



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**LA MUTACION R248Q EN p53
ALTERA EL METABOLISMO ENERGETICO DE
CÁNCER DE CÉRVIX**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

JOHALY VIRIDIANA MIGUEL BÁEZ

AMOR SCIENTIA QVE INSERVIANT CORDI



**INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA
IGNACIO CHÁVEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. SARA RODRÍGUEZ
ENRÍQUEZ
CANDIDATA A DRA. ILEANA HERNÁNDEZ
RESÉNDIZ**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México Agosto 2016



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.

*Solo pido a mi orgullo que siempre camine
al lado de mi inteligencia y si un
día mi inteligencia me abandona, pues le
encanta escabullirse volando, que mi orgullo
no deje de volar al lado de mi
insensatez.....*

Así Habla Zaratrusta

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que estuvieron conmigo apoyándome de cerca o lejos, a quienes encontré a lo largo del camino de la carrera y sobre todo en la vida

A mis padres Gregorio y Pilar quienes siempre me han acompañado en este camino a pesar de los obstáculos. Gracias por su incondicional apoyo, por estar a mi lado y ayudarme a seguir sin mirar atrás y creer en mí.

A mi hermana Nancy, por formar parte de mi vida, no tengo las palabras suficientes para agradecer el apoyo incondicional que me brindas día con día, gracias por escucharme y alentarme en las decisiones que he tomado.

A la familia Báez: Yolanda, José, Vicente, Carlos, y mis primos Eduardo, Miguel y Rafael, fueron indispensables en este camino, gracias por brindarme su compañía en todo momento, cariño y consejos.

En memoria a mi abuelo Carlos Q.E.P.D, por haber creído en mí en todo momento, siempre estaré agradecida por haberme acompañado todos estos años, brindándome tu cariño y consejos.

A mi abuelita Elisa por su incondicional apoyo, por animarme a seguir a delante sin dejarme caer.

A mis amiga yuno gracias por todos estos años de amistad, por soportarme, animarme y sobre todo estar en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por abrirme sus puertas, desde el primer día que me convertí en Universitaria supe del gran honor y responsabilidad que implica pertenecer a esta institución.

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han brindado su apoyo, solidaridad y fraternidad para la culminación de esta etapa en mi vida.

Gracias Dra. Sara Rodríguez Enríquez por su confianza y apoyo a lo largo de este proceso, y la experiencia compartida en el Metabolismo Energético Tumoral.

Gracias Ileana Hernández Reséndiz por mostrarme lo grande que puede llegar a ser una persona, por alentarme, dedicarme tu tiempo y compartir conmigo un poco del enorme conocimiento que posees.

Al laboratorio de Bioquímica, en especial a Sílvia y Ana por su paciencia, sin ustedes no hubiera sido lo mismo al momento de las risas.

A mis sinodales la Dra. Yolanda Chirino, Dra. Martha Salcedo y el Dr. Baíza, por sus comentarios y consejos.

A mis amigos: Ale, Ingrid, Brenda, Salvador, Lina, Ricardo, Fer, con quienes compartí grandes momentos, risas, emociones fuertes, trabajo, y demás,

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	[1]
RESUMEN.....	[2]
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Epidemiología del cáncer.....	[4]
1.2 Cáncer.....	[4]
1.3 Características de P53.....	[5]
1.4 Estructura.....	[8]
1.5 P53 mutado.....	[7]
1.6 Metabolismo energético tumoral mediado por p53 wild type.....	[9]
1.7 Metabolismo energético tumoral mediado por p53 mutado.....	[11]
2. JUSTIFICACION	[12]
HIPOTESIS.....	[12]
OBJETIVOS.....	[13]
3. MATERIAL Y METODOS	[14]
4. RESULTADOS	
4.1 Efecto de la mutación R248Q sobre los blancos canónicos de p53..	[19]
4.2 Efecto de la mutación R248Q sobre la proliferación celular.....	[20]
4.3 Efecto de la mutación R248Q sobre proteínas de adhesión.....	[21]
4.4 Efecto de la mutación R248Q sobre las proteínas de glucólisis y de la FO.....	[22]
4.5 Efecto de la mutación R248Q de p53 sobre los flujos de FO y glucólisis en HeLa.....	[23]
4.6 Efecto de la mutación R248Q sobre la dependencia a la producción a la producción de ATP de la glucólisis y FO.....	[26]
5. DISCUSION	[27]
5.1 La mutación de p53 en R248Q bloquea la función mitocondrial.....	[28]
5.2 La mutación de p53 en R248Q favorece el efecto Warburg.....	[29]

6. CONCLUSIONES	[31]
BIBLIOGRAFIA.....	[32]
Apéndice.....	[38]

ABREVIATURAS

2DOG.....	2-desoxiglucosa
2OGDH.....	2 oxoglutarato deshidrogenasa
COXIV.....	citocromo oxidasa o complejo IV de la cadena transportadora de electrones
FO.....	Fosforilación oxidativa
GA.....	Glutaminasa
GLUT.....	Transportador de glucosa
HeLa ^{WT}	HeLa wild type
HeLap53 ^{WT}	HeLa con p53 sobre-expresado
HeLap53 ^{R248Q}	HeLa con p53 mutado sobre-expresado. Substitución de la glutamina 248 por arginina
HIF-1 α	Factor inducido por hipoxia 1alfa
HK.....	Hexocinasa
HPI.....	Hexosa fosfato isomerasa
LDH.....	Lactato deshidrogenasa
NADH.....	Nicotinamida adenin dinucleotido
NDI.....	NADH deshidrogenasa o complejo I de la cadena transportadora de electrones
ngAtO.....	nanogramo átomo de oxigeno
PFKI.....	Fosfrofructocinasa tipo I
PGAM.....	Fosfoglicerato mutasa

PUMA..... p53 upregulated modulator of apoptosis modulador de apoptosis activado por p53

RK..... Ringer krebs

SCO2..... cofactor para la síntesis de la citocromo oxidasa tipo 2

TIGAR..... Regulador de la apoptosis y glucólisis inducido por TP53

WB..... Western blot”

RESUMEN

p53 es un supresor tumoral que presenta diversas mutaciones en la mayoría (aprox. 70%) de los cánceres metastásicos. Este factor transcripcional está involucrado en procesos celulares importantes como la regulación del ciclo celular, inducción de muerte por apoptosis, estabilidad genética y metabolismo intermediario. Las mutaciones de p53 alteran sus vías canónicas de supresión tumoral causando tanto la pérdida de la función de la proteína como la adquisición de funciones relacionadas con la malignidad. Los residuos de arginina-248 y arginina-273 del dominio de unión al DNA son los aminoácidos con mayor índice de mutabilidad en el 80% de los cánceres malignos y metastásicos. Hasta el momento, no se ha analizado el efecto de la mutación de p53 sobre el metabolismo energético, el cual es esencial para la transformación y desarrollo del tumor.

