



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE $p53^{WT}$ Y DE LA MUTANTE $p53^{R273C}$ SOBRE EL SISTEMA
ANTIOXIDANTE DEL CÁNCER DE CÉRVIX HELA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. JORGE LUIS VARGAS NAVARRO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA SALUD, UAM IZTAPALAPA.

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

LABORATORIO EPIGENÉTICA, INMEGEN.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, JULIO 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE p53^{WT} Y DE LA MUTANTE p53^{R273C} SOBRE EL SISTEMA
ANTIOXIDANTE DEL CÁNCER DE CÉRVIX HELA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. JORGE LUIS VARGAS NAVARRO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA SALUD, UAM IZTAPALAPA.

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

LABORATORIO EPIGENÉTICA, INMEGEN.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, JULIO 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/363/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de marzo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** del estudiante **VARGAS NAVARRO JORGE LUIS**, con número de cuenta **312287834** con la tesis titulada **“Efecto de p53^{WT} y de la mutante p53^{R273C} sobre el sistema antioxidante del cáncer de cérvix HeLa.”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SAINZ
Vocal: DR. JOSÉ DE LA LUZ DÍAZ CHÁVEZ
Vocal: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ
Vocal: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Secretario: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 26 de abril de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL), FACULTAD DE MEDICINA, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)

SEP-CONACYT No. 283144 DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

CIENCIA Y FRONTERA-CONACyT No. 6379 DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

PAPIIT, DGAPA-UNAM No. IA201823. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

APOYO PARA EL POSGRADO CONACYT No. DE CVU: 1036458

TUTOR PRINCIPAL Y MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

TUTOR PRINCIPAL: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

COMITÉ TUTOR: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

DRA. MINA KONIGSBERG FAINTEIN

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A MI ABUELITA, HASTA DONDE QUIERA QUE ESTÉS, PORQUE SIEMPRE ME APOYASTE Y ESTUVISTE CONMIGO, SIN TI, ESTO NO SERÍA POSIBLE.

A MI MADRE, POR GUIARME EN TODO MOMENTO, POR ALENTARME A SEGUIR ADELANTE Y POR TODO EL AMOR QUE SIEMPRE ME HA DADO.

A MI NOVIA GABRIELA, QUE DURANTE ESTOS AÑOS DE MAESTRÍA (INCLUSO DESDE ANTES) ME HA MOTIVADO Y APOYADO A CONTINUAR Y A SER UNA MEJOR PERSONA. GRACIAS POR TODO EL AMOR.

A LA DRA. SARA RODRÍGUEZ, POR CONFÍAR EN MI Y POR TODO EL APOYO QUE ME HA BRINDADO DESDE ANTES DE EMPEZAR LA MAESTRÍA.

AL DR. RAFAEL MORENO, POR LAS OBSERVACIONES, CRÍTICAS Y CONOCIMIENTO QUE AYUDARON AL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

A LA DRA. SILVIA PACHECO Y LA DRA. DIANA ROBLEDO POR TODO SU AYUDA Y ENSEÑANZAS.

A LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO DE TUMORES DEL INCar Y LABORATORIO DE CONTROL METABÓLICO DE LA FES-I.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1 p53 COMO PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES | 5 |
| 1.2 MUTACIONES EN p53: GANANCIA Y PÉRDIDA DE FUNCIONES | 8 |
| 1.3 p53 EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO | 10 |
| 1.4 p53 EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE | 12 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| 3. HIPÓTESIS | 19 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 20 |
| 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 20 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODO | 21 |
| 5.1 SOBREEXPRESIÓN DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} | 21 |
| 5.2 CULTIVO CELULAR | 21 |
| 5.3 CURVAS DE CRECIMIENTO | 22 |
| 5.4 EXTRACCIÓN E INMUNODETECCIÓN DE PROTEINAS POR WESTER BLOT | 22 |
| 5.5 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN Y CISTEÍNA | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO | 24 |
| 5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 24 |
| 6. RESULTADOS | 25 |
| 6.1 SOBREENPRESIÓN DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} EN CÉLULAS HELA | 25 |
| 6.2 EFECTO DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR | 26 |
| 6.3 EFECTO DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} SOBRE EL CONTENIDO DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES Y PROTEÍNAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE | 28 |
| 6.4 EFECTO DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} SOBRE EL CONTENIDO DE GSH Y CISTEÍNA | 30 |
| 6.5 EFECTO DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} SOBRE EL CONTENIDO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) | 31 |
| 7. DISCUSIÓN | 36 |
| 7.1 LA SOBREENPRESIÓN DE p53 ^{WT} Y p53 ^{R273C} NO MODIFICA LA PROLIFERACIÓN CELULAR | 36 |
| 7.2 p53 ^{R273C} INCREMENTA EL CONTENIDO DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES Y ENZIMAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE | 37 |
| 7.3 LA PRESENCIA DE p53 ^{R273C} INCREMENTA LOS NIVELES DE CISTEÍNA Y GLUTATIÓN | 38 |
| 7.4 LA SOBREENPRESIÓN DE p53 ^{R273C} NO ALTERA LOS NIVELES DE ERO EN CÉLULAS HELA | 40 |
| 8. CONCLUSIÓN | 42 |
| 9. PERSPECTIVAS | 43 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| ANT | Transportador de adenosín nucleótidos |
| ATPs | ATP sintasa |
| CAT | Catalasa |
| CuZnSOD | Superóxido dismutasa dependiente de cobre/ zinc |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| FO | Fosforilación oxidativa |
| FoxO | Forkhead box clase O |
| GA | Glutaminasa |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GR | Glutación reductasa |
| GSH | Glutación reducido |
| HO-1 | Hemo oxigenasa 1 |
| MDM2 | Murine double minute 2 |
| MnSOD | Superóxido dismutase dependiente de manganeso |
| NQO-1 | NADPH quinona óxido reductasa 1 |
| Nrf2 | Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 |
| PDH | Piruvato deshidrogenasa |
| PGAM | Fosfoglicerato mutasa |
| SLC7A11 | Solute Carrier Family 7 Member 11 |
| TrxR2 | Tioredoxina reductasa 2 |
| 2OGDH | 2-oxoglutarato deshidrogenasa |

RESUMEN

En células no cancerosas el factor transcripcional p53 regula diferentes procesos como la reparación del ADN, el metabolismo energético y el estrés oxidante. Este factor transcripcional se encuentra mutado en más del 50% de los tumores metastásicos y una de las mutaciones más frecuentes es la R273C (sustitución de arginina por cisteína). Estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo, demostraron que en condiciones de normoxia, la sobreexpresión nativa de p53 (p53^{WT}) en células de cáncer de cérvix HeLa (HeLa-H) incrementa la fosforilación oxidativa (FO) 1.6 veces vs. HeLa wild-type (e.g., sin p53, HeLa-L); mientras que la expresión de p53^{WT} no tuvo un efecto relevante sobre la glucólisis tumoral. Por el contrario, en células HeLa con la mutante R273C, la FO disminuyó 40-69% vs. HeLa-H, favoreciendo el efecto Warburg (e.g., incremento de la glucólisis en presencia de oxígeno por la disfunción mitocondrial). Nuestra hipótesis es que la disminución en la FO observada en la mutante de p53 posiblemente aumenta a las especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que está establecido que la baja actividad de la cadena respiratoria correlaciona con un aumento substancial en los niveles de ERO. El manejo de los ERO esta regulado por el sistema antioxidante. Esta reportado que la sobreexpresión de un p53 mutado (e.g. R273H, R273C, R248Q, etc.) regula a la baja la expresión y/o actividad de ciertas enzimas del sistema antioxidante. En consecuencia, se propone que la presencia de la mutación R273C promueve un mecanismo antioxidante deficiente comparado con células HeLa p53 que no presenten la mutación. Por lo tanto, se propuso como objetivo general de este estudio, determinar de manera global el efecto de p53^{WT} y p53^{R273C} sobre el sistema antioxidante del cáncer de cérvix HeLa midiendo (I) el contenido de proteína de enzimas del sistema antioxidante; (II) el contenido de proteína de factores transcripcionales que regulan al sistema antioxidante (e.g. Nrf2, FoxO); (III) el contenido de metabolitos antioxidantes como glutatión y cisteína; y (IV) la velocidad de producción de ERO.

Para este estudio se utilizaron las células de cáncer de cérvix HeLa sobreexpresantes de p53^{WT} y la mutante p53^{R273C}. El contenido de las proteínas

estudiadas se determinó por Western blot y los contenidos de cisteína y glutatión (total y reducido) se determinaron por HPLC en extractos celulares. El contenido intracelular de ERO se determinó en células intactas con el indicador fluorescente dihidroetidio.

Como resultados, la mutación R273C no modificó la tasa de duplicación ($0.74 \pm 0.04 \text{ días}^{-1}$) y el tiempo generacional ($23 \pm 2.7 \text{ hrs}$) vs. HeLa p53^{WT} (HeLa-H; 0.77 ± 0.18 ; 22 ± 4.5) indicando que ésta mutación no afecta la proliferación celular. El contenido de proteína de los factores transcripcionales responsables de la activación del sistema antioxidante y blancos de p53: Nrf2, FoxO 1 y FoxO 3a, así como sus isoformas fosforiladas, incrementó de 1.4 a 7.5 veces en HeLa p53^{R273C} vs. HeLa H. Esta mutante también promovió un incremento de 1.5 a 42 veces en el contenido de las enzimas involucradas en el sistema antioxidante (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx4, GR y TxrR 2) vs. HeLa-H. Por otro lado, el contenido de cisteína y glutatión reducido incrementó 2 - 4 veces en HeLa p53^{R273C} ($3 \pm 1.6 \text{ nmol}$ equivalentes de cisteína; 8.3 nmol equivalentes de cisteína) vs. HeLa-H (0.82 ± 0.7 ; $4.7 \pm 2.7 \text{ nmol}$ equivalentes de cisteína); sin embargo, el contenido de glutatión oxidado (GSSG) aumentó 12 veces (5.5 nmol equivalentes de cisteína, n=2) y la relación GSH/GSSG fue 4 veces menor (4 nmol equivalentes de cisteína, n=2) en HeLa p53^{R273C} vs. HeLa-H (0.46 ± 0.33 ; 17 ± 3.8). Por último, se determinó contenido total y la velocidad de producción de ERO. En HeLa p53^{R273C} el contenido total de ERO (2.24 ± 0.18) y su velocidad de producción (0.016 ± 0.0018) incrementaron 1.2 veces vs. HeLa-H (1.7 ± 0.3 ; 0.013 ± 0.005), aunque estos incrementos no fueron significativos.

Los datos anteriores indican que, contrario a la hipótesis propuesta, la mutación p53^{R273C} favorece un incremento en el sistema antioxidante de las células HeLa, lo cual le permite un manejo más eficiente de las ERO en condiciones en las que la FO está fuertemente abatida.

ABSTRACT

In non-cancer cells, the transcriptional factor p53 regulates several processes involved in DNA repairing, energy metabolism and oxidative stress. In cancer cells, p53 is frequently mutated favoring metastatic phenotype in most (<50%) of malignant cancers, being the R273C mutation (arginine replaced by cysteine) the most frequently found in metastatic cancers. Previous studies revealed that in normoxic conditions, the p53 wild-type overexpression in human cervical HeLa carcinoma (HeLa-H), increases the oxidative phosphorylation (OxPhos) by 1.6-fold whereas glycolytic metabolism keep without change vs. wild-type HeLa cells (HeLa-L). On the contrary, in HeLa cells containing p53^{R273C} mutation (HeLa-R273C), the OxPhos decreased by 40-69% vs. HeLa-H favoring Warburg effect (i.e., glycolysis activation in aerobic conditions induced by mitochondrial impairment). The hypothesis driven in this work is that the low OxPhos flux observed in HeLa-R273C may be connected with an increment in reactive-oxygen species (ROS) because it has been widely established that the low respiratory chain activity correlates with a substantial increase in ROS level. Mutations in p53 as R273H decreases expression and activity of several antioxidant system enzymes. Consequently, it is proposed that p53 R273C mutation promotes a deficient antioxidant system compared to HeLa-H. Thus, the overall goal in this study is the systematic determination of p53^{WT} and p53^{R273C} effect on HeLa cancer cells antioxidant system. For this purpose (I) the content of proteins and transcriptional factors (i.e., Nrf2, FoxO), (II) the content of metabolites as glutathione and cysteine involved in the antioxidant system; and (III) ROS rate production.

The cells used in this study were HeLa-L, HeLa-H and HeLa^{R273C}. The protein content was assayed by Western-blot, the glutathione (reduced and total) and cysteine contents were determined by HPLC. The ROS content was determined by using fluorescent dihydroethidium dye in intact cells.

As results, R273 mutation did not affect duplication rate ($0.74 \pm 0.04 \text{ days}^{-1}$) and doubling time ($23 \pm 2.7 \text{ hours}$) vs. HeLa-H ($0.77 \pm 0.18 \text{ days}^{-1}$; $22 \pm 4.5 \text{ hours}$, respectively) indicating that p53 mutation does not affect cellular proliferation. The

protein level of transcriptional factors Nrf2, FoxO 1 and FoxO 3a associated with antioxidant system activation and their phosphorylated isoforms increased 1.4-7.5-times in HeLa-R273C vs. HeLa-H. Mutation also promoted an increment of 42-times in the level of CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx4, GR y TxrR 2 vs. HeLa-H. In parallel, the cysteine and reduced glutathione contents increased by 2-4 times in HeLa-R273C (3 ± 1.6 nmol cysteine equivalents and 8.3 nmol cysteine equivalents, respectively) vs. HeLa-H (0.82 ± 0.7 nmol cysteine equivalents and 4.7 ± 2.7 nmol cysteine equivalents, respectively); however, the total content of oxidized glutathione (GSSG) increased by 12-times promoting a significant lowering by 4-times in the GSH/GSSG ratio in HeLa-R273C vs HeLa-H (0.46 ± 33 nmol cysteine equivalents y 17 ± 3.8 nmol cysteine equivalents, respectively). Lastly, the intracellular ROS content and production rate was slightly higher in HeLa-R273C vs. HeLa-H but without significant difference.

In conclusion, and on the contrary to proposed hypothesis, p53^{R273C} mutation encourages antioxidant system for ROS efficient management under conditions in which OxPhos is strongly impaired in HeLa cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 p53 COMO PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES

La proteína supresora de tumores p53, codificada por el gen TP53 localizado en el cromosoma 17p13.1. [Maillet & Pervaiz, 2012], es un factor transcripcional homotetramérico conocido como “el guardián del genoma”, ya que regula múltiples procesos celulares como son la reparación de ADN, el ciclo celular, las vías energéticas (e.g. glucólisis, fosforilación oxidativa, FO), apoptosis, necrosis, autofagia y respuesta antioxidante [Robbins & Zhao, 2012; Kasthuber & Lowe, 2017; Simabuco *et al.*, 2018; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019; Shamloo & Usluer, 2019; Kumutina *et al.*, 2021]. Cada monómero que constituye a p53 se encuentra dividido en 4 dominios: N-terminal o dominio de transactivación, que además contiene un sitio rico en prolina; dominio de unión a ADN; dominio de oligomerización; y C-terminal o dominio de regulación (Figura 1) [Kumutina *et al.*, 2021].



Figura 1. Dominios de la proteína p53. TA: dominio de transactivación; PRD: dominio rico en prolina; DBD: dominio de unión al ADN; OD: dominio de oligomerización; CDT: dominio carboxilo terminal.

