



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EFFECTO DE p53 MUTANTE (R273C) SOBRE  
EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÁNCER DE CERVIX**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA

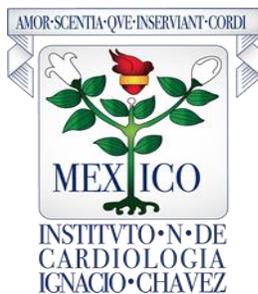
P R E S E N T A:

**BLANCO CARPINTERO BETSY ALEJANDRA**

TUTORAS:

DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

M. en C. DIANA XOCHIQUETZAL ROBLEDO CADENA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



## AGRADECIMIENTOS

A mis papás y a mis hermanos, por apoyarme en este largo camino y festejar conmigo cada uno de mis logros, infinitas gracias.

A la Doctora Sara Rodríguez Enríquez, por haberme permitido estar en su laboratorio y por haberme brindado de su conocimiento.

A Diana, que fue mi tutora y mi amiga; que siempre estuvo conmigo en cualquier momento, gracias por ayudarme a crecer como persona y como estudiante.

A todo el grupo de tumores, por todas aquellas observaciones, preguntas y por apoyarme en el transcurso.

A mis amigos del laboratorio, ya que gracias a ellos mi estancia fue más agradable compartiendo tantas risas, opiniones, pláticas y horas de comida.

A mis amigos de la carrera, por todas y cada una de las experiencias en clases y prácticas de campo; en especial a Claudia, Brenda, Ana y Gaby. Las quiero amigas.

Este trabajo de investigación fue apoyado por el donativo de SEP-CONACyT No. 283144.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9

### **CAPÍTULO I**

#### INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER	11
1.2. p53 <sup>WT</sup> COMO SUPRESOR TUMORAL	12
1.3. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA DE p53 <sup>WT</sup>	13
1.4. MUTACIONES EN LA PROTEÍNA p53	13
1.5. METABOLISMO ENERGÉTICO TUMORAL	16
1.6. REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MEDIADO POR p53 NO MUTADO (P53 <sup>WT</sup> ) Y P53 CON LA MUTACIÓN R248Q	16

### **CAPÍTULO II**

2.1. JUSTIFICACIÓN	19
2.2. HIPÓTESIS	20
2.3. OBJETIVOS	21

### **CAPÍTULO III**

#### MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR	22
3.2. SOBREEXPRESIÓN DE P53 MUTADO (R273C)	22
3.3. CURVA DE CRECIMIENTO	23
3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	23
3.5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES POR EL MÉTODO DE WB	24
3.6. DETERMINACIÓN DEL FLUJO GLUCOLÍTICO	24
3.7. DETERMINACIÓN DEL FLUJO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (FO)	25

3.8. DETERMINACIÓN DE POTENCIAL MITOCONDRIAL	25
3.9. DETERMINACIÓN DEL APORTE DE ATP EN LA LÍNEA CELULAR DE HeLa <sup>WT</sup> Y HeLa p53 <sup>R273C</sup>	26
3.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBIDOR DE PROVOCA UNA INHIBICIÓN DEL 50% SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR IC <sub>50</sub>	26
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

4.1. EFECTO DE LA MUTACIÓN R273C SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	28
4.2. EXPRESIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE p53 Y DE SU FORMA FOSFORILADA EN LA MUTANTE HeLa p53 <sup>R273C</sup>	29
4.3. EFECTO DE LA MUTACIÓN DE p53 <sup>R273C</sup> SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES CANÓNICOS REGULADORES DE p53 <sup>WT</sup>	30
4.4. EFECTO DE LA MUTACIÓN DE p53 <sup>R273C</sup> SOBRE PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO	31
4.5. EFECTO DE LA MUTACIÓN DE p53 <sup>R273C</sup> SOBRE LOS FLUJOS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN CÉLULAS HeLa	33
4.6. EFECTO DE LA MUTACIÓN p53 <sup>R273C</sup> SOBRE EL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL MITOCONDRIAL	35
4.7. EFECTO DE LA MUTACIÓN DE R273C SOBRE EL APORTE DE ATP EN LA LÍNEA CELULAR DE HeLa	37
4.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN REQUERIDA PARA INHIBIR EL 50% LA PROLIFERACIÓN CELULAR (IC <sub>50</sub> ) DE DIFERENTES INHIBIDORES METABÓLICOS Y CANÓNICOS EN HeLa	38

## **CAPÍTULO V**

5.1. DISCUSIÓN	39
----------------	----

## **CAPÍTULO VI**

6.1. CONCLUSIÓN 43

6.2. REFERENCIAS 44

## **CAPÍTULO VII**

7.1. ANEXO 1 49

7.2. ANEXO 2 50

7.3 ANEXO 3 51

## ABREVIATURAS

DBD	Binding Domain (Dominio de unión al ADN)
CaCu	Cáncer Cervicouterino
CD	Carboxyl Domain (dominio carboxilo)
COX IV	Citocromo oxidasa o complejo IV
FO	Fosforilación Oxidativa
FT	Factor de transcripción
GLUT 1	Transportador de glucosa tipo 1
GLUT 4	Transportador de glucosa tipo 2
HeLa p53 <sup>WT</sup>	HeLa con una sobreexpresión de p53 <sup>WT</sup>
HeLa p53 <sup>R248Q</sup>	HeLa con la sobreexpresión de p53 mutado (el residuo de arginina en la posición 248 es sustituido por glutamina)
HeLa p53 <sup>R273C</sup>	HeLa con la sobreexpresión de p53 mutado (el residuo de arginina en la posición 273 es sustituido por cisteína)
HeLa <sup>WT</sup>	HeLa wild type (células transformadas con el vector vacío que contiene un nivel de proteína p53 casi nulo)
HIF-1 $\alpha$	Factor inducido por hipoxia 1 alfa
HK	Hexocinasa
HPI	Hexosa fosfato isomerasa
IARC	International Agency for Research
IC <sub>50</sub>	Concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LDH	Lactato deshidrogenasa
NDI	NADH deshidrogenasa o complejo I
ngAtO/min/mg	nanogramo átomo de oxígeno por minuto por miligramo de proteína
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Buffer fosfato salino
PFK 1	Fosfofructocinasa tipo I
PRD	Proline Rich Domain (dominio rico en prolina)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAD	Transactivation Amino Domain (dominio amino de transactivación)
TD	Tetramerization Domain (dominio de tetramerización)
WB	Western Blot

## RESUMEN

La proteína p53 es un factor transcripcional involucrado en procesos de estabilidad genética y reparación del ADN. Sin embargo, en la mayoría de los tumores se encuentra mutado, lo que le confiere mayor quimioresistencia, evasión de la apoptosis y mayor capacidad de migración e invasión a las células. Una de las mutaciones más frecuentes en los tumores malignos, es en el residuo 273 donde se intercambia una arginina por cisteína (R273C). En nuestro grupo hemos demostrado que en los tipos de cáncer que expresan p53 mutado (R248Q) la glucólisis es la principal vía de aporte de ATP (>80%). Con el objetivo de evaluar si la redistribución del metabolismo energético hacia un fenotipo glucolítico se conserva en diferentes mutaciones, se estudió el efecto de la mutación p53<sup>R273C</sup> sobre el metabolismo energético y procesos dependientes de energía (crecimiento tumoral y resistencia a fármacos) en cáncer cervicouterino de HeLa.

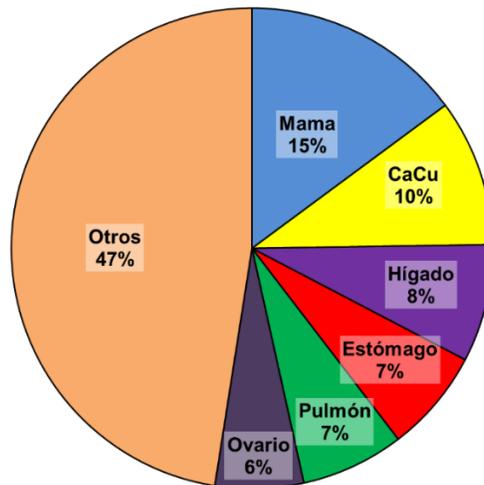
En este estudio se analizaron los tipos de cáncer de HeLa<sup>WT</sup> (sin p53) y de HeLa p53<sup>R273C</sup>. El tiempo de duplicación celular fue similar entre las dos líneas celulares. La mutación evitó la expresión en el nivel de proteína de los blancos canónicos de p53<sup>WT</sup>: PUMA y NOXA; pero TIGAR y H-RAS aumentaron su expresión (4 veces) significativamente contra HeLa<sup>WT</sup>. El contenido de proteínas glucolíticas (GLUT1, GLUT 3, HKI, HKII, PFK-1 y LDH) y mitocondriales (2OGDH, GA, NDI y COXIV) así como el flujo de glucólisis (~10 nmol de lactato/min/mg de proteína) fue similar entre ambas líneas celulares; sin embargo, la fosforilación oxidativa (FO) y el potencial transmembranal mitocondrial disminuyeron (64-86%) en HeLa p53<sup>R273C</sup>. En la línea celular con el p53 mutado la contribución de ATP por parte de la glucólisis fue de 60%. Para validar estos resultados, se determinó la IC<sub>50</sub> de dos compuestos que inhiben el metabolismo energético. Para inhibir a la función mitocondrial se utilizó el anti-inflamatorio no esteroideo celecoxib, que ha demostrado ser un potente inhibidor del complejo II de la cadena transportadora de electrones; para inhibir la glucólisis se utilizó el gopipol un inhibidor de las enzimas deshidrogenasas de la glucólisis. La proliferación celular de HeLa p53<sup>R273C</sup> fue más sensible al gopipol (IC<sub>50</sub>= 38±10 µM) que la línea

parental ( $IC_{50}=178\pm35 \mu M$ ). Por otro lado, la línea HeLa<sup>WT</sup> fue más sensible al celecoxib ( $43\pm9 \mu M$ ) que la línea con la mutación en p53 ( $IC_{50}= 117\pm45 \mu M$ ). En conclusión, la mutación en p53<sup>R273C</sup> favorece al metabolismo glucolítico promoviendo el llamado efecto Warburg contrario a lo reportado en tumores con p53 sin mutaciones; por lo tanto, la terapia anti-glucolítica podría ser propuesta como una nueva estrategia terapéutica alternativa para disminuir el crecimiento tumoral de cánceres con p53 con mutaciones R273C.

1.1 Cáncer

El Cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por la proliferación acelerada de las células. Esta transformación involucra procesos derivados, en parte, por una serie de mutaciones al azar donde se alteran los “*checkpoints*” del ciclo celular. En paralelo, algunos genes supresores de tumor como son *P53*, *BRCA1* y *BRCA2* pierden su función y los proto-oncogenes (*C-MYC*, *H-RAS* Y *K-RAS*) se activan, [López et al., 2001; Ríos y Hernández, 2001]. Cuando las células exceden los límites tisulares (lámina basal) del órgano e invaden zonas adyacentes se inicia un proceso denominado metástasis [OMS, 2018].

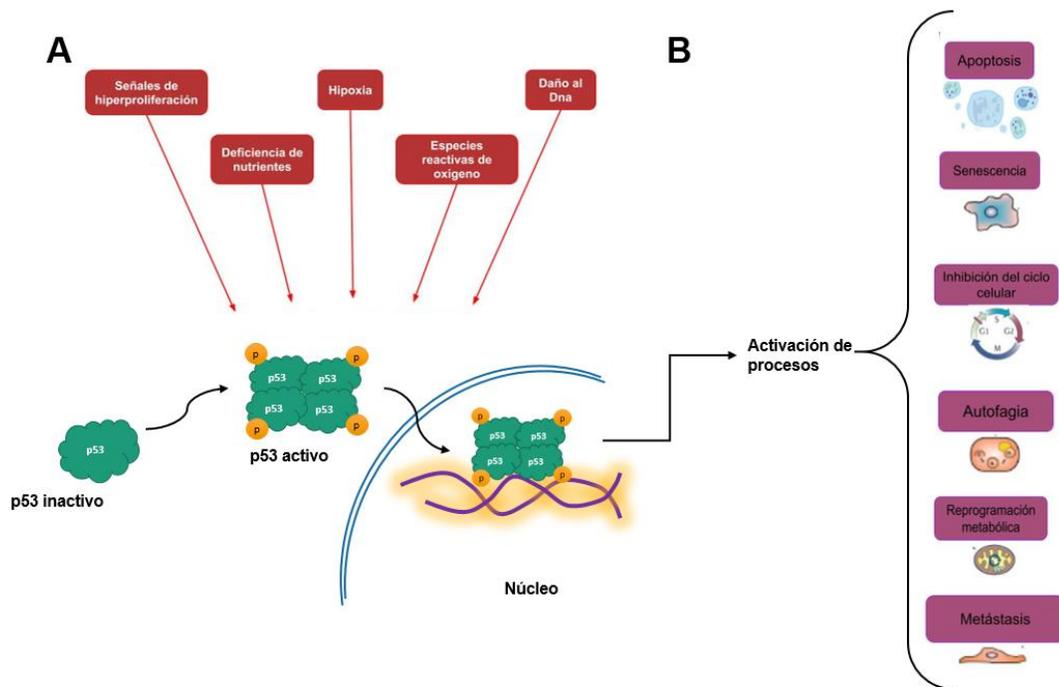
En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 8.8 millones de defunciones relacionadas con el cáncer, siendo la tercera causa de muerte a nivel mundial en ambos géneros. En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que la población femenina de 30 a 59 años padece cáncer cervicouterino, por lo que se le ha asignado como la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres en edad reproductiva (Figura 1).