En nuestro grupo de trabajo, se evaluó el efecto de p53 silvestre (p53^{WT}) no mutado sobre el metabolismo energético tumoral. Para lo anterior, se sobre-expresó p53 en la línea de cáncer cervicouterino humano estadio IV (HeLa), la cual contienen niveles indetectables de p53 por su constante degradación mediada por la proteína viral E6. Esta línea cancerosa transformada y llamada HeLa-H (o HeLa con p53 sobre-expresado) mostró un aumento en el contenido de proteínas mitocondriales (2-4 veces), del flujo de la fosforilación oxidativa (FO) (60%) y del potencial transmembranal mitocondrial (40%); sin embargo, a pesar de que p53 causa una disminución significativa de algunas proteínas glucolíticas como GLUT1 y GLUT3 (1-1.5 veces), el flujo no varió significativamente comparado con HeLa-L (células carentes de p53). Recientemente se ha asociado la agresividad de un tumor con la presencia de mutaciones de p53, por lo que en este proyecto se analizó el efecto de la sustitución de la arginina-248 en p53, por glutamina (R248Q) sobre el metabolismo energético de HeLa. Nuestros resultados mostraron que la mutación R248Q (HeLap53^{R248Q}) se asocia con una menor expresión en los blancos canónicos, TIGAR, NOXA y PUMA. Con respecto a la duplicación celular, la mutación promovió una disminución significativa (1.3 veces)

en el tiempo de duplicación celular comparado con las HeLap53^{WT}. Además, en el sobrenadante de los cultivos de células HeLap53^{R248Q} se encontró una gran cantidad de células viables, debido a la disminución (60%) del contenido de proteínas de adhesión como E-caderina, β -catenina y vimentina. A nivel energético, la mutación promovió un aumento de 1.5-3 veces en el contenido de proteínas glucolíticas GLUT1, GLUT3, HKI y HKII que correlacionó con un aumento del flujo glucolítico del 70% vs. HeLap53^{WT}. En paralelo, la mutación disminuyó 40-80% el contenido de proteínas mitocondriales ND1, COXIV, 2ODGH, GA y ATPasa lo que correlacionó con una disminución del 60% en el flujo de la fosforilación oxidativa y en el potencial transmembranal mitocondrial. En estas condiciones, la mutación de p53 promovió que la glucólisis fuera la principal vía de producción de ATP (77%) en condiciones aeróbicas, efecto conocido como efecto Warburg. Con estos resultados se demuestra que la presencia de p53 mutado favorece el efecto Warburg promoviendo una mayor dependencia al metabolismo glucolítico para la obtención de ATP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 8.2 millones de defunciones relacionadas con esta enfermedad, y ocupando el segundo lugar como causa de defunciones, después de los padecimientos cardiovasculares [1]. En México, los principales tipos de cáncer con mal pronóstico son los de pulmón con el 9.7%; mama con 7.2%; próstata con 8.1%, cervicouterino con 6.1% así como colon y recto con el 6% [2]

1.2 Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que involucra el crecimiento acelerado de células malignas dentro de un órgano o tejido, comprometiendo su funcionalidad. Las células cancerosas presentan características que difieren de las normales y que les permite sobrevivir en microambientes hostiles, entre ellas están: 1) resistencia a la muerte celular; 2) capacidad de invasión y metástasis; 3) angiogénesis; 4) cambios en el metabolismo intermediario; 5) evasión del crecimiento; 6) inmortalidad; 7) inestabilidad genómica; 8) promoción de la inflamación y 9) evasión del sistema inmune. Estas características se presentan como consecuencia de la sobre expresión de oncogenes o bien, por la pérdida de genes supresores tumorales, como p53 [3]

1.3 Características de P53

P53 es un supresor tumoral que pertenece al grupo de los factores de transcripción y codifica para una fosfoproteína de 53kDa [4]. P53 está involucrado en diversos procesos celulares importantes en la supresión tumoral, como en la determinación de la respuesta de las células a numerosos tipos de estrés tales como daño del DNA, la hipoxia, disminución nutricional, supervivencia celular y la promoción de la muerte celular [5, 6, 7]. En la última década se han propuesto nuevos blancos de p53 involucrados en la regulación del metabolismo energético celular [4].

1.4 Estructura

p53 se compone de cinco dominios funcionales: un dominio de transactivación (TA), donde se fosforilan las proteínas para su activación; un dominio rico en prolinas (PRD), involucrado en la regulación de muerte celular por apoptosis; un dominio de unión al DNA (DBD), el cual tiene unión directa con los elementos de respuesta de p53; un dominio de oligomerización (OD), donde se lleva a cabo la unión de los monómeros de p53 para formar el tetrámero activo, y un dominio carboxilo terminal (CDT) donde se llevan a cabo las modificaciones postraduccionales para la regulación de la proteína [8] (Fig. 1).



Figura 1. Representación de los 5 dominios de p53.

1.5 P53 mutado

Aunque parte de la investigación se ha centrado en p53^{WT}, más del 70% de los cánceres malignos presentan al menos una mutación en p53, lo cual se ha correlacionado con la mala prognosis en los tratamientos contra el cáncer [9]. La presencia de una sola mutación en esta proteína altera sus vías canónicas de supresión tumoral causando no solo la pérdida de la función, si no que adquiere nuevas funciones relacionadas con la inducción de la transformación celular [10, 11], así como el incremento en la metástasis y malignidad celular [12, 13]. En modelos bidimensionales, las mutaciones de p53 promueven migración, invasión, angiogénesis, supervivencia y quimioresistencia [12, 14, 15].

