa no fosforilada de β -Catenina, así como en el estado de regulación de p-GSK3 β ser9, cuya versión está asociada a un estado inactivo de esta enzima. Siendo esta enzima un punto de regulación importante al favorecer el estado hiperfosforilado de β -Catenina, es un elemento de regulación clave ya que su inactivación por fosforilación se relaciona con el estado de activación de β -Catenina y su translocación nuclear.

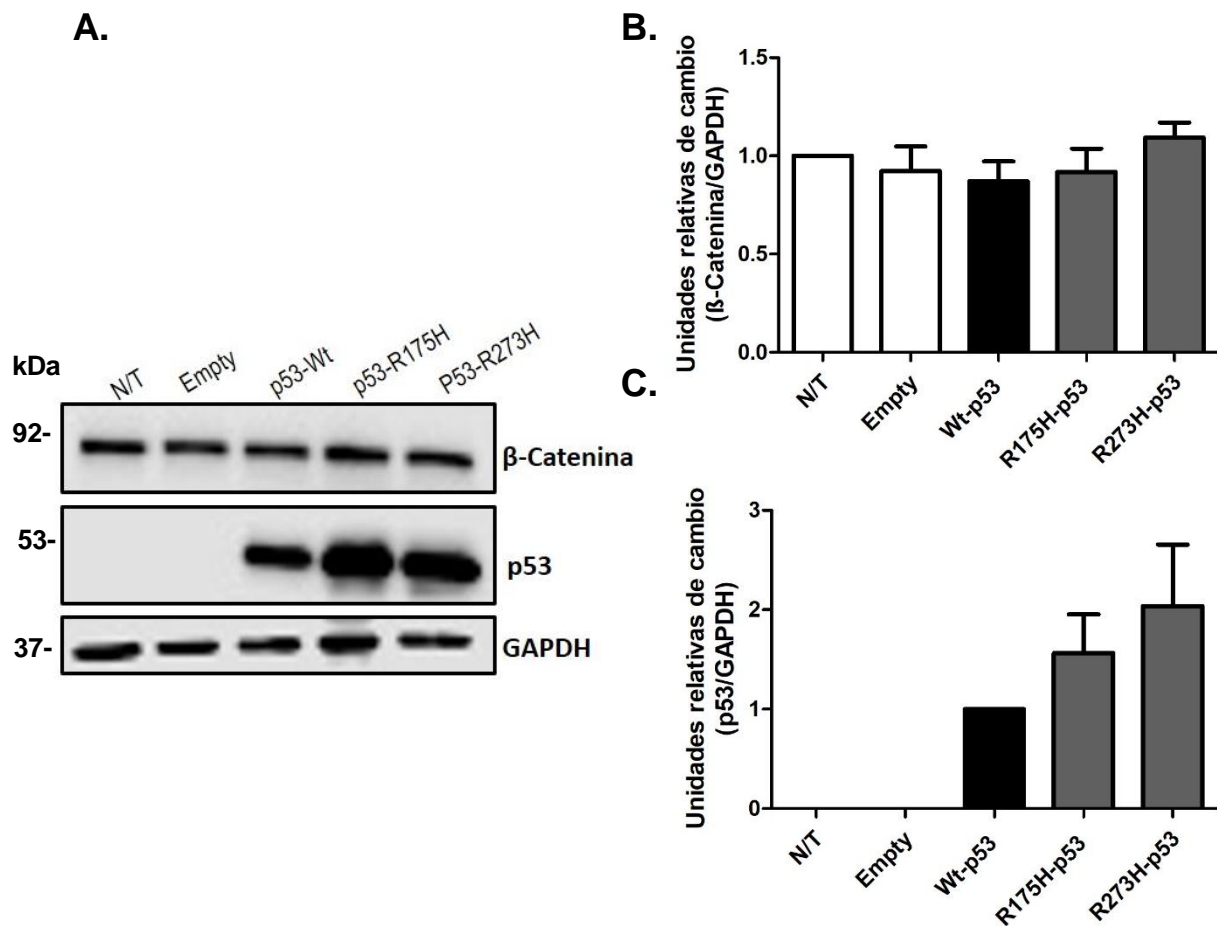


Figura 19. Presencia de p53-Wt y p53-Mut en el modelo de generación de esferas. **A.** Western Blot representativo de la presencia de β -Catenina y p53, la proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. **B-C.** Análisis densitométrico de β -Catenina y p53, se grafican las unidades relativas de cambio considerando como control de carga a la proteína GAPDH. Los valores fueron normalizados respecto a los grupos no transfectedo y p53-Wt para β -Catenina y p53 respectivamente.

p53-Mut ejerce un efecto de ganancia de función a través de la vía PI3K/AKT.

Como parte del análisis de estas proteínas, en la imagen representativa del ensayo realizado por Western Blot se observa una disminución en los niveles de la forma activa no fosforilada de β -Catenina en aquellas células que expresan la versión p53-Wt (datos preliminares). Las versiones p53-R175H y p53-R273H muestran niveles similares en su presencia respecto al control Empty ya que no muestran cambios significativos entre los grupos. De manera interesante, cuando se analizó la presencia de p-GSK3 β ser9, esta incrementó de manera significativa respecto al control Empty, sugiriendo de manera interesante una ganancia de función favorecida por la presencia de p53-Mut (Figura 20 A).

Asimismo, es de hacer notar que se observan bajas unidades de cambio en el grupo Empty, lo cual apunta a una baja inactivación basal de GSK3 β (Figura 20 A). Existen diferentes elementos que llevan a la inactivación de GSK3 β , las funciones de esta enzima son múltiples, por lo que es un punto de convergencia de diferentes vías de señalización implicadas en proliferación celular. Su inactivación resulta un elemento importante para promover la activación de diferentes vías de señalización. Una de las proteínas mejor descritas en este proceso es AKT. Dado que se observa una presencia de p-GSK3 β , nos propusimos identificar si esta inactivación se contrasta con la presencia de p-AKT ser473 así como en sus niveles totales. La presencia de p53-Mut no tiene efectos claros en los niveles de p-AKT ser473, pero si se observan cambios en AKT total normalizando respecto a su control de carga GAPDH (Figura 20 B). Esto podría explicar, en parte la presencia de la forma inactiva de GSK3 β observada en el modelo de generación de esferas. Los resultados apuntan a una posible ganancia de función reflejada en la inactivación de GSK3 β por su fosforilación en serina 9. Para explicar si este mecanismo es regulado por la vía PI3K/AKT, se llevó a cabo un tratamiento con wortmanina, un inhibidor de la vía PI3K/AKT. El efecto de este tratamiento reduce de manera importante la presencia de p-AKT ser473 ($p < 0.01$), sin embargo, este efecto es más notorio en el caso de p53-Mut (p53-R175H y p53-R273H) ($p < 0.001$). Esto apunta a que la presencia de p-AKT en estos casos es predominantemente regulado por a sobreactivación de receptores asociados a factores de crecimiento que a través de la vía PI3K/AKT explicaría la presencia activa de AKT en el caso de p53-Mut. Además, el efecto de la inhibición del eje PI3K/AKT llevó a la reducción de la presencia de p-GSK3 β ser9, por lo que permite comprobar que la ganancia de función en la que participa p53-Mut se correlaciona con la presencia de la activación de AKT en este tipo de modelo (Figura 21 A-B).