**Figura 1.** Causas principales de mortalidad en la población femenina mexicana. Cada color representa los principales tipos de cáncer, así como sus porcentajes de mortalidad [INEGI, 2019]. CaCu, cáncer cervicuterino.

## 1.2 p53<sup>WT</sup> como supresor tumoral

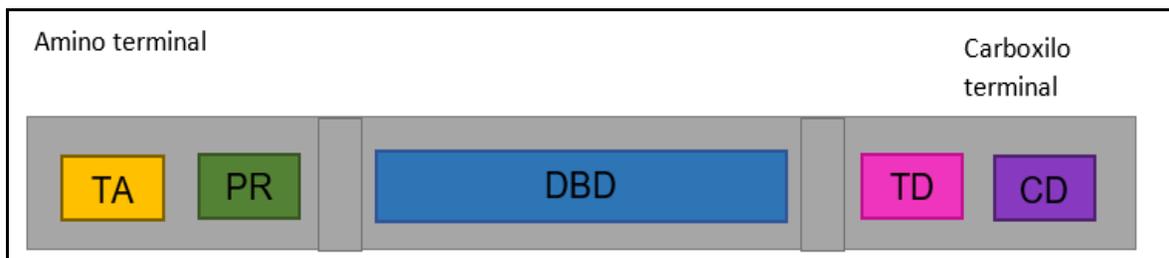
La proteína codificada por el gen supresor tumoral *TP53*, es una fosfoproteína (proteína unida covalentemente a un grupo fosfato) tetramérica que al ser activada se localiza en el núcleo celular y juega un papel central en el ciclo celular y su regulación (Figura 2A), [López et al., 2001]. El daño en el ADN o la activación de oncogenes son señales de estrés celular que promueven una cascada de señalización requerida para la activación de la proteína p53. En consecuencia, incrementa la expresión de la proteína y del mRNA de diferentes genes blanco de p53 para iniciar la reparación del ADN o modificar vías de señalización asociadas a la activación de oncogenes. Los genes blancos del p53 no mutado (p53<sup>wt</sup>) modulan diferentes vías celulares importantes como son la senescencia, la angiogénesis, la autofagia, y la regulación metabólica (Figura 2B), [Vousden y Prives, 2009].



**Figura 2.** Activación de la proteína p53 y sus procesos celulares blanco. A) Señales de estrés (recuadros rojos) que activan indirectamente a p53<sup>wt</sup>, posteriormente se transloca al núcleo. B) Procesos celulares (recuadros morados) activados por p53<sup>wt</sup>.

### 1.3 Estructura de la proteína p53<sup>WT</sup>

La proteína de p53<sup>wt</sup> se divide estructuralmente en 4 dominios funcionales: 1) El dominio amino terminal (N-terminal), que contiene un sub-dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés *Transactivation Amino Domain*) que activa transcripcionalmente a los genes blanco y un sub-dominio rico en prolina (PRD, por sus siglas en inglés *Proline Rich Domain*) relacionado con la regulación de la apoptosis [Chang et al., 1995]; 2) El dominio de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés *DNA Binding Domain*), utilizado para el reconocimiento y unión del p53 con secuencias específicas del ADN localizadas en las regiones promotoras de sus genes blanco [Wei et al., 2006], 3) El dominio de tetramerización (TD, por sus siglas en inglés *Tetramerization Domain*), responsable de la conformación tetramérica y más funcional de p53 [Chène et al., 2001], 4) El dominio del carboxilo terminal (CD, por sus siglas en inglés *Carboxyl Domain*) constituido por múltiples sitios de regulación covalente (ubiquitinación, fosforilación, acetilación y glicosilación) [Appella et al., 2001] (Figura 3).

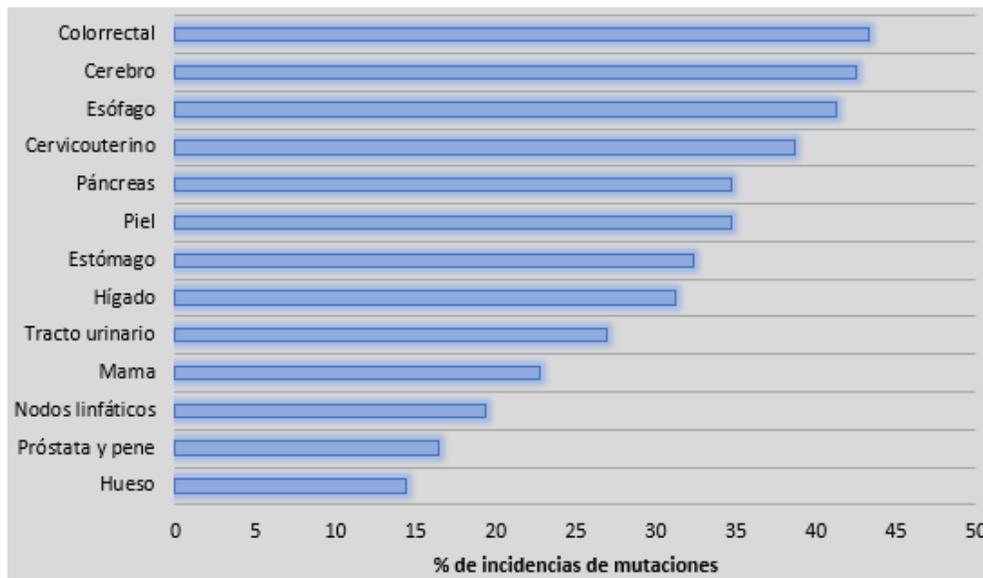


**Figura 3.** Estructura de la proteína de p53 y sus diferentes dominios. El dominio de transactivación N-terminal (TA) se muestra en color amarillo; la región rica en prolina (PR) se muestra en color verde; el dominio de unión al ADN (DBD) se muestra en color azul; el dominio de tetramerización (TD) se muestra en rosa y el dominio del carboxilo terminal (CD) se muestra en morado.

### 1.4 Mutaciones en la proteína p53

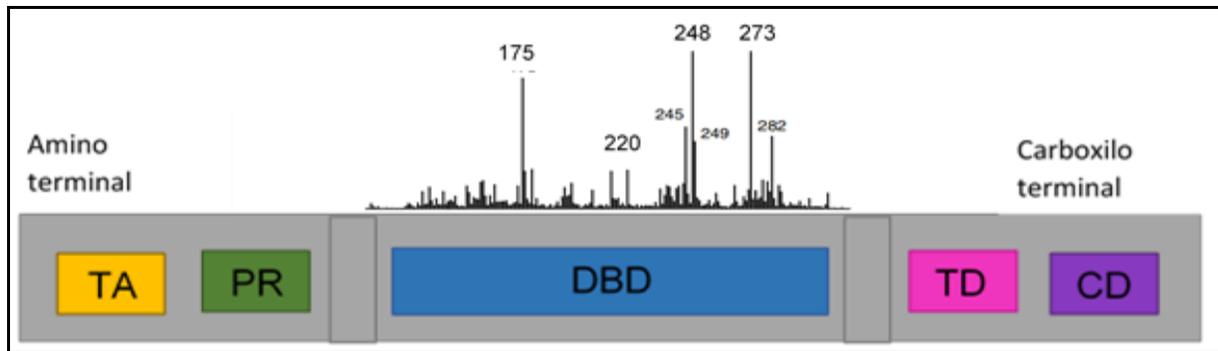
La proteína p53 se encuentra mutada en más del 80% de los tipos de cáncer malignos. La mayoría de las mutaciones (> 50%) se localizan en el dominio de unión al ADN inactivando las funciones importantes de p53 [Leroy et al., 2014]. La incidencia de las mutaciones de p53 es variable y depende del tipo de cáncer y de la etapa de malignidad en la que se encuentre. Por ejemplo, el cáncer cervicouterino (CaCu) en

estadio IV o altamente metastásico presenta un p53 altamente mutado (38%) (Figura 3), [IARC, 2019]. El cáncer colorectal, cerebro y esófago tienen una mayor incidencia de mutaciones en el DBD de p53, relacionándose con una mayor quimioresistencia en estas células. Por lo tanto, aumenta la malignidad tumoral y los pacientes tienen una baja prognosis en la enfermedad [Joerger y Fersht, 2007].



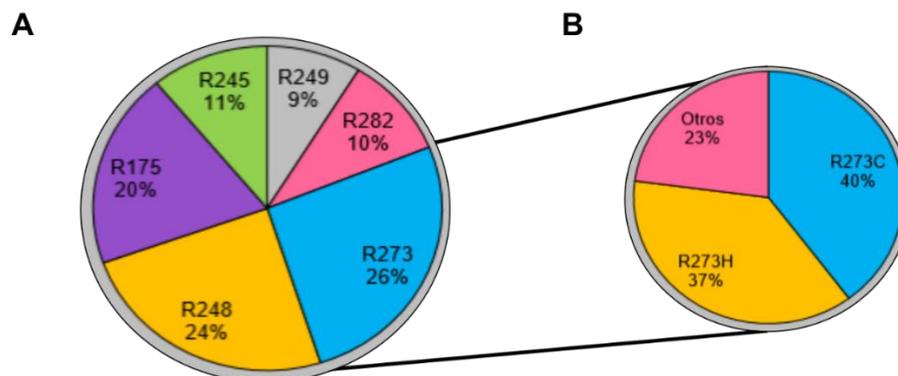
**Figura 3.** Gráfica de la incidencia de mutaciones en la proteína de p53 en diferentes tipos de tumores malignos

Las mutaciones causan efectos a nivel estructural y funcional del p53 [Cho et al., 1994] y se dividen en: a) mutaciones de contacto (eliminación de los sitios de interacción con el ADN) y b) estructurales (disminución de la estabilidad del ADN), [Bullock et al., 2000]. Las mutaciones de contacto más frecuentes (97%) se dan en tres residuos de arginina (Arg) que son 248, 273 y 280, donde la Arg se intercambia por glutamina, cisteína ó triptófano, respectivamente, ocasionando una pérdida de reconocimiento del p53 a una secuencia específica de ADN, un cambio en su actividad transcripcional ó una pérdida de su función canónica [Joerger y Fersht, 2007], (Figura 4).



**Figura 4.** Gráfica que muestra las principales mutaciones que presenta la proteína p53 en el sitio de unión al ADN. Las mutaciones más comunes se ubican en los residuos 175, 220, 248, 273 y 282 del dominio de unión al ADN (DBD).

Las mutaciones de p53 donde se sustituye arginina por glutamina, cisteína ó triptófano en los residuos 175, 248 y 273 son las más frecuentemente (> 70%) encontradas en los cánceres malignos, siendo la mutación en el residuo 273 la de mayor recurrencia (26%) [Selivanova y Wiman, 2007] (Figura 5A). La Arg 273 puede ser intercambiada eficientemente por la cisteína (Cys, 40%) ó por la histidina (His, 37%) (Figura 5B) en algunos canceres malignos como mama, cerebro y hueso, [IARC, 2019]. De hecho, ambas mutaciones estimulan la malignidad tumoral porque ambas promueven la proliferación, la formación de colonias, la invasión y la migración celular. Además, ambas mutaciones aumentan la resistencia celular a la apoptosis inducida por la radiación ultravioleta (UV) y la radiación ionizante (IR), [Kang et al., 2018].



**Figura 5.** Porcentaje de incidencias de mutaciones: A) Mutaciones más comunes en el dominio de unión al ADN; B) Mutaciones con mayor incidencia en el residuo Arg 273.