El 80% de las mutaciones de esta proteína se encuentran en el dominio DBD (Fig. 2). Existen 6 mutaciones importantes divididas en dos categorías: (1) mutaciones estructurales que causan desplegamiento de la proteína p53 (R175H, G245S, R249S y R282W) y (2) mutaciones de contacto donde el cambio de un aminoácido modifica la estructura de p53 (R248Q y R273H) [16, 17] (Fig. 2). En este último, la sustitución de las argininas 248 y 273 son las de mayor frecuencia [18, 19] en cánceres con mayor malignidad y potencial metastásico.

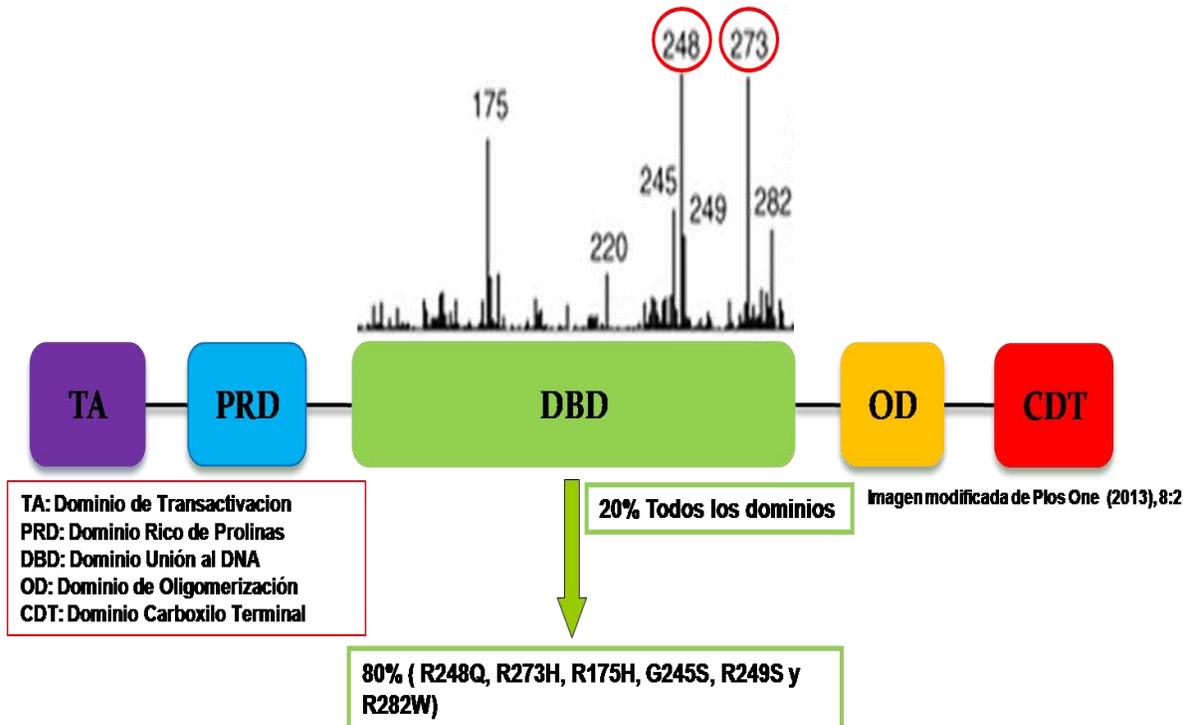


Figura 2. Mutaciones frecuentes en p53. El 80% de las mutaciones se encuentran en el dominio de unión al DNA; las más frecuentes son la sustitución de arginina 248 y 273 por glicina y triptófano, respectivamente.

1.6 Metabolismo energético tumoral mediado por p53 wild type (p53^{WT})

Uno de los principales cambios metabólicos observados en las células tumorales es el aumento de la glucólisis aún en condiciones aerobias, donde se sobre-expresan oncogenes que activan la transcripción de enzimas de la glucólisis. Este efecto en células tumorales es conocido como efecto Warburg.

A nivel de la glucólisis se ha reportado que p53 disminuye el transcrito de varias enzimas y transportadores de la glucólisis como son GLUT1, GLUT4 y Fosfoglicerato mutasa (PGAM) [20, 21, 22]; y aumenta el transcrito de TIGAR, un inhibidor de la PFK-II promoviendo la disminución de fructosa-2,6-bisfosfato, el activador fisiológico de la PFK [23, 24, 25]. A nivel del metabolismo mitocondrial, p53 tiene un efecto contrario; ya que aumenta los transcritos de (1) la Piruvato deshidrogenasa cinasa tipo 2 (PDK2), promoviendo una inhibición de la Piruvato deshidrogenasa (PDH) [26]; (2) la SCO2 involucrada en la síntesis *de novo* de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (COXIV) y (3) la glutaminasa [25], que cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato, el cual se metaboliza hasta 2-oxoglutarato, intermediario del ciclo de Krebs [27, 28].

Sin embargo, el análisis del metabolismo energético resulta incompleto si solo se analiza el contenido de mRNA como se hizo en los estudios anteriores debido a que un aumento del mRNA no es indicativo de la síntesis de una proteína funcional; ya que ésta también puede presentar modificaciones covalentes y de regulación alostérica [29].

En un estudio integral y reciente de nuestro laboratorio en cáncer de HeLa se demostró que p53 no mutado (p53^{WT}) afecta de manera importante el metabolismo energético tumoral [30]. La presencia de p53^{WT} aumentó (1) el contenido de las proteínas mitocondriales COXIV, 2ODGH y la ATPasa (2-4 veces); (2) el flujo de la fosforilación oxidativa (FO) y el potencial transmembranal mitocondrial (40-60%). Por el contrario, el flujo de la glucólisis no se afectó a pesar de que se observó una disminución substancial (40-60%) en los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 [30]. En este contexto, se cuantificó el ATP derivado de ambas vías energéticas y se demostró que p53 promueve la

dependencia energética del tumor hacia la mitocondria. Además se demostró que inhibidores mitocondriales a muy bajas dosis afectaron el crecimiento de este tumor.