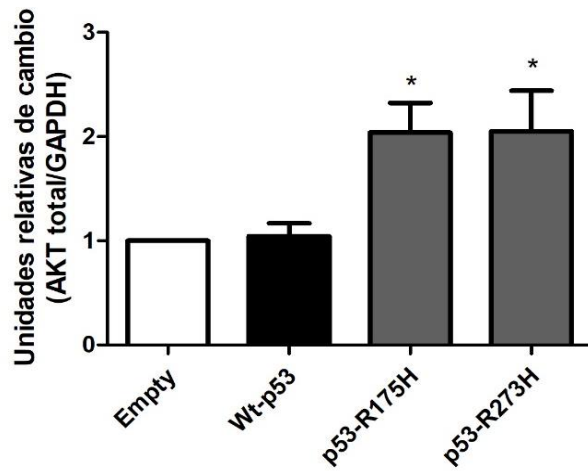
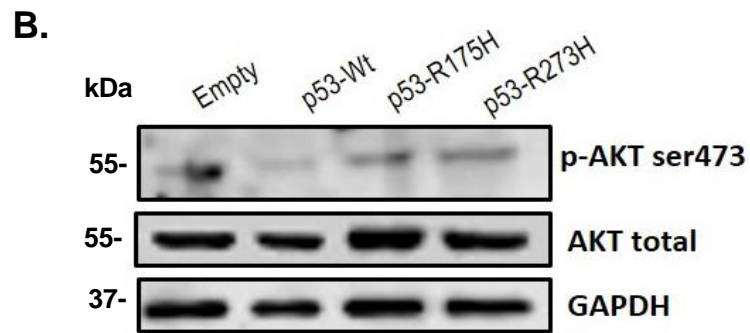
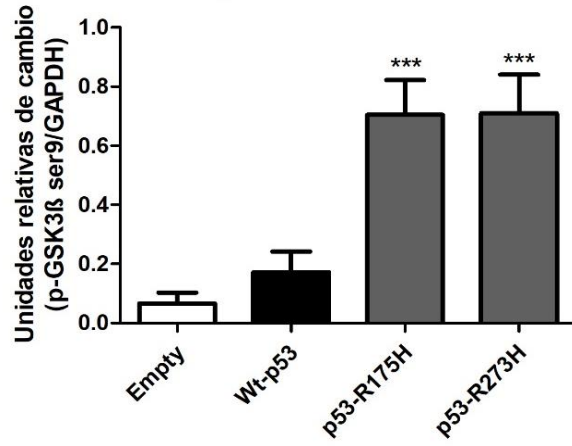
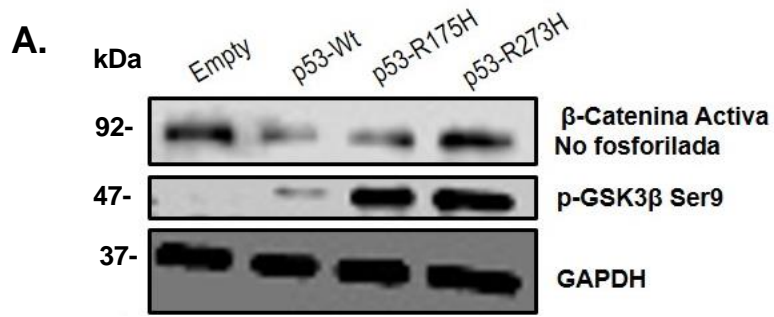


Figura 20. La presencia de p53-Mut en esferas incrementa la inactivación de GSK3 β . **A.** Gráfica y western blot representativo de p-GSK3 β y β -Catenina no fosforilada, la proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. **B.** Gráfica y western blot representativo de p-AKT ser473 y AKT total, la proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. En el análisis densitométrico de las gráficas se observan las unidades relativas de cambio normalizando respecto al grupo Empty, n=5. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con post hoc de Dunnett considerando como control al grupo Empty, el valor $p < 0.05$ fue considerado significativo $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

Como parte del análisis de estas proteínas, en la imagen representativa del ensayo realizado por Western Blot se observa una disminución en los niveles de la forma activa no fosforilada de β -Catenina en aquellas células que expresan la versión p53-Wt. Las versiones p53-R175H y p53-R273H muestra niveles similares en su presencia respecto al control Empty ya que no muestran cambios significativos entre los grupos. De manera interesante, cuando se analizó la presencia de p-GSK3 β ser9, esta incrementó de manera significativa respecto al control Empty, sugiriendo de manera interesante una ganancia de función favorecida por la presencia de p53-Mut.

Asimismo, es de hacer notar que se observan bajas unidades de cambio en el grupo Empty, lo cual apunta a una baja inactivación basal de GSK3 β (Figura 20 A). Existen diferentes elementos que llevan a la inactivación de GSK3 β , las funciones de esta enzima son múltiples, por lo que es un punto de convergencia de diferentes vías de señalización implicadas en proliferación celular. Su inactivación resulta un elemento importante para promover la activación de diferentes vías de señalización. Una de las proteínas mejor descritas en este proceso es AKT. Dado que se observa una presencia de p-GSK3 β , nos propusimos identificar si esta inactivación se contrasta con la presencia de p-AKT ser473 así como en sus niveles totales. La presencia de p53-Mut no tiene efectos claros en los niveles de p-AKT ser473, pero si se observan cambios en AKT total normalizando respecto a su control de carga GAPDH (Figura 20 B). Esto podría explicar, en parte la presencia de la forma inactiva de GSK3 β . Los resultados apuntan a una posible ganancia de función reflejada en la inactivación de GSK3 β por su fosforilación en serina 9, para explicar si este mecanismo es regulado por la vía PI3K/AKT, se llevó a cabo un tratamiento con wortmanina, un inhibidor de la vía PI3K/AKT. El efecto de este tratamiento reduce de manera importante la presencia de p-AKT ser473 ($p < 0.01$), sin embargo, este efecto es más notorio en el caso de p53-Mut (p53-R175H y p53-R273H) ($p < 0.001$). Esto apunta a

que la presencia de p-AKT en estos casos es predominantemente regulado por a sobreactivación de receptores asociados a factores de crecimiento que a través de la vía PI3K/AKT explicaría la presencia activa de AKT en el caso de p53-Mut. Además, el efecto de la inhibición del eje PI3K/AKT llevó a la reducción de la presencia de p-GSK3 β ser9, por lo que permite comprobar que la ganancia de función en la que participa p53-Mut se correlaciona con la presencia de la activación de AKT en este tipo de modelo (Figura 21 A-B).

Los resultados apuntan a la sobreactivación de vías oncogénicas como parte de la presencia de p53-Mut, mismas que se reflejan al menos en p-GSK3 β ser9. Sin embargo, queda por definirse si esta presencia en este modelo experimental lleva a promover procesos implicados en el incremento de la capacidad proliferativa o bien el incremento de la supervivencia celular. La activación de la vía PI3K/AKT tiene funciones importantes en promover la progresión del ciclo celular, síntesis de proteínas y en el favorecer mecanismos que lleven a cabo las señales de construcción necesarias que intrínsecamente las células necesitan en este proceso. Actualmente, se ha definido que la activación de la macroautofagia (referido en adelante como autofagia) como un proceso catabólico en que se degradan macromoléculas vía lisosoma con el propósito de mantener la homeostasis celular. La generación de estos productos de degradación (nucleótidos, ácidos grasos y aminoácidos) constituyen las bases de construcción que promueven señales anabólicas necesarias para favorecer este proceso constante de proliferación.