## **1.5 Metabolismo energético tumoral**

La reprogramación del metabolismo energético es una característica importante de los cánceres malignos [Vander et al., 2009]. En 1956, Otto Warburg demostró que la mayoría de los tumores malignos mantienen una glucólisis aeróbica acelerada comparada con las células normales (10 veces) lo que hizo suponer que la mitocondria estaba dañada [Warburg, 1956], sin haberse demostrado experimentalmente. Recientemente mi grupo de investigación y otros hemos demostrado que la mitocondria es funcional y la fosforilación oxidativa (FO) aporta más del 60% del ATP requerido para procesos altamente demandantes de energía. En el caso de HeLa, la FO aporta más del 70% del ATP celular [Zu y Guppy, 2004; Rodríguez-Enríquez et al., 2007; Hernández- Reséndiz et al., 2015]. Por lo anterior, hemos propuesto que esta vía puede ser considerada como un blanco potencial terapéutico alternativo en el tratamiento del cáncer de cérvix [Moreno-Sánchez et al., 2007].

## **1.6 Regulación del metabolismo energético mediado por p53 no mutado (p53<sup>WT</sup>) y p53 con la mutación R248Q**

La proteína p53<sup>WT</sup> y las isoformas que conservan mutaciones modulan el metabolismo energético (glucólisis y fosforilación oxidativa, FO) [Hernández- Reséndiz et al., 2015, 2018].

En mi grupo de investigación, se demostró que el p53 no mutado (p53<sup>WT</sup>) aumenta (2 veces) el contenido de enzimas mitocondriales (ND1 y COX IV), el flujo de FO (1.6 veces) y por lo tanto, el suministro mitocondrial de ATP (>80%) en células de cáncer de cérvix (HeLa). Por el contrario, la mutación de p53 en el residuo R248Q (reemplazo de arginina por glutamina) causó un aumento en la glucólisis (74%) y en el contenido de GLUT1, GLUT3, HKI y HKII (>2 veces) que correlacionó con una disminución del 40-70% en el (a) contenido de varias proteínas mitocondriales (ND1 y COX IV); (b) del flujo de la FO y un aumento substancial del 70% en la degradación mitocondrial (mitofagia). A nivel subcelular, esta mutación en p53 promovió que varios

factores transcripcionales blanco de p53<sup>WT</sup> (PUMA, NOXA y TIGAR) fueran inactivos; mientras que en otros (NF-κB y c-MYC) hubo ganancia de función. La mutación p53<sup>R248Q</sup> favoreció el efecto Warburg, ya que la glucólisis suministró más del 80% de ATP celular [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

En la literatura no hay mucha información acerca del papel de otras mutaciones (R273C y R273H,) de p53 sobre el metabolismo energético. En carcinoma H1299 de pulmón humano se evaluó el efecto de la mutación R273H (intercambio de arginina por histidina) sobre la glucólisis. La mutación promovió un aumento en la glucólisis (1.5 veces) comparado con el p53wt [Zhang et al., 2013; Erickson et al., 2017]. Sin embargo, en este estudio, la glucólisis se analizó midiendo la acidificación del medio extracelular, que no podría ser resultado exclusivo de la activación de la vía porque otros procesos metabólicos, como la producción de CO<sub>2</sub> por el ciclo de Krebs, pueden cambiar el pH del medio extracelular [TeSlaa y Teitell, 2014]. También solo se analizó la producción de lactato total, es decir, no se utilizaron inhibidores para descartar la producción de lactato proveniente de otras vías como la glucogenólisis y la glutaminólisis. Finalmente, en dicho estudio, tampoco se determinó el aporte de ATP, para lo cual debían de haber analizado a la otra vía productora de energía: la fosforilación oxidativa.

Los antecedentes claramente indican que la mutación R248Q y parcialmente la R273H en p53 conllevan la activación del metabolismo glucolítico (efecto Warburg), pero no es claro cuál es su efecto sobre el metabolismo mitocondrial. Por lo tanto, fue de nuestro interés analizar de manera sistemática e integral el efecto de la mutación de p53 en R273H sobre el metabolismo energético para proponer que la mutación conlleva de manera generalizada al efecto Warburg.

Actualmente en la clínica, no existen fármacos aprobados por la FDA para tumores que tienen p53 mutado, sin embargo, existen tratamientos experimentales que tienen como objetivo reactivar p53wt. Los tratamientos propuestos son: a) terapia génica a través de virus o nanopartículas y b) usando PRIMA-1 o su análogo PRIMA-1MET, fármacos que pueden restaurar las proteínas mutantes a una conformación p53wt, aumentando la expresión (20-60%) de Puma, Noxa y Bax. Estas nuevas estrategias terapéuticas proponen ser específicas y sin efectos secundarios, sin

embargo, esto no se ha determinado en modelos *in vitro* con células no tumorales o *in vivo* con animales [Blandino y Agostino, 2018]. Por lo tanto, el estudio del metabolismo central energético con las mutaciones en p53 permitirá en un futuro, proponer alternativas complementarias a las ya existentes contra los cánceres malignos que tengan mutaciones de p53 y cuyas alternativas de tratamiento no son del todo exitosas.

## **CAPÍTULO II**

### **2.1 JUSTIFICACIÓN**

La mayoría de los tumores malignos de alta recurrencia en México como colorrectal, mama y cerebro mantienen al factor transcripcional p53 en un estado mutado. Por lo tanto, la dilucidación de la vía principal de suministro de ATP ya sea la glucólisis o la fosforilación oxidativa en modelos de cánceres con p53 mutado permitirá proponer estrategias alternativas a las ya existentes para disminuir el crecimiento de estos tipos de cáncer.

## 2.2 HIPÓTESIS

La mutación p53<sup>R273C</sup> promueve que la vía glucolítica sea el principal aporte de ATP requerido para procesos altamente demandantes de energía.

## 2.3 OBJETIVOS

### I) Objetivo general

- Evaluar el efecto de la mutación de p53<sup>R273C</sup> sobre el metabolismo energético tumoral.

### II) Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la mutación HeLa p53<sup>R273C</sup> sobre la proliferación vs HeLa<sup>WT</sup>
- Determinar contenido de proteínas glucolíticas y mitocondriales en células HeLa p53<sup>R273C</sup> vs HeLa<sup>WT</sup>
- Determinar los flujos de glucólisis y fosforilación oxidativa en células HeLa p53<sup>R273C</sup> vs HeLa<sup>WT</sup>
- Determinar el aporte de ATP de ambas vías energéticas
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de fármacos anti-mitocondriales, anti-glucolítico y antineoplásicos canónicos sobre las células HeLa p53<sup>R273C</sup> vs HeLa<sup>WT</sup>

### 3.1 Cultivo celular

Las células HeLa p53<sup>R273C</sup> y HeLa<sup>WT</sup> se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). El análisis de genotipificación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) demostró que la línea HeLa<sup>WT</sup> comparte 14 de los 16 alelos (anexo 1), y HeLa p53<sup>R273C</sup> tuvo 12 de 16 alelos (anexo 2) comparados con las líneas parentales de la ATCC.

Las células HeLa<sup>WT</sup> se cultivaron en 20 mL de DMEM (Dulbecco-MEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10,000 unidades de penicilina/estreptomicina en placas de cultivo celular (20 x 150 mm) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire.

### 3.2 Sobreexpresión de p53 mutado (R273C)

La línea celular de HeLa con la sobreexpresión de p53<sup>R273C</sup> fue donada amablemente por el Dr. Patricio Gariglio Vidal del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). Las células se cultivaron en 20 mL de DMEM (Dulbecco-MEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10,000 unidades de penicilina/estreptomicina en placas de cultivo celular (20 x 150 mm) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Para mantener estable el estado de transfección de las células, se añadió el antibiótico G418 (16 µg/mL) a cada cultivo celular [Hernández-Reséndiz et al., 2019]

### 3.3 Curva de crecimiento

Las células (10,000 células totales) se sembraron en placas de 96 pozos (SARSTEDT, Alemania) en 100 µl de medio DMEM (HeLaWT) o DMEM +G418 (HeLa p53R273C) y se incubaron por 6 días en 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Los cultivos celulares se lavaron con un buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés: Phosphate Buffer Saline) a pH 7.2 cada 24 horas. La separación de las células adheridas al sustrato de la placa de cultivo se realizó incubando a las células con tripsina / EDTA 0.25% por 3 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2600 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. El conteo del número de células se realizó en una cámara de Neubauer con un microscopio invertido (Carl Zeiss, México).

El tiempo de duplicación se determinó con la siguiente fórmula matemática [McAtter y Davis, 1994]:

$$n = \frac{1}{[3.32(\log N_f - \log N_i)/(t_f - t_i)]}$$

Donde:

N<sub>f</sub>, representa el número de células cultivadas al final la fase de crecimiento

N<sub>i</sub>, representa el número de células al inicio de la curva de crecimiento

t<sub>f</sub>, es el tiempo final al cual las células fueron tripsinizadas

t<sub>i</sub>, es el tiempo inicial de cultivo.

### 3.4 Extracción de proteína

Las células se resuspendieron en 200 µl de buffer de lisis (RIPA, PBS 1x pH 7.2 1% IGEPAL NP40, SDS 25%, deoxicolato de sodio 0.05%), 5 µL de inhibidor de proteasas (PMSF), con una jeringa de insulina (1 mL) durante 10 minutos. Los lisados se centrifugaron a 10,000 rpm x 30 min a 4°C. La cuantificación de la proteína del sobrenadante obtenido se realizó por el método de Lowry. [Lowry et al., 1951]

### **3.5 Inmunodetección de las proteínas celulares por el método de Western Blot**

El extracto celular (50 µg proteína) se incubó con 25 µL de buffer de carga que contiene 10% de SDS, 1% de glicerol, y 5% de β-mercaptoetanol y se hirvió por 1 minuto. Posteriormente todo el extracto se cargó en geles desnaturizantes de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida. La muestra se transfirió a una membrana de PVDF aplicando una electroforesis de 300 mA, 15 volts por 15 minutos en un buffer de transferencia que contiene Tris 48 mM, SDS 1mM y glicina 39 mM, posteriormente se incubó con 10 ml de leche libre de grasa al 0.5% y tween-20 al 0.1% en TBS (Solución salina de Tris, que contiene 200 mM de Tris y 500 mM de NaCl) 1x por una hora. Las membranas se incubaron a 4°C con los respectivos anticuerpos monoclonales de humano: p53, p-p53, PUMA, NOXA, H-RAS, K-RAS HIF-1α, TIGAR, GLUT-3, HKI, PFK, GA, COX-IV, y anticuerpos policlonales: p-p53, GLUT-1, HKII, LDH-A, 2-OGDH y NDI (Santa Cruz, EUA); usando como control de carga β-actina (Santa Cruz, EUA) en dilución 1:500 y 1:2000. Posteriormente, las membranas se lavaron durante 1 hora (con cambios cada 15 minutos) con TBS 1x/Tween-20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes por una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Los lavados fueron realizados durante 1 hora con cambios cada 10 minutos con TBS 1x/Tween-20. Al término se adicionó 500 µL de la solución de quimioluminiscencia (GE Healthcare, EUA) y se reveló utilizando papel fotográfico (Carestream, USA). Las bandas obtenidas se analizaron densitométricamente utilizando el programa *ScionImage* para Windows [Gallardo-Pérez et al., 2017].

### **3.6 Determinación del flujo glucolítico**

La glucólisis se determinó midiendo el contenido de lactato+piruvato con un ensayo enzimático como se describe a continuación. En tres viales se colocaron 3 mg de proteína celular/vial en un volumen total de 2 ml de Krebs Ringer (KR) con 5mM de glucosa y se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 37°C. Al primer vial no se le añadió nada. Al segundo vial se le adicionó 20 mM de 2-desoxiglucosa (2-DOG) y al tercer vial se le añadió 2-DOG/rotenona (1 µM), para descartar la producción de lactato

proveniente del glucógeno y de la glutaminólisis. Al minuto 0, 10 y 15 se detuvo la reacción con 10% de ácido perclórico frío. Las muestras ácidas obtenidas se neutralizaron con una solución de 3 M de KOH y 0.1 M Tris. El lactato formado se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm como la generación de NADH en una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a una concentración de 25 U/mg. La velocidad de la glucólisis se calculó por la diferencia de absorbancias, el coeficiente de extinción molar del NADH ( $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) y el tiempo de reacción [Marín-Hernández et al., 2006].

### **3.7 Determinación del flujo de la Fosforilación Oxidativa (FO)**

La FO se determinó polarográficamente mediante el registro del consumo de oxígeno sensible a oligomicina (5  $\mu\text{M}$ ) con un oxígrafo de respirometría de alta resolución (Oroboros, Austria). En 2 ml de Ringer Krebs se añadió 1 mg de proteína, una vez obtenido el estado estacionario de respiración celular total se adicionó 5  $\mu\text{M}$  de oligomicina para revelar la FO y 1 mM de KCN para revelar la respiración extramitocondrial. El cero químico se obtuvo reduciendo todo el oxígeno molecular con ditionita. El oxígeno disuelto en la cámara de reacción fue de 380 nanogramos átomo de oxígeno (ngAtO) que corresponde al valor calculado a la altura de la Ciudad de México a 37°C [Rodríguez-Enríquez et al., 2019].