1.7 Metabolismo energético tumoral mediado por p53 mutado

Pocos estudios se han realizado evaluando el efecto de p53 mutado sobre el metabolismo energético tumoral. Lo anterior toma relevancia porque la glucólisis acelerada es una característica fundamental para la transformación celular [31]. Varios trabajos han estudiado la correlación de p53 mutado y la dependencia de la glucólisis en células de cáncer. Las mutaciones R248Q, R175H y R273H en p53 de cáncer de pulmón (H1299) aumentó el transcrito de proteínas involucradas (RhoA) en la translocación de los transportadores de glucosa del citosol a la membrana plasmática, lo cual promovió un aumento en la captación de glucosa (1.5 veces) vs. células H1299 con p53 no mutado [32]. Sin embargo, la captación de glucosa NO es sinónimo de glucólisis, debido a que parte de la glucosa internalizada es utilizada para la generación de NADPH a través de la vía de las pentosas. En células de carcinoma folicular de tiroides humano FTC133, la mutación de p53 R273H promovió una disminución en el transcrito del supresor tumoral PTEN, involucrado en la activación de enzimas glucolíticas como la PK2 y PFKFB3 [33] y en la translocación de GLUT1 a la membrana celular para la captación de glucosa [34]. Hasta el momento no se ha evaluado cual es el efecto que tiene p53 mutado sobre la FO. Es por ello que mi tesis está enfocada en la dilucidación del papel de p53 mutado sobre la función mitocondrial del cáncer de HeLa. Para una mejor interpretación de los resultados, se evaluó en paralelo la función glucolítica. Los resultados de este trabajo contribuirán en el mejor entendimiento del papel del factor transcripcional p53 y la importancia que representa la presencia de mutaciones en esta proteína sobre vías energéticas.

2. JUSTIFICACIÓN

Las mutaciones en p53 en los residuos de arginina-248 y arginina-273 del dominio de unión al DNA promueven cambios en el fenotipo de malignidad celular [10], es probable que dicha mutación esté asociada también a cambios en el metabolismo energético tumoral, característica fundamental para la transformación celular.

HIPÓTESIS

La mutación R248Q de p53 aumentará el flujo glucolítico y disminuirá el flujo de la fosforilación oxidativa en células HeLa favoreciendo el fenotipo Warburg.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar el efecto de $p53^{R248Q}$ mutante sobre el metabolismo energético tumoral

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la mutación $p53^{R248Q}$ sobre los blancos de $p53^{WT}$
- Evaluar el efecto de la mutación $p53^{R248Q}$ sobre el crecimiento celular de HeLa
- Evaluar contenido de proteínas glucolíticas y mitocondriales en células HeLap53^{R248Q}
- Determinar los flujos de glucólisis y fosforilación oxidativa en células HeLap53^{R248Q}
- Determinar en las HeLap53^{R248Q} la vía predominante en el suministro de ATP celular

3. MATERIALES Y METODOS

Cultivo y mantenimiento de células HeLap53^{R248Q}

Las células de HeLap53^{R248Q} se cultivaron (5×10^6 cels/mL) en cajas de Petri (60 X 15 mm) en 5 mL de medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium") (apéndice 1) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10,000 U de penicilina/estreptomicina y fueron incubadas en 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C hasta la fase exponencial (72 h). La genotipificación de esta clona coincidió con la clona de HeLa original de la American Tissue Culture Collection (ATTC).

Curvas de crecimiento para HeLa p53^{R248Q}

HeLap53^{R248Q} (5×10^6 cels/mL) se sembraron en cajas Petri (60 X 15 mm) en 5 mL de medio DMEM y se incubaron por 120 h en 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. Las células se contaron cada 24 h; se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) pH 7.2 que contiene KH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 155 mM, NaH₂PO₄·7H₂O 27 mM. La separación de las células se realizó químicamente con 3 mL de tripsina/EDTA 0.25% por 2 - 5 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2500 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente y se determinó la viabilidad con el método de exclusión de azul de tripano al 0.1% como se describe en el (apéndice 2). Para la determinación del tiempo generacional se utilizó la siguiente ecuación:

TDP =Tiempo de duplicación poblacional

TDP= tiempo total transcurrido/ número de generaciones

Tasa de duplicación (r) = $3.32 (\log N_H - \log N_1) / (t_2 - t_1)$

TPD= $1/r$ (h)

donde...

N_H= número de células cosechadas al final del experimento

N₁= número de células sembradas al inicio del experimento

t_2 = tiempo final del experimento (h)

t_1 = tiempo inicial del experimento (h)

Medición de los flujos energéticos

Para realizar la medición de los flujos, se cultivaron células HeLap53^{R248Q} (5×10^6 cels/mL) en cajas de Petri de (150 X 20 mm) con 15 mL de medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s médium”). Una vez que las células alcanzaron el 90% de confluencia (fase exponencial a las 72 h), se lavaron con buffer Ringer krebs (RK) pH 7.4 (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM, KH_2PO_4 1 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM). La separación química se realizó con 3 mL de tripsina/EDTA 0.25% por 2 - 3 minutos. Las células se lavaron y se centrifugaron a 2500 rpm por 3 minutos, el botón celular se resuspendió en 1 mL de RK pH 7.4. La proteína celular se cuantificó por el método de biuret (apéndice 3) [35]. Las suspensiones celulares obtenidas se usaron inmediatamente para las mediciones experimentales.

Fosforilación oxidativa

La FO se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark registrando del consumo de oxígeno total y el sensible a oligomicina a una temperatura fisiológica de 37°C. En un volumen final de 1.9 mL de RK se añadieron 4 mg de proteína celular/mL en presencia de 5 mM de glucosa exógena; se registró el estado estacionario de respiración celular total; posteriormente se añadió 4 μM de oligomicina para revelar el consumo de oxígeno utilizado para la síntesis de ATP. El cero químico de oxígeno se registró con ditionita (apéndice 4).