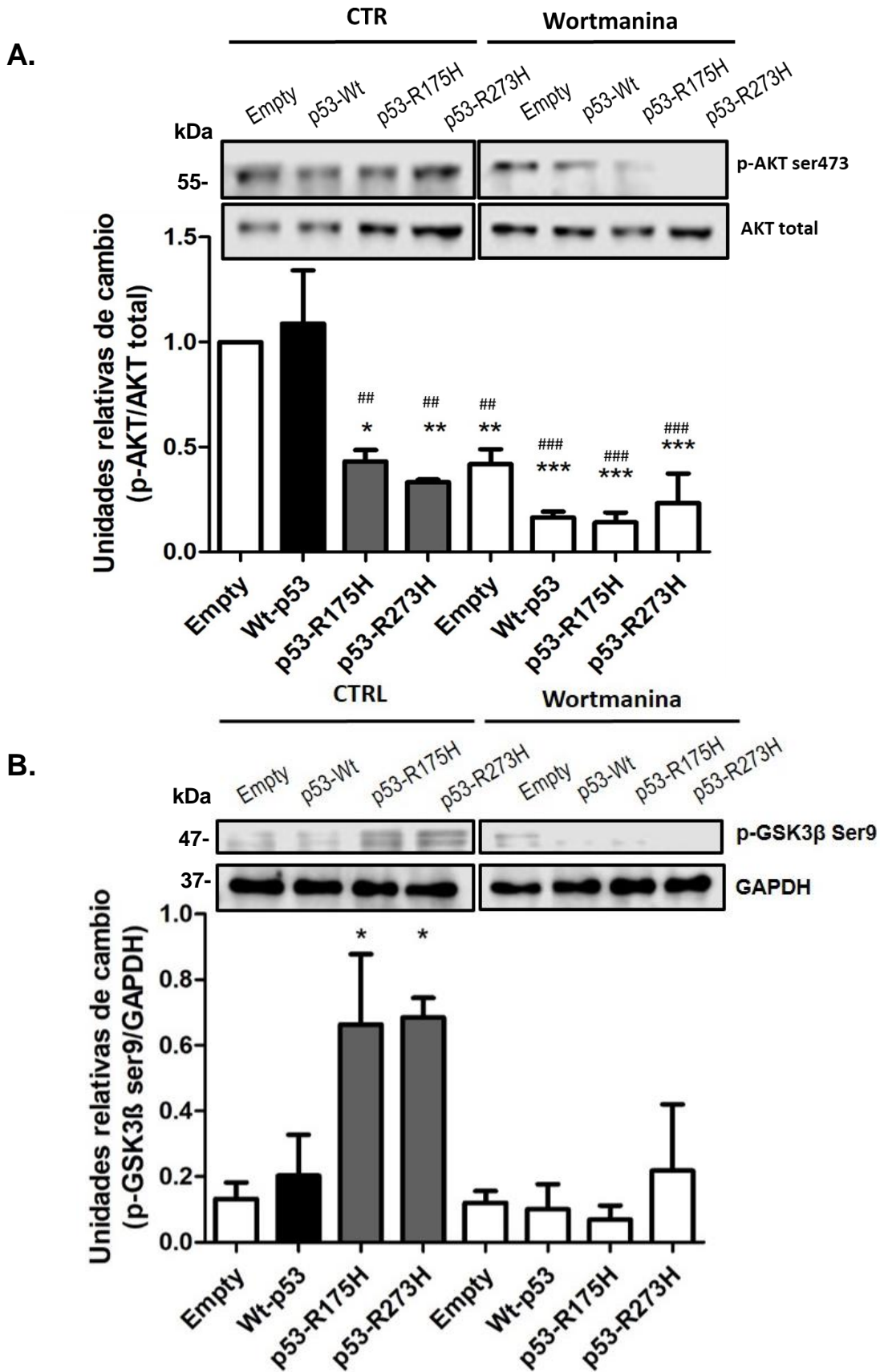


Figura 21. La presencia de p53-Mut favorece la inactivación de GSK3 β a través de la vía PI3K/AKT. A. Gráfica y western blot representativo de p-AKTser473 en condiciones Empty, p53-Wt, p53-Mut y su tratamiento con 150 nM de wortmanina, la proteína GAPDH fue utilizada como control. **B.** Gráfica y western blot representativo de p-GSK3 β ser9 en condiciones Empty, p53-Wt, p53-Mut y su tratamiento con 150 nM de wortmanina. En el análisis densitométrico de las gráficas se observa el cociente de las unidades relativas de cambio de la proteína de interés y el control de carga GAPDH. n=3. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet considerando como control al grupo Empty. p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***), en el caso de # se refiere a la comparación con el grupo p53-Wt.

Con el objetivo de obtener una aproximación en nuestro modelo que permita definir el efecto ejercido sobre la autofagia como parte de la sobreexpresión de p53-Wt y p53-Mut, se evaluaron las proteínas p62/SQSTM1 y la escisión de LC3 (referido como LC3-I y LC3-II), ambas utilizadas ampliamente para monitorear el proceso de autofagia.

Observamos que como parte de la presencia de p53-Mut se ejerce un incremento en las proteínas p62, así como en la presencia de LC3 respecto a las condiciones p53-Wt y Empty, la presencia de LC3, fue reducida como parte del tratamiento con wortmanina (Figura 22). Estos resultados apuntan a que el incremento en la vía PI3K/AKT dado por la presencia de p53-Mut podría ejercer procesos implicados en incremento de la autofagia basal como un posible mecanismo asociado a supervivencia.

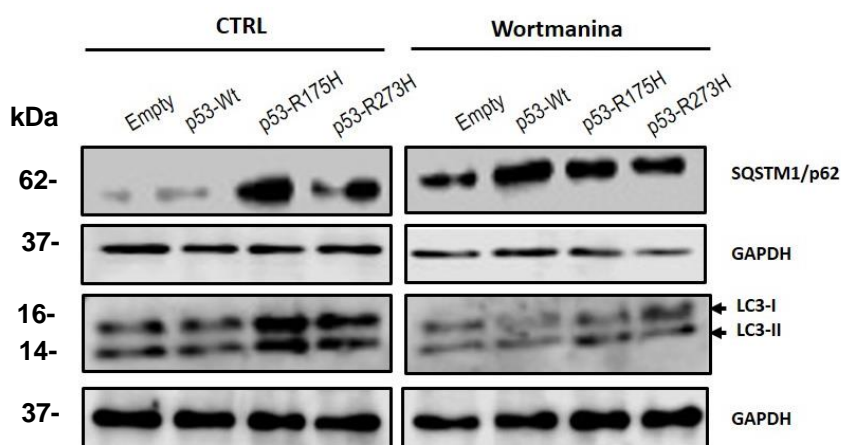


Figura 22. La presencia de p53-Mut incrementa la presencia de proteínas involucradas en el establecimiento de autofagia. A. Western Blot de un solo ensayo de las proteínas p62/SQSTM1 y de LC3-I y LC3-II es esferas trasfectadas con Empty, p53-Wt y p53-Mut (p53-R175H y p53-R273H). La proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. n=2

DISCUSIÓN

Regulación de la vía Wnt canónica por p53

Partiendo de la importancia de la vía Wnt en la regulación de la homeostasis celular, en una primera aproximación decidimos explorar el efecto que tiene p53-Wt en concentraciones crecientes sobre elementos de la vía Wnt canónica, particularmente β -Catenina y la proteína LRP6 (co-receptor del ligando Wnt). Actualmente se ha definido que los elementos que llevan a determinar el mecanismo de activación dependiente de β -Catenina es la fosforilación de la cola citoplasmática del co-receptor LRP6 (MacDonald y He, 2012). A partir de esta modificación, las proteínas accesorias que generalmente llevan a degradar a β -Catenina son reclutadas a la membrana celular, por lo que este complejo de degradación se disocia. Los resultados obtenidos señalan una disminución importante en los niveles totales de β -Catenina y LRP6 como consecuencia de la sobreexpresión de p53-Wt, lo que apunta a una regulación negativa por parte de p53-Wt sobre la vía canónica. Este efecto no es ejercido por parte de p53-Mut (p53-R175H/p53-R273H). Estos resultados son consistentes con la capacidad supresora tumoral de p53-Wt, misma que se contrasta con la viabilidad celular, ya que al regular negativamente la vía Wnt canónica, podría constituir un punto de control importante para evitar su sobreactivación ante vías oncogénicas.

Nuestros resultados señalan al micro-RNA34a como un elemento importante que lleva a la supresión de la vía Wnt canónica, ya que parece disminuir los niveles totales de β -Catenina y LRP6. En concordancia con los experimentos de diferenciación celular asociado a p53-Wt, es bien sabido que la vía Wnt canónica lleva además de la proliferación celular al establecimiento indiferenciado de las células. Funcionalmente, la vía Wnt canónica dependiente de β -Catenina se ha evaluado en ensayos de duplicación del eje embrionario, donde la estimulación de la vía Wnt canónica en el polo contrario al centro organizador de Spemann (ventral) genera células indiferenciadas que pueden llevar a la formación de un nuevo eje. De manera particular, se ha establecido que la capacidad de promoverse este proceso de diferenciación depende de p53 y su efecto ejercido sobre miR-34a, así la vía Wnt canónica se reprime y promueve la diferenciación celular. En este sentido, diferentes elementos como TCF/LEF4, Wnt1, Wnt3, LRP6 y β -Catenina poseen en sus segmentos UTR 3' sitios de unión a miR-34a (N. H. Kim et al., 2011). Este mecanismo destaca que el miR-34a no sólo resulta ser un blanco adicional de p53 al igual que los ya conocidos

implicados en supresión y arresto celular, sino que gran parte del establecimiento indiferenciado radica en su falta de capacidad de ser regulado por p53.

En diversos estudios han señalado que en muestras de tejido de cáncer como mama, glioblastoma o colon existe una subexpresión de miR-34a, esto se correlaciona con una sobreactividad de vías de señalización como Wnt y Notch (Li et al., 2017; Liu et al., 2017; Yin et al., 2013). Por ejemplo, se ha señalado de manera particular que en las células de la base de la cripta del colon existe una división celular asimétrica que determina procesos que implican diferenciación celular, aquellas células donde miR34a se silencia, se incrementa la capacidad de autorrenovación de células cancerosas con características de troncalidad (Bu et al., 2013b, p. 34, 2016). Este mecanismo en el cual miR-34a está involucrado dicta la represión de vías de señalización asociadas con el establecimiento desdiferenciado de las células.