### **3.8 Determinación del potencial transmembranal mitocondrial**

La determinación de la diferencia de potencial transmembranal mitocondrial se determinó utilizando el indicador fluorescente rodamina 6G. En 2 mL de medio KR se añadió 0.25  $\mu\text{M}$  de rodamina 6G a 37°C. Posteriormente, se añadieron 0.5 mg de células HeLa<sup>WT</sup> ó HeLa p53<sup>R273C</sup>. Una vez obtenido el registro, se añadió 5  $\mu\text{M}$  del desacoplante m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP) para establecer la magnitud total de la señal de fluorescencia [Rodríguez-Enríquez et al., 2019].

### **3.9 Determinación del aporte de ATP en la línea celular de HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R273C</sup>**

La determinación del aporte de ATP por la glucólisis se asumió una estequiometría de 1 lactato/piruvato por ATP sintetizado; para la FO se asumió que por cada  $\mu\text{gAtO}$  consumido por la vía se establece una relación P/O de 2.5 ATP [Nakashima et al., 1984].

### **3.10 Determinación de la concentración de inhibidor que provoca una inhibición del 50% sobre la proliferación celular ( $\text{IC}_{50}$ )**

Los inhibidores utilizados en este estudio fueron el gossipol (inhibidor de varias deshidrogenasas), el celecoxib (inhibidor del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial) y el cisplatino (intercalante del ADN) utilizado como antineoplásico canónico contra el cáncer de cérvix [Granchi y Minutolo, 2012; Dasari y Tchounwou, 2014; Pritchard et al., 2018]. Para estos ensayos se utilizaron a parte de HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R273C</sup>, otras dos líneas celulares más, HeLa p53<sup>WT</sup> (que tiene a p53 no mutado sobreexpresado) y a HeLa p53<sup>R248Q</sup> (que tiene a p53 mutado en los residuos indicados). Todas las líneas celulares se sembraron a una densidad final de  $1 \times 10^4$  células totales en cajas de cultivo de 96 pozos. Cada inhibidor/droga se adicionó en concentraciones logarítmicas crecientes (1, 10, 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM) al día 2 que correspondió a la fase de crecimiento exponencial de cada línea celular. Después de 24 horas, el número de células se determinó colorimétricamente con el ensayo de MTT incubando 2 mM de bromuro de 3-(4, 5 dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio por 3 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire [Van-Meerloo et al., 2011]. Los cristales de formazan se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido. La absorbancia se detectó a 595 nm en un lector de placas Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts).

### **3.13 Análisis estadístico**

A partir de los resultados obtenidos se calcularon las medias y las desviaciones estándar. La significancia ( $p < 0.05$ ) se determinó por la prueba  $t$  de Student y por el análisis de ANOVA/post hoc Scheffle [Klockars et al., 2000; Krzywinski y Altman, 2014].

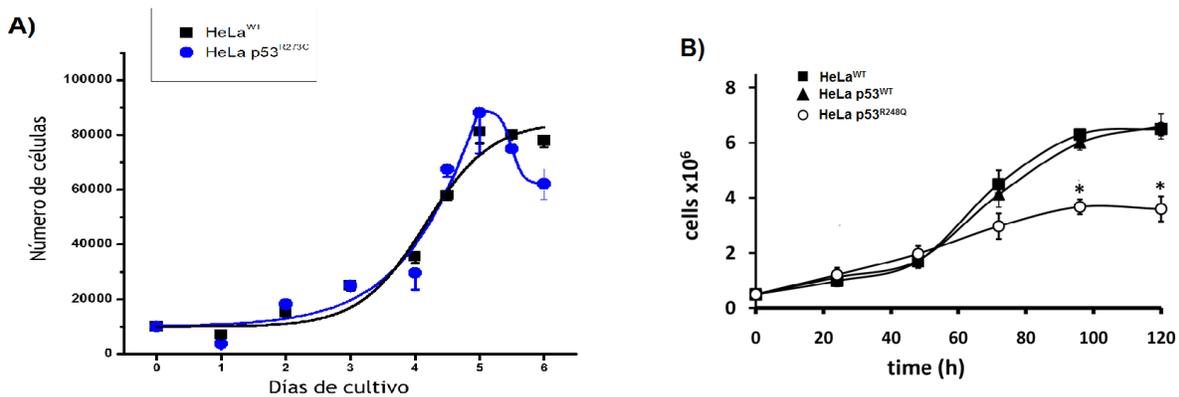
## CAPÍTULO IV

## Resultados

### 4.1 Efecto de la mutación R273C sobre la proliferación celular

Este estudio se enfocó en el análisis de las dos líneas celulares HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R273C</sup>. Sin embargo, para el análisis global de los resultados que involucró el efecto de la mutación p53 sobre el metabolismo energético, incorporé en mi análisis los resultados de HeLa p53<sup>WT</sup> y de HeLa p53<sup>R248Q</sup> que fueron publicados por mi grupo de investigación en [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

La mutación R273C no afectó el tiempo generacional y la velocidad de proliferación de las células de HeLa. El tiempo generacional fue de  $24 \pm 0.8$  y  $28 \pm 4$  horas, en HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R273C</sup>, respectivamente (Figura 6A, Tabla 1). Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente para la línea celular HeLa<sup>WT</sup> y la mutación p53<sup>R248Q</sup> donde la velocidad de proliferación y el tiempo generacional no tuvieron diferencias significativas entre las líneas celulares [Hernández-Reséndiz et al., 2019] (Figura 6B, Tabla 1).



**Figura 6.** Curva de crecimiento de (A) HeLa<sup>WT</sup> (■) y HeLa p53<sup>R273C</sup> (●) y (B) HeLa<sup>WT</sup> (■), HeLa p53<sup>WT</sup> (▲) y HeLa p53<sup>R248Q</sup> (○) publicado en [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. \*P < 0.01 vs. HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

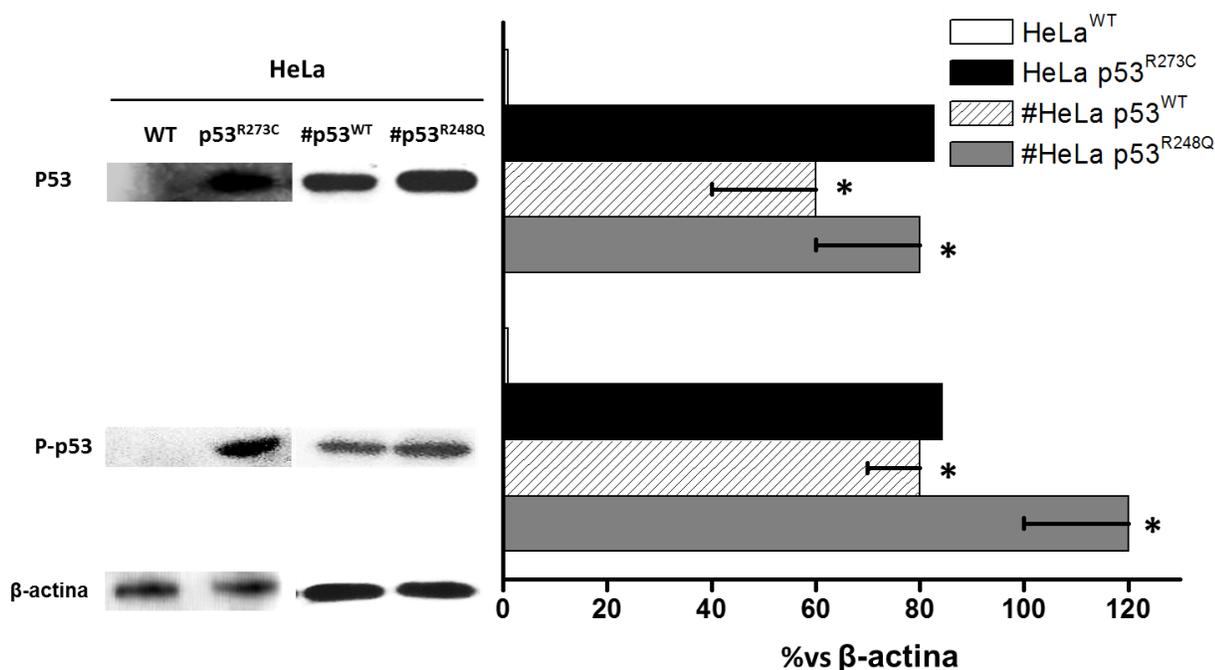
**Tabla 1.** Tiempo generacional de las diferentes líneas celulares de HeLa

Línea celular	HeLa <sup>WT</sup>	#HeLa p53 <sup>WT</sup>	HeLa p53 <sup>R273C</sup>	HeLa p53 <sup>R248Q</sup>
Tiempo generacional (h)	28 ± 6	24 ± 0.8	28 ± 4	27 ± 1.5 <sup>#</sup>

Los datos muestran el promedio ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

#### **4.2 Expresión del contenido total de p53 y de su forma fosforilada en la mutante HeLa p53<sup>R273C</sup>**

El contenido de la proteína p53 total y de su forma fosforilada en el residuo de serina 15 se analizó en HeLa<sup>WT</sup> y en HeLa p53<sup>R273C</sup> y se comparó con el contenido de p53 total y fosforilado ya reportado [Hernández-Reséndiz et al., 2019] (Figura 7). La presencia de fosforilación en la proteína p53 indica que el factor transcripcional se encuentra activo en las 3 líneas que tienen p53 (Figura 7) [Ashcroft et al., 1999; Loughery et al., 2014]. El contenido de la proteína total de p53 y de su forma fosforilada aumentó 80 veces en HeLa p53<sup>R273C</sup> vs. HeLa<sup>WT</sup> y 50% en HeLa p53<sup>R273C</sup> vs. HeLa p53<sup>WT</sup> indicando que la proteína en la línea HeLa mutante se encuentra activa (Figura 7). Este dato coincide con lo reportado en p53<sup>R248Q</sup> donde hubo un aumento del 50% en el contenido de la proteína total y fosforilada en comparación con HeLa p53<sup>WT</sup> (Figura 7).

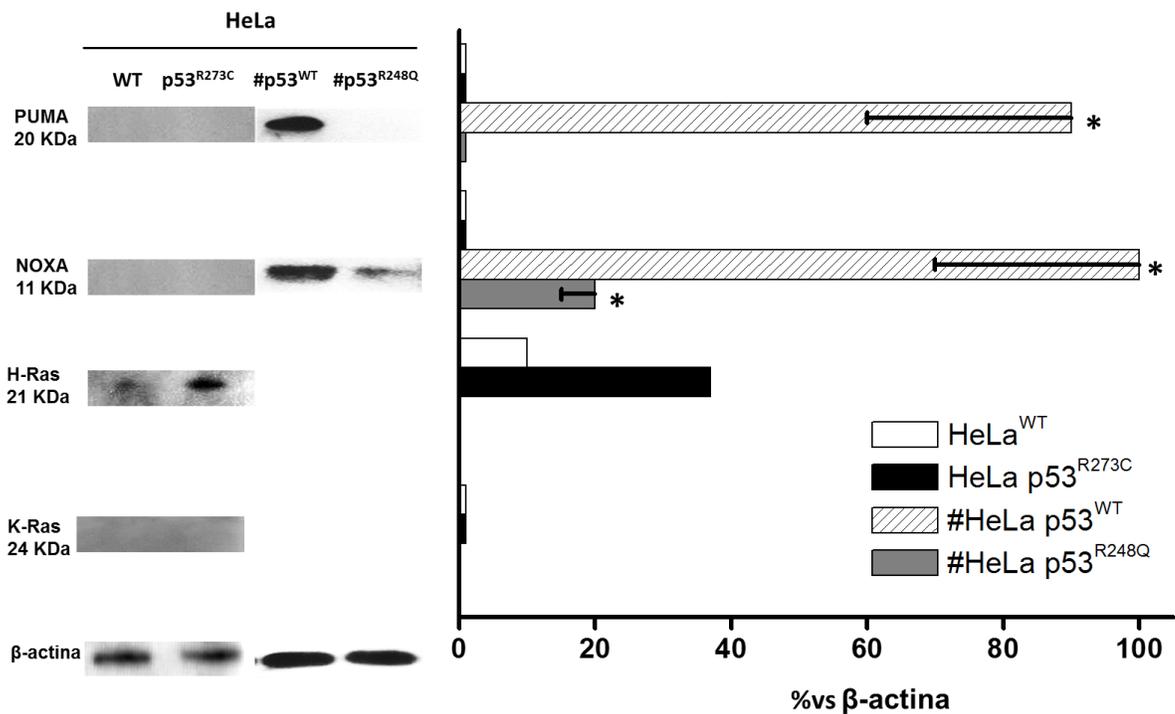


**Figura 7.** Contenido de la proteína p53 en su forma total y fosforilada (p-p53) en HeLa<sup>WT</sup>, HeLa p53<sup>R273C</sup>, HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R248Q</sup>. \*P < 0.01 vs HeLa<sup>WT</sup>, análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. Los datos muestran el promedio ± desviación estándar de al menos 2-3 experimentos independientes. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