La estabilidad y funcionalidad de p53 es controlada por diferentes modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación o ubiquitinación [Meek, 1998; Bode & Dong, 2004; Dai & Gu, 2010; Shi *et al.*, 2021]. En condiciones de no estrés, p53 es blanco de ubiquitinización en diferentes residuos de lisina (K370, K372, K373, K381, K382 y K386) por la proteína MDM2 (murine double minute-2), favoreciendo su exportación del núcleo al citosol, para así ser degradado en el proteosoma [Dai & Gu, 2010; Joerger & Fersht, 2016]. Otra proteína implicada en la degradación de p53 es MDMX (MDM4), la cual no presenta actividad de

ubiquitin-ligasa pero favorece la unión de MDM2 a p53 [Joerger & Ferscht, 2016]. Por otro lado, está documentado que el estrés celular (e.g. hipoxia severa 0.1 %O₂ o crónica 0.5 - 1% O₂; rupturas de doble hebra del ADN; activación oncogénica; estrés oxidativo entre otras) (Figura 2) favorece la fosforilación y acetilación de p53 permitiendo su estabilización, traslocación, acumulación y tetramerización en núcleo para activar/inactivar diferentes genes blanco [Shieh *et al.*, 1997; Levine & Oren, 2009; Maillet & Pervaiz, 2012; Joeger & Ferscht, 2016; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019]. La fosforilación de p53 se lleva a cabo principalmente en los residuos de serina y treonina localizados en los dominios N-terminal y de unión al ADN (Ser 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46, 149, 315 y 292 y Thr 18, 81, 150 y 155) (Figura 3). Diferentes proteínas cinasas (PK) como ATM, ATR, p38, CDK, PKC, ERK, participan en el proceso de fosforilación de p53. Las PK son activadas por diferentes procesos de estrés promoviendo el arresto de ciclo celular o muerte por apoptosis (e.g. ATM es activado por daño al ADN y fosforila Ser 15 para inducir apoptosis; ATR es activado por radiación γ y luz UV, fosforilando Ser 15 y 37 para inducir apoptosis; ERK es inducido por doxorubicina y fosforila Thr 55 incrementando la actividad de p53) [Bode & Dong, 2004]. En paralelo a la regulación de p53 por fosforilación, su acetilación, mediada por p300/CBP, permite la estabilización y acumulación de p53 porque inhibe su interacción y unión con MDM2; además, promueve el reclutamiento de diferentes cofactores asociados al incremento en su actividad transcripcional [Dai & Gu, 2010].

Aunque p53 actúa principalmente en el núcleo, se ha descrito que p53 está presente en otros organelos como la mitocondria en la cual participa en varios procesos celulares. Por ejemplo, p53 puede unirse a BCL-2 y favorece la liberación del citocromo c, activando la apoptosis intrínseca [Bode & Dong, 2004]. También, al parecer, se une a la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) y disminuye su actividad, lo que conlleva a un aumento en los niveles de ERO y al daño celular [Robbins & Zhao, 2012] sobre todo en células malignas.

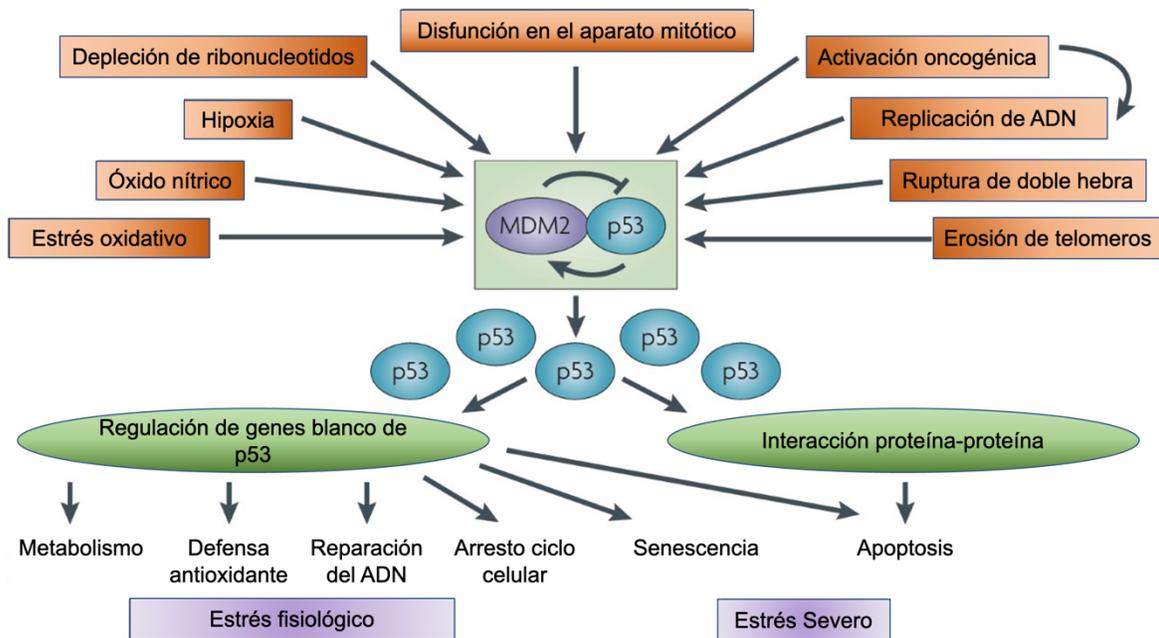


Figura 2. Activación de p53. Tomado y modificado de Levine & Oren, 2009.

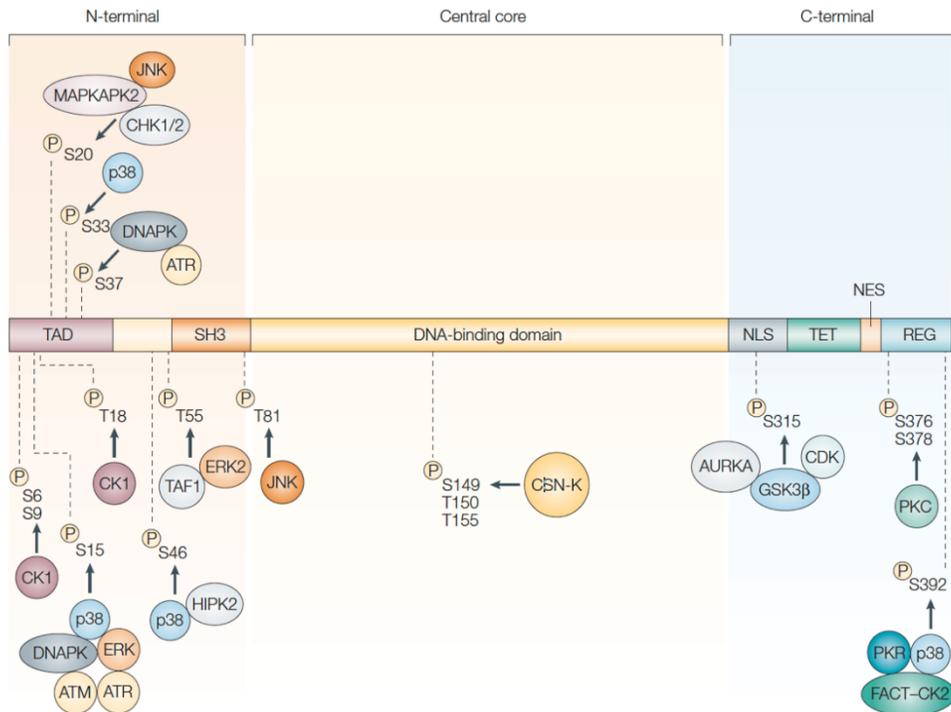


Figura 3. Sitios de fosforilación en p53. Tomado de Bode & Dong, 2004. ATM: Ataxia Telangiectasia Mutada; ATR: Ataxia Telangiectasia y proteína asociada con Rad 3; AURKA: Aurora cinasa; CDK: ciclina dependiente de cinasa; CK: caseína cinasa; CSN-K: complejo de cinasa asociado a signalosoma COP9; DNA-PK: cinasa dependiente de ADN; ERK: cinasa regulada

por señal extracelular; GSK3 β : glicogeno sintasa cinasa 3 β ; HIPK2: proteína cinasa que interactúa con el homeodominio 2; p38: p38 cinasa; PKC: proteína cinasa C. Tomada de Bode & Dong, 2004.

1.2 MUTACIONES EN p53: GANANCIA Y PÉRDIDA DE FUNCIONES

El gen TP53 se encuentra mutado en más del 50% de cánceres malignos como son el de mama, el de pulmón o el colorectal [Joerger & Ferscht, 2016; ICGC/TCGA, 2020; Alexandrov *et al.*, 2020; Rheinbay *et al.*, 2020; Gerstung *et al.*, 2020]. A nivel de proteína, estas modificaciones promueven la pérdida de las funciones canónicas de p53^{WT} como gen supresor de tumores [Petitjean *et al.*, 2007] y, en la mayoría de los casos, proporcionan nuevas características (ganancia de funciones; e.g. activación oncogénica) que conducen al desarrollo de un fenotipo maligno [Dittmer *et al.*, 1993; Alvarado-Ortiz *et al.*, 2021]. Hasta la fecha, se han reportado más de 2000 mutaciones en p53, de las cuales más del 80% se encuentran en el dominio de unión al ADN (e.g. R175H, Y220C, G245S, R248Q/W, R249S, R273C/H y R282W) (Figura. 4) [Joerger & Ferscht, 2016; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019]. De ellas, la mutación R248Q (sustitución de arginina por glutamina) y la mutación R273C (sustitución de arginina por cisteína) son las mutaciones más frecuentes [Dong *et al.*, 2013; Hanel *et al.*, 2013] y a las cuales se les ha asociado un desarrollo del fenotipo de malignidad tumoral [Li *et al.*, 2014; Joerger & Ferscht, 2016; Hernández-Resendiz *et al.*, 2019].

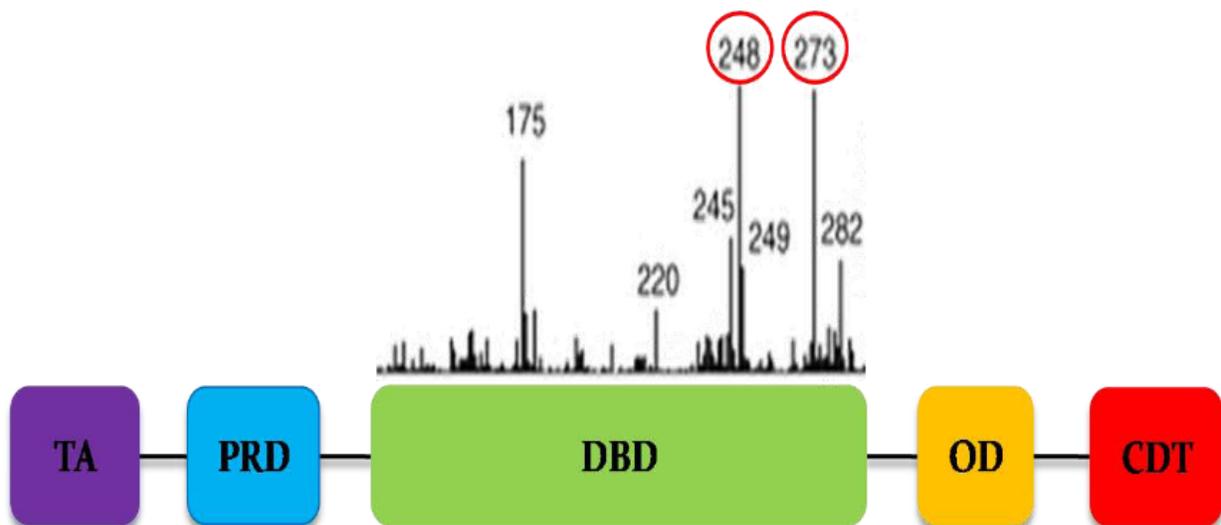


Figura 4. Mutaciones más frecuentes en la proteína p53. La figura muestra la posición de los residuos mas frecuentemente mutados en cáncer (e.g. posición 175, 248 y 273 corresponde a cambio de una arginina por otro aminoácido). Tomado de Miguel-Báez, 2016. Licenciatura.

Así como en p53^{WT}, la estabilidad y actividad de p53^{R248Q} y p53^{R273C} también depende de los tipos de modificación post traduccional que presenten, ya sea fosforilación, acetilación o ubiquitinación [Bode & Dong, 2004]. Se ha reportado una hiperfosforilación e hiperacetilación de diferentes mutantes de p53 (e.g. p53^{R248Q} y p53^{R273H}) en cánceres como cerebro, pulmón o páncreas, lo que conlleva a una fuerte inhibición en la actividad de MDM2 debido a que p53 mutante forma una asociación estable con Hsp90, impidiendo ser blanco de ubiquitinización y degradación [Bode & Dong, 2014; Allende-Vega & Villalba, 2019]. Por lo tanto, la fosforilación y acetilación son mecanismos que permiten la estabilización, acumulación y tetramerización de las formas mutantes de p53 promoviendo su actividad oncogénica [Bode & Dong, 2014; Allende-Vega & Villalba, 2019; Mantovani *et al.*, 2019].

La ganancia y pérdida de funciones inducidas por las mutaciones p53^{R248Q} y p53^{R273C} ya ha sido reportada anteriormente. En general, ambas mutaciones pierden la habilidad activar la transcripción de p21, PUMA, NOXA o p53AIP1, todos blancos de p53^{WT}, inhibiendo el control del ciclo celular y la apoptosis [Igarashi *et al.*, 2014; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019]. Por otro lado, incrementan la formación de colonias, resistencia a drogas antineoplásicas, expresión de P-glycoproteína, reparación de daño al ADN, proliferación, invasión y metástasis, [Chan & Lung, 2004; Igarashi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2020], además de modificar el metabolismo energético y la respuesta antioxidante [Eriksson *et al.*, 2017; Kalo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019].

1.3 p53 EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.

La modificación del metabolismo energético es considerado una característica distintiva del cáncer [Hannahan & Weinberg, 2011]. En un principio se pensó que en todos los tipos de cáncer, el aumento en el flujo glucolítico (hasta 60 veces comparado con su tejido de origen) era consecuencia de una disfunción mitocondrial a lo que se le llamó “efecto Warburg”. En consecuencia se concluyó que la glucólisis proporcionaba la mayor cantidad de ATP celular, sin que este hecho se hubiera demostrado experimentalmente [Warburg, 1956]. Actualmente, varios grupos de trabajo, incluyendo el nuestro, hemos demostrado que aunque la glucólisis es mayor en células tumorales vs. células no tumorales (Figura 5) [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Moreno-Sánchez *et al.*, 2009], la mitocondria proporciona más del 70% del ATP en células metastásicas (Figura. 6) [Mandujano-Tinoco *et al.*, 2013; Moreno-Sánchez *et al.*, 2014, Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2021] para promover procesos altamente dependientes de energía [Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018; Moreno-Sánchez *et al.*, 2023].

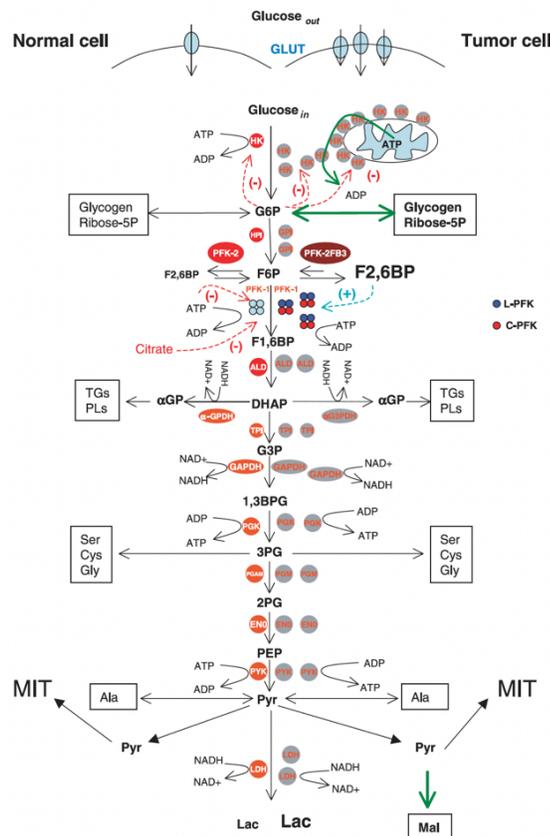


Figura 5. Glucólisis en células no tumorales (izquierda) y en células tumorales (derecha). Tomado de Moreno-Sánchez *et al.*, 2007.