Estos resultados, en acorde a lo reportado en diferentes estudios destacan la capacidad supresora tumoral de p53, en este caso sobre la vía de señalización Wnt canónica evaluada sobre LRP6 y β -Catenina, sin embargo, deben tomarse en cuenta diferentes puntos de control. Si bien, se comprueba por la co-tranfección de p53-Wt y anti-miR-34a que existe una regulación negativa de p53-Wt sobre estos dos elementos, aún queda por definir si parte de las funciones canónicas en las cuales p53-Wt está involucrado dependen de la presencia de este micro-RNA, ya que los estudios de embriogénesis definen que la diferenciación del mesodermo no puede llevarse a cabo si no se poseen los sitios de unión al miR-34a, aun cuando p53 está presente, esto resulta interesante por definir ya que p53-Wt en conjunto con los factores de transcripción Smad, pueden promover la expresión de genes blanco implicados en diferenciación celular, incluyendo p21 (Cordenonsi et al., 2007). De manera similar a la embriogénesis, en nichos particulares de condiciones no cancerosas como la cripta del colon, las vías Wnt canónica (presente en las células troncales de la base) y TGF- β ejercen efectos opuestos, por lo que p53 puede jugar un papel clave en la activación y supresión de estas vías implicadas en el establecimiento desdiferenciado. En cáncer, existen hits oncogénicos que promueven la progresión maligna, uno de ellos es la pérdida de la funcionalidad de p53, de esta manera al perderse esta capacidad supresora de la proliferación su ausencia podría ser determinante y explicaría en parte, la razón por la cual la vía Wnt tiene una participación preponderante en diferentes tipos de modelos experimentales (Nakayama y Oshima, 2019).

Sin embargo, en diferentes tipos de cáncer se sabe que la vía Wnt está desregulada, particularmente en colon el supresor tumoral APC (Poliposis coli adenomatosa) se encuentra mutado, esta proteína forma parte del complejo de degradación de β -Catenina lo que lleva a la sobreactivación de la vía Wnt canónica (Gaspar y Fodde, 2004a; Powell et al., 1992). Particularmente, este es uno de los genes más frecuentemente mutados en pacientes con este tipo de cáncer (54% aproximadamente) (Gaspar y Fodde, 2004b). Posteriormente, se adquieren otras mutaciones como *KRAS*, *SMAD4* y *TP53*, si bien en este punto p53 resulta importante en la progresión oncogénica, en lo que respecta a su funcionalidad, queda por definir si la capacidad regulatoria y supresora tumoral de miR-34a sería suficiente para contrarrestar los efectos de aquellas mutaciones que promueven la activación constitutiva de la vía Wnt.

Modelo de monocapa vs esferas

El efecto de la sobreexpresión p53-Wt y p53-Mut fue extrapolado a un modelo de generación de esferas. Los resultados obtenidos en la comparación de los niveles totales de β -Catenina resultan en una disminución de su promedio de cambio en el modelo de esferas respecto a la monocapa. Esto resulta en un punto interesante, ya que actualmente se ha definido que la comparación de los niveles totales de β -Catenina no es necesariamente un sinónimo de su actividad. Bajo esta premisa, los elementos que podrían llevar a esta disminución podrían explicarse en dos niveles. En primer lugar, la regulación del transcrito de β -Catenina ya que, si bien se trata de una proteína constitutiva, los cambios generados podrían explicarse desde aquellos elementos que regulan su expresión constitutiva. En segundo lugar, se encuentran las modificaciones postraduccionales que regulan su estabilidad. En condiciones adherentes β -Catenina y su interacción con α -Catenina y E-Cadherina promueven la adhesión célula-célula, sin embargo, al tratarse de un modelo en suspensión existe una pérdida de la polaridad celular que llevaría a su degradación proteosomal o bien a favorecer su actividad como co-activador transcripcional, lo que podría explicar el incremento en la actividad transcripcional de los TCF/LEF evaluado mediante el reportero (Mosimann et al., 2009). En esto último, existen modificaciones postraduccionales directas que regulan la estabilidad de β -Catenina en el residuo de ser552, siendo en este caso regulado por AKT o bien en ser675 llevada a cabo por PKA (Fang et al., 2007).

El empleo del modelo de esferas a través el uso del medio comercial Mammocult ha sido ampliamente utilizado para enriquecer a células con características de troncalidad,

asociando su actividad con vías de señalización asociadas un fenotipo maligno (Hassan et al., 2013). De manera interesante, en el modelo de generación de esferas se observa la presencia de p21, el cual es regulado de manera independiente de p53. Estos resultados apuntan a que la tasa de proliferación entre una condición y otra es distinta, además de la presencia de elementos que llevan y explican la expresión de p21, entre estos podría apuntar a la vía de TGF- β . Se ha reportado que esta expresión podría ser regulada por el señalamiento canónico de esta vía, el cual a través de los factores p-Smad3/5 contribuirían a la expresión de genes asociados a la supresión de la proliferación, entre ellos p27 o p21. Sin embargo, debe tomarse con precaución sobre la posible participación de TGF- β en este modelo, ya que las respuestas biológicas asociadas a su activación son duales en lo que respecta a condiciones cancerosas y no cancerosas (Adorno et al., 2009; Brown et al., 2017; Budi et al., 2017).

Adicionalmente, se evaluó en ambos modelos una forma activa fosforilada de GSK3 α/β en el residuo de tirosina 270/216. Esta se trata de una forma autofosforilada que reconoce sustratos previamente fosforilados para así, promover las fosforilaciones secuenciales que regulan su actividad, entre ellos a β -Catenina (Beurel et al., 2015). En los resultados se observa una disminución en esta forma activa y total de GSK3 α/β . Esto en parte podría explicar el incremento en la actividad transcripcional observada sobre los factores TCF/LEF. Si bien, estos resultados no reflejan directamente que la actividad sea explicada por señales Wnt, apuntan a que en el modelo de esferas existe un incremento en la actividad transcripcional de β -Catenina.

El estudio de la enzima GSK3 α/β es de particular importancia en cáncer, ya que constituye un punto de regulación importante de diferentes vías de señalización por sus modificaciones postraduccionales que regulan su actividad. Las señales Wnt, por los mecanismos previamente descritos apuntan a que su efecto principal no es limitado a β -Catenina, sino a la inactivación de GSK3 β . Esta inactivación radica en el reclutamiento de GSK3 α/β en cuerpos multivesiculares para así evitar la acción sobre sus sustratos, este efecto parece ser observado a partir de 20 minutos después de la estimulación con señales Wnt (Taelman et al., 2010). Pese a la importancia de este mecanismo, existen señales mediadas por factores de crecimiento que favorecen la inactivación de GSK3 β y cuyas consecuencias radican en el incremento de la actividad transcripcional mediada por β -Catenina, por lo que no debe excluirse la posibilidad de que elementos adicionales como aquellos regulados a través de receptores tipo tirosina cinasa podrían participar regulando la actividad de GSK3 β

(Fuentealba et al., 2007). En estos resultados, la disminución p-GSK3 α / β Y270/216 podría implicar la promoción de vías de señalización dependientes de esta enzima, entre ellas aquellas asociadas al proceso indiferenciado y de autorrenovación. Sin embargo, queda por definir las vías y mecanismos presentes en este tipo de modelo experimental.

Adicionalmente, se observó que en el modelo de generación de esferas existe un incremento de células con alta actividad ALDH. Las proteínas ALDH constituyen una familia de enzimas que convierten aldehídos endógenos y exógenos a ácidos carboxílicos. Esto podría indicar procesos asociados a la detoxificación y quimioresistencia presentes en este tipo de modelo experimental, sin embargo, no está bien definido los mecanismos que regulan esta actividad (Toledo-Guzmán et al., 2019).

Efecto de p53-Mut en el modelo de generación de esferas

En este trabajo se realizaron ensayos de sobreexpresión de p53-Wt y p53-Mut observando su efecto en el modelo de generación de esferas. En el modelo de monocapa al igual que en la generación de esferas, se observa una mayor presencia de p53-Mut respecto a la versión p53-Wt. Esto apunta a una mayor estabilidad temporal por parte de las versiones mutadas de p53. Es necesario recalcar que la vida media de p53 es corta (20 minutos), es bien conocido que su estabilidad se ve regida por la interacción con la proteína MDM2, que es una ligasa de ubiquitina que lleva a degradar a p53. Esta interacción se lleva a cabo en el dominio de transactivación en la región N-terminal, sin embargo esto no se observa en mutaciones presentes en el dominio de unión al DNA (Freed-Pastor y Prives, 2012).

En nuestros resultados no se observa un efecto claro sobre los niveles de β -Catenina total, a diferencia de lo observado en el modelo de monocapa. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el estudio de sus niveles totales no es reflejo de su actividad. Además, la expresión de β -Catenina es constitutiva, por lo que, pese a que puede existir la regulación negativa sobre elementos de la vía Wnt canónica, sus efectos no podrían ser totalmente reflejados en sus niveles totales. Debe tomarse en consideración que los efectos observados en el modelo de esferas son 72 horas después de haber sido sembradas. Además, la presencia de p21 en caso de la monocapa mostró niveles mayores a las 24 horas respecto a las 72 horas postrafeción, lo que indica que pese que se observa la presencia proteica de p53, la regulación de sus blancos transcripcionales tiende a reducirse. Esto podría explicar la ausencia de efecto sobre los niveles totales de β -Catenina.