#### 4.3 Efecto de la mutación de p53<sup>R273C</sup> sobre la expresión de factores transcripcionales canónicos reguladores de p53<sup>WT</sup>

Las mutaciones en p53 permiten que la proteína gane o pierda funciones [Oren et al., 2010; Rivlin et al., 2011]. La mutación en p53<sup>R273C</sup> disminuyó la expresión de varios factores transcripcionales como PUMA y NOXA que son blancos canónicos de la forma no mutada de p53 (p53<sup>WT</sup>) (Figura 8). Este efecto fue observado para la mutación de p53<sup>R248Q</sup> donde la expresión de PUMA y NOXA disminuyó significativamente >50% vs. HeLa p53<sup>WT</sup> (Figura 8). Por el contrario, la expresión del oncogen H-Ras, que no está presente en HeLa<sup>WT</sup>, aumentó 3 veces en p53<sup>R273C</sup>. El oncogen H-Ras es un blanco directo del p53 mutado en P223L y en V274F en cáncer de mama MCF-7 y de próstata DU-145 [Omerovic et al., 2007]. Sin embargo, el oncogen K-Ras no se observó en HeLa<sup>WT</sup> ni en p53<sup>R273C</sup> (Figura 8). Para demostrar

que nuestro anticuerpo anti K-Ras es funcional se utilizó como control positivo a MCF-7 donde la expresión del oncogen K-Ras es evidente (Anexo 3).

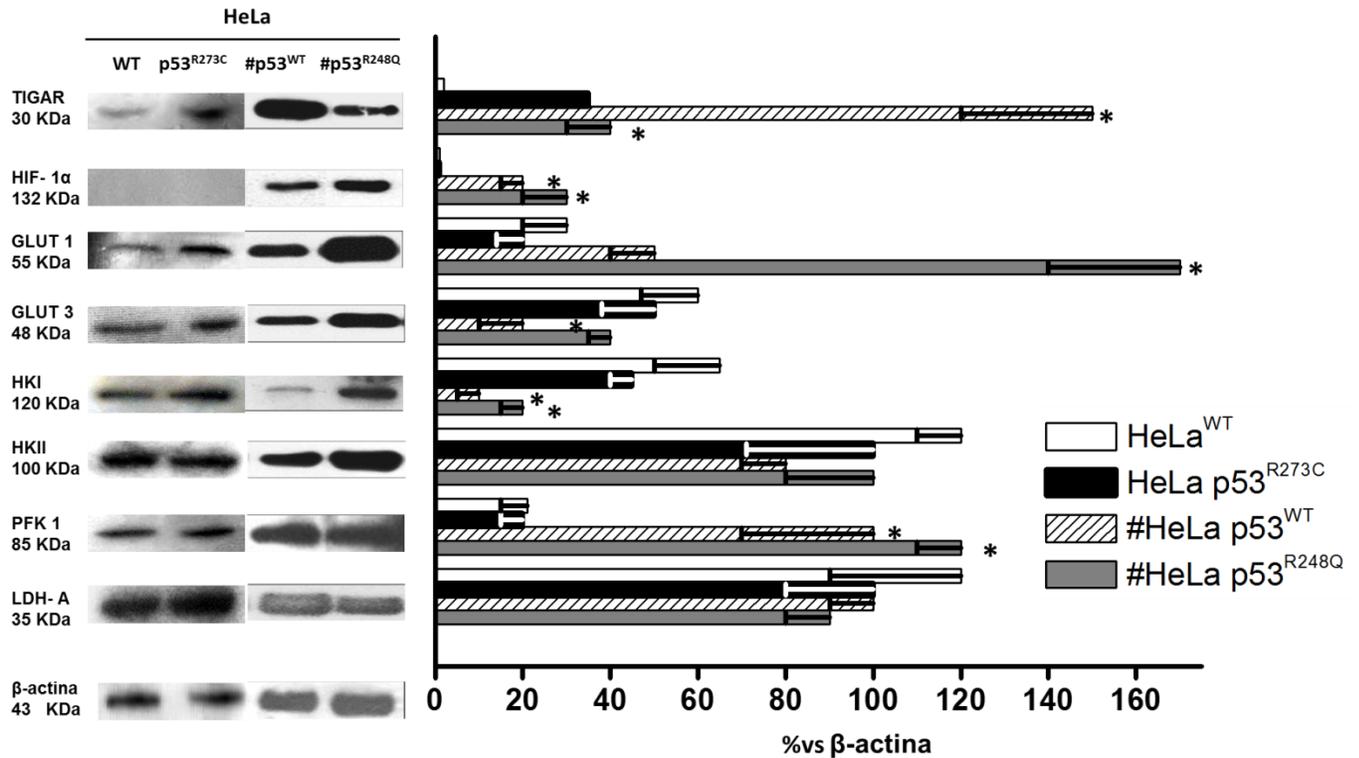


**Figura 8.** Contenido de algunos factores de transcripción canónicos, blancos de p53<sup>WT</sup> y de p53 mutante en las células de HeLa<sup>WT</sup>, p53<sup>R273C</sup>, p53<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R248Q</sup>. Los datos muestran el promedio ± desviación estándar de al menos 2-3 experimentos independientes. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. \*P < 0.01 versus HeLa<sup>WT</sup> análisis de ANOVA/post hoc Scheffé.

#### 4.4 Efecto de la mutación p53<sup>R273C</sup> sobre proteínas del metabolismo energético.

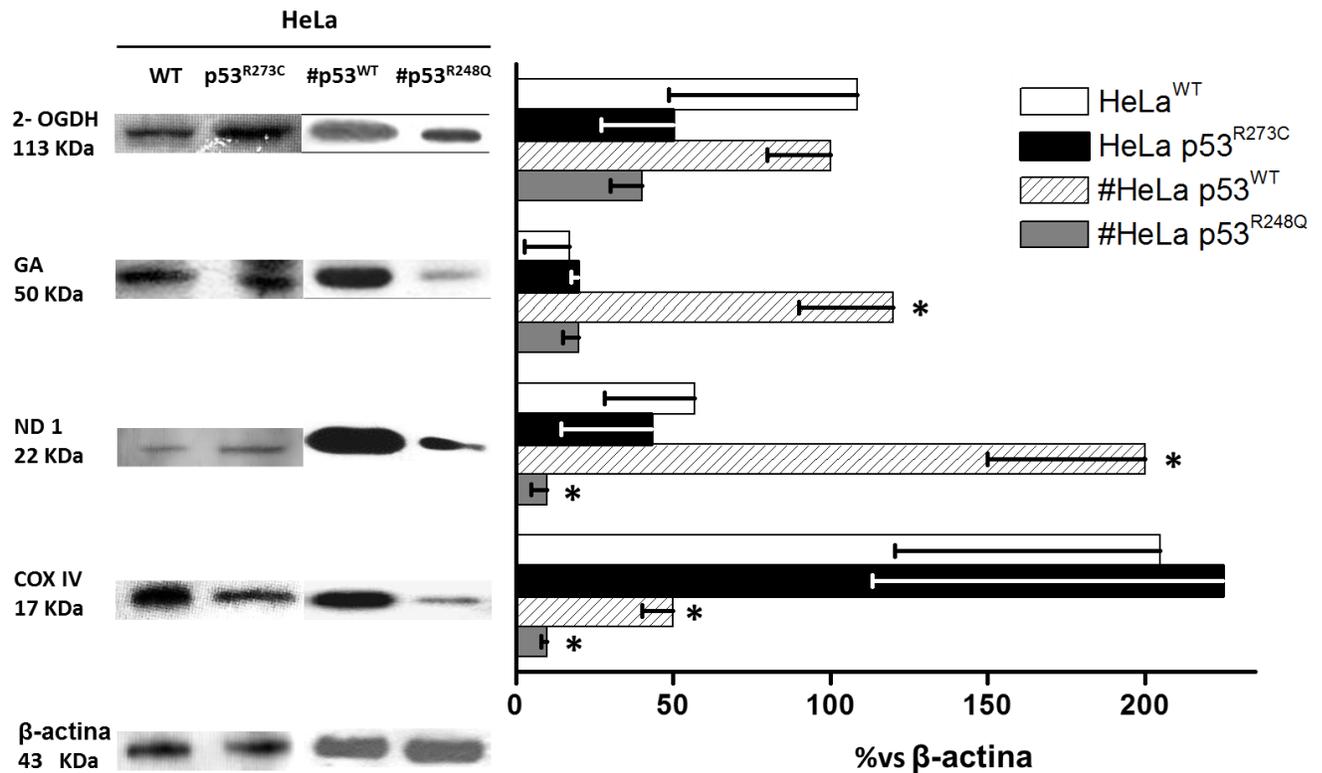
Analice el efecto de la mutación p53<sup>R273C</sup> sobre algunos factores transcripcionales (FT) que regulan al metabolismo energético. Primero se analizaron dos FT que regulan la glucólisis como TIGAR y HIF-1α. La presencia de la mutación p53<sup>R273C</sup> promovió un aumento substancial de 40 veces en TIGAR, mientras que HIF-1α se mantuvo constante comparado con HeLa p53<sup>WT</sup>. De hecho, todas las enzimas glucolíticas analizadas y que son blanco directo de HIF-1α no aumentaron importantemente (su contenido aumentó de 0.2 a 0.5 veces) en HeLa p53<sup>R273C</sup> en comparación con HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa<sup>WT</sup> (Figura 9). Por el contrario, en la mutación p53<sup>R248Q</sup> hubo un incremento importante de HIF-1α, que correlacionó con un aumento

substantial (1- 6 veces) de todas las proteínas glucolíticas analizadas vs. HeLa p53<sup>WT</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Contenido de algunos factores transcripcionales que regulan el metabolismo glucolítico y de proteínas glucolíticas en HeLa<sup>WT</sup>, HeLa p53<sup>R273C</sup>, HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R248Q</sup>. A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada comparada contra el control de carga β-actina; a la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los datos muestran el promedio ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. \*P < 0.01 versus HeLa p53<sup>WT</sup>. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

En HeLa p53<sup>R273C</sup> las proteínas 2-OGDH, GA y ND1 disminuyeron su expresión (10-50%), mientras que la proteína COXIV disminuyó un 10% en comparación con HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa<sup>WT</sup>. La intensidad de carga de estas proteínas fue menor (40-80%) a lo reportado para la mutación p53<sup>R248Q</sup> (Figura 10).



**Figura 10.** Contenido de proteínas mitocondriales en HeLa<sup>WT</sup>, HeLa p53<sup>R273C</sup>; HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R248Q</sup>. A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada contra el control de carga ( $\beta$ -actina), a la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \* $P < 0.01$  versus HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

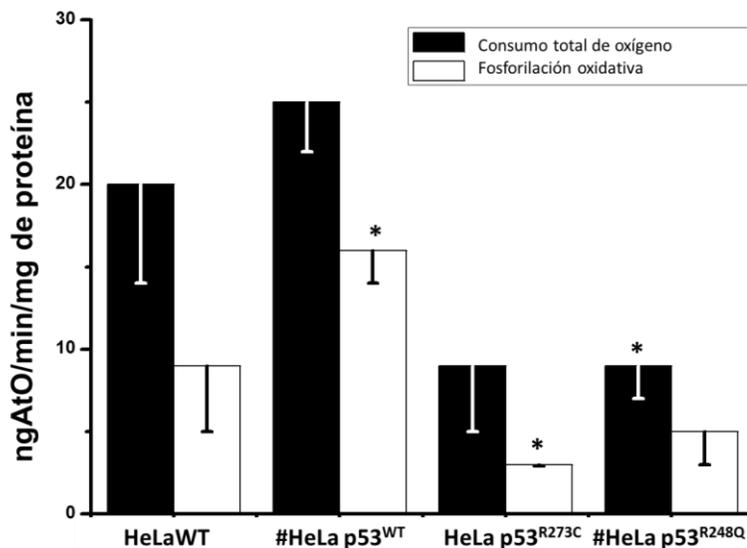
#### 4.5 Efecto de la mutación p53<sup>R273C</sup> sobre los flujos del metabolismo energético en las células HeLa

La expresión de proteínas no revela el efecto sobre la función en los procesos celulares [Moreno- Sánchez et al., 2016], por lo tanto, se determinó la producción total de lactato, la glucólisis, glutaminólisis, el consumo total de oxígeno y la FO en las líneas celulares de HeLa para revelar el efecto de la mutación sobre la función energética.