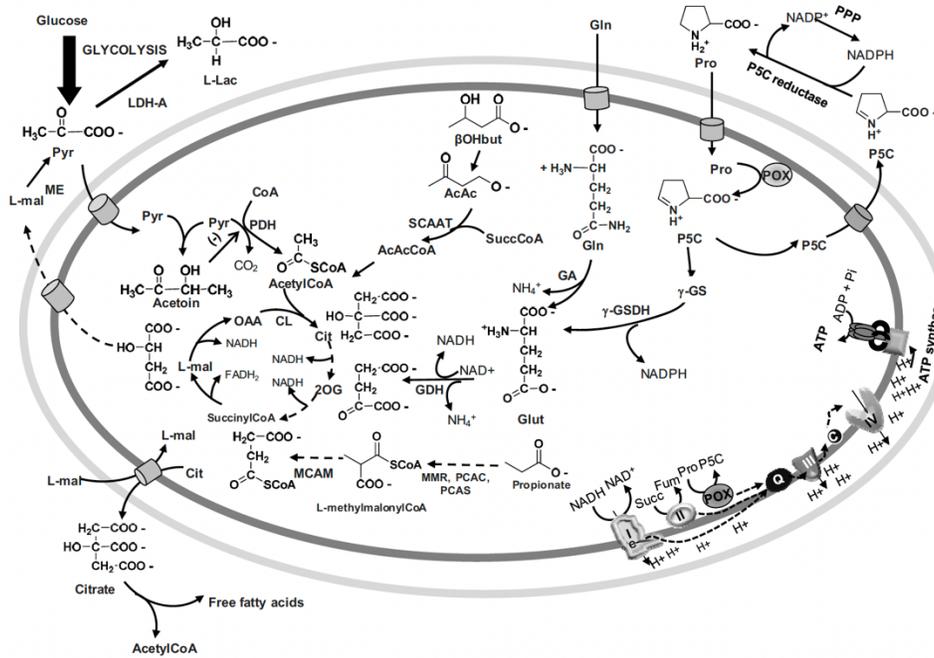


Figura 6. Metabolismo energético mitocondrial en células tumorales. Tomado de Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011.

La actividad de $p53^{WT}$ como regulador del metabolismo energético tumoral depende de la concentración de O_2 celular disponible. En normoxia (21% O_2), la sobre expresión de $p53^{WT}$ disminuyó el ARNm y contenido de proteína de GLUT 1, 3, y PGAM; sin embargo, el flujo de la glucólisis permaneció sin cambio en fibroblastos transformados, células de osteosarcoma (Saos-2) y en cáncer de cérvix HeLa [Chipuk & Green, 2006; Kawauchi *et al.*, 2008; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015]. Por otro lado, la sobre-expresión de $p53^{WT}$ en cáncer de cérvix HeLa incrementó el contenido de proteína de 2OGDH, GA y ANT, el flujo de fosforilación oxidativa -FO- (1.6 veces) vs. HeLa sin $p53$ (wild-type),. Por el contrario, en hipoxia (0.1% O_2) la sobreexpresión de $p53^{WT}$ en células HeLa sólo incrementa el contenido de GLUT 1 (>2 veces) vs. normoxia; sin embargo, el flujo glucolítico disminuyó 40% vs. normoxia [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015]. En esta condición,

el contenido de proteína de enzimas de la cadena respiratoria (ND1 y COX IV), ciclo de Krebs (2OGDH y PDH) y sistema fosforilante (ATPs y ANT), así como el flujo de FO disminuyeron significativamente 30 - 93% vs. HeLa wild type. Estos resultados revelaron que independientemente del nivel del oxígeno celular, p53^{WT} tiene como blanco directo a la fosforilación oxidativa, pero no a la vía glucolítica [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015].

Por el contrario, las mutaciones en p53 disminuyen el metabolismo mitocondrial y favorecen el efecto Warburg. En células H1299 de cáncer de pulmón y en células cáncer de cérvix HeLa, la sobreexpresión de p53^{R175H}, p53^{R273H} y p53^{R248Q} incrementan el contenido de proteína de GLUT1 y 3, HK I y II, las cuales son considerados sitios de control del flujo glucolítico en células cancerosas [Marín-Hernández *et al.*, 2006], lo que repercute en un aumento en el flujo glucolítico >70% vs. HeLa o H1299 wild type [Eriksson *et al.*, 2017; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019], mientras que la sobreexpresión de las mutantes de p53 H179R, R181H, S241F, R249S, R273H, C275Y, R280K, D281G, R273C y R248Q, disminuyeron el contenido de proteínas mitocondriales (ND1, COX IV, ATPs, GA y 2OGDH) y el flujo de FO (40-70%) vs. HeLa o H1299 wild type [Eriksson *et al.*, 2017; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019; Blanco-Carpintero, 2020].

1.4 p53 EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE

El oxígeno es un diradical ya que en el nivel $2\pi^*$ tiene dos electrones desapareados y dependiendo del spin que presenten estos electrones se puede clasificar en oxígeno triplete (mismo spin) o singulete (spin contrario), donde este último es el más reactivo de los dos [Halliwell & Gutteridge, 2015]. Sin embargo, la toxicidad del oxígeno radica en las especies reactivas (ERO) que se producen durante el metabolismo celular (radical superóxido $-\text{O}_2^{\bullet-}$, peróxido de hidrógeno $-\text{H}_2\text{O}_2-$ y radical hidroxilo $-\bullet\text{OH}-$). Los niveles intracelulares de ERO dependen de dos factores: el sistema productor de ERO (llamado sistema pro-oxidante) y el sistema consumidor de ERO (llamado sistema antioxidante) (Figura 7). El sistema pro-

oxidante está integrado por diferentes enzimas como son la xantina oxidasa (XO), la NADPH oxidasa (NOX) o los citocromos p450 [Halliwell & Gutteridge, 2015; He *et al.*, 2017; Rodic & Vincent, 2018]. Sin embargo, la principal fuente de producción de ERO intracelular es la mitocondria [Staniek & Nohl, 2000; St Pierre *et al.*, 2002; Nathan & Cunningham-Bussel, 2013], ya que un bloqueo o inhibición del transporte electrónico en los complejos I, II y III de la cadena transportadora de electrones, genera que los electrones circulantes se acumulen e interactúen con el oxígeno molecular que se encuentra en la vecindad de dichos complejos y en consecuencia formen ERO [Moreno-Sánchez *et al.*, 2013]. La regulación de la FO por parte de p53^{WT}, p53^{R248Q} y p53^{R273C} ya ha sido descrito anteriormente [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019; Blanco-Carpintero, 2020].

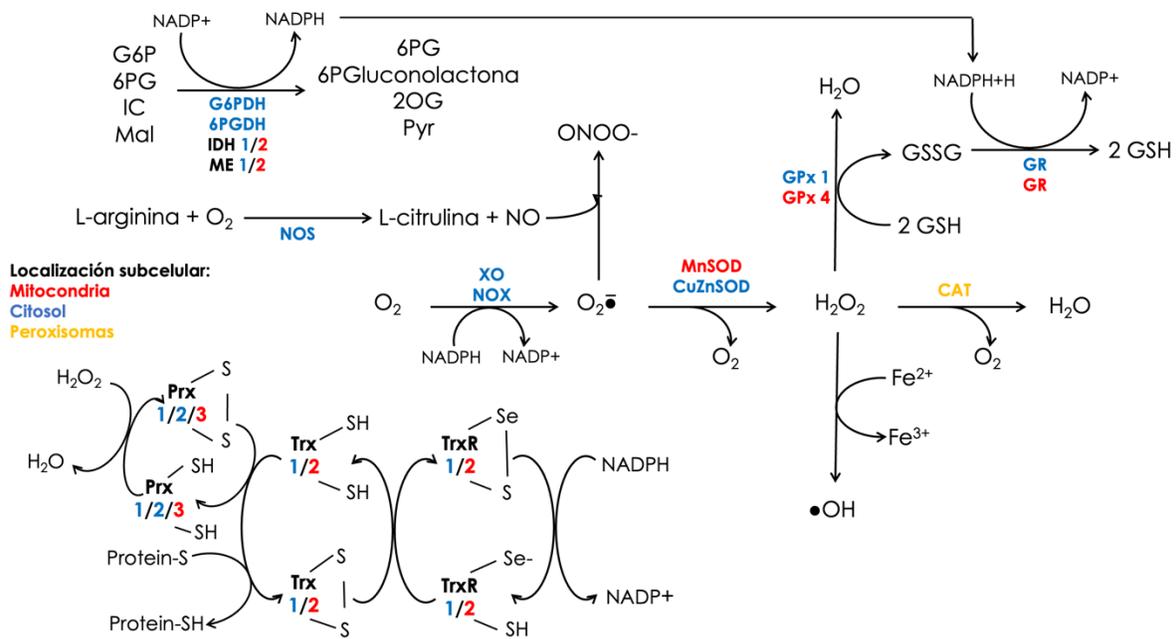


Figura 7. Producción y consumo de especies reactivas de oxígeno (ERO).

En el sistema antioxidante participan dos factores transcripcionales: Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, por su siglas en inglés) y FoxO (Forkhead box clase O) [Dinkova-Kostova & Abramov, 2015; Klotz *et al.*, 2015]. Estos factores se transcriben constitutivamente pero son regulados negativamente

por diferentes proteínas (e.g Nrf2 es regulado por Keap 1) y su activación esta mediada por un incremento en el estrés oxidativo (e.g. aumento en los niveles de ROS). La principal función de estos factores transcripcionales es incrementar el contenido de metabolitos antioxidantes como el glutatión (GSH) [Narayanankutty *et al.*, 2019], aminoácidos como la cisteína y el mARN y el contenido de proteína de las enzimas del sistema antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la tioredoxina reductasa (TrxR), que permiten a la célula mantenerse en un estado de homeostasis. Recientemente se ha propuesto que el p53^{WT} regula la transcripción, estabilidad y actividad de Nrf2 y FoxO (isoformas 1 y 3a) [You & Mak, 2005; Klotz *et al.*, 2015; Tonelli *et al.*, 2018]. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), p53^{WT} aumenta el contenido del ARNm de FoxO 3a 2 veces comparado vs. MEF p53^{-/-} [Renault *et al.*, 2011], mientras que en células de cáncer de colon HCT-116, el p53^{WT} aumenta 2-4 veces el contenido de ARNm de los blancos canónicos de Nrf2, NQO1 y HO-1 vs. HCT-116 p53^{-/-} [Kalo *et al.*, 2012]. Los datos anteriores sugieren que en células cancerosas, el p53^{WT} controla positivamente la expresión y activación de Nrf2 y FoxO, así como de sus proteínas blanco. Sin embargo, poca información ha sido publicada en cuanto al efecto de p53 sobre las enzimas del sistema antioxidante. En este sentido, se publicó que la sobreexpresión de p53^{WT} disminuye el ARNm y la actividad (>40%) de la MnSOD comparada vs. HeLa mock (p53^{-/-}) disminuyendo su resistencia a paraquat, adriamicina y privación de suero en células de cáncer de cérvix HeLa [Pani *et al.*, 2000]. Por otro lado, en células de leucemia mieloide aguda NB-4 y de cáncer de pulmón A549 se reportó que p53^{WT} incrementa el contenido de MnSOD (1.5 - 4 veces) como mecanismo de protección contra el estrés oxidante causado por una intoxicación con selenito de sodio o 2 desoxiglucosa [Li *et al.*, 2010; Sinthupibulyait *et al.*, 2010]. Lo anterior claramente indica que existen reportes contradictorios en cuanto el efecto de p53^{WT} sobre la MnSOD. Además, no existen reportes publicados donde se demuestre la regulación de p53^{WT} sobre otras enzimas del sistema antioxidante, sobre sus actividades o sobre el nivel de los metabolitos antioxidantes como son el glutatión y la cisteína. Al respecto, solo se ha reportado es que la sobre-expresión de p53^{WT} en células de cáncer de pulmón

H1299 disminuyen los niveles de ERO (60%) vs. H1299 wild-type [Eriksson *et al.*, 2017].

Con respecto al estudio del metabolismo antioxidante en células cancerosas con p53 que exprese alguna mutación existe poca literatura al respecto. Por ejemplo, en células de cáncer mama triple negativo MDA-MB-231, la sobre expresión de p53^{R280K} (sustitución de arginina por lisina) incrementa los niveles de ARNm del factor transcripcional Nrf2 (6 veces) comparados con células no tumorales de mama MCF10A [Lisek *et al.*, 2018]. Por el contrario, en células de cáncer de pulmón H1299 o colorectal HCT116 la sobreexpresión de p53^{R273H} (sustitución de arginina por histidina), p53^{R248Q} (sustitución de arginina por glutamina) o p53^{R175H} (sustitución de arginina por histidina) disminuye (2-7 veces) vs. células cancerosas p53^{-/-} los niveles de ARNm y el contenido de proteína de algunos blancos directos de Nrf2 como son SLC7A11, NQO1 y HO-1 indicando que las mutaciones en p53 afectan la actividad de Nrf2 [Kalo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017]. Hasta la fecha, se desconoce si otros factores transcripcionales reguladores del sistema antioxidante como FoxO son blancos directos de p53 mutado. En cuanto a la regulación de las enzimas del sistema antioxidante mediado por un p53 mutado, algunos reportes han demostrado que la sobre-expresión de p53^{R175H} y p53^{R273H} en células de cáncer colorectal HCT-116, incrementan el contenido de proteína de MnSOD (2 veces) y disminuyen los niveles de ERO (>70%) comparados vs. HCT-116 p53^{-/-} aunque no se determinó 1) la actividad de la enzima; y 2) si este incremento mediado por p53 mutado era directo sobre la enzima o era por un aumento en el contenido de proteína/actividad de algún factor transcripcional (e.g. Nrf2, FoxO), además, no se evaluó ninguna otra enzima parte del sistema antioxidante (Tabla 1). Hasta la fecha no se ha llevado a cabo ningún estudio sistemático y global que analice los niveles de metabolitos antioxidantes (GSH y cisteína) así como el contenido de proteína y las actividades de las enzimas que forman parte del sistema antioxidante además de su función directa: la producción de ERO en células de cáncer con mutaciones en p53. Lo anterior toma relevancia porque está reportado que el análisis individual de los contenidos de ARNm no

siempre refleja la contenido de las proteínas y mucho menos su actividad [Moreno-Sánchez *et al.*, 2016].