Se decidió usar un anticuerpo que detecta una forma activa (no fosforilada) de β -Catenina así como su efecto ejercido sobre GSK3 β . En los resultados se observa una menor

presencia de la forma activa de β -Catenina en aquellas que expresan p53-Wt que son acordes a la regulación negativa de la vía Wnt y que refuerzan su capacidad de actuar como supresor tumoral. De manera interesante, la presencia de p53-Mut en nuestras condiciones genera una ganancia de función que recae en promover la inactivación de GSK3 β por su fosforilación en la ser9. Es bien sabido que este residuo fosforilado lleva a su inactivación, mismo que en diferentes reportes se asocia con el incremento en la actividad transcripcional mediada por β -Catenina. Es necesario hacer notar que la actividad de esta enzima es constitutiva, la regulación de sus sustratos dependerá de sus modificaciones postraduccionales. A través de su fosforilación en ser9 de GSK3 β se puede ejercer su inactivación. Se han identificado diferentes mecanismos que pueden promover este efecto, las cuales son activadas como consecuencia de la presencia de factores de crecimiento, entre ellas se encuentra CaMKII, PKA y la vía PI3K/AKT (Beurel et al., 2015; Fang et al., 2007; Song et al., 2010).

Asimismo, se observa que esta ganancia de función en la cual p53-Mut es participe radica en favorecer la sobreactivación de la vía PI3K/AKT, ya que la inhibición de este eje reduce de manera importante p-GSK3 β ser9. Lo que apunta a que la presencia de p53-Mut favorece mecanismos independientes de Wnt que llevan a inactivar a GSK3 β . Este es un elemento importante a tomar en cuenta, porque es bien conocido que las señales Wnt y el mecanismo ejercido a través del receptor Fzd, LRP6 y su señalización consecuente no lleva a inactivar a GSK3 β por fosforilación en ser9. Además, actualmente se sabe que a pesar de que GSK3 β regula, en diferentes niveles la activación de vías de señalización implicadas en promover proliferación celular, es bien conocido que las señales Wnt únicamente inactivan a GSK3 β unida a la proteína adaptadora Axina2 (Dajani, 2003; McManus et al., 2005).

En los análisis mostrados en este trabajo no se observa un incremento evidente en p-AKT ser473, a pesar de que se observa p-GSK3 β ser9, sin embargo, incrementan los niveles totales de AKT. Existen de dos sitios fosforilados de AKT que regulan su actividad, p-AKT ser473 y p-AKT thr308. La regulación ejercida por factores de crecimiento vía RTK ejerce un efecto directo sobre p-AKT thr308, por lo que para entender si existe una regulación directa sobre receptores RTK sería necesario considerar esta fosforilación. Pese a esta discrepancia, la inhibición del eje PI3K/AKT permite explicar la ganancia de función ejercida por p53-Mut (Abraham y O'Neill, 2014).

Los mecanismos en que p53-Mut pueden ejercer una ganancia de función son una interrogante y podrían actuar a varios niveles. Aquellos que podrían explicar la activación del eje PI3K/AKT/GSK3- β radican en que la presencia de mutantes de p53 favorecen la movilización de receptores a factores de crecimiento a la membrana. Además, se ha estudiado de p53-Mut (p53-R273H) regula negativamente a miR27, el cual es un regulador negativo de EGFR (W. Wang et al., 2013). Lo que podría explicar una mayor capacidad responsiva sobre EGF. Asimismo, la distribución de receptores se ha visto potenciada en aquellos tumores con p53-Mut (Muller et al., 2009).

Los presentes resultados apuntan a la existencia de una ganancia de función comprobado en la activación de la vía PI3K/AKT, sin embargo y en concordancia a lo que se ha señalado en diferentes trabajos no debe omitirse la participación del incremento de otras vías asociadas a proliferación y particularmente a aquellas cuyo efecto radique la inactivación de GSK3 β , ya que la inhibición de PI3K realizada en este trabajo no excluye la posibilidad de generar efectos inespecíficos sobre otras enzimas que regulen la actividad de GSK3 β .

Finalmente, observamos que p53-Mut incrementa los niveles de p62 así como de la proteína LC3. Estas proteínas están implicadas en el establecimiento de autofagia, actualmente se sabe que la autofagia es un proceso catabólico en que se degradan macromoléculas y organelos en el lisosoma con el propósito de promover la adaptación a condiciones microambientales como el estrés. El rol de la autofagia es complejo ya que se ha reportado que gran parte de los procesos dinámicos de proliferación celular requieren de la autofagia con un mecanismo protumorigénico y de supervivencia (Yang et al., 2017). Se evaluó p62/SQTM1, la cual es una proteína de andamiaje necesaria para la formación del autofagosoma, en nuestros resultados se observa su incremento en la condición que sobreexpresa p53-Mut, se sabe que esta proteína es degradada como parte del proceso de autofagia, lo que podría apuntar a un posible incremento de autofagia basal. Este efecto se contrasta con LC3, el cual es un marcador biológico que constituye la membrana autofagosomal, en la degradación LC3-I se conjuga con la fosfatidiletanolamina y forma LC3-II, de tal manera que el ratio LC3-II/LC3-I se asocia con el aumento en la autofagia (Santana-Codina et al., 2017).

En los resultados se observa que basalmente existe LC3-II/LC3-I, lo que sugiere que en el modelo de esferas existe una autofagia basal reflejada en la escisión de esta proteína, la presencia de p53-Mut aumenta los niveles de LC3, apuntando al incremento basal de la autofagia coincidiendo con p62, sin embargo visualmente existe menor nivel de LC3-II en

el caso de p53-Mut, lo que apunta a que los mecanismos asociados a promover proliferación asociados a la pérdida en la funcionalidad de p53 reprimen el establecimiento de autofagia, siendo concordantes con p62 ya que esta proteína es blanco de degradación por autofagia (Bellot et al., 2009). Este efecto parece depender de la ganancia de función de p53 ejercida sobre la vía PI3K/AKT. Esto último resulta interesante por describir, ya que los mecanismos que involucran una proliferación sostenida requieren de la evaluación del status energético para que se promueva la progresión en el ciclo celular, esto implica evaluación del ratio ATP/AMP, disponibilidad de oxígeno, disponibilidad de aminoácidos, etc. (Bar-Peled y Sabatini, 2014).

CONCLUSIÓN

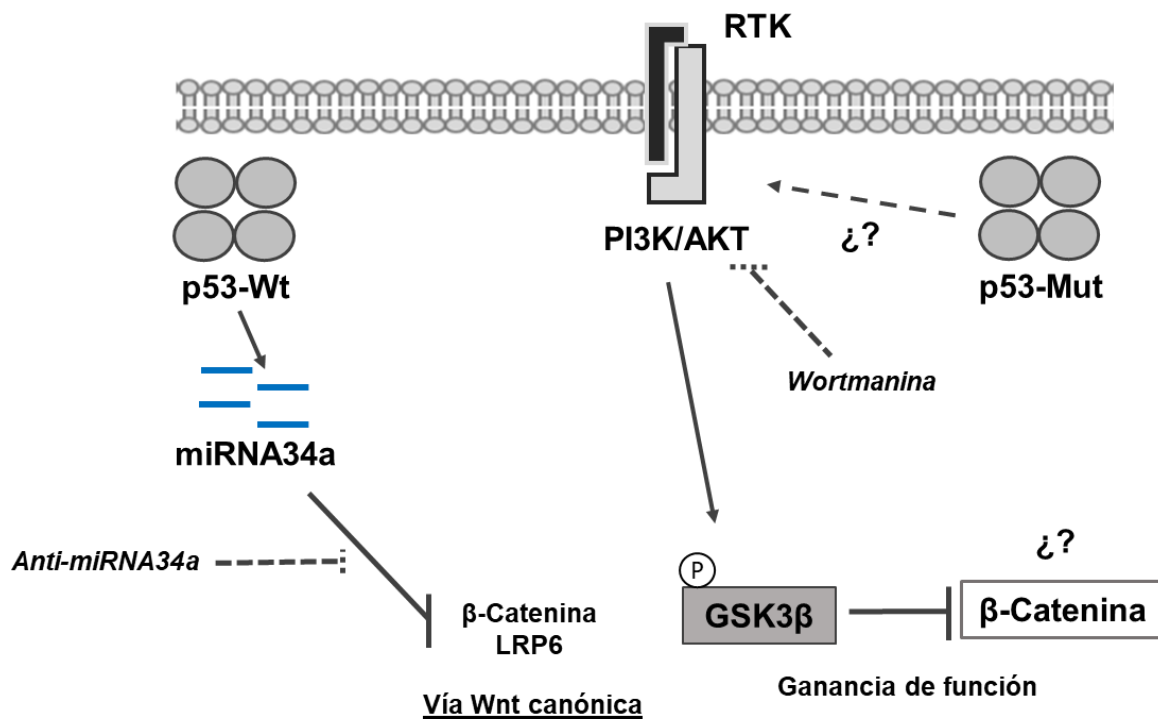


Figura 23. Esquema general del efecto de p53 en la regulación de la vía Wnt. Las flechas indican el efecto ejercido como parte de la expresión p53-Wt y p53-Mut. En cursiva se señalan los efectos ejercidos por el Anti-miRNA34a y el inhibidor de PI3K wortmanina. Los resultados apuntan a una regulación negativa ejercida por p53-Wt sobre elementos de la vía canónica Wnt, β-catenina y LRP6 mientras que p53-Mut favorece la inactivación de GSK3-β a través de la vía de PI3K/AKT.