Los cálculos para determinar la velocidad de consumo de oxígeno se realizaron considerando que la Ciudad de México se encuentra a una altura de 2240 metros sobre el nivel del mar. A 37°C y bajo estas condiciones, el oxígeno disuelto en un

mL de medio RK se ha calculado de 380 nanogramo átomos de oxígeno (ngAtO) [36]

Glucólisis

En dos viales de plástico se colocaron 8 mg/mL de proteína celular en un volumen final de 2 mL de RK, pH 7.4. Las células se incubaron y se mantuvieron en agitación constante en un baño de agitación a 150 rpm y 37°C. Después de 10 minutos, al vial 1 se adicionó 5 mM de glucosa exógena y al vial 2, 5 mM de glucosa + el inhibidor de glucólisis 2-desoxiglucosa (2DOG) a una concentración final de 10 mM. Esta corrección se realizó porque las células tumorales producen lactato por la oxidación de glutamina mitocondrial. Al minuto 15, 20 y 25 se detuvo la reacción con 10% de ácido perclórico frío. Las muestras ácidas se neutralizaron con una solución 3 M KOH y 0.1 M Tris y se congelaron a -70°C hasta su uso.

La glucólisis se determinó cuantificando el lactato-piruvato formado después de la incubación con glucosa exógena. La detección de lactato - piruvato se realizó espectrofotométricamente a 340 nm con un espectrofotómetro de diodos. El lactato-piruvato formado se acopló a la generación de NAD⁺ en una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (apéndice 4). La velocidad de la glucólisis se calculó por la diferencia de absorbancia inicial y final, el coeficiente de extinción molar del NADH que corresponde a 6.22 mM⁻¹ y el tiempo de reacción [37]

Preparación de extractos para WB

Para la extracción de proteína total celular, las células HeLa en fase exponencial (90% confluencia), se lavaron y se centrifugaron a 2500 rpm por 3 minutos. El botón celular se resuspendió en 300 µL de buffer de lisis RIPA (PBS 1x, 1% IGEPAL NP40, SDS 25% y desoxicolato de sodio 0.05%) y 5 µL de inhibidor de proteasas. Los lisados celulares se centrifugaron a 10000 rpm x 30min a 4°C, se

desechó el botón y el sobrenadante obtenido (~300 - 400 μ l) se guardó a -20°C hasta su uso.

Inmunodetección de las proteínas por WB

Las células de HeLa (60 μ g de proteína celular total) se mezclaron con 5 μ L de buffer de carga 3x SDS (Tris 1.8 mM, SDS 2 mM, 2-metamerceptoetanol 3 mM, etanol 98%, azul de bromofenol 0.02 mM, β -mercaptoetanol 5%) y se hirvió durante 5 minutos. Posteriormente el lisado celular se aplicó a geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno y se aplicó una carga de transferencia de 300 mA (15 volts) por 15-30 min. Posteriormente, la membrana se incubó con 5% de leche libre de grasa y 0.1% de TWEEN-20 en TBS 1x (Tris-Base 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7.6) durante una hora. Las membranas se incubaron durante toda la noche en refrigeración con los siguientes anticuerpos policlonales de humano y a las siguientes diluciones: P-p53 y TIGAR (1:100); p53, PUMA, NOXA, HIF-1 α , TIGAR, GLUT-3, HKI, HKII, PFK1, LDH-A, α -KGD, GA, NDI, COX IV (1:1000) y actina 1:1000, (Santa Cruz, CA, USA).

Posteriormente, las membranas se lavaron 4 veces durante 10 minutos con TBS 1x/TWEEN-20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes por una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Se lavaron 4 veces durante 10 minutos con TBS 1x/Tween-20, se añadieron 500 μ L de la solución de quimioluminiscencia (Amersham ECL Plus, GE Health carey); se revelaron en un cuarto oscuro utilizando papel fotográfico Carestream, Kodak, BioMax Ligh Film, Sigma Aldrich. Las bandas obtenidas se analizaron densitométricamente utilizando el programa Scion Image para Windows, Beta 4.0.3 (Bethesda, MD). Se realizó una doble normalización contra actina y contra HeLa^{WT}.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de la mutación R248Q sobre los blancos canónicos de p53

Las células HeLa con p53 no mutado es decir, HeLap53^{WT} tiene varios blancos canónicos como son PUMA, NOXA y TIGAR cuya expresión aumenta de 1.5–3 veces cuando p53^{WT} se sobre-expresa [38] (Fig. 3).

Para demostrar si la mutación R248Q en p53 modifica estas proteínas blanco, se determinó su contenido por WB y se comparó con las células HeLap53^{R248Q}. En HeLap53^{R248Q} las proteínas PUMA, NOXA y TIGAR disminuyeron significativamente (46-80%), mientras que la forma total (p53) y activa o fosforilada (p53-P) de p53 aumentó importantemente de 1-1.5 veces vs. HeLap53^{WT} (Fig.3). Estos datos sugieren que la mutación R248Q en p53 pierde su capacidad de inducir sus propios blancos canónicos.