Por lo tanto, este estudio pretende analizar de manera sistemática y global al sistema antioxidante en células HeLa con sus sobre-expresantes de p53^{WT} y p53^{R273C} en condiciones basales de crecimiento (21% de O₂, 25 mM glucosa y 5% CO₂) determinando el contenido de proteína de Nrf2, FoxO (1, P-1, 3a y P-3a), MnSOD, CuZnSOD, CAT, GR, GPx1, GPx4 y TrxR2, los niveles de GSH, cisteína y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Tabla 1. Efecto de p53 mutante sobre el sistema antioxidante en células tumorales.

| p53 | Línea celular | Efecto general | Referencia | Conclusión |
|---|--|---|---|--|
| <p>p53^{C277F} p53^{R248Q}</p> <p>p53^{R273H} p53^{R175H}</p> | <p>Cáncer esófago</p> <ul style="list-style-type: none"> FLO-1 OACM5.1 <p>Cáncer de pulmón</p> <ul style="list-style-type: none"> H1299 | <p>↓SLC7A11 mRNA y proteína vs p53 -/-.</p> <p>↑NQO1, PRDX1, OGGIN1, HMOX1, KEAP1, SLC3A2: mRNA 2 - 4.5 veces con siRNA p53-mut.</p> | <p><i>Nat Commun.</i> 2017, 8: 14844</p> | <p><i>No favorece respuesta antioxidante</i></p> |
| <p>p53^{R273H}</p> | <p>Cáncer colorectal</p> <ul style="list-style-type: none"> HCT-116 | <p>↓NQO1, HO-1: mRNA (60%) en estrés con diethylmaleate vs HTC-116 sin mutación.</p> <p>↑Proliferación y formación de colonias (2.5 veces) al ser incubadas con DEM vs. HCT-116 sin p53-mut.</p> | <p><i>J Cell Sci.</i> 2012, 125: 5578-5586.</p> | <p><i>No favorece respuesta antioxidante</i></p> |

| | | | | |
|--|--|--|---|--|
| <p>p53^{R273H} p53^{R248Q}</p> | <p>Cáncer de pulmón</p> <ul style="list-style-type: none"> • H1299 | <p>↓ NQO1, HO-1: mRNA (60%) en estrés con diethylmaleate vs H1299 sin mutación.</p> | <p><i>J Cell Sci.</i> 2012, 125: 5578-5586.</p> | <p><i>No favorece respuesta antioxidante</i></p> |
| <p>p53^{R280K}</p> | <p>Cáncer de mama</p> <ul style="list-style-type: none"> • MDA-MB-231 | <p>↑ Nrf2 en núcleo. ↑ Viabilidad (100 y 500 μm de H₂O₂) vs MDA-MB-231 siTP53-mutante. ↑ mRNA TXN, TXNRD1, PSMC y GCLM vs MDA-MB-231 siTP53-mutante ↓ mRNA HMOX, SLC7A11, ABCC3 (0.5 veces) vs MDA-MB-231 siTP53-mutante</p> | <p><i>Oncotarget.</i> 2018, 9: 20508.</p> | <p><i>Si favorece respuesta antioxidante</i></p> |

2. JUSTIFICACIÓN

Existe poca literatura que demuestre el papel regulador de p53 con mutaciones sobre el sistema antioxidante en cánceres metastásicos. Lo anterior toma relevancia porque no es claro si las mutaciones de p53 favorecen o no al sistema antioxidante en células cancerosas. Conocer los mecanismos a través de los cuales el cáncer maneja el estrés de los ERO, puede ser útil para el desarrollo de terapias complementarias contra este tipo de cánceres.

3. HIPÓTESIS

La mutación p53^{R273C} promueve un sistema antioxidante deficiente lo que conlleva a un aumento substancial de ERO comparado con p53^{WT} en células de cáncer de cérvix HeLa.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de p53^{WT} (HeLa-H) y p53^{R273C} sobre el sistema antioxidante del cáncer de cérvix HeLa.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de p53^{WT} y p53^{R273C} sobre:

- El crecimiento celular.
- Los contenidos de proteína de p53 y de su análogo fosforilado P-p53.
- Los niveles de proteína de los factores transcripcionales FoxO 1, P-FoxO 1, FoxO 3a, P-FoxO 3a y Nrf2.
- El contenido de proteínas involucradas en el sistema antioxidante (CuZnSOD, CAT, MnSOD, GR, GPx 1, GPx 4 y TrxR 2).
- Los niveles de glutatión y de cisteína total y en su estado reducido.
- El contenido total y la producción de especies reactivas de oxígeno.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 SOBREENPRESIÓN DE p53^{WT} Y p53^{R273C}

La línea celular de HeLa con la sobreexpresión de p53^{WT} y p53^{R273C} fueron proporcionadas por el Dr. Patricio Gariglio Vidal del Departamento de Biología y Genética Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). Las células de HeLa-L, HeLa-H y HeLa p53^{R273C} comparten 14 de 16 alelos con la línea reportada por la ATCC (INMEGEN, México).

La línea celular de cáncer de cérvix HeLa (estadio IV, morfología epitelial), no contiene a p53 debido a que la proteína E6 del virus del papiloma humano (VPH) interacciona con él y promueve su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal [Thomas *et al.* 1999]. Para este trabajo se definió a la línea tumoral HeLa wild type (sin plásmido añadido) como HeLa-Low o HeLa-L. Esta misma línea celular fue transfectada con 0.5µg del plásmido pCMV-Neo-Bam utilizando un kit de transfección celular comercial (SA Biosciences; Ontario, Canada) [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015], siguiendo las instrucciones del fabricante, que contiene (1) p53 sin mutación (llamada HeLa-High o HeLa-H) y (2) p53 con la mutación 273 (R: CGT por C: TGT). Para mantener estable la transfección en estas células, se añadieron 1200 µg/ml de antibiotico G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) [Hernández-Reséndiz *et al.* 2019]. La presencia de la mutación puntual requerida de p53 se verificó mediante secuenciación de ADN.

5.2 CULTIVO CELULAR

Las células HeLa (WT, p53^{WT} y p53^{R273C}) fueron cultivadas en medio Dulbecco-MEM modificado (DMEM, Sigma-Aldrich, MO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest, México) y 10,000 unidades de penicilina/estreptomina (Sigma-Aldrich, MO, USA) en placas de petri a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire.

5.3 CURVAS DE CRECIMIENTO

Las células (5×10^3 células/100 μL) fueron cultivadas en placas de 96 pozos. Los cultivos se lavaron con buffer PBS (NaCl 155 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, y NaH_2PO_4 2.7 mM, pH 7.2) y fueron separadas con tripsina por 3 minutos. Las células se centrifugaron (3200 rpm x 3 min) y contaron en una cámara de Neubauer con un microscopio invertido (Carl Zeiss, México). El tiempo de duplicación se determinó utilizando la siguiente fórmula matemática [McAtter & Davis, 1994]:

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

Donde:

N_f representa el número de células cultivadas al final de la fase crecimiento

N_i representa el número de células al inicio de la curva de crecimiento

T_f es el tiempo final a la cual las células fueron tripsinizadas

T_i es el tiempo inicial de cultivo

5.4 EXTRACCIÓN E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para la evaluación del sistema antioxidante se sembraron células HeLa (1×10^6 cells/mL) en cajas Petri de 150x20 mm (Sarsted, México). Después de 7 días de cultivo, tiempo al que se obtiene la mayor densidad celular (viabilidad >95%) [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015; 2019] las células se cosecharon y se incubaron en 200 μL de buffer de lisis RIPA (PBS 1x pH 7.2, IGEPAL NP40 al 1%, SDS al 25% y desoxicolato de sodio al 0.05%) *plus* 5 μL de PMSF (phenyl methanesulfonyl fluoride) y una tableta inhibidora de proteasas (Roche, Mannheim, Germany). Los extractos celulares se centrifugaron a 10,000 rpm x 30 min a 4°C. La determinación de proteína se realizó con el método de Lowry [Lowry *et al.* 1951]. Posteriormente, las muestras (50 μg de proteína) se resuspendieron en buffer de carga (β -

mercaptoetanol 5%) y se cargaron en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 12 o 15% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA, USA) y se bloquearon con leche libre de grasa al 5% con tween-20 al 0.1% en TBS 1x (NaCl 5M y Tris base 2M, pH 7.2) durante una hora. Las membranas se incubaron por >12 h a 4°C con anticuerpos monoclonales (Santa Cruz Biotechnology, Cambridge, MA, USA) de humano (p53, p53-P, CuZnSOD, CAT, GR, MnSOD, GPx 1, GPx 4, TrxR 2, FoxO 1, FoxO 1-P, FoxO 3a, FoxO 3a-P, Nrf2 y actina (dilución 1:1000-1:500). Los anticuerpos fueron revelados con su correspondiente anticuerpo secundario (anti-ratón, -cabra o -conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Cambridge, MA, USA). Las bandas obtenidas se analizaron densitométricamente utilizando el programa Scion Image para Windows (Scion Corp., Frederic, MD, USA) [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017].

5.5 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN Y CISTEÍNA

Para la determinación de glutatión y cisteína, las células se tripsinizaron, se lavaron y se resuspendieron en un buffer PBS. Las células (2-13 mg proteína/mL) se incubaron con Triton X-100 0.1% a temperatura ambiente por 15 min. Después, las muestras fueron mezcladas con ácido perclórico al 2.7% por 1 min y centrifugadas 14 rpm x 3 min a 4°C. Los niveles de Cys_{Red} y GSH_{Red} fueron determinados en ausencia o presencia de 1mM de ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Los sobrenadantes fueron filtrados utilizando un filtro Millex-Milipore de 0.45µm de diámetro y analizados por HPLC (Waters 1525, Milford, MA, USA) equipado con un columna de simetría de fase inversa C-18 con un tamaño de partícula de 3.5µm y 4.6mm x 75mm (Symmetry, Waters, MA, USA). La columna fue equilibrada con 99% de ácido tricloroacético en 0.1% de agua ultra pura y 1% de acetonitrilo en fase móvil a una tasa de flujo 1mL/min. La derivatización de las muestras post-columna se realizó en 0.1mM de ácido 5´5-ditiobis(2-nitro-benzoico) / 0.1mM KH₂PO₄ a pH

8. El glutatión y la cisteína fueron detectados a 412nm en un espectofotómetro UV/visible (Waters 2489, Mildford, MA) [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019].

5.6 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las células (5×10^3 células/100 μL) fueron cultivadas en placas de 96 pozos. En el día 7, se expusieron a dihidroetidio (DHE) (Sigma-Aldrich, MO, USA) 25 μM durante 2 horas para la detección de ERO. La fluorescencia de DHE fue medida a una longitud de onda de 518 nm de excitación y 605 nm de emisión con un lector de placa para fluorescencia (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU). Para verificar el funcionamiento de la sonda de detección de ERO, se llevaron a cabo experimentos control en presencia de (I) el “scavenger” (i.e., atrapador de ERO) *N*- acetil cisteína (5 mM) (control positivo) [Hussain *et al.*, 2004]; y (II) en presencia de H_2O_2 (500 μM) (control negativo) [Ericksson *et al.*, 2017].

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar (D.S) de al menos 3 experimentos independientes, a menos que se indique lo contrario. Para la detección de diferencias significativas entre grupos experimentales, se utilizó el análisis de ANOVA / posthoc Scheffé [Klockars & Hancock, 2000; Krzywinski & Altman, 2014]. Para la determinación de diferencias significativas entre muestras no pareadas, se tomó un valor de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 SOBREENPRESIÓN DE $p53^{WT}$ Y $p53^{R273C}$ EN CÉLULAS HELA.

En este estudio se determinó el efecto de $p53^{WT}$ (p53 sin mutación) y $p53^{R273C}$ (p53 con la mutación R sustituida por C en la región 273) en células de cáncer de cérvix HeLa. Se refiere a HeLa-L a la línea celular de HeLa wild-type; como HeLa-H a la línea de HeLa sobre-expresante de $p53^{WT}$; y como HeLa^{R273C} a la línea de HeLa sobre-expresante de $p53^{R273C}$. Para determinar la presencia de p53 se evaluó el contenido de proteína y se comparó vs. HeLa-L. En efecto, el contenido de p53 y de su forma activa (e.g., p53 fosforilado) fue detectado en HeLa-H y HeLa $p53^{R273C}$ (Figura 8), confirmando que la sobre expresión de $p53^{WT}$ y $p53^{R273C}$ fueron capaces de superar la inhibición por parte del VPH presente en células HeLa [Thomas *et al.*, 1999].

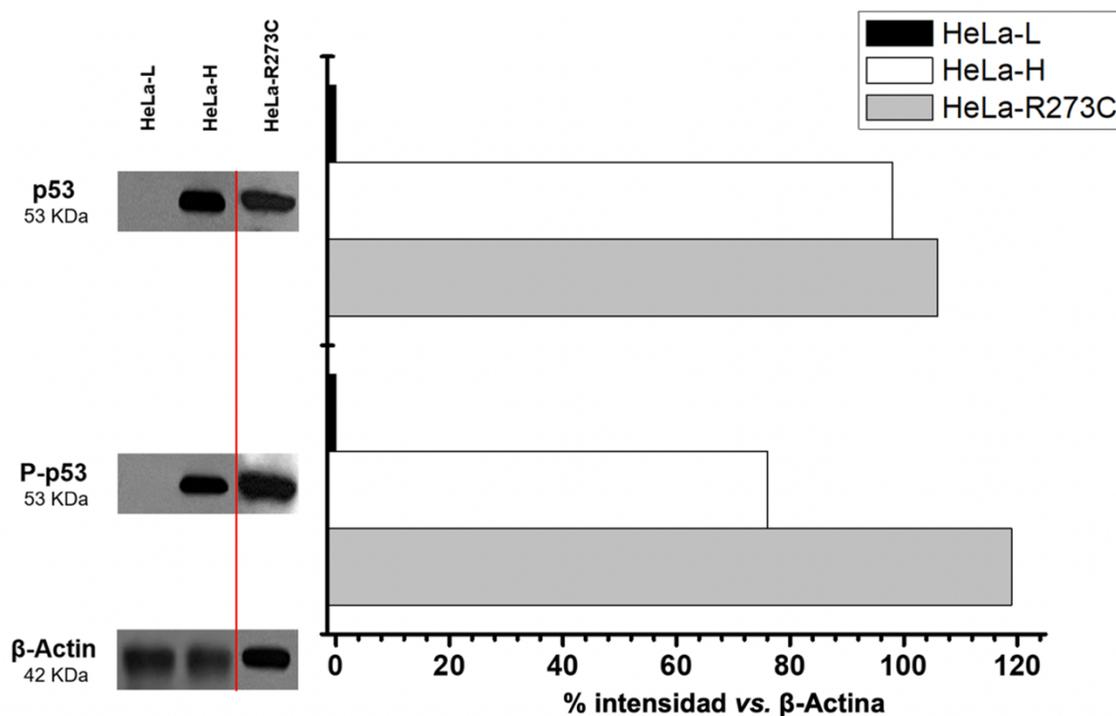
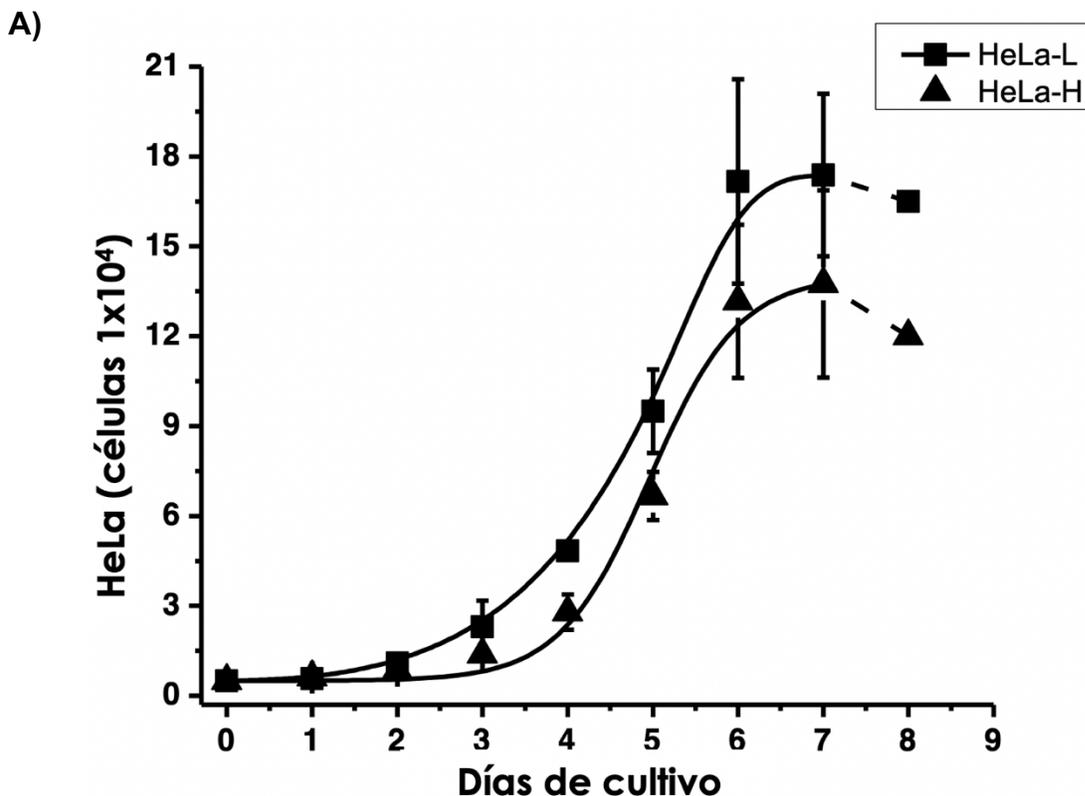


Figura 8. La sobreexpresión de p53 se encuentra presente en células HeLa-H y HeLa $p53^{R273C}$.
n=2.