El entendimiento de los mecanismos que rigen la activación de la vía Wnt canónica fue uno de los objetivos del presente trabajo, la funcionalidad de p53 constituye un punto importante para regular su activación.

- La proteína p53 genera una regulación negativa sobre elementos que forman parte de la activación canónica de la vía Wnt, como β -Catenina y el co-receptor LRP6. Este efecto es regulado por el micro-RNA34a y de una manera específica por p53-Wt, ya que p53-Mut no genera ejerce esta regulación negativa.

- Se observa una mayor presencia de p53-Mut, apuntando a una mayor estabilidad respecto a la versión p53-Wt.

- El modelo de generación de esferas muestra elementos asociados a la activación canónica de la vía Wnt, entre ellos una disminución de la fosforilación activadora de GSK3 β (Y216) y un aumento en la actividad transcripcional mediada por β -Catenina.

- La versión p53-Wt reduce la capacidad de generar esferas.

- La presencia de p53-Mut lleva a una ganancia de función reflejada en la inactivación de GSK3 β por su incremento en la fosforilación en ser9, este efecto depende de la vía PI3K/AKT demostrado a través de la inhibición farmacológica de esta vía.

En conjunto, estos resultados destacan la importancia del estudio de p53 y su funcionalidad en la regulación de vías de señalización asociadas a la proliferación y supervivencia celular.

PERSPECTIVAS

Pese a que los resultados evidencian la importancia del estudio de la funcionalidad de p53 en la regulación de vías de señalización, existen diferentes elementos por tomar en consideración:

A) Comprobar la especificidad del mecanismo de la vía Wnt dependiente de β -Catenina en el modelo de generación de esferas, corroborando no sólo su localización y presencia nuclear. Para ello el empleo de células estables con el reportero de TCF/LEF permitiría definir de manera fehaciente la actividad ejercida de β -Catenina.

B) Analizar si las funciones canónicas como apoptosis o arresto celular en que p53-Wt está involucrado dependen del efecto ejercido por miR-34a. Para ello es necesario analizar blancos transcripcionales asociados a su actividad.

- C) Definir si la ganancia de función ejercida sobre p-GSK3 β ser9 se correlaciona con el incremento en la actividad transcripcional ejercida por β -Catenina.
- D) Explicar los mecanismos en que p53-Mut podría explicar en el presente modelo la activación de la vía PI3K/AKT, así como definir temporalmente el punto de tiempo en que se llevaría a cabo la inactivación de GSK3 β .
- E) Determinar si la presencia de p53-Mut tiene un efecto funcional en la capacidad proliferativa, supervivencia o resistencia a muerte celular por apoptosis.
- F) Estudiar si p53-Mut podría ser un elemento importante en el establecimiento de un fenotipo troncal-tumoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, A. G., & O'Neill, E. (2014). PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 798-803. <https://doi.org/10.1042/BST20140070>
- Acebron, S. P., Karaulanov, E., Berger, B. S., Huang, Y.-L., & Niehrs, C. (2014). Mitotic Wnt Signaling Promotes Protein Stabilization and Regulates Cell Size. *Molecular Cell*, 54(4), 663-674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.014>
- Acebron, S. P., & Niehrs, C. (2016). β -Catenin-Independent Roles of Wnt/LRP6 Signaling. *Trends in Cell Biology*, 26(12), 956-967. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.009>
- Adorno, M., Cordenonsi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M. B., Guzzardo, V., Parenti, A. R., Rosato, A., Biciato, S., Balmain, A., & Piccolo, S. (2009). A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGF β -induced metastasis. *Cell*, 137(1), 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.039>
- Amelio, I., Mancini, M., Petrova, V., Cairns, R. A., Vikhрева, P., Nicolai, S., Marini, A., Antonov, A. A., Le Quesne, J., Baena Acevedo, J. D., Dudek, K., Sozzi, G., Pastorino, U., Knight, R. A., Mak, T. W., & Melino, G. (2018). P53 mutants cooperate with HIF-1 in transcriptional regulation of extracellular matrix components to promote tumor progression. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 115(46), E10869-E10878.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1808314115>

Bai, L., & Zhu, W.-G. (2006). p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J Cancer Mol.*

2(4) 141-153.

Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in Cell*

Biology, 24(7), 400-406. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.003>

Batlle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 23(10), 1124-1134.

<https://doi.org/10.1038/nm.4409>

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M.

(2009). Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor

Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Molecular and Cellular Biology*,

29(10), 2570-2581. <https://doi.org/10.1128/MCB.00166-09>

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N. C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., &

Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell*,

126(1), 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>

Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation,

actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 114-131.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>

Bilic, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., & Niehrs, C. (2007).

Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6

Phosphorylation. *Science*, 316(5831), 1619-1622.

<https://doi.org/10.1126/science.1137065>

Boveri, T. (2008). Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science*, 121(Supplement 1), 1-84.

<https://doi.org/10.1242/jcs.025742>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Brown, J. A., Yonekubo, Y., Hanson, N., Sastre-Perona, A., Basin, A., Rytlewski, J. A., Dolgalev, I., Meehan, S., Tsigos, A., Beronja, S., & Schober, M. (2017). TGF- β -Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell*, 21(5), 650-664.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.10.001>

Bu, P., Chen, K.-Y., Chen, J. H., Wang, L., Walters, J., Shin, Y. J., Goerger, J. P., Sun, J., Witherspoon, M., Rakhilin, N., Li, J., Yang, H., Milsom, J., Lee, S., Zipfel, W., Jin, M. M., Gümüş, Z. H., Lipkin, S. M., & Shen, X. (2013a). A microRNA miR-34a-Regulated Bimodal Switch Targets Notch in Colon Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 12(5), 602-615.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.002>

Bu, P., Chen, K.-Y., Chen, J. H., Wang, L., Walters, J., Shin, Y. J., Goerger, J. P., Sun, J., Witherspoon, M., Rakhilin, N., Li, J., Yang, H., Milsom, J., Lee, S., Zipfel, W., Jin, M. M., Gümüş, Z. H., Lipkin, S. M., & Shen, X. (2013b). A microRNA miR-34a-Regulated Bimodal Switch Targets Notch in Colon Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 12(5), 602-615.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.002>

Bu, P., Wang, L., Chen, K.-Y., Srinivasan, T., Murthy, P. K. L., Tung, K.-L., Varanko, A. K., Chen, H. J., Ai, Y., King, S., Lipkin, S. M., & Shen, X. (2016). A miR-34a-Numb Feedforward Loop

- Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell*, 18(2), 189-202. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.006>
- Budi, E. H., Duan, D., & Derynck, R. (2017). Transforming Growth Factor- β Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends in Cell Biology*, 27(9), 658-672. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.04.005>
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Clevers, H. (2016). Cancer therapy: Defining stemness. *Nature*.534,176–177(2016) <https://doi.org/10.1038/534176a>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Cordani, M., Oppici, E., Dando, I., Butturini, E., Dalla Pozza, E., Nadal-Serrano, M., Oliver, J., Roca, P., Mariotto, S., Cellini, B., Blandino, G., Palmieri, M., Di Agostino, S., & Donadelli, M. (2016). Mutant p53 proteins counteract autophagic mechanism sensitizing cancer cells to mTOR inhibition. *Molecular Oncology*, 10(7), 1008-1029. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.001>
- Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Insinga, A., Imbriano, C., & Piccolo, S. (2003). Links between tumor suppressors: P53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell*, 113(3), 301-314. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00308-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00308-8)
- Cordenonsi, M., Montagner, M., Adorno, M., Zacchigna, L., Martello, G., Mamidi, A., Soligo, S., Dupont, S., & Piccolo, S. (2007). Integration of TGF- β and Ras/MAPK Signaling Through p53 Phosphorylation. *Science*, 315(5813), 840-843. <https://doi.org/10.1126/science.1135961>
- Cruciat, C.-M. (2014). Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 31, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.08.003>