Primero se analizaron los flujos energéticos totales, es decir, el flujo total de consumo de oxígeno y la producción total de lactato. Estos flujos no representan los

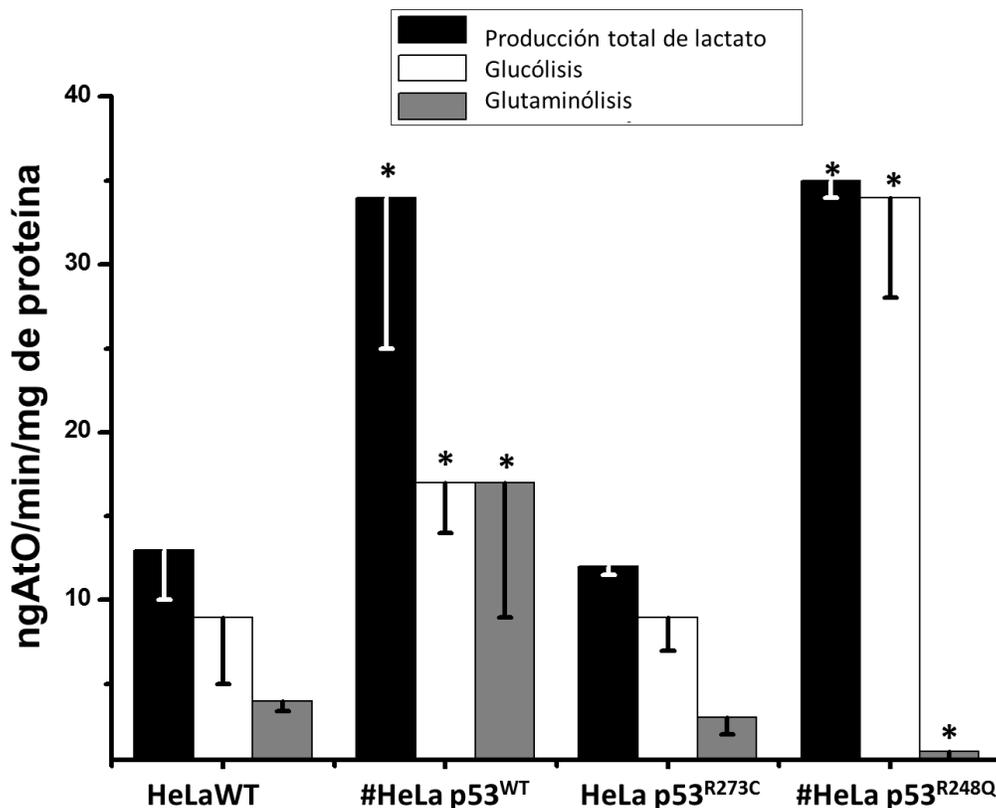
flujos reales de fosforilación oxidativa ni de glucólisis porque tanto la producción de lactato o el consumo de oxígeno pueden provenir otras vías que integran el metabolismo general de la célula; en el caso del lactato, éste puede ser generado por la degradación de glucógeno o de la glutaminólisis y el consumo de oxígeno puede provenir de enzimas altamente consumidoras de oxígeno como son los citocromos P450. Para descartar el metabolismo no asociado a glucólisis o a la fosforilación oxidativa se utilizaron inhibidores específicos para cada vía. Para revelar el flujo de la fosforilación oxidativa se utilizó oligomicina y para revelar la respiración no mitocondrial se utilizó cianuro de potasio (KCN). Para revelar el flujo de la glucólisis se utilizó la 2-desoxiglucosa (2-DOG) y rotenona para descartar la producción de lactato proveniente del glucógeno y de la glutaminólisis [Marín-Hernández et al., 2006; Rodríguez-Enriquez et al., 2019].

La mutación p53<sup>R273C</sup> disminuyó 50% el consumo total de oxígeno y la FO, en comparación con HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>WT</sup> coincidiendo con lo reportado para la mutación de p53<sup>R248Q</sup> (Figura 11).



**Figura 11.** Flujos del consumo total de oxígeno y fosforilación oxidativa en las cuatro líneas celulares de HeLa. Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \*P < 0.05 versus HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

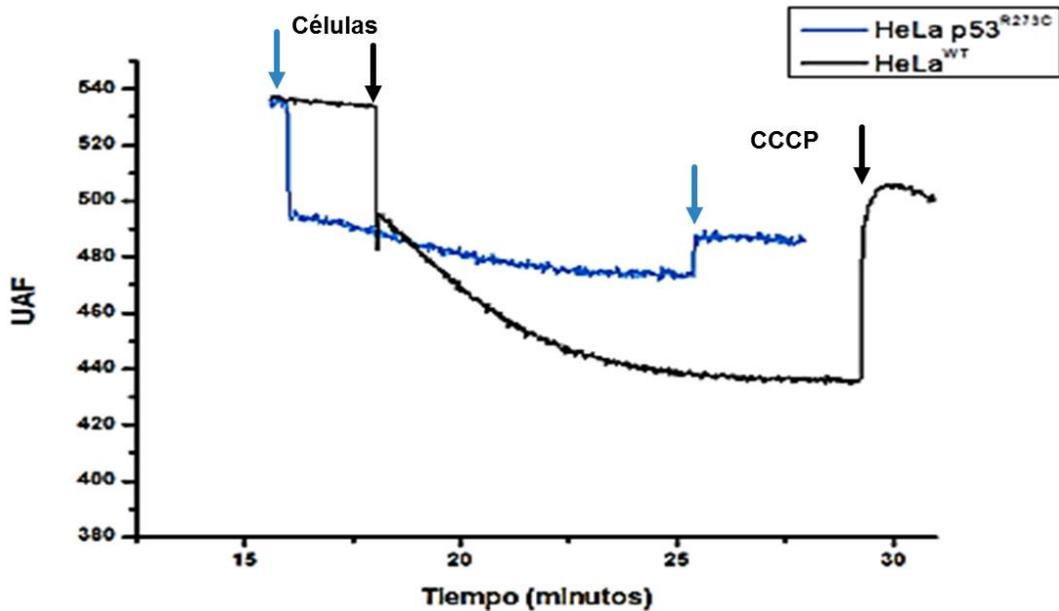
En HeLa p53<sup>R273C</sup>, la producción total de lactato disminuyó un 75% en comparación con HeLa p53<sup>WT</sup>; sin embargo, no hubo diferencia significativa con respecto a la línea sin p53 (HeLa<sup>WT</sup>). La glucólisis y la glutaminólisis disminuyeron 50-80% en p53<sup>R273C</sup> vs. HeLa p53<sup>WT</sup>. Por el contrario, el flujo glucolítico en p53<sup>R248Q</sup> aumentó 9 veces vs HeLa p53<sup>R273C</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** Flujos energéticos en las diferentes líneas celulares de HeLa. Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \*P < 0.01 versus HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

#### 4.6 Efecto de la mutación de p53<sup>R273C</sup> sobre el potencial transmembranal mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Las mutaciones p53<sup>R273C</sup> y p53<sup>R248Q</sup> disminuyeron 40-80% el potencial transmembranal mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) comparado con HeLa p53<sup>WT</sup> (Figura 13, Tabla 2). Lo anterior indica que las mutaciones independientemente de donde se encuentren afectan la función termodinámica de la fosforilación oxidativa.



**Figura 13.** Efecto de la mutación de p53<sup>R273C</sup> sobre el potencial mitocondrial transmembranal ( $\Delta\Psi_m$ ). Se muestra un trazo representativo en células HeLa p53<sup>R273C</sup> y HeLa<sup>WT</sup> utilizando rodamina 6G. Las flechas señalan el momento en que las células y el desacoplante CCCP fueron añadidos al medio de reacción. Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \*P < 0.05 versus HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. UAF, Unidades arbitrarias de fluorescencia.

**Tabla 2.** Valores de potencial mitocondrial transmembranal de las diferentes líneas celulares de HeLa

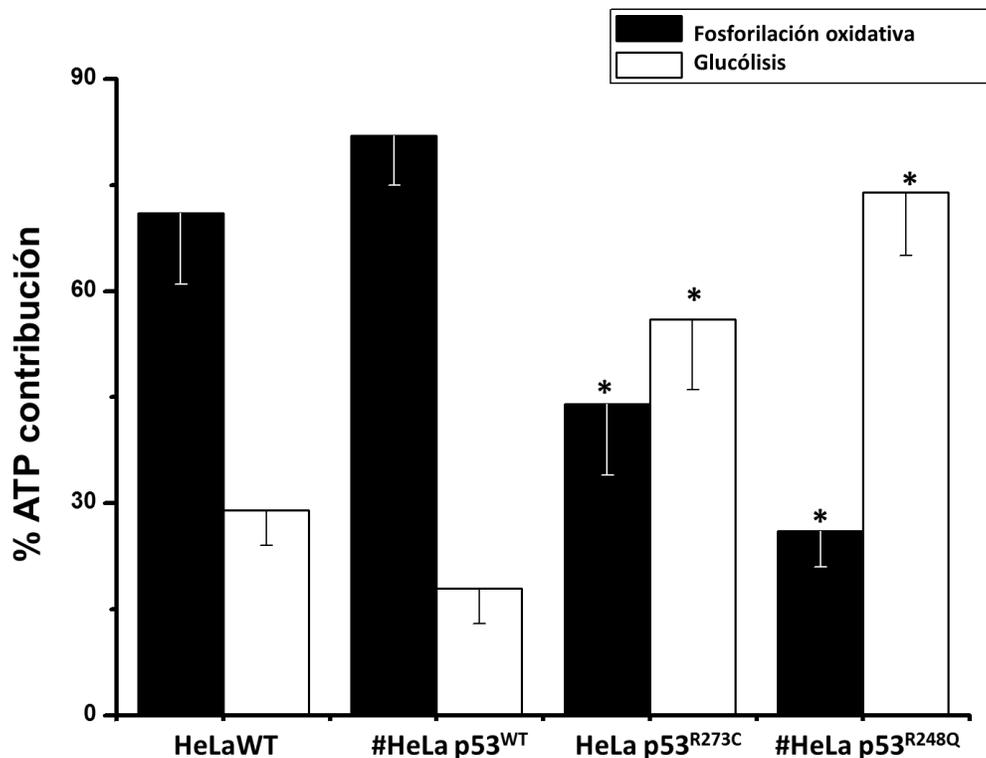
	Líneas celulares			
	HeLa <sup>WT</sup>	#HeLa p53 <sup>WT</sup>	HeLa p53 <sup>R273C</sup>	#HeLa p53 <sup>R248Q</sup>
$\Delta\Psi_m$	95 $\pm$ 1	170 $\pm$ 9*	13 $\pm$ 1*	60 $\pm$ 10*

Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \*P < 0.05 versus HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

#### 4.7 Efecto de la mutación de p53<sup>R273C</sup> sobre el aporte de ATP en la línea celular de HeLa

A partir de los valores obtenidos experimentalmente de cada flujos energéticos se calcularon los aportes de ATP celular proveniente de cada vía energética asumiendo que por cada lactato generado se obtiene estequiométricamente una molécula de ATP y para la fosforilación oxidativa (FO) se asumió que por cada ngAtO consumido por la vía se forman 2.5 moléculas de ATP [Nakashima et al., 1984].

En HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>WT</sup> el mayor aporte energético fue proporcionado por la FO (70 y 82%, respectivamente). Por el contrario, para la mutación R273C, la glucólisis fue la vía que proporcionó más del 50% del ATP. Este resultado correlacionó con lo reportado para la mutación R248Q donde la glucólisis fue la principal vía energética [Hernández-Reséndiz et al., 2019] (Figura 14).



**Figura 14.** Contribución de ATP por la glucólisis y fosforilación oxidativa en las células de HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>R273C</sup>. Los datos muestran el promedio  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \*P < 0.05 vs. HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé. # reportado por [Hernández-Reséndiz et al., 2019].