6.2 EFECTO DE $p53^{WT}$ Y $p53^{R273C}$ SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para dilucidar si la sobreexpresión de p53 en HeLa-H y HeLa^{R273C} modifica la duplicación de las células HeLa debido a que p53 es un regulador de ciclo celular [Chen, 2016; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019], se evaluaron I) la tasa de duplicación y II) el tiempo generacional de HeLa-H y HeLa $p53^{R273C}$ vs. HeLa-L. La presencia de $p53^{WT}$ o la mutación R273C no afectaron ningún parámetro de la proliferación celular (Figura 9, Tabla 1). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015; Blanco-Carpintero, 2020].

Debido a que la determinación de los parámetros bioenergéticos de HeLa-L, HeLa-H, y HeLa $p53^{R273C}$ reportados por nuestro grupo se llevaron a cabo cosechando a las células en el día máximo de crecimiento [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015; Hernández-Reséndiz *et al.*, 2019; Blanco-Carpintero, 2020], los experimentos posteriores en este estudio se llevaron a cabo en células cosechadas al día 7 de cultivo.



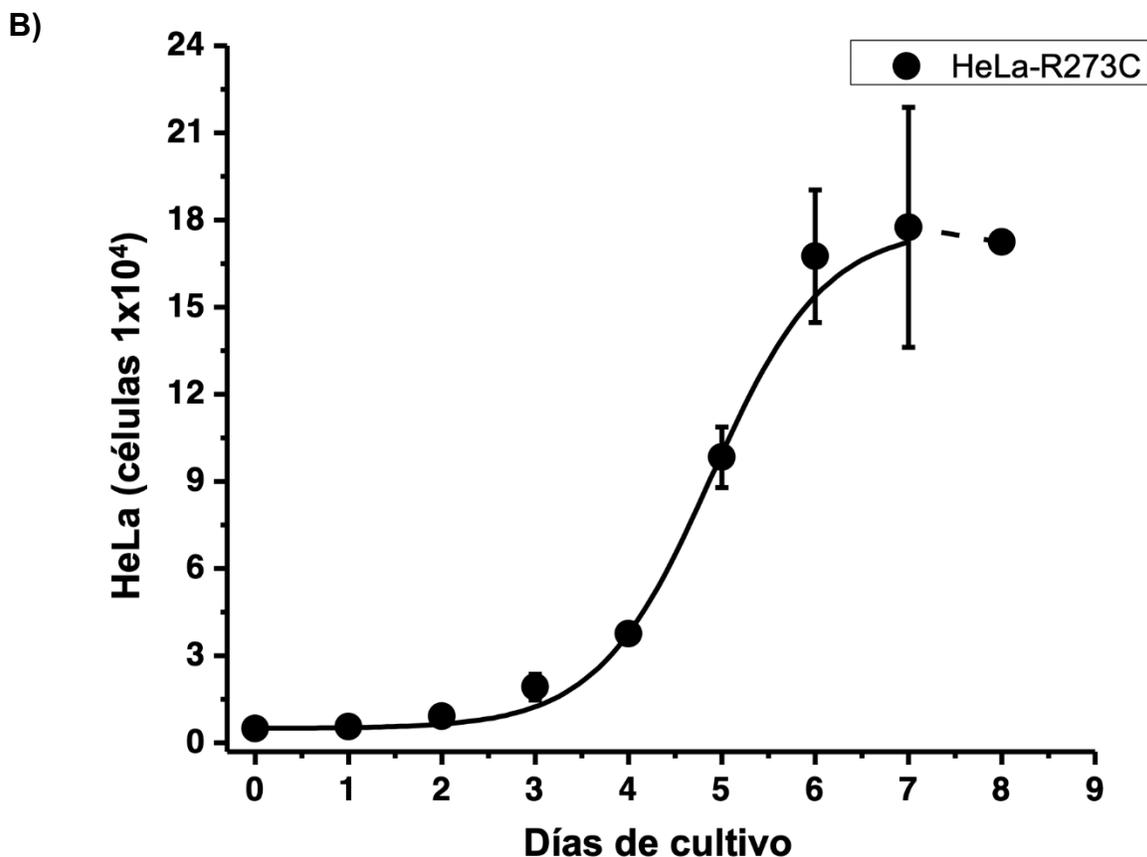


Figura 9. Curvas de crecimiento de A) HeLa-L y HeLa-H; y B) HeLa p53^{R273C}. La viabilidad en los tres cultivos fue >95%. n=3 ± D.S.. Análisis ANOVA / *posthoc Scheffé* reportó no diferencia significativa en ningún punto de la curva.

Tabla 1. Tiempo de proliferación y tasa de duplicación en HeLa-L, HeLa-H y HeLa^{R273C}.

| Línea celular | Velocidad de proliferación (μ) (días ⁻¹) | Tiempo de duplicación (hrs) | Número de células |
|-----------------------|--|-----------------------------|-------------------|
| HeLa-L | 0.62 ± 0.12 | 27 ± 5.4 | 173750 ± 27119 |
| HeLa-H | 0.77 ± 0.18 | 22 ± 4.5 | 137500 ± 31225 |
| HeLa ^{R273C} | 0.74 ± 0.04 | 23 ± 2.7 | 177500 ± 41307 |

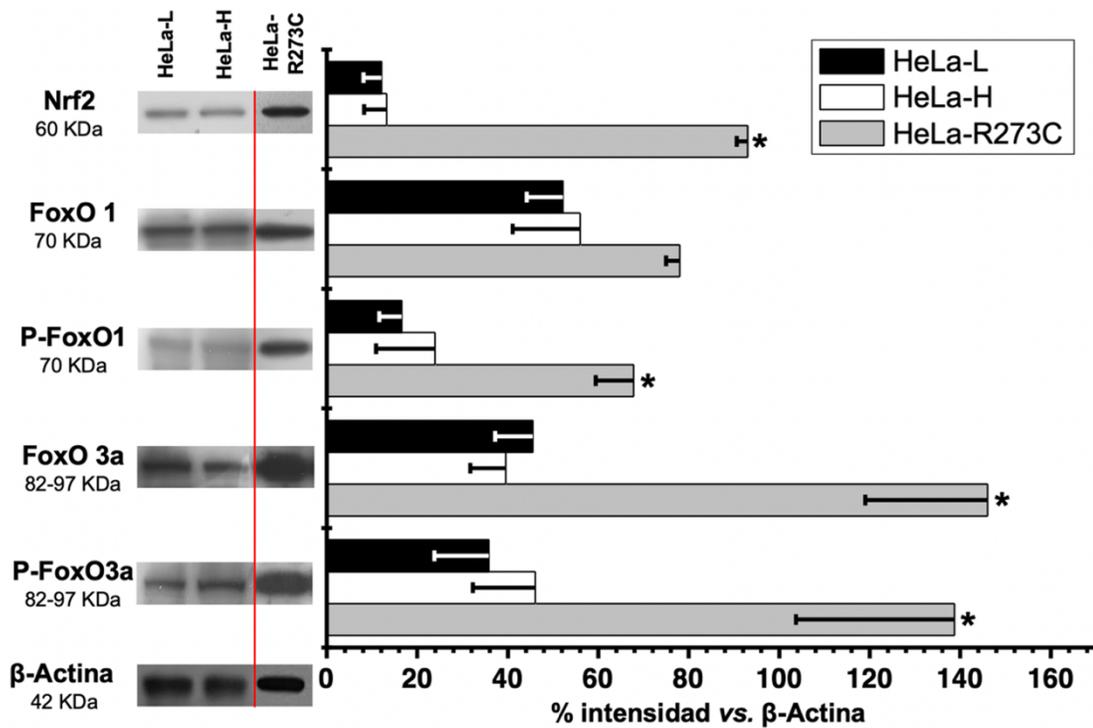
Los datos representan 3 experimentos independientes ± D.S. Análisis ANOVA / *posthoc Scheffé* reportó no diferencias significativas entre las células evaluadas.

6.3 EFECTO DE $p53^{WT}$ Y $p53^{R273C}$ SOBRE EL CONTENIDO DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES Y PROTEÍNAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE

El sistema antioxidante en células cancerosas y no cancerosas se encuentra regulado principalmente por los factores transcripcionales Nrf2 y FoxO (isoformas 1, 3a, 4 y 6). Sin embargo, p53 regula únicamente la transcripción de Nrf2, FoxO 1 y FoxO 3a, además de la actividad de Nrf2 sobre sus genes blanco [Klotz *et al.*, 2015; Tonelli *et al.*, 2018]. En HeLa-H, el contenido de proteína de Nrf2, FoxO 1 y FoxO 3a fue similar al de HeLa-L, pero en HeLa $p53^{R273C}$ el contenido de éstos incrementó de 1.4 a 7.5 veces vs. HeLa-L y HeLa-H (Figura 10). Está descrito que la actividad de FoxO 1 y FoxO 3a está regulada por modificaciones postraduccionales como fosforilación/ desfosforilación. La fosforilación de FoxO 1 en el residuo de serina 256 (S256) incrementa su interacción con otros factores transcripcionales y su capacidad de aumentar la transcripción de sus genes blanco, es decir, su actividad [Asada *et al.*, 2007]. En HeLa-L, solo el 30% de la proteína total de FoxO 1 se encuentra fosforilada pero la presencia de p53, ya sea en su forma no-mutada o mutada, incrementó el contenido de FoxO 1 fosforilado (1.4 y 3 veces respectivamente) (Figura 10). Por otro lado, la fosforilación de FoxO 3a en el residuo de serina 253 (S253) disminuye su actividad transcripcional [Asada *et al.*, 2007]. En HeLa-L y HeLa-H el 80-84% del contenido total de FoxO 3a se encuentra fosforilado, pero la presencia de $p53^{R273C}$ incrementa a P-FoxO 3a (1.2 veces) vs. HeLa-H (Fig. 10). Estos resultados indican que la mutación $p53^{R273C}$ podría tener una ganancia de función al incrementar el contenido y actividad de FoxO 1, mientras que, a pesar del incremento en el contenido FoxO 3a, su actividad se ve severamente disminuida.

Como resultado de un aumento en los contenidos de los factores transcripcionales Nrf2 y FoxO, se evaluaron las enzimas del sistema antioxidante citosólicas: superóxido dismutasa dependiente de cobre zinc (CuZnSOD o SOD1), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa 1 (GPx 1); y mitocondriales: superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD o SOD 2), tioredoxina reductasa 2 (TrxR 2) y glutatión peroxidasa 4 (GPx 4) en los tres tipos celulares de

HeLa. En HeLa-H, el contenido de proteína de SOD 1, SOD 2, CAT, GPx1 y GPx 4 fue similar vs. HeLa-L, y las enzimas TrxR2 y GR aumentaron 1.5 y 2.5 respectivamente vs. HeLa-L (Figura 11). Mientras que en HeLa p53^{R273C}, el contenido de las enzimas GR y TrxR2 fue similar vs. HeLa-H. SOD 1, SOD 2, CAT y GPx 4 incrementaron significativamente (3.5 a 42 veces) vs. HeLa-H; y la GPx 1 no fue detectada (Figura 11).



| | P-FoxO 1 / FoxO 1 (%) | P-FoxO3a / FoxO 3a (%) |
|----------------------|-----------------------|------------------------|
| HL | 30 | 80 |
| HH | 42 | 84 |
| p53 ^{R273C} | 87 | 94 |

Figura 10: Contenido de factores transcripcionales relacionados con el sistema antioxidante en células HeLa-L, HeLa-H y HeLa p53^{R273C}. n=3; *P < 0.05 vs. HeLa-H. ANOVA / *posthoc* Scheffé.

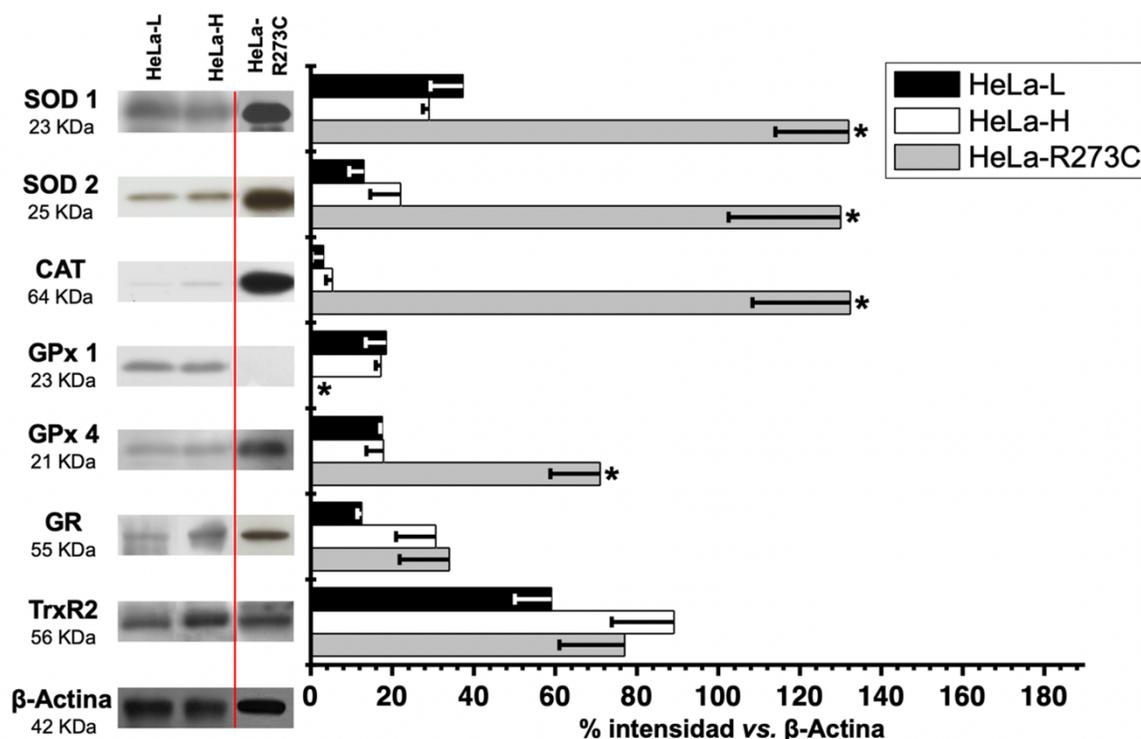


Figura 11: Contenido de enzimas del sistema antioxidante en células HeLa-L, HeLa-H y HeLa p53^{R273C}. n=3; *P < 0.05 vs. HeLa-H. ANOVA / *posthoc* Scheffé.