- Dajani, R. (2003). Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *The EMBO Journal*, 22(3), 494-501.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg068>
- Demagny, H., Araki, T., & De Robertis, E. M. (2014). The Tumor Suppressor Smad4/DPC4 Is Regulated by Phosphorylations that Integrate FGF, Wnt, and TGF- β Signaling. *Cell Reports*, 9(2), 688-700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.020>
- Demagny, H., & De Robertis, E. M. (2016). Point mutations in the tumor suppressor Smad4/DPC4 enhance its phosphorylation by GSK3 and reversibly inactivate TGF- β signaling. *Molecular & Cellular Oncology*, 3(1), e1025181. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1025181>
- De Robertis, E. M., & Ploper, D. (2015). Sperm Motility Requires Wnt/GSK3 Stabilization of Proteins. *Developmental Cell*, 35(4), 401-402.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.11.009>
- Edwards, PAM (1999). The Impact of Developmental Biology on Cancer Research: An Overview. 6. *Cancer and Metastasis Reviews*.18, 175–180.
- Escoll, M., Gargini, R., Cuadrado, A., Anton, I. M., & Wandosell, F. (2017). Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ. *Oncogene*, 36(25), 3515-3527. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.518>
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., & Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-Catenin by AKT Promotes β -Catenin Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11221-11229.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M611871200>
- Faux, M., Coates, J., Catimel, B., Cody, S., Clayton, A., Layton, M., & Burgess, A. (s. f.). *Recruitment of adenomatous polyposis coli and b-catenin to axin-puncta*. 13.

- Freed-Pastor, W. A., & Prives, C. (2012). Mutant p53: One name, many proteins. *Genes & Development*, 26(12), 1268-1286. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>
- Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M., & De Robertis, E. M. (2007). Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal. *Cell*, 131(5), 980-993. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.027>
- Gaspar, C., & Fodde, R. (2004a). APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), 377–386.
- Gaspar, C., & Fodde, R. (2004b). APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), 377-386. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041807cg>
- Global Initiative for Cancer Registry Development. International Agency for Research on Cancer. <https://gicr.iarc.fr/>
- Green, J., Nusse, R., & van Amerongen, R. (2014). The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009175>
- Guo, X., Ramirez, A., Waddell, D. S., Li, Z., Liu, X., & Wang, X.-F. (2008). Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling. *Genes & Development*, 22(1), 106-120. <https://doi.org/10.1101/gad.1590908>
- Gwak, J., Cho, M., Gong, S.-J., Won, J., Kim, D.-E., Kim, E.-Y., Lee, S. S., Kim, M., Kim, T. K., Shin, J.-G., & Oh, S. (2006). Protein-kinase-C-mediated β -catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Cell Science*, 119(22), 4702-4709. <https://doi.org/10.1242/jcs.03256>

- Hammond, E. M., Dorie, M. J., & Giaccia, A. J. (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12207-12213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212360200>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hassan, K. A., Wang, L., Korkaya, H., Chen, G., Maillard, I., Beer, D. G., Kalemkerian, G. P., & Wicha, M. S. (2013). Notch Pathway Activity Identifies Cells with Cancer Stem Cell-like Properties and Correlates with Worse Survival in Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 1972-1980. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0370>
- Hernández-Reséndiz, I., Gallardo-Pérez, J. C., López-Macay, A., Robledo-Cadena, D. X., García-Villa, E., Gariglio, P., Saavedra, E., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Enríquez, S. (2019). Mutant p53^{R248Q} downregulates oxidative phosphorylation and upregulates glycolysis under normoxia and hypoxia in human cervix cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5524-5536. <https://doi.org/10.1002/jcp.27354>
- Hernández-Reséndiz, I., Román-Rosales, A., García-Villa, E., López-Macay, A., Pineda, E., Saavedra, E., Gallardo-Pérez, J. C., Alvarez-Ríos, E., Gariglio, P., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Enríquez, S. (2015). Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(12), 3266-3278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.033>
- Hino, S. -i., Tanji, C., Nakayama, K. I., & Kikuchi, A. (2005). Phosphorylation of β -Catenin by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Stabilizes β -Catenin through Inhibition of Its Ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9063-9072. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.9063-9072.2005>

- Honda, R., & Yasuda, H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene*, *19*(11), 1473.
- Huang, W., Lv, X., Liu, C., Zha, Z., Zhang, H., Jiang, Y., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2012). The N-terminal Phosphodegron Targets TAZ/WWTR1 Protein for SCF ^{β -TrCP}-dependent Degradation in Response to Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(31), 26245-26253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382036>
- Humpton, T. J., & Vousden, K. H. (2016). Regulation of Cellular Metabolism and Hypoxia by p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(7), a026146. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026146>
- Ingallina, E., Sorrentino, G., Bertolio, R., Lisek, K., Zannini, A., Azzolin, L., Severino, L. U., Scaini, D., Mano, M., Mantovani, F., Rosato, A., Bicciato, S., Piccolo, S., & Del Sal, G. (2018). Mechanical cues control mutant p53 stability through a mevalonate–RhoA axis. *Nature Cell Biology*, *20*(1), 28-35. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0009-8>
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O., & Guan, K.-L. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*, *126*(5), 955-968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055>
- Jain, A. K., Allton, K., Iacovino, M., Mahen, E., Milczarek, R. J., Zwaka, T. P., Kyba, M., & Barton, M. C. (2012). P53 Regulates Cell Cycle and MicroRNAs to Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Biology*, *10*(2), e1001268. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001268>

- Janda, C. Y., Waghray, D., Levin, A. M., Thomas, C., & Garcia, K. C. (2012). Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science*, 337(6090), 59-64.
<https://doi.org/10.1126/science.1222879>
- Ji, L., Xu, J., Liu, J., Amjad, A., Zhang, K., Liu, Q., Zhou, L., Xiao, J., & Li, X. (2015). Mutant p53 Promotes Tumor Cell Malignancy by Both Positive and Negative Regulation of the Transforming Growth Factor β (TGF- β) Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11729-11740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639351>
- Jiang, L., & Hermeking, H. (2017). *MiR-34a* and *miR-34b/c* Suppress Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Research*, 77(10), 2746-2758. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2183>
- Junk, D. J., Vrba, L., Watts, G. S., Oshiro, M. M., Martinez, J. D., & Futscher, B. W. (2008). Different Mutant/Wild-Type p53 Combinations Cause a Spectrum of Increased Invasive Potential in Nonmalignant Immortalized Human Mammary Epithelial Cells. *Neoplasia*, 10(5), 450-461.
<https://doi.org/10.1593/neo.08120>
- Kamat, C. D., Green, D. E., Warnke, L., Thorpe, J. E., Ceriello, A., & Ihnat, M. A. (2007). Mutant p53 facilitates pro-angiogenic, hyperproliferative phenotype in response to chronic relative hypoxia. *Cancer Letters*, 249(2), 209-219. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.08.017>
- Kim, E. M., Jung, C.-H., Kim, J., Hwang, S.-G., Park, J. K., & Um, H.-D. (2017). The p53/p21 Complex Regulates Cancer Cell Invasion and Apoptosis by Targeting Bcl-2 Family Proteins. *Cancer Research*, 77(11), 3092-3100. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2098>
- Kim, H., Vick, P., Hedtke, J., Ploper, D., & De Robertis, E. M. (2015). Wnt Signaling Translocates Lys48-Linked Polyubiquitinated Proteins to the Lysosomal Pathway. *Cell Reports*, 11(8), 1151-1159. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.048>

- Kim, L., & Kimmel, A. (2006). GSK3 at the Edge: Regulation of Developmental Specification and Cell Polarization. *Current Drug Targets*, 7(11), 1411-1419.
<https://doi.org/10.2174/1389450110607011411>
- Kim, N. H., Kim, H. S., Kim, N.-G., Lee, I., Choi, H.-S., Li, X.-Y., Kang, S. E., Cha, S. Y., Ryu, J. K., Na, J. M., Park, C., Kim, K., Lee, S., Gumbiner, B. M., Yook, J. I., & Weiss, S. J. (2011). P53 and MicroRNA-34 Are Suppressors of Canonical Wnt Signaling. *Science Signaling*, 4(197), ra71-ra71. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001744>
- Koch, S., Acebron, S. P., Herbst, J., Hatiboglu, G., & Niehrs, C. (2015). Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. *Cell*, 163(5), 1225-1236.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.029>
- Li, Z.-H., Weng, X., Xiong, Q.-Y., Tu, J.-H., Xiao, A., Qiu, W., Gong, Y., Hu, E.-W., Huang, S., & Cao, Y.-L. (2017). MiR-34a expression in human breast cancer is associated with drug resistance. *Oncotarget*, 8(63). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22286>
- Lim, S.-T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T.-T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S. J., Schlaepfer, D. D., & Ilic, D. (2008). Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. *Molecular Cell*, 29(1), 9-22.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.031>
- Liu, J., Zhang, C., Zhao, Y., & Feng, Z. (2017). MicroRNA Control of p53: MicroRNAs and p53. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(1), 7-14. <https://doi.org/10.1002/jcb.25609>
- MacDonald, B. T., & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ -Catenin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a007880-a007880.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007880>
- Manchester, K. L. (1995). Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. *Trends in Cell Biology*, 5(10), 384-387. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)89080-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)89080-7)

- Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L., & Charvet, C. (2014). GSK-3—At the crossroads of cell death and survival. *Journal of Cell Science*, *127*(7), 1369-1378.
<https://doi.org/10.1242/jcs.138057>
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Bertrand, F. E., Davis, N. M., Sokolosky, M., Abrams, S. L., Montalto, G., D'Assoro, A. B., Libra, M., Nicoletti, F., Maestro, R., Basccke, J., Rakus, D., Gizak, A., Demidenko, Z., Cocco, L., Martelli, A. M., & Cervello, M. (2014). GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*, *5*(10), 2881-2911.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2037>
- McManus, E. J., Sakamoto, K., Armit, L. J., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R., & Alessi, D. R. (2005). Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO Journal*, *24*(8), 1571-1583.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600633>
- Mendrysa, S. M., & Perry, M. E. (2000). The p53 Tumor Suppressor Protein Does Not Regulate Expression of Its Own Inhibitor, MDM2, Except under Conditions of Stress. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(6), 2023-2030. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.6.2023-2030.2000>
- Michalovitz, D., Halevy, O., & Oren, M. (1990). Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell*, *62*(4), 671-680.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90113-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90113-s)
- Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., & Nishita, M. (2009). Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: Their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Developmental Dynamics*. *239*(1).1-15
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21991>
- Misso, G. Mir-34: A New Weapon Against Cancer? *Molecular Therapy*, *16*. Mol Ther Nucleic Acids. 2014. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.47>

- Mosimann, C., Hausmann, G., & Basler, K. (2009). β -Catenin hits chromatin: Regulation of Wnt target gene activation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(4), 276-286.
<https://doi.org/10.1038/nrm2654>
- Muller, P. A. J., Caswell, P. T., Doyle, B., Iwanicki, M. P., Tan, E. H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D. A., Ludwig, R. L., Gosselin, P., Cromer, A., Brugge, J. S., Sansom, O. J., Norman, J. C., & Vousden, K. H. (2009). Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell*, *139*(7), 1327-1341. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.026>
- Nakayama, M., & Oshima, M. (2019). Mutant p53 in colon cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, *11*(4), 267-276. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>
- Parrales, A., Thoenen, E., & Iwakuma, T. (2018). The interplay between mutant p53 and the mevalonate pathway. *Cell Death & Differentiation*, *25*(3), 460-470.
<https://doi.org/10.1038/s41418-017-0026-y>
- Piao, S., Lee, S.-H., Kim, H., Yum, S., Stamos, J. L., Xu, Y., Lee, S.-J., Lee, J., Oh, S., Han, J.-K., Park, B.-J., Weis, W. I., & Ha, N.-C. (2008). Direct Inhibition of GSK3 β by the Phosphorylated Cytoplasmic Domain of LRP6 in Wnt/ β -Catenin Signaling. *PLOS ONE*, *3*(12), e4046.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004046>
- Pipas, J. M., & Levine, A. J. (2001). Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, *11*(1), 23-30. <https://doi.org/10.1006/scbi.2000.0343>
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, *359*(6392), 235-237. <https://doi.org/10.1038/359235a0>
- Puzio-Kuter, A. M. (2011). The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes & Cancer*, *2*(4), 385-391.
<https://doi.org/10.1177/1947601911409738>

- Rodriguez, J., Herrero, A., Li, S., Rauch, N., Quintanilla, A., Wynne, K., Krstic, A., Acosta, J. C., Taylor, C., Schlisio, S., & von Kriegsheim, A. (2018). PHD3 Regulates p53 Protein Stability by Hydroxylating Proline 359. *Cell Reports*, 24(5), 1316-1329.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.108>
- Santana-Codina, N., Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2017). The Role of Autophagy in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 19-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041816-122338>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., & Karnieli, E. (2004). The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters **GLUT1** and **GLUT4** Gene Expression. *Cancer Research*, 64(7), 2627-2633. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-0846>
- Seino, T., Kawasaki, S., Shimokawa, M., Tamagawa, H., Toshimitsu, K., Fujii, M., Ohta, Y., Matano, M., Nanki, K., Kawasaki, K., Takahashi, S., Sugimoto, S., Iwasaki, E., Takagi, J., Itoi, T., Kitago, M., Kitagawa, Y., Kanai, T., & Sato, T. (2018). Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.009>
- Sermeus, A., & Michiels, C. (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death & Disease*, 2(5), e164. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.48>
- Song, B., Lai, B., Zheng, Z., Zhang, Y., Luo, J., Wang, C., Chen, Y., Woodgett, J. R., & Li, M. (2010). Inhibitory Phosphorylation of GSK-3 by CaMKII Couples Depolarization to Neuronal Survival. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 41122-41134.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130351>

- Taelman, V. F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L. C., Vorwald, P. P., Gumper, I., Sabatini, D. D., & De Robertis, E. M. (2010). Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell*, *143*(7), 1136-1148. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.034>
- Tan, B. S., Tiong, K. H., Choo, H. L., Fei-Lei Chung, F., Hii, L.-W., Tan, S. H., Yap, I. K., Pani, S., Khor, N. T., Wong, S. F., Rosli, R., Cheong, S.-K., & Leong, C.-O. (2015). Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). *Cell Death and Disease*, *6*(7), e1826. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.191>
- Terzian, T., Suh, Y.-A., Iwakuma, T., Post, S. M., Neumann, M., Lang, G. A., Van Pelt, C. S., & Lozano, G. (2008). The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes & Development*, *22*(10), 1337-1344. <https://doi.org/10.1101/gad.1662908>
- Tian, Q., Feetham, M. C., Tao, W. A., He, X. C., Li, L., Aebersold, R., & Hood, L. (2004). Proteomic analysis identifies that 14-3-3 interacts with -catenin and facilitates its activation by Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(43), 15370-15375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406499101>
- Toledo-Guzmán, M. E., Hernández, M. I., & Ortiz-Sánchez*, Á. A. G.-G. and E. (2019). ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Current Stem Cell Research & Therapy*. <http://www.eurekaselect.com/164566/article>
- Tolwinski, N. S., & Wieschaus, E. (2001). Axin and dTCF/Pan regulate Arm localization. *Development*. *128*: 2107-2117.
- Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin: β -Catenin: a life by, beyond, and against the Wnt canon. *The EMBO Journal*, *31*(12), 2714-2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>

- Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.-P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., & Clevers, H. (2002). The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell*, 10, 111(2), 241-250
- Wang, Q., Zou, Y., Nowotschin, S., Kim, S. Y., Li, Q. V., Soh, C.-L., Su, J., Zhang, C., Shu, W., Xi, Q., Huangfu, D., Hadjantonakis, A.-K., & Massagué, J. (2017). The p53 Family Coordinates Wnt and Nodal Inputs in Mesendodermal Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 20(1), 70-86. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.002>
- Wang, W., Cheng, B., Miao, L., Mei, Y., & Wu, M. (2013). Mutant p53-R273H gains new function in sustained activation of EGFR signaling via suppressing miR-27a expression. *Cell Death and Disease*, 4(4), e574. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.97>
- Willert, K., & Nusse, R. (2012). Wnt Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a007864-a007864. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007864>
- Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19(1), 163-194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
- Yin, D., Ogawa, S., Kawamata, N., Leiter, A., Ham, M., Li, D., Doan, N. B., Said, J. W., Black, K. L., & Phillip Koeffler, H. (2013). MiR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 32(9), 1155-1163. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.132>
- Zhang, C., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Zhao, Y., Hong, X., Lin, M., Yu, H., Liu, L., Levine, A. J., Hu, W., & Feng, Z. (2013). Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature Communications*, 4(1), 2935. <https://doi.org/10.1038/ncomms3935>

Zhou, G., Wang, J., Zhao, M., Xie, T.-X., Tanaka, N., Sano, D., Patel, A. A., Ward, A. M., Sandulache, V. C., Jasser, S. A., Skinner, H. D., Fitzgerald, A. L., Osman, A. A., Wei, Y., Xia, X., Songyang, Z., Mills, G. B., Hung, M.-C., Caulin, C., ... Myers, J. N. (2014). Gain-of-Function Mutant p53 Promotes Cell Growth and Cancer Cell Metabolism via Inhibition of AMPK Activation. *Molecular Cell*, 54(6), 960-974. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.024>