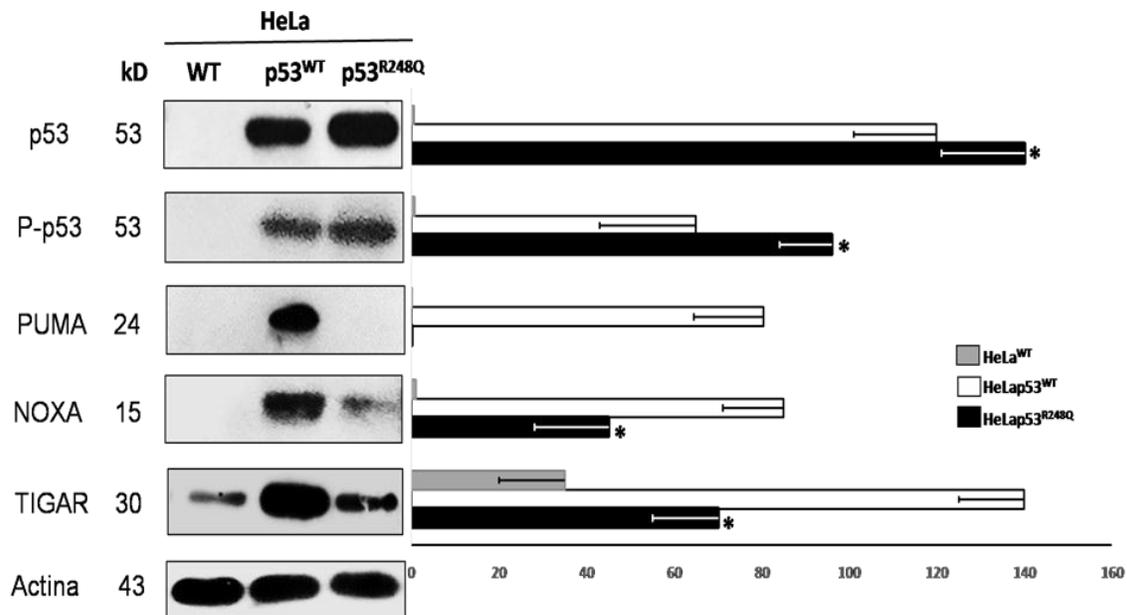


Figura 3. Western blot y Análisis densitométrico de los blancos canónicos de p53 en HeLa^{WT}, HeLap53^{WT} y HeLap53^{R248Q}. Se muestra el promedio de los resultados \pm desviación estándar de al menos 3 muestras independientes * $p \leq 0.05$

4.2 Efecto de la mutación R248Q sobre la proliferación celular

Para evaluar el efecto de la mutación R248Q sobre la proliferación celular, se llevó a cabo una curva de crecimiento comparando HeLap53^{R248Q} vs. HeLa^{WT} y HeLap53^{WT} durante 120 h a 37°C.

Durante los 5 días que transcurrió la curva de cultivo, las células HeLap53^{R248Q} mostraron un lento crecimiento con una densidad generacional menor comparada con HeLa^{WT} y HeLap53^{WT} (2.5 vs. 3.6 y 3.5 generaciones totales, respectivamente). Sin embargo, notamos que sólo en el sobrenadante del cultivo de las células HeLap53^{R248Q} hubo un mayor número de células vivas (>99%) indicando que posiblemente, la mutación disminuye la adherencia al sustrato sin promover muerte celular (Fig.4). Al determinar el crecimiento de células HeLap53^{R248Q} adheridas + células vivas en suspensión, se obtuvo un tiempo de duplicación de 16 h y 4.5 generaciones totales a las 120 h. Los datos indican que la mutación R248Q ¿causa una disminución en el tiempo de duplicación y la capacidad de crecer en suspensión?, lo que no se observa en las otras líneas celulares.

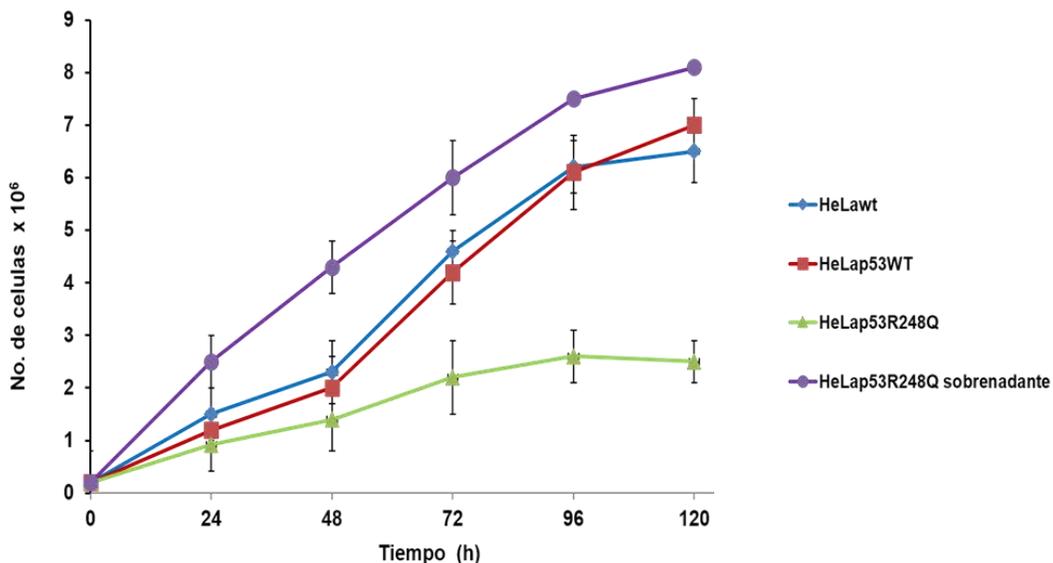


Figura 4. Curva de crecimiento de células HeLa^{WT}, HeLap53^{WT} y HeLap53^{R248Q}. Los puntos muestran el promedio \pm desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes.

4.3 Efecto de la mutación R248Q sobre proteínas de adhesión

Para entender el mecanismo por el cual la proliferación celular más lenta en células adheridas en comparación con las células HeLap53^{WT}, se evaluó el contenido de proteínas de adhesión y anclaje celular E-caderina, β -catenina, vimentina y del factor de transcripción Snail involucrado en la regulación negativa de algunas proteínas de adherencia como la vimentina [39]. Los resultados mostraron una disminución significativa (50-70%) en todas las proteínas de adhesión analizadas, excepto Snail en HeLap53^{R248Q} vs. HeLap53^{WT} (Fig.5). Por el contrario, la proteína Snail aumentó 2 veces vs. HeLap53^{WT}. Nuestros datos indican que (1) la disminución de las proteínas de adhesión y (2) el aumento de Snail pueden estar asociados con la adquisición de un fenotipo metastásico y maligno tal como se ha demostrado para células de cáncer de ovario (HGS-OvCa).