6.4 EFECTO DE p53^{WT} Y p53^{R273C} SOBRE EL CONTENIDO DE GSH Y CISTEÍNA

El contenido de glutatión y cisteína, 2 metabolitos implicados en el sistema antioxidante, fue determinado en HeLa-L, HeLa-H y HeLa p53^{R273C} en presencia o ausencia de 1 mM de ditioneitol (DTT), compuesto que reduce al glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) y de Cistina a Cisteína, lo que permite obtener los niveles totales de estos metabolitos [Ates *et al.*, 2009]. En HeLa-H, los contenidos de Cys_{total} (+DTT) y Cys_{reducida} (-DTT) incrementaron 2 veces vs. HeLa-L; y en HeLa p53^{R273C} incrementaron 2.7-3.6 veces vs. HeLa-H (Tabla 2). Por otro lado, los contenidos de GSH (-DTT) y glutatión total (+DTT) en HeLa-H disminuyeron 30% vs. HeLa-L, y en HeLa p53^{R273C} incrementaron 1.8 - 4 veces vs. HeLa-H (Tabla 2). A pesar de la disminución en el contenido de GSH en HeLa-H, los niveles de GSSG y la relación GSH/ GSSG fue similar vs. HeLa-L. Contrario a HeLa-H, en HeLa

p53^{R273C} a pesar del incremento en los niveles de GSH y glutatión total, el contenido de GSSG incrementó 12 veces y la relación GSH/ GSSG disminuyó 77% vs. HeLa-H (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de metabolitos antioxidantes en células HeLa-L, HeLa-H y HeLa^{R273C}.

| | Cys | | GSH | | GSSG | GSH/GSSG |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| | -DTT | +DTT | -DTT | +DTT | | |
| HeLa-L | 0.44 ± 0.3 (5) | 0.5 ± 0.16 (3) | 6.3 ± 2 (7) | 7.4 ± 1.7 (6) | 0.51 ± 0.36 (5) | 14.3 ± 9.8 (4) |
| HeLa-H | 0.82 ± 0.7 (5) | 1.04 ± 0.5 (3) | 4.7 ± 2.7 (4) | 5.5 ± 3 (5) | 0.46 ± 0.3 (3) | 17 ± 3.8 (4) |
| HeLa^{R273C} | 3 ± 1.6* (3) | 2.8 (2) | 8.3 (2) | 22.8 (2) | 5.5 (2) | 4 (2) |

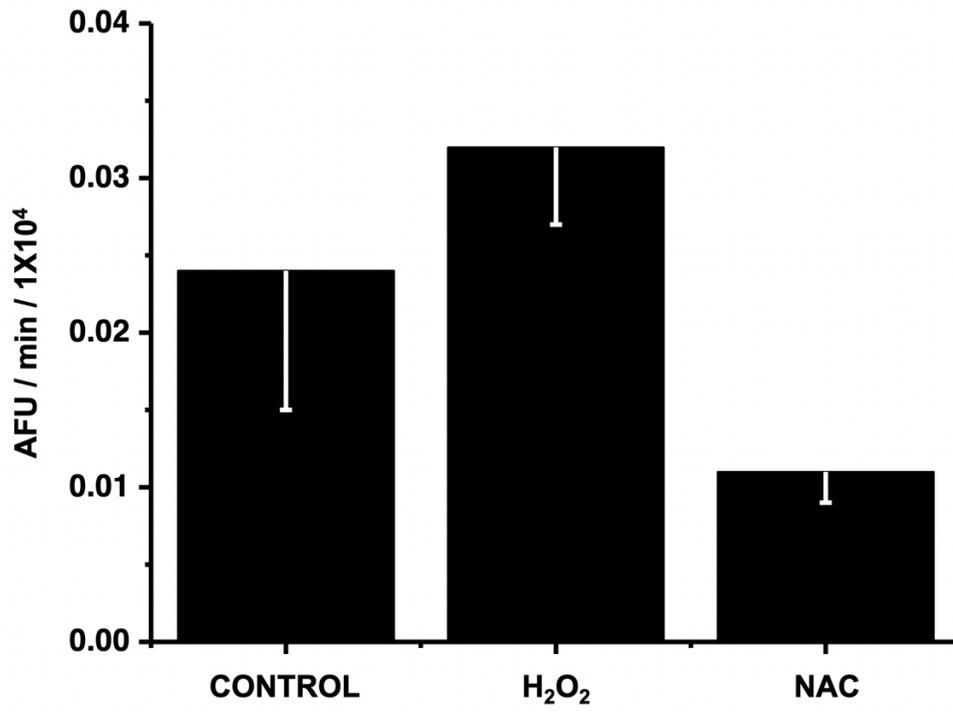
El contenido de metabolitos está expresado en nmol equivalentes de Cys/ mg de proteína. Los datos representan el promedio ± D.S. *P < 0.05 vs. HeLa-H utilizando ANOVA / *posthoc* Scheffé .

6.5 EFECTO DE p53^{WT} Y p53^{R273C} SOBRE EL CONTENIDO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

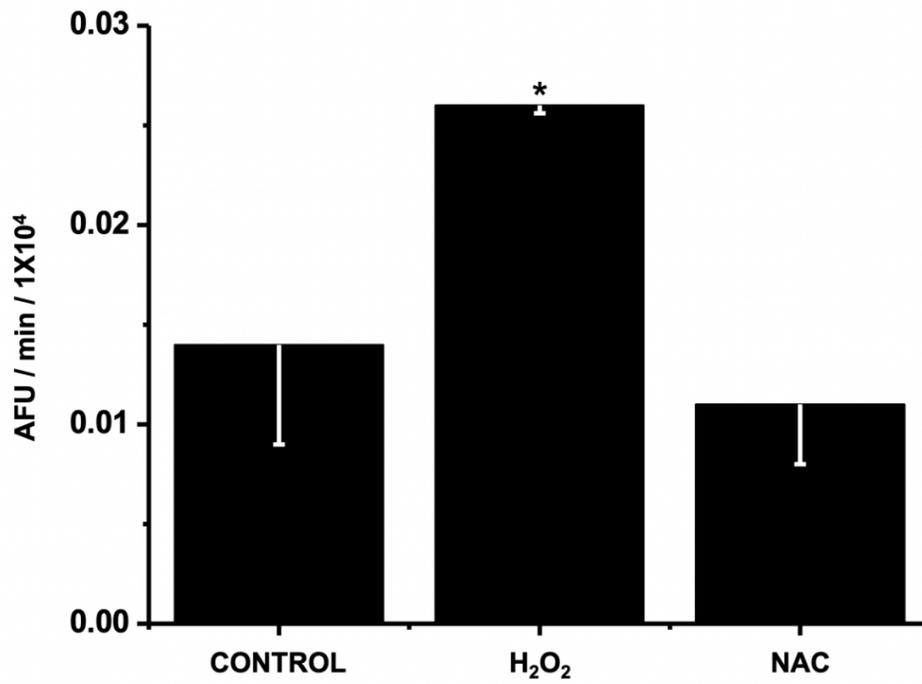
Se determinó el contenido intracelular de ERO utilizando la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE). Para verificar que la fluorescencia producida es específica para ERO, se adicionó un atrapador de radicales libres o “scavenger” (N-acetil cisteína, NAC) o un pro-oxidante (H₂O₂). En HeLa-L, la incubación con H₂O₂ (500 µM, 5 min), incrementó la velocidad de producción de ERO (1.4 veces) vs. control (HeLa-L sin H₂O₂), mientras que al ser incubada con NAC (5mM, 24h), disminuyó la velocidad de producción de ERO (60%) vs. control (HeLa-L sin NAC) (Figura 12A). Para HeLa-H, la incubación con H₂O₂ incrementó significativamente la velocidad de producción de ERO (2 veces) vs. control (HeLa-H sin H₂O₂) y la incubación con NAC disminuyó

15% vs. control (HeLa-H sin NAC) (Figura 12B). Por último, la incubación de HeLa p53^{R273C} con H₂O₂ incrementó la velocidad de producción de ERO (2 veces) vs. control (HeLa p53^{R273C} sin H₂O₂), mientras que la incubación con NAC disminuyó 20% la producción de ERO vs. control (HeLa p53^{R273C} sin NAC) (Figura 12C), demostrando que, en las tres líneas celulares la fluorescencia obtenida corresponde a un nivel basal de ERO. El incremento en los niveles intracelulares de ERO esta principalmente asociado con una inhibición en la función mitocondrial [Staniek & Nohl, 2000; St Pierre *et al.*, 2002; Nathan & Cunningham-Bussel, 2013]. En HeLa-H, donde la fosforilación oxidativa (FO) se encuentra incrementada [Hernández-Reséndiz *et al.*, 2015], la velocidad de producción de ERO disminuyó >40% vs. HeLa-L, sin embargo, en HeLa p53^{R273C}, donde la FO se encuentra severamente disminuída [Blanco-Carpintero, 2020], la velocidad de producción fue similar a HeLa-H (Figura 13). El contenido total de ERO en HeLa-L y HeLa-H fue similar, mientras que en HeLa p53^{R273C} incrementó (1.2 veces), aunque este incremento no fue significativo (Figura 14).

A)



B)



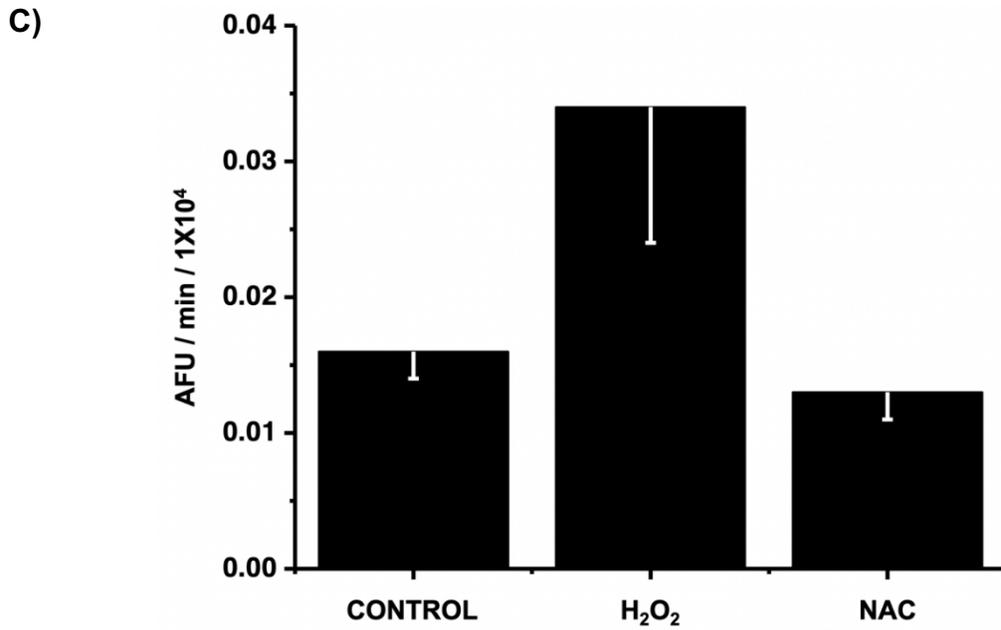


Figura 12. Efecto antioxidante de NAC (5mM, 24h) o prooxidante de H₂O₂ (500 μM, 5min) en A) HeLa-L; B) HeLa-H y C) HeLa p53^{R273C}. Los datos muestran el promedio ± D.S. n=3. ANOVA / *posthoc Scheffé* reportó no diferencias significativas.

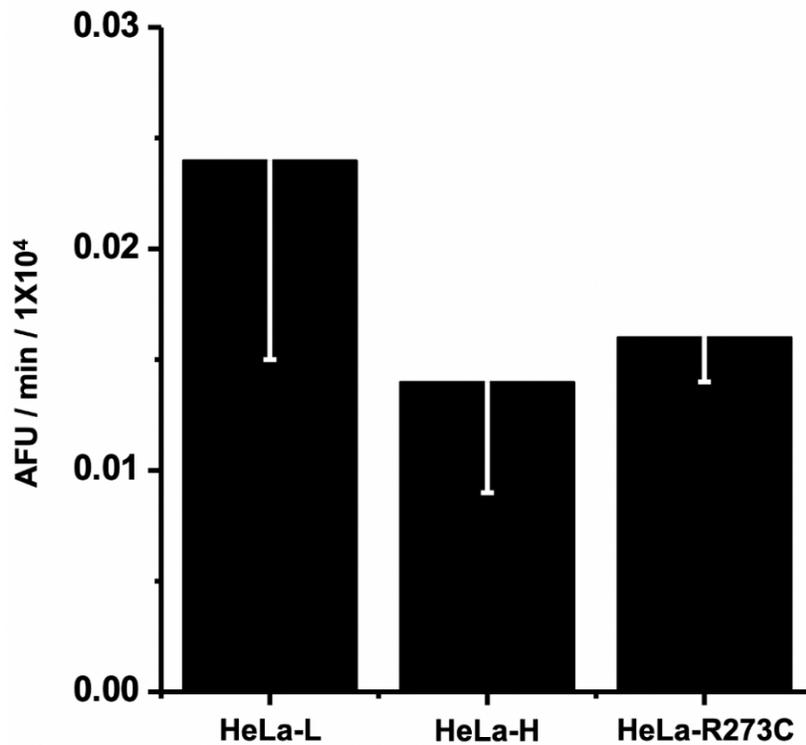


Figura 13. Velocidad de producción de ERO en HeLa-L, HeLa-H y HeLa p53^{R273C}. Los datos muestran el promedio ± D.S n=3. ANOVA / *posthoc Scheffé* reportó no diferencias significativas.

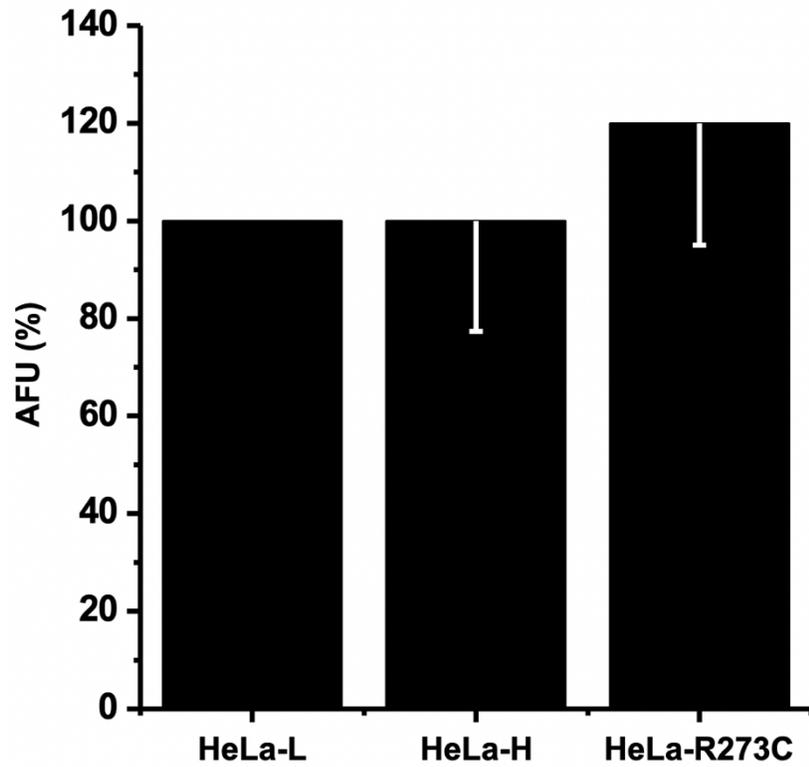


Figura 14. Contenido total de ERO en HeLa-L, HeLa-H y HeLa p53^{R273C} al punto final (120 min de incubación con DHE). El 100% de fluorescencia corresponde a 1.9 ± 0.26 AFU. Los datos muestran el promedio \pm D.S n=3. ANOVA / *posthoc Scheffé* reportó no diferencias significativas.