#### 4.8 Determinación de la concentración requerida para inhibir el 50% la proliferación celular (IC<sub>50</sub>) de diferentes inhibidores metabólicos y canónicos en HeLa

HeLa<sup>R273C</sup> y HeLa<sup>R248Q</sup> mostraron mayor sensibilidad (4-5 veces) al inhibidor glucolítico gosispol comparado con HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa<sup>WT</sup>, con valores de IC<sub>50</sub> en el orden micromolar (Tabla 3). Por el contrario, el celecoxib cuyo blanco no canónico es la función mitocondrial [Pritchard et al., 2018] afectó mayormente el crecimiento de HeLa<sup>WT</sup> y de HeLa p53<sup>WT</sup>. Las células HeLa con las mutaciones fueron menos sensibles al celecoxib debido en parte a que no dependen del ATP mitocondrial. Las células HeLa p53<sup>WT</sup> y ambas mutantes de p53 mostraron alta resistencia al cisplatino vs. HeLa<sup>WT</sup> (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores de IC<sub>50</sub> de los inhibidores metabólicos sobre HeLa

Compuestos	Líneas celulares			
	HeLa <sup>WT</sup>	HeLa p53 <sup>WT</sup>	HeLa p53 <sup>R273C</sup>	HeLa p53 <sup>R248Q</sup>
<b>Anti-glucolítico</b>				
Gosispol (μM)	178±35	125±12	38±10*	16±5*
<b>Anti-mitocondrial</b>				
Celecoxib (μM)	43±9	30±8	117±45*	202±25*
<b>Antineoplásico</b>				
Cisplatino (μM)	13±3	98±17*	69±28*	78±29*

Los inhibidores ensayados se añadieron a las células de HeLa en fase exponencial y se incubaron por 24 h. Las concentraciones ensayadas son: gosispol (10, 100 μM, 1 mM), celecoxib (1, 10, 100, 500 μM) y cisplatino (1, 10, 100, 500 μM). Los datos muestran el promedio ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes, \*P< 0.05 vs. HeLa<sup>WT</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. Análisis de ANOVA/post hoc Scheffé.

La presencia de la forma no mutada de p53<sup>WT</sup> favorece al metabolismo mitocondrial [Hernández-Reséndiz et al., 2015]. Sin embargo, más del 80% de los cánceres metastásicos tienen a p53 con alto índice de mutabilidad lo que promueve que su proliferación celular, grado de invasión, metástasis y resistencia a los fármacos sea mayor que en células que no tienen p53 o que expresan la isoforma no mutada del gen supresor [Dittmer et al., 1993; Petitjean et al., 2007; Kandoth et al., 2013]. La proteína p53 juega un papel importante en el metabolismo energético y en su regulación. En un trabajo previo se demostró que la mutación R248Q en p53 favoreció el metabolismo glucolítico proveyendo más del 80% del ATP celular [Hernández-Reséndiz et al., 2019]. En nuestro grupo de trabajo nos interesó determinar si esta redistribución del metabolismo energético observada en el fenotipo mutante R248Q se conserva en otros tipos de células con mutaciones en aminoácidos diferentes como la R273C. La identificación de la vía energética que provee la mayor cantidad de ATP requerido por la célula tumoral para llevar a cabo sus procesos dependientes de energía como proliferación celular, biosíntesis de lípidos, migración e invasión celular [DeBerardinis et al., 2008] permitirá proponerla como un potencial sitio terapéutico en los tumores que presentan p53 con isoformas mutantes, que además, son los tipos de cáncer más agresivos [Eldar et al., 2013].

### **5.1 Efecto de p53 mutado sobre el metabolismo energético de HeLa**

La hipótesis de Warburg sostiene que las células tumorales utilizan primordialmente a la glucólisis como fuente de energía incluso en condiciones aeróbicas. Esta aseveración dio lugar a la propuesta de que la mitocondria tumoral está dañada, sin haberse evaluado experimentalmente [Warburg, 1956].

La mayoría de los estudios que analizan el efecto de p53 y de sus isoformas mutadas sobre el metabolismo energético no son concluyentes debido que sólo se evalúa a la glucólisis sin profundizar en la función mitocondrial. Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en demostrar que la mitocondria sí es funcional en diferentes tipos de tumores malignos. Derivado de ello, hemos propuesto a la terapia anti-mitocondrial como una estrategia potencial para disminuir el crecimiento tumoral y aquellos procesos de alta dependencia energética en el tumor como son proliferación, migración e invasión celular.

El efecto de p53<sup>WT</sup> sobre el metabolismo energético ya ha sido explorado por varios grupos de investigación incluyendo el nuestro [Zhang et al., 2013; Hernández- Reséndiz et al., 2015; Eriksson et al., 2017]. Sin embargo, pocos trabajos han sido publicados analizando el efecto de p53 con alguna mutación sobre la producción de energía global del tumor; es decir, analizando ambas vías energéticas [Hernández- Reséndiz et al., 2018].

Existen múltiples estudios que señalan que las mutaciones en p53 aceleran la glucólisis. Por ejemplo, el cáncer de pulmón H1299 o el cáncer de colon HCT116 con mutaciones R175H, R248Q, R248W o R273H en p53 tienen un consumo de glucosa y producción de lactato más elevado que su contraparte no mutada [Zhang et al., 2013; Eriksson et al., 2017]. De manera similar, yo encontré en este trabajo que el cáncer de cérvix HeLa con p53 mutado en R273C mantiene un aumento en la expresión de las proteínas y del flujo glucolítico comparado con HeLa p53 no mutado. Mis datos correlacionaron con lo reportado para la mutación p53<sup>R248Q</sup> [Hernández-Reséndiz et al., 2019] donde también la glucólisis aumentó favoreciendo el efecto Warburg.

En los dos tipos de HeLa mutado analizados en este estudio se encontró una disminución de la fosforilación oxidativa más del 50%. Esto indica que el efecto Warburg prevalece en las células tumorales que presentan un p53 mutado independientemente del tipo de mutación presente. Además este resultado sugiere que (1) la mutación de p53 puede estar ligada a un remodelaje metabólico y (2) la glucólisis podría proponerse como blanco terapéutico en estos tipos de canceres con p53 mutado.

## **5.2 Efecto de la mutación de p53 sobre la resistencia a fármacos antineoplásicos en HeLa**

Las mutaciones de p53 disminuyen la toxicidad de varios fármacos antineoplásicos como el cisplatino, el carboplatino y el paclitaxel provocando resistencia [Chuaire-Noack et al., 2008; Brachova et al., 2014]. Entre los mecanismos propuestos se encuentran la sobre-expresión de las glicoproteínas tipo P, la promoción de la supervivencia celular, la inhibición de la apoptosis y autofagia, la reparación del ADN y la inducción de un fenotipo tipo *stem* en las células tumorales [He et al., 2017]. Por lo tanto, es imperativo encontrar nuevos blancos terapéuticos que eviten la recurrencia del tumor en los pacientes con cáncer.

En este estudio evalué las concentraciones de algunos inhibidores metabólicos que disminuyen la proliferación del tumor al 50% (IC<sub>50</sub>) en HeLa<sup>WT</sup> y en sus tres isoformas de p53.

Las isoformas de HeLa que presentaron alguna de las dos mutaciones en p53 analizadas, fueron significativamente más sensibles al inhibidor glucolítico gopipol a concentraciones atractivas para el sector clínico (IC<sub>50</sub> <40 µM) y mostraron alta resistencia al inhibidor mitocondrial celecoxib debido a que estas células dependen principalmente del metabolismo glucolítico (>60%) y no del mitocondrial. Sin embargo, se reconoce que el gopipol no es un inhibidor específico para las deshidrogenasas glucolíticas (LDH y GAPDH), ya que bloquea inespecíficamente a otras deshidrogenasas mitocondriales (PDH, SDH, 2OGDH, IDH o de la β-oxidación) [De Peyster y Wang, 1993]. Por ello, se están realizando experimentos en combinación con gopipol que a bajas dosis pudiera bloquear la glucólisis más efectivamente. Las células HeLa<sup>WT</sup> y HeLa p53<sup>WT</sup> fueron muy sensibles al celecoxib como se ha demostrado en otros tipos de cáncer como el de mama triple negativo (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y el de HeLa [Pacheco-Velázquez et al., 2018; Pritchard et al., 2018]. De hecho, todos estos tipos celulares dependen más de la fosforilación oxidativa que de la glucólisis para sostener la proliferación, migración e invasión celular [Pacheco-Velázquez et al., 2018; Pritchard et al., 2018]. Además, se demostró que el celecoxib no tiene efecto aparente en las células sanas (fibroblastos de ratón, 3T3 y células epiteliales de tejido mamario humano, MCF-10A) a concentraciones similares a las determinadas en este estudio (1-20 µM) [Pacheco-Velázquez et al., 2018].

El cisplatino (fármaco canónico usado para disminuir el crecimiento del cáncer cervicouterino) tuvo un efecto potente en las células que no tienen p53 ni en su forma mutada tal como se ha publicado en otras células cancerosas carentes de p53 [Robledo-Cadena et al. 2020, manuscrito en revisión]. Las IC<sub>50</sub> para cisplatino calculadas en HeLa p53<sup>WT</sup> y en las dos mutantes fue muy similar y no se reportó diferencia significativa entre ellas indicando que la presencia de la mutación no influye en la sensibilidad del cisplatino en HeLa. En comparación con los inhibidores metabólicos celecoxib y gopipol, el cisplatino mostró alta toxicidad en las células HeLa<sup>WT</sup> vs. HeLa p53<sup>WT</sup> y HeLa p53 mutado. Esto coincide con reportes anteriores donde se ha determinado una mayor resistencia a los

fármacos antineoplásicos cuando p53 está presente ya que aumentan la expresión de las glicoproteínas tipo P [He et al., 2017].

La evaluación citotóxica de diferentes inhibidores anti-metabólicos sobre diferentes tipos celulares dependiendo de la expresión de p53 es un campo poco estudiado. Mi trabajo marca un precedente importante sobre el efecto que tiene p53 y sus mutaciones sobre la resistencia a fármacos antineoplásicos del cáncer cervicouterino. Aunque los fármacos ensayados disminuyeron la proliferación tumoral, algunos de ellos como el cisplatino tienen efectos secundarios disminuyendo la función cardiovascular y hepática [Harder y Rosenberg, 1970]. El celecoxib afecta al riñón y al tracto gastrointestinal, e incluso causa hemorragias gástricas [Goldstein et al., 2000]. El gosipol provoca hipocalcemia, fatiga muscular, toxicidad renal y hepática, infertilidad permanente y causa la destrucción gradual y progresiva del miocardio [Dalefield, 2017]. Es por ello que la implementación de una terapia combinatoria podría ser esencial contra estos tumores con p53. Al respecto, en mi grupo de trabajo se encontró que el celecoxib aumentó la potencia de cisplatino, paclitaxel y doxorubicina sin afectar la proliferación y viabilidad de las células sanas (fibroblastos de ratón 3T3 y fibroblastos de piel HFF-1) [Robledo- Cadena et al., 2020, manuscrito enviado a *Frontiers in Oncology*].

## CAPITULO VI

### 6.1 Conclusión

La mutación en p53<sup>R273C</sup> promueve el efecto Warburg y la terapia anti- glucolítica podría ser una nueva estrategia terapéutica para disminuir el crecimiento de cánceres que tienen p53 mutado.

## 6.2 Referencias

- Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 1751–1758.
- Appella E, Anderson W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Biochem.* 2001; 10: 2764-2772.
- Blandino G, Di Agostino S. New therapeutic strategies to treat human cancers expressing mutant p53 proteins. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37:30.
- Brachova P, Mueeting Sr, Carlson Mj, Goodheart MJ, Button AM, Mott, SL., Leslie KK. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum- and taxane-based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma. *Int J Oncol.* 2014; 46: 607–618.
- Bullock A, Henckel J, Fersht A. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene.* 2000; 19: 1245–1256.
- Chang J, Kim DH, Lee S W, Choi K Y, Sung, Y C. Transactivation Ability of p53 Transcriptional Activation Domain Is Directly Related to the Binding Affinity to TATA-binding Protein. *JBC.* 1995; 270: 25014–25019.
- Chène P. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene,* 2001; 20: 2611–2617.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey P Pavletich N. Crystal structure of a p53 tumor suppressor- DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science,* 1994; 265: 346–355.
- Chuaire-Noack L, Sánchez-Corredor M C, Ramírez-Clavijo S. p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. *Invest Clin.* 2008; 49: 561 – 593.
- Dalefield R. Agricultural and Feed-Related Toxicants. *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand.* 2017. 343–360.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–378.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism.* 2008; 7:11–20.
- De Peyster A, Wang YY. Genetic toxicity studies of gossypol. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1993. 297: 293–312.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet.* 1993; 4: 42-46.