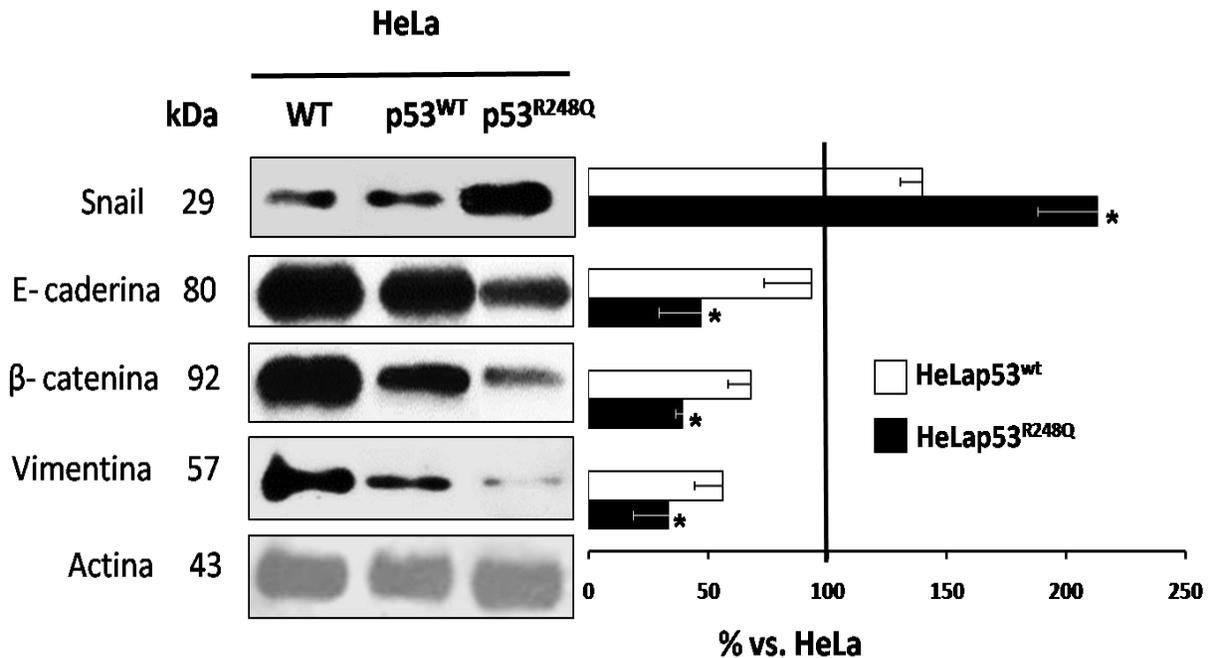


Figura 5. Western blot y Análisis densitométrico de proteínas de adhesión y de Snail. Las muestras se normalizaron contra actina y contra HeLa^{WT}. Se muestra el promedio \pm desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. * $p \geq 0.005$

4.4 Efecto de la mutación R248Q sobre las proteínas de glucólisis y de la FO

La mutación R248Q aumentó (1.5 - 3.5 veces) el contenido de las proteínas glucolíticas GLUT1, GLUT3, HKI y HKII, así como un factor transcripcional que modula positivamente a la vía, HIF-1 α (Fig. 6). La sobre-expresión de GLUT1 y HKII asociada con el aumento de HIF-1 α correlaciona con lo reportado en la literatura en células tumorales de HeLa [37]. En paralelo al aumento de las proteínas glucolíticas, se encontró una disminución significativa (80%) del modulador negativo de la glucólisis TIGAR.

Con respecto a la FO, la mutación R248Q disminuyó (40-80%) las proteínas de la cadena respiratoria NADH deshidrogenasa (NDI), citocromo c oxidasa (COXIV), del ciclo de Krebs (2OGDH, GA) y del sistema fosforilante (ATPasa) vs. HeLap53^{WT} (Fig. 6). Lo anterior indica que p53 mutado podría estar disminuyendo la función mitocondrial.

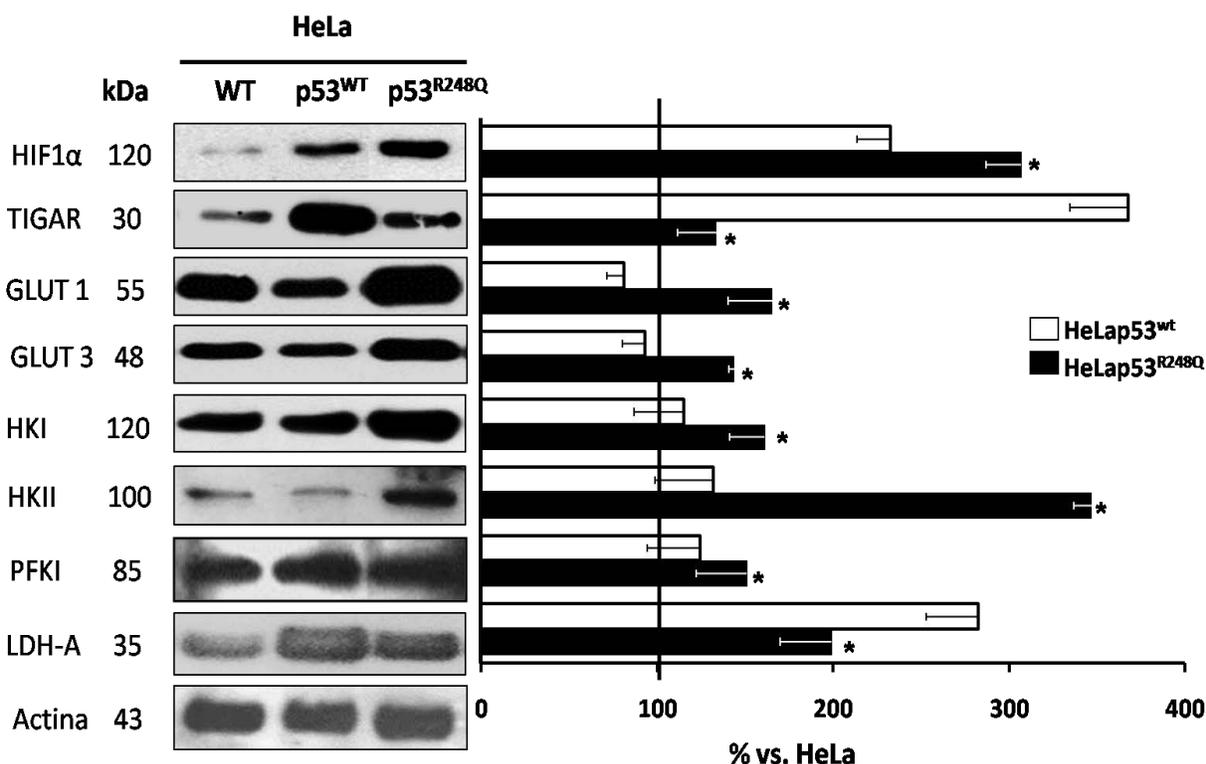


Figura 6. Western blot y Análisis densitométrico de factores de transcripción asociados con glucólisis y de proteínas glucolíticas. Las muestras se normalizaron contra actina y contra HeLa^{WT}. Se muestra el promedio \pm desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. *p \geq 0.005