7. DISCUSIÓN

7.1 LA SOBREENPRESIÓN DE $p53^{WT}$ Y $p53^{R273C}$ NO MODIFICA LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La sobreexpresión de $p53^{WT}$ no modificó la proliferación en células HeLa vs. HeLa-L (Tabla 1). Lo anterior toma relevancia debido a que este factor transcripcional es un inhibidor de la proliferación celular ya que tiene como blanco a p21, la cual es una proteína inhibidora de CDK2 y CDK4 [Kastan *et al.*, 1995], así como de la cinasa activadora de cdk's (CAK) [Schneider *et al.*, 1998], por lo que la presencia de p53 debería estar afectando negativamente el crecimiento del cáncer. Sin embargo, está reportado que la glucosa a concentraciones encontradas en los medios de cultivo como el Dulbecco-MEM (e.g., 25 mM) promueve la activación de las vías de señalización (EGFR) y la transcripción de genes involucrados en la activación del ciclo celular (ciclina A, ciclina E y el factor transcripcional E2F) [Masur *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021]. Además, la línea celular de HeLa contiene integrado el genoma del virus del papiloma humano 18 (VPH 18) [Thomas *et al.*, 1999], que sobre-expresa las oncoproteínas E6 y E7, las cuales contribuyen en la proliferación celular [Hao *et al.*, 2020; Pal & Kundu, 2020] y posiblemente en su metabolismo. Para el caso de HeLa con la mutación $p53^{R273C}$, la tasa de proliferación y el tiempo de duplicación tampoco se modificaron vs. HeLa-L (Tabla 1). Es posible entonces, que el aumento en la concentración de glucosa y la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7, bloqueen el efecto inhibitorio de p53 sobre la proliferación celular. Además, algunas mutaciones (*i.e.*, R175H, R248Q, R273H) incluyendo la estudiada en este trabajo (R273C), inhiben la expresión de p21 [Eriksson *et al.*, 2017] y en consecuencia la actividad de las ciclinas CDK2 y CDK4 se restaura favoreciendo la proliferación celular [Schneider *et al.*, 1998].

7.2 p53^{R273C} INCREMENTA EL CONTENIDO DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES Y ENZIMAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE

En este trabajo se encontró que p53^{WT} no tiene efecto sobre los niveles intracelulares de los factores transcripcionales responsables de la activación del sistema antioxidante: Nrf2, FoxO 1 y FoxO 3a. Sin embargo, está reportado por Klotz *et al.* (2015) y Tonelli *et al.* (2018) que p53^{WT} aumenta directamente la expresión de FoxO 1 y FoxO 3a o indirectamente Nrf2 (a través de p21), lo que puede explicarse por las modificaciones epigenéticas reportadas en sus genes [Ilango *et al.*, 2020]. Hasta la fecha no se ha reportado la regulación transcripcional por p53 mutado sobre la transcripción de Nrf2 o sobre alguna isoforma de FoxO. Por lo tanto, este estudio es pionero en proponer que la mutación p53^{R273C} incrementa el contenido de proteína de estos factores transcripcionales (1.5 - 7 veces) vs. HeLa-H (c.f. Figura 10) sugiriendo una posible ganancia de función [Oren & Rotter, 2010; Yue *et al.*, 2017; Alvarado-Ortiz *et al.*, 2021]. Con respecto a las modificaciones postraduccionales, está reportado que la activación de FoxO está ligada a su fosforilación [Asada *et al.*, 2007]. La fosforilación de FoxO 1 en el residuo de serina 256 (S256) promueve su interacción con otros factores transcripcionales como Ets-1 y la transcripción de genes relacionados con la defensa antioxidante (e.g. MnSOD, CAT y TrxR 2) [Greer & Brunet, 2005; Asada *et al.*, 2007]. De manera contraria, la fosforilación de FoxO 3a en el residuo de serina 253 (S253) inhibe su actividad [Asada *et al.*, 2007]. Nuestros resultados muestran que el contenido de proteína fosforilada/total de FoxO 1 en HeLa-L y HeLa-H fue similar (30% y 42 % respectivamente), mientras que en HeLa p53^{R273C} la fosforilación de FoxO 1 incrementó 2 veces vs. HeLa-H o HeLa-L, indicando que la activación de FoxO1 es a dos niveles: aumentando el contenido de proteína y la actividad.

Por otro lado, el contenido de proteína fosforilada/total de FoxO 3a fue similar en HeLa-L y HeLa-H (80% y 84%, respectivamente), mientras que en HeLa p53^{R273C} incrementó 1.2 veces vs. HeLa-H o HeLa-L, lo que indicaría que este factor transcripcional se encuentra inactivado. Este efecto puede deberse a que, FoxO 3a no solo regula el sistema antioxidante, sino también es un potente regulador del

ciclo celular y la apoptosis en células cancerosas y no cancerosas [Medema *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2004; Seonane *et al.*, 2004], por lo que su inactivación en algunos tipos de cáncer como es el carcinoma mamario correlaciona con una mala prognosis [Hu *et al.*, 2004].

Además, el incremento en el contenido de Nrf2 y en el contenido / actividad de FoxO 1 en HeLa p53^{R273C} correlaciona con el aumento de las enzimas del sistema antioxidante (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx 4 y TrxR2) observada en este estudio (c.f. Figura 11) lo explica por qué algunos tipos de cáncer como mama, pulmón, páncreas o colorectal presentan mayor resistencia a drogas antineoplásicas [Goto *et al.*, 2008], inductoras de ERO [DeAtley *et al.*, 1999; Siomek *et al.*, 2006; Dougan *et al.*, 2008]. En el caso de la GPx 1, no fue detectada en HeLa p53^{R273C}, lo cual puede estar relacionado con la regulación que ejercen ciertas mutaciones de p53 (R273H, C177F, R175H) sobre la actividad de Nrf2 [Lisek *et al.*, 2018; Kalo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017].

7.3 LA PRESENCIA DE p53^{R273C} INCREMENTA LOS NIVELES DE CISTEÍNA Y GLUTATIÓN

El glutatión es el principal metabolito que se produce en respuesta a un estrés oxidativo en células de mamífero, además, es cofactor de algunas enzimas del sistema antioxidante como la GPx [Ribas *et al.*, 2014]. En células HeLa-H, el contenido de GSH y glutatión total disminuyó 1.7 veces vs. HeLa-L, mientras que en HeLa p53^{R273C} incrementó 1.8 - 4 veces vs. HeLa-H (Tabla 2), indicando que esta mutante de p53 estimula la síntesis de este metabolito demostrando nuevamente una ganancia de función [Oren & Rotter, 2010; Yue *et al.*, 2017]. En células no cancerosas, la síntesis de GSH depende de la cantidad de cisteína (Cys) disponible [Bannai & Tateishi, 1986; Ishii *et al.*, 1987]; y de la actividad de la enzima γ -glutamyl-cisteína sintetasa (γ -GCS) que condensa al L-glutamato + L-cisteína en gamma-glutamyl cisteína en una reacción dependiente de ATP + [Wild & Mulcahy, 2000]. El nivel de Cys_{total} en HeLa-H fue similar comparado vs. HeLa-L, incluso el nivel de

Cys_{reducida} fue 2 veces mayor vs. HeLa-L (Tabla 2) lo que indica que el contenido de Cys no podría ser un factor limitante en el bajo contenido de glutatión detectado en HeLa-H. Para el caso de las mutaciones de p53, está documentado que las mutaciones C277F, R248Q, R273H, R175H inhiben la expresión y el contenido del transportador de cisteína/glutamato SLC7A11, disminuyendo el contenido intracelular de Cys utilizado para la formación de GSH; en consecuencia, las células cancerosas con p53 mutado presentan mayor sensibilidad al estrés [Liu *et al.*, 2017]. Al contrario de lo observado anteriormente, mi estudio reveló que la mutación p53^{R273C} incrementa los niveles de Cys_{total} y Cys_{reducida} (2.7 y 3.6 respectivamente) vs. HeLa-H (Tabla 2), correlacionando con un incremento en el contenido de glutatión total e indicando que tal vez, esta mutación no afecta la expresión de SLC7A11; sin embargo, hacen falta más estudios para comprobar esto. La variación en los niveles de GSH encontrados en HeLa-H (disminuido vs. HeLa-L) y en HeLa p53^{R273C} (aumentado vs. HeLa-L) podría estar regulado por la actividad de la enzima γ -GCS. Está establecido que Nrf2 estimula la transcripción de γ -GCS [Forman *et al.*, 2009], por lo que los altos niveles de Nrf2 encontrados en la mutante p53^{R273C} podrían explicar mecanísticamente porqué el nivel de GSH es mayor en este tipo celular. Además, está reportado que en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) con sobre-expresantes de p53^{R280K} (sustitución de arginina por lisina), los niveles de ARNm de γ -GCS se encuentran incrementados (5 veces) vs. MCF10A (línea no tumoral de mama) [Lisek *et al.*, 2018], apoyando la propuesta de que algunas mutaciones podrían favorecer la transcripción y actividad de la γ -GCS por lo que su posterior análisis podría tomar relevancia en el aspecto clínico.

El análisis de los niveles de GSH reveló que en HeLa-H el GSH es menor vs. HeLa-L. Sin embargo, el nivel de glutatión oxidado (GSSG) y el cociente GSH/GSSG fue similar en ambas líneas celulares. El cociente GSH/GSSG intracelular revela fisiológicamente como se encuentra el estado de glutatión reducido/oxidado [Navarro *et al.*, 1999] indicando que ambas líneas celulares se encuentran con la misma disponibilidad de GSH. En HeLa p53^{R273C} donde se registró un incremento substancial de GSH, el nivel de GSSG fue mayor (12 veces) promoviendo que la

relación GSH/GSSG disminuyera significativamente (77%) vs. HeLa-H, lo que nos indica que la mutación en p53 1) promueve que la célula se encuentre en un estrés mayor inducido por la producción masiva de ERO [Navarro *et al.*, 1999] asociado principalmente a la disfunción mitocondrial; y 2) induce una disminución en la actividad de la GR, debido a que esta enzima la cual se encarga de la regeneración del glutatión (GSSG a GSH) utilizando el NADPH como donador de electrones [Meister & Anderson, 1983].

7.4 LA SOBREENPRESIÓN DE p53^{R273C} NO ALTERA LOS NIVELES DE ERO EN CÉLULAS HELA

En las células de mamífero, el manejo de las ERO se lleva a cabo por la acción concertada de diferentes enzimas del sistema antioxidante [Matés *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2013]. p53^{WT} es un factor transcripcional que se encarga de regular la transcripción de FoxO y Nrf2 reponsables de la activación del sistema antioxidante [You & Wak, 2005; Klotz *et al.* 2015; Tonelli *et al.* 2018], y de la sobre expresión de algunas enzimas del sistema antioxidante como son MnSOD y GPx [Pani *et al.*, 2000; Hussain *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010; Sinthupibulyait *et al.*, 2010]. En ciertos tipos de cáncer como pulmón, esófago y colorrectal, la presencia de un p53 mutado (e.g. C277F, R248Q, R273H, R175H) disminuye los niveles de ARNm de algunas enzimas del sistema antioxidante [Kalo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017] sugiriendo un aumento en los niveles de ERO. En células HeLa-H solo las enzimas TrxR2 y GR incrementaron vs. HeLa-L, sin embargo; la velocidad de producción de ERO disminuyó 40% vs. HeLa-L (Figura 13). Esta diferencia se ha observado en otras líneas celulares de cáncer de pulmón (H1299) y cáncer colorrectal (HCT-116) donde la sobreexpresión de un p53^{WT} (p53^{+/+}) disminuye los niveles de ERO (>50%) vs. H1299 y HCT-116 p53^{-/-} [Eriksson *et al.*, 2017] y este efecto principalmente es atribuido a una alta tasa de FO, ya que está establecido que una disminución en la función mitocondrial se asocia a un incremento en los niveles de ERO [Halliwell & Gutteridge, 2015; Dunn *et al.*, 2015; Nolfi-Donagan *et al.*, 2020]. Por otro lado, en HeLa p53^{R273C}, contrario a lo descrito, los factores transcripcionales y las enzimas

del sistema antioxidante incrementaron significativamente vs. HeLa-H (Figura 10 y Figura 11), excepto la TrxR2 y GR ya que sus niveles fueron similares a HeLa-H, y la GPx 1 la cual no fue detectada (Figura 10 y Figura 11). Esto repercutió en 1) la velocidad de producción de ERO ya que se mantienen en niveles similares a HeLa-H, y 2) en el contenido total de ERO que incrementó 1.2 veces vs. HeLa-H, aunque esto no fue significativo, sugiriendo que la esta mutación, al tener ganancia de funciones, activa al sistema antioxidante evitando que exista una producción masiva de ERO en células donde la mitocondria se encuentra fuertemente inhibida [Blanco-Carpintero, 2020], manteniendo los niveles basales muy similares a HeLa p53^{WT}.

8. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio, muestran que la mutación p53^{R273C} (Figura 11; Tabla 2) en células de cáncer de cervix HeLa, favorece el sistema antioxidante a diferentes niveles: incrementando I) el contenido de proteína de los factores transcripcionales Nrf2, FoxO 1 y FoxO 3a; II) de enzimas antioxidantes (SOD 1, SOD 2, CAT, GPx4, GR y TrxR2); y III) de los niveles de cisteína y glutatión total. En consecuencia, la velocidad de producción de ERO disminuye vs. HeLa-L y se mantienen en niveles similares vs. HeLa-H (Figura 16). Lo anterior puede dar una explicación mecánica de porqué células cancerosas son resistentes a terapias antineoplásicas cuyo objetivo sea la producción masiva de ERO [Goto *et al.*, 2008].

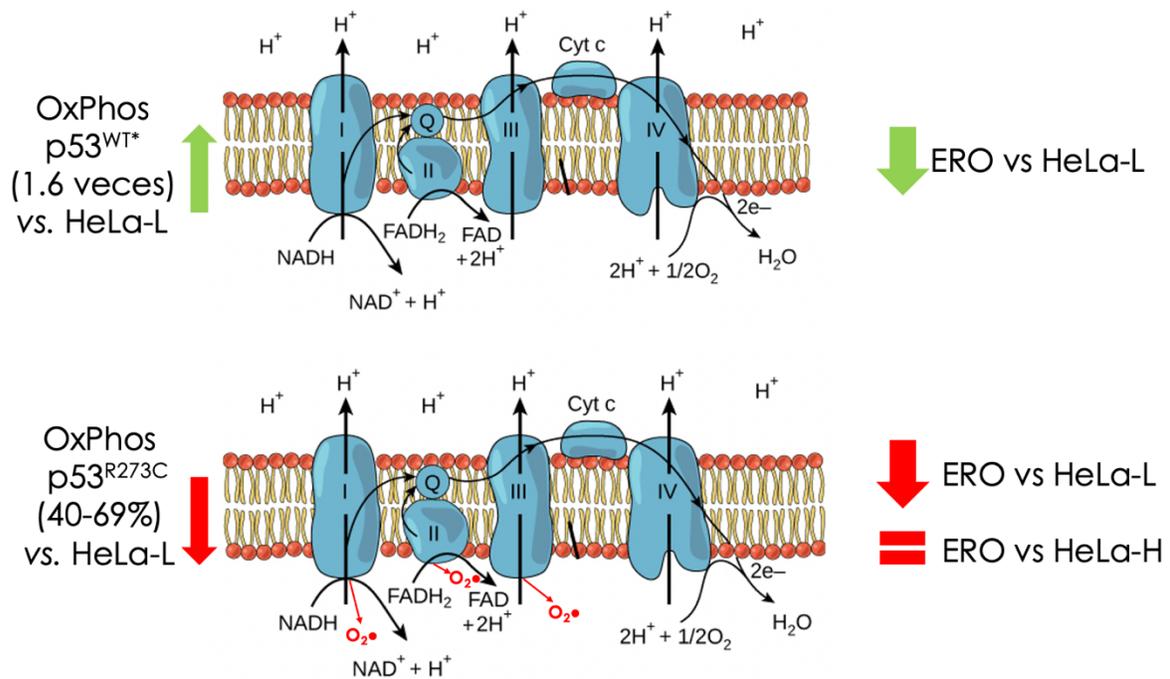


Figura 15: Esquema de fosforilación oxidativa en HeLa-H y HeLa p53^{R273C} comparada vs. FO en HeLa-L y niveles de ERO en HeLa p53^{R273C} comparados vs. ERO en HeLa-L y HeLa-H.