Eldar A, Rozenberg H, Diskin-Posner Y, Rohs R, Shakked Z. Structural studies of p53 inactivation by DNA-contact mutations and its rescue by suppressor mutations via alternative protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 8748–8759

Eriksson M, Ambroise G, Ouchida A T, Lima Queiroz A, Smith D, Gimenez-Cassina A., Vakifahmetoglu-Norberg H. Effect of Mutant p53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism. *Mol Cell Biol.* 2017; 37.

Gallardo-Pérez JC, Adán-Ladrón de Guevara A, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. HPI/AMF inhibition halts the development of the aggressive phenotype of breast cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017; 1864:1679-1690.

Goldstein JL, Silverstein FE, Agrawal NM, Hubbard RC, Kaiser J, Maurath CJ, Geis GS. Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor. *AM J Gastroenterol.* 2000; 95(7): 1681–1690.

Granchi C, Minutolo F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *Chem. Med. Chem.* 2012; 7: 1318–1350.

Harder HC, Rosenberg B. Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. *IJC.* 1970; 6: 207–216.

He C, Li L, Guan X, Xiong L, Miao X. Mutant p53 gain of function and chemoresistance: The role of mutant p53 in response to clinical chemotherapy. *Chemotherapy.* 2017; 62:43-53.

Hernández-Reséndiz I, Román-Rosales A, García-Villa E, López-Macay A, Pineda E, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Alvarez-Ríos E, Gariglio P, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1853: 3266-3278.

Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez J C, López-Macay A, Robledo-Cadena D X, García-Villa E, Gariglio P, Rodríguez-Enríquez S. Mutant p53<sup>R248Q</sup> downregulates oxidative phosphorylation and upregulates glycolysis under normoxia and hypoxia in human cervix cancer cells. *Journal of Cellular Physiology.* 2019; 234: 5524-5536.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2019. <https://www.inegi.org.mx/>

International Agency for Research on Cancer, 2019, [globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).

Joerger AC, Fersht AR. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene.* 2007; 26:2226–2242.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013; 502: 333–339.

Kang N, Wang Y, Guo S, Ou Y, Wang G, Chen J, Li D, Zhan Q. Mutant TP53 G245C and R273H promote cellular malignancy in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cell Biol.* 2018; 19: 16.

Klockars, A. J.; Hancock, G. R. Scheffé's More Powerful FProtected Post Hoc Procedure. *J. Educ. Behav. Stat.* 2000; 25: 13–19.

Krzywinski, M.; Altman, N. Points of significance: Analysis of variance and blocking. *Nat. Methods.* 2014, 11: 699–700.

Leroy B, Anderson, M, Soussi, T. TP53 Mutations in Human Cancer: Database Reassessment and Prospects for the Next Decade. *Human Mutation.* 2014; 35: 672–688.

Loughery J, Cox M, Smith LM, Meek DW. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res.* 2014. 42:7666-7680.

López M, Anzola M, Cuevas-Salazar N, Aguirre JM, Martínez de Pancorbo M. p53, un gen supresor tumoral. *Gac Med Bilbao.* 2001; 98: 21-27

Lowry O, Rosebrough NJ, Farr A L , Randall, R J. Protein measurement with the Folm phenol reagent. *Bzol Chem.* 1951; 193: 265-275.

McAtter JA, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines, in Davis JM (Ed), *Basic Cell Culture. A practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York 1994, pp. 93-147.

Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 2006; 273:1975-1988.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 2007; 274: 1393-1418.

Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek, FD, Rodríguez-Enríquez, S. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS Journal*, 2016, 283: 54–73.

Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* 1984; 4: 5702- 5706.

Omerovic J, Hammond D, Clague M, Prior I. Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. *Oncogene.* 2007; 27: 2754–2762.

Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2 (2):a001107.

Pacheco-Velázquez SC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. *Mol Pharm*. 2018; 15: 2151-2164.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007; 28: 622-629.

Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Bortnik V, Moreno-Sánchez R, Ralph S. Celecoxib inhibits mitochondrial O<sub>2</sub> consumption, promoting ROS dependent death of murine and human metastatic cancer cells via the apoptotic signalling pathway. *Biochem Pharmacol*. 2018; 154: 318–334.

Ríos M A, Hernández, M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Oncol*. 2001; 17: 65-71.

Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011; 2: 466–474.

Robledo-Cadena DX, Gallardo-Pérez JC, Dávila-Borja V, Pacheco-Velázquez SC, Belmont-Díaz JA, Ralph SJ, Blanco-Carpintero BA, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase cisplatin, paclitaxel and doxorubicin efficacy against human cervix cancer cells. Manuscrito enviado a *Frontiers in Oncology*. 2020.

Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, García-García JD, Belmont-Díaz J, López-Marure R, Hernández-Esquível L, Sánchez-Thomas R, Moreno-Sánchez R. Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019; 370: 65-77.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Pacheco-Velázquez SC, Belmont-Díaz JA, Robledo-Cadena DX, Vargas-Navarro JL, Corona de la Peña NA, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells. *Cells*. 2019; 8.

TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol*. 2014; 542: 91–114.

Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011; 731: 237-45.

Vander G, Cantley C, Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009; 324: 1029–1033.

Vousden K, Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009; 137: 413-431.

Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956; 123: 309–314.

Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Ruan Y. A Global Map of p53 Transcription-Factor Binding Sites in the Human Genome. *Cell*. 2006; 124: 207–219.

Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine AJ. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat. Commun*. 2013; 4: 2935.

Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 459-465.

## 6.3 ANEXO 1

## Genotipificación de HeLa<sup>wt</sup>



### INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

Laboratorio de Diagnóstico Genómico

Periférico Sur 4809, Col. Arenal de Tepepan, Delegación Tlalpan,  
México, D.F., C.P. 14610

Tel.: +52 (55) 53 50 19 37

[www.inmegen.gob.mx](http://www.inmegen.gob.mx)

#### Identificación LCH719-902-4

Muestra analizada Cultivo celular

Línea celular identificada por el cliente como HeLa (ATCC® CCL-2™)

<https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#specifications>

ID Tubo entregado para analizar **HeLa 28/10/19**

#### INTERPRETACIÓN:

A partir de la muestra identificada como **HeLa 28/10/19 (LCH719-902-4)** se realizó la lisis celular para amplificar marcadores de tipo STR autosómicos y gen de la *Amelogenina*. En la electroforesis capilar se obtuvo un electroferograma de buena calidad que nombro sólo los alelos reportados en este documento.

Para la muestra **HeLa 28/10/19 (LCH719-902-4)** se observan 14 de los 16 alelos reportados para la línea celular **HeLa (ATCC® CCL-2™)**, por lo que se puede concluir que la muestra analizada contiene células de una clona de la línea celular referida y no existe evidencia de que presente otro tipo de células humanas o este contaminada.

Marcador	LCH719-902-4	HeLa
<i>D3S1358</i>	15 18	
<i>vWA</i>	16 18	16 16
<i>D16S1339</i>	9 9	9 10
<i>CSF1PO</i>	9 10	9 10
<i>TPOX</i>	12 12	8 12
<i>D8S1179</i>	12 13	
<i>D21S11</i>	27 27	
<i>D18S11</i>	16 16	
<i>Peeta E</i>	7 17	
<i>D2S441</i>	10 11	
<i>D19S433</i>	13 14	
<i>TH01</i>	7 7	7 7
<i>FGA</i>	18 21	
<i>D22S1045</i>	16 17	
<i>D5S818</i>	11 12	11 12
<i>D18S117</i>	12 13.3	12 13.3
<i>D7S820</i>	8 12	8 12
<i>D8S1043</i>	18 18	
<i>D10S1248</i>	13 15	
<i>D1S1656</i>	12 15.0	
<i>D12S391</i>	20 25	
<i>D2S1338</i>	17 17	
<i>Peeta D</i>	8 8	
<i>Amelogenina</i>	XX	XX

## 6.4 ANEXO 2

## Genotipificación de HeLa p53<sup>R273C</sup>



INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA  
 Laboratorio de Diagnóstico Genómico  
 Periférico Sur 4809, Col. Arenal de Tepepan, Delegación Tlalpan,  
 México, D.F., C.P. 14610  
 Tel.: +52 (55) 53 50 19 37 [www.inmegen.gob.mx](http://www.inmegen.gob.mx)

Identificación **LCH719-902-2**  
 Muestra analizada Cultivo celular  
 Línea celular identificada por el cliente como HeLa (ATCC® CCL-2™)  
<https://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#specifications>  
 ID Tubo entregado para analizar **HeLa R273C 28/10/19**

### INTERPRETACIÓN:

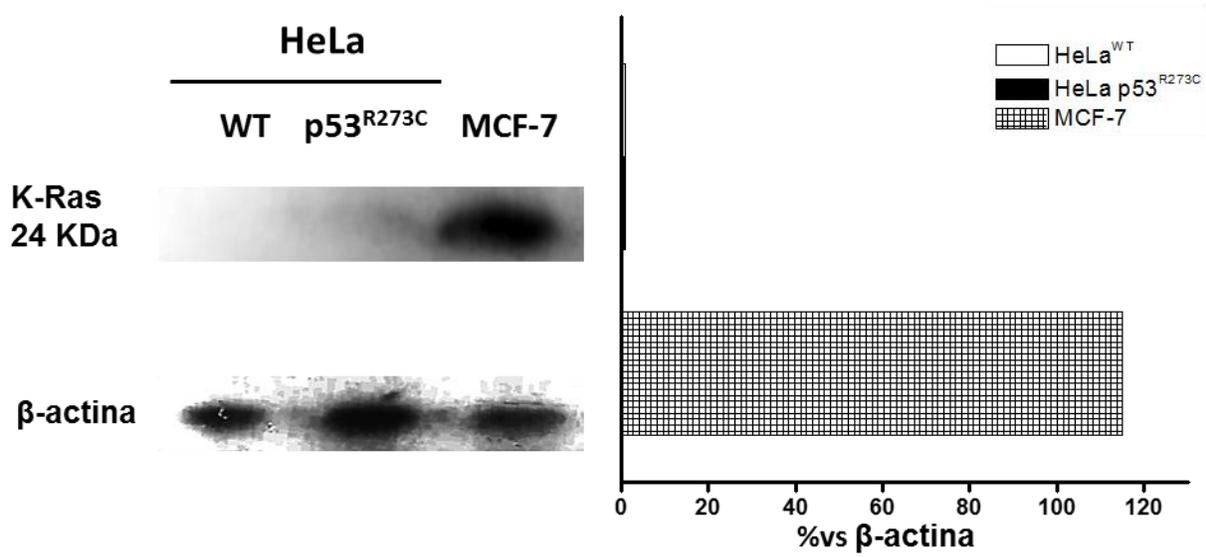
A partir de la muestra identificada como **HeLa (LCH719-902-2)**, se realizó la lisis celular para amplificar marcadores de tipo STR autosómicos y gen de la *Amelogenina*. En la electroforesis capilar se obtuvo un electroferograma de buena calidad que nombro sólo los alelos reportados en este documento.

La muestra identificada como: **HeLa (LCH719-902-2)**, presenta **12 de los 16 alelos reportados para la línea celular humana HeLa (ATCC® CCL-2™)**, por lo que se puede concluir que la muestra analizada una clona de células de la línea celular humana **HeLa (ATCC® CCL-2™)**, no existe evidencia de que esté contaminada con otro tipo de células humanas.

Marcador	LCH719-902-2	HeLa
<i>D3S1338</i>	10 10	
<i>vWA</i>	10 10	16 16
<i>D16S539</i>	10 10	9 10
<i>CSF1PO</i>	10 10	9 10
<i>TPOX</i>	8 12	8 12
<i>D8S1179</i>	12 13	
<i>D21S11</i>	27 28	
<i>D18S51</i>	10 10	
<i>Penta E</i>	7 7	
<i>D2S441</i>	10 11	
<i>D19S433</i>	13 14	
<i>TH01</i>	7 7	7 7
<i>FGA</i>	18 21	
<i>D22S1043</i>	16 17	
<i>D5S818</i>	11 12	11 12
<i>D13S317</i>	10.3 10.3	12 13.3
<i>D7S820</i>	12 12	8 12
<i>D6S1043</i>	10 10	
<i>D10S1248</i>	13 15	
<i>D1S1636</i>	12 10.0	
<i>D12S391</i>	20 20	
<i>D2S1338</i>	17 17	
<i>Penta D</i>	8 10	
<i>Amelogenina</i>	XX	XX

### 6.5 ANEXO 3

### Contenido de la proteína K-Ras



Contenido de la proteína K-Ras en las células de HeLa<sup>WT</sup>, p53<sup>R273C</sup> y MCF-7. A la izquierda se muestra el WB representativo de cada proteína analizada contra el control de carga ( $\beta$ -actina), a la derecha se muestra el análisis densitométrico de la misma [Omerovic, et al., 2007].