4.5 Efecto de la mutación R248Q de p53 sobre los flujos de FO y glucólisis en HeLa

Pocos estudios han demostrado la correlación de p53 mutado y la dependencia de la glucólisis. Nuestros datos indican que el aumento en el contenido de factores transcripcionales que modulan positivamente a la glucólisis como HIF-1 α y el contenido de proteínas glucolíticas controladoras del flujo como GLUT1 y HKII podría correlacionar con un aumento substancial del flujo glucolítico. Sin embargo, hemos documentado que no siempre se establece dicha correlación [29], por lo cual es indispensable medir la actividad de las mismas o en su defecto, medir el flujo de la vía. Es indispensable indicar que la mayoría de los estudios [40] solo muestran el contenido de lactato total como indicativo de glucólisis. Sin embargo esto es incorrecto ya que el lactato puede provenir de otras fuentes como del catabolismo de algunos aminoácidos, principalmente glutamina (Tabla 1), por lo tanto para descartar la participación de la glutaminólisis, los experimentos se realizaron en presencia de 2DOG, un inhibidor de la hexosa fosfato isomerasa y en consecuencia se detiene la producción de lactato inducido por glucosa exógena. Por lo tanto, a la producción de lactato total se le resta aquella producción de lactato en presencia del inhibidor 2DOG (considerado como lactato proveniente de la glutaminólisis). Con este análisis, se encontró que la producción de lactato total fue muy similar al de HeLap53^{WT} y al menos 2 veces mayor que el de HeLa^{WT}. Interesantemente, la glucólisis (lactato total menos lactato proveniente de la glutaminólisis y la degradación de glucógeno) de las células con la mutación R248Q fue el doble que el de las células HeLap53^{WT} y HeLa^{WT}. En términos de glutaminólisis, la mutación R248Q disminuyó significativamente la producción de lactato por la oxidación de glutamina indicando una menor funcionalidad mitocondrial.

Contrario a lo observado con la glucólisis, la mutación R248Q de p53 en HeLa disminuyó 60% el consumo total de oxígeno que representa el consumo de oxígeno mitocondrial y no mitocondrial así como 70% la FO (oxígeno utilizado para la síntesis de ATP) vs. HeLap53^{WT} (Tabla 1). Así mismo, la capacidad

máxima de la cadena transportadora de electrones (respiración celular en presencia de cianuro) fue menor 63% vs. HeLap53^{WT}. La disminución en el contenido de proteínas mitocondriales también correlacionó con una disminución de la actividad mitocondrial sugiriendo que la mutación está involucrada en una regulación negativa de la vía.

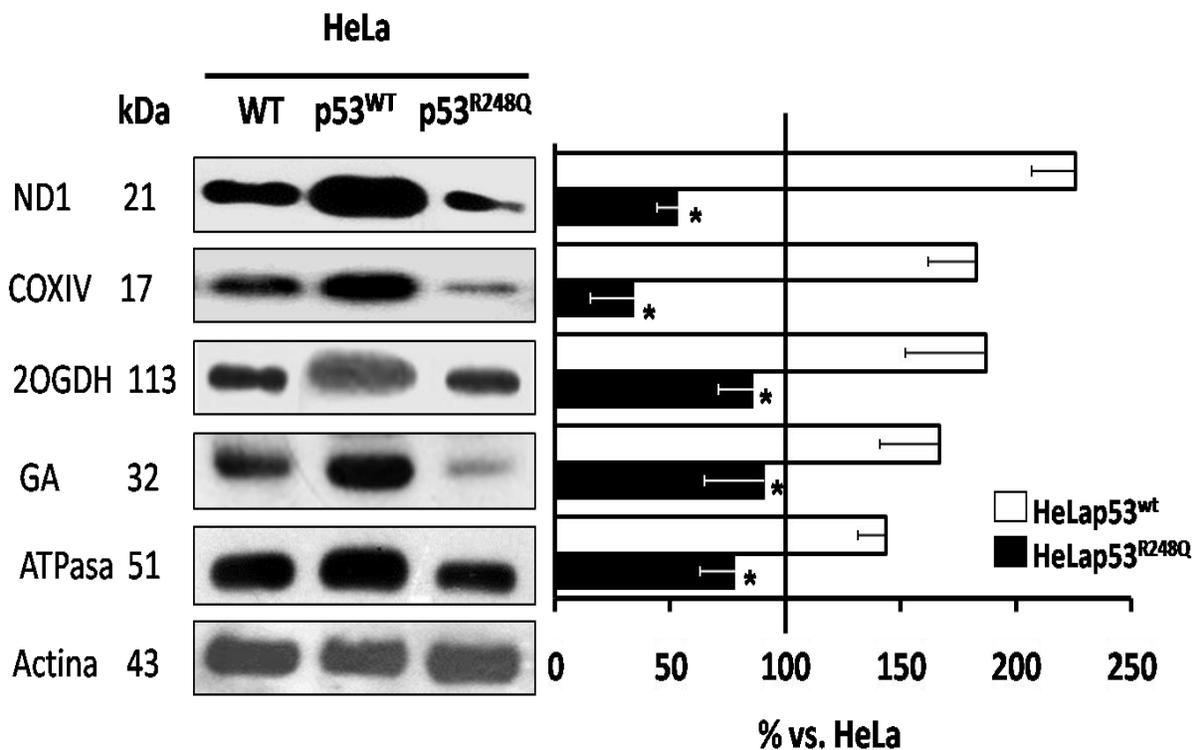


Figura 7. Western blot y Análisis densitométrico de proteínas de la FO. Las muestras se normalizaron contra actina y contra HeLa^{WT}. Se muestra el promedio ± desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. *p ≥ 0.005

Tabla 1. Flujos de FO y glucólisis en células HeLa. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes

	HeLaWT	HeLap53^{WT}	HeLap53