9. PERSPECTIVAS

Los datos anteriores indican que el sistema antioxidante fue favorecido en presencia de la mutación p53^{R273C}. Un paso siguiente es la caracterización cinética del sistema antioxidante mediada por un p53 mutado. Lo anterior permitirá identificar a la enzima/enzimas que se encuentren controlando esta vía metabólica utilizando el enfoque de la teoría de Control Metabólico [Fell, 1997; Moreno-Sánchez *et al.*, 2008] y así proponerlas como un blanco terapéutico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandrov LB, Kim J, Harandhvala NJ, Huang MN, Tian Ng AW, Wu Y, Boot A, Covington KR, Gordenin DA, Bergstrom EN, Islam SMA, Lopez-Bigas N, Klimczak LJ, McPherson JR, Morganella S, Sabarinathan R, Wheeler DA, Mustonen V, PCAWG Mutational Signatures Working Group, Getz G, Rozen SG, Stratton MR, PCAWG Consortium. (2020). The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*. 578: 94-101.

Allende-Vega N, Villalba M. (2019). Metabolic stress controls mutant p53 R248Q stability in acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep*. 9: 5637.

Alvarado-Ortiz E, de la Cruz-López KG, Becerril-Rico J, Sarabia-Sánchez MA, Ortiz-Sánchez E, García-Carránca A. (2021). Mutant p53 gain-of-function: role in cancer development, progression and therapeutic approaches. *Front Cell Dev Biol*. 8: 607670.

Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, Iwashita S, Kako K, Kishi T, Kasuya Y, Fukamizu A. (2007). Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate FoxO 1. *Cell Signal*. 19: 519-527.

Ates B, Ercal BC, Manda K, Abraham L, Ercal N. (2009). Determination of glutathione disulfoxide levels biological samples using thiol-disulfoxide exchanging agent, dithiothreitol. *Biomed Chromatogr*. 23: 119-23.

Bannai S, Tateishi N. (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol*. 89: 1-8.

Blanco-Carpintero BA. (2020). Efecto de p53 mutante (R273C) sobre el metabolismo energético del cáncer de cérvix HeLa. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Bode AM, Dong Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 4: 793-805.

Chan KT, Lung ML. (2004). Mutant p53 expression enhance drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*. 53: 519-526.

Chen J. (2016). The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6: a26104.

Chipuk JE, Green DR. (2006). p53 and metabolism: inside the TIGAR. *Cell*. 126: 30.32.

Dai C, Gu W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trend Mol Med*. 16: 528-536.

DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Harris B, Hadley R, Cole Harper P, Carney JM, Butterfield DA. (1999). Antioxidant protects against reactive oxygen species associated with adriamycin-treated cardiomyocytes. *Cancer Lett*. 136: 41-6.

Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. (2015). The emerging role of Nrf2 mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*. 88: 179-188.

Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Levine AJ. (1993). Gain of functions mutation of p53. *Nature Genetics*. 4: 42-46.

Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J, Sakuraqi N. (2013). Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*. 4: 3286.

Dougan SJ, Habtemariam A, McHale SE, Parsons S, Sadler PJ. (2008). Catalytic organometallic anticancer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 11628-33.

Dunn JD, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 6: 472-485.

Eriksson M, Ambriose G, Ouchida AT, Queiroz AL, Smith D, Gimenez-Cassina A, Iwanicki M, Muller PA, Norberg E, Vakifahmetoglu-Norberg H. (2017). Effect of mutant p53 proteins of glycolysis and mitochondrial metabolism. *Mol Cell Biol*. 37: e00328-17.

Fell D. (1997). Understanding the control of metabolism. Portland Press. London.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 30: 1-12.

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

Garg A, Hazra JP, Sannigrahi MK, Rakshit, Sinha S. (2020). Variable mutations at the p53-R273 oncogenic hotspot position leads altered properties. 118: 720-728.

Gerstung M, Jolly C, Leshchiner I, Dentro SC, Gonzalez S, Rosebrock D, Mitchell TJ, Rubanova Y, Anur P, Yu K, *et al.* (2020). The evolutionary history of 2568 cancers. *Nature*. 578: 122-128.

Greer EL, Brunet A. FoxO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 24 (2005): 7410-25.

Goto T, Takano N, Hirata J, Tsuda H. The involvement of FoxO 1 in cytotoxic stress and drug-resistance induced by paclitaxel in ovarian cancer. *Br. J. Cancer*. 98 (2008): 1068-1075.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (2015). Oxygen: boon yet bane-introducing oxygen toxicity and reactive species. Fifth edition. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. 1-29.

Hanahan D, Weinberg A. (2011). Hallmarks of cancer: next generation. *Cell*. 4: 646-674.

He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. (2017). Antioxidant maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem*. 44: 532-553.

Hanel W, Marchenko N, Xu S, Yu S, Weng W, Moli U. (2013). Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 20: 898.

Hernández-Reséndiz I, Román-Rosales A, García-Villa E, López-Macay A, Pineda E, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Álvarez-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. *Biochim Biophys Acta*. 1853: 3266-3278.

Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, López-Macay A, Robledo-Cadena DX, 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. *J Cell Physiol*. 234: 5524-5536.

Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. (2017). High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 9: 429-436.

Hu MCT, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung MC. (2004). IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO 3a. *Cell*. 117: 225-37.

Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanich L, Okamura S, Hofseth L, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. (2004). p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. *Cancer Res*. 64: 2350-2356.

ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. (2020). Pan-Cancer of Whole Genomes. *Nature*. 578: 82-93.

Igarashi H, Hirano H, Yahagi A, Saika T, Ishihara K. (2014). Anti-apoptotic role of mutant p53 R248Q through suppression of p53-regulated apoptosis-inducing protein 1 in RA-derived fibroblast-like synoviocyte cell line MH7A. *Clin Immunol*. 150: 12-21.

Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. (2020). Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 25: 1058-1109.

Ishii T, Sugita Y, Bannai S. (1987). Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J Cell Physiol*. 133: 330-336.

Joerger AC., Ferscht AR. (2016). The p53 pathway: origins. Inactivation in cancer and emerging therapeutic approaches. *Annu. Rev. Biochem*. 85: 375-404.

Kalo E, Kogan-Sakin I, Solomon H, Bar-Nathan E, Shay M, Shetzer Y, Dekel E, Goldfinger N, Buganim Y, et al. (2012). Mutant p53R273H attenuates expression the expression of phase 2 detoxifying enzymes and promotes the survival of cells with high level of reactive oxygen species. *J Cell Sci*. 125: 5578-5586.

Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. (1995). p53, cell cycle control an apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 14: 3-15.

Kastenhuber ER, Lowe SW. (2017). Putting p53 in context. *Cell*. 170: 1062-1078.

Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. (2008). p53 regulates glucose metabolism through an IKK.NFKB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol*. 10: 611-618.

Klockars, A.J., Hancock, G.R. (2000). Scheffé's more powerful protected post hoc procedure. *J. Educ. Behav. Stat*. 25: 13–19.

Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbanek P, Steinbrenner H, Monsalve M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factor. *Redox Biology*. 6: 51-72.

Krzywinski, M., Altman, N. (2014). Points of significance: comparing samples—part I. *Nat. Methods*. 11: 215–216.

Kumutina J., Yao XQ., Hamelberg D. (2021). p53 is potentially regulated by cyclophilin D in the triple-proline loop of the DNA binding domain. *Biochemistry*. 60: 597-606.

Lee HM, Lee SH, He L, Kong APS, Mao D, Hou Y, Chung ACK, Xu G, Ma RCW, Chan JCN. (2021). Legacy effect of high glucose on promoting survival of HCT 116 colorectal cancer cells by reducing endoplasmic reticulum stress response. *Am J Cancer Res*. 11: 6004-6023.

Lee S, Kim SM, Lee RT. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanism to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 28: 1165-207.

Levine AJ, Oren M. (2009). The first 30 years of p53: growing even more complex. *Nat Rev Cancer*. 9: 749-758.

Li J, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan YC, Li H, Hu S, Weng Y, Yen Y. (2014). Mutant TP53 p.R273H and R273C but not p.R273G enhance cancer cell malignancy. *Hum Mutat*. 35: 575-584.

Li Z, Shi K, Guan L, Cao T, Jiang Q, Yang Y, Xu C. (2010). ROS leads to MnSOD upregulation through ERK2 translocation and p53 activation in selenite-induced apoptosis of NB4 cells. *FEBS Lett*. 584: 2291-7.

Lisek K, Campener E, Ciani Y, Walerych D, Del Sal G. (2018). Mutant p53 tunes the Nrf2-dependent antioxidant response to support survival of cancer cells. *Oncotarget*. 9: 20508.

Liu DS, Duong CP, Haupt S, Montgomery KG, House CM, Azar WJ, Pearson HB, Fisher OM, Read M, Guerra GR, *et al.* (2017). Inhibiting the system xC⁻ / glutathione axis selectively targets cancer with mutant -p53 accumulation. *Nat Commun*. 8: 14844.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.

Maillet A, Pervaiz S. (2012). Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. *Antioxid Redox Signal*. 16: 1285-94.

Mandujado-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez. (2013). Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys Acta*. 1833: 541-51.

Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ*. 26: 199-212.

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

Masur K, Vetter C, Hinz A, Tomas N, Henrich H, Niggemann B, Zänker KS. (2011). Diabetogenic glucose and insuline concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumor cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer*. 104: 345-52.

Matés JM, Pérez-Gómez C, Nuñez de Castro E. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem*. 32: 595-603

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

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. (2000). AFX-like forkhead transcription factor mediate cell cycle regulation by RAS and PKB through p27kip1. *Nature*. 404: 782-7.

Meek DW. (1998). Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal*. 10: 159-166.

Meister A, Anderson ME. (1983). Glutathione. *Ann Rev Biochem*. 52: 711-760.

Moreno-Sánchez R, Hernández-Esquivel L, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Neuzil J, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. (2013). Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *FEBS J*. 280: 927-938.

Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Saavedra E, Pardo JP, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. (2014). Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 50: 10-23.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín Hernández A, Saavedra E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274: 1383-418.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. (2009). The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors.* 25: 209-25.

Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjnek FD, Rodríguez-Enríquez S. (2016). Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitation of current mics analyses. *FEBS J.* 283: 54-73.

Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Olín-Sandoval V. (2008). Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol.* 2008: 597913.

Moreno-Sánchez R, Robledo-Cadena DX, Pacheco-Velázquez SC, Vargas Navarro JL, Padilla-Flores JA, Rodríguez-Enríquez S. (2023). Estimation of energy pathway fluxes in cancer cells - Beyond the Warburg effect. *Arch Biochem Biophys.* 739: 109559.

Narayanankutty A, Job JT, Narayanankutty V. (2019). Glutathione, an antioxidant tripeptide: dual role in carcinogenesis and chemoprevention. *Curr Protein Pep Sci.* 20: 907-917.

Nathan C, Cunningham-Bussel A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol.* 13: 349-61.

Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Aviño J, Pérez P, Estrela JM. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associated with tumor growth in vivo. *Free Radic Biol Med.* 26: 410-8.

Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measure. *Redox Biol.* 37: 101674.

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

Pacheco-Velázquez SC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. (2018). Energy metabolism drugs block triple negative breast metastatic cancer cell phenotype. *Mol Pharm.* 5: 2151-64.

Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Colavitti R, Palazzotti B, Borrello S, Galeotti T. (2000). Deregulated Manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res.* 60: 4654-4660.

Pal A, Kundu R. (2020). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol.*10: 3116.

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

Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, Kenzelmann Broz D, Venturelli OS, Johnson TM, Oskoui PR, Xuan Z, et al. (2011). The pro-longevity gene FoxO 3 is a direct target the p53 tumor suppressor. *Oncogene.* 30: 3207-21.

Rheinbay E, Nielsen MM, Abascal F, Wala JA, Shapira O, Tiao G, Hornshøj H, Hess JM, Juul RI, Lin Z, et al. (2020). Analysis of non-coding somatic drivers 2658 cancer whole genomes. *Nature.* 278: 102-111.

Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. (2014). Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol.* 5: 151.

Robbins D, Zhao Y. (2012). Oxidative stress induced by MnSOD-p53 interaction: pro-or anti-tumorigenic? *Signal Transduct.* 2012: 1-13.

Rodic S, Vincent MD. (2018). Reactive oxygen species (ROS) are key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer.* 142: 440-448.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Pacheco-Velázquez SC, Belmont-Díaz J, Robledo-Cadena DX, Vargas-Navarro JL, Corona de la Peña NA, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. (2019). Transcriptional regulation of energy metabolism in tumor cells. *Cells.* 8: 1225.

Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, Garcia-García JD, Belmont-Díaz J, López-Marure R, Hernández-Esquivel L, Sánchez-Thomas R, Moreno-

Sanchez R. (2019). Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 273: 65-77.

Rodríguez-Enríquez S, Robledo-Cadena DX, Gallardo-Pérez JC, Pacheco-Velázquez SC, Vázquez C, Saavedra E, Vargas-Navarro JL, Blanco-Carpintero BA, Marín-Hernández A, Jasso-Chávez R, Encalada R, Ruiz-Godoy L, Aguilar-Ponce JL, Moreno-Sánchez R. (2021). Acetate promotes a differential energy metabolic response in human HCT 115 and COLO 205 colon cancer impacting cancer cell growth invasiveness. *Front Oncol.* 11: 697408.

Schneider E, Montenarh M, Wagner P. (1998). Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene.* 17: 2733-41.

Seonane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. (2004). Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell.* 117: 211-23.

Shamloo B, Usluer S. (2019). p21 in cancer research. *Cancer (basel).* 11: 1178.

Shi T, Polderman PE, Pages-Gallego M, van Es M, Vos HR, Burgering BMT, Dansen TB. (2021). p53 form dependent protein-protein interaction through cysteine 277. *Antioxidants.* 10: 1578.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 91: 325-334.

Simabuco FM, Morale MG, Pavan ICB, Morelli AP, Silva FR, Tamura RE. (2018). p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget.* 9: 3780-23823.

Sinthupibulyait C, Ittarat W, St Clair WH, St Clair DK. (2010). p53 protects lung cancer against metabolic stress. *Int J Oncol.* 37: 1575-81.

Siomek A, Tujakowski J, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, Dziaman T, Roszkowski K, Olinski R. (2006). Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. *Int J Cancer.* 119: 2228-30

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. (2002). Topology of superoxide production from different sites in mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 277: 44784-90.

Staniek K, Nohl H. (2000). Are mitochondrial permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta*. 1460: 268-75.

Thomas M, Pim D, Banks L. (1999). The role of E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 18: 7690-7700.

Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. (2018). Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 29: 1727-1745.

Wang H, Bao W, Jiang F, Che Q, Chen Z, Wang F, Tong H, Dai C, He X, Liao Y, Liu B, Sun J, Wan X. (2015). Mutant p53 (R248Q) functions as an oncogene in promoting endometrial cancer by up-regulating REG γ . *Cancer Lett*. 360: 269-179.

Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. 123: 309-14.

Wild AC, Mulcahy RT. (2000). Regulation of gamma-glutamylcystein synthetase subunit gene expression: insight into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic Res*. 32: 281-301.

You H, Wak TW. (2005). Crosstalk between p53 and FOXO transcription factors. *Cell Cycle*. 4: 37-38.

Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. (2017). Mutant p53 in cancer: accumulation, gain of function, and therapy. *J Mol Biol*. 429: 1595-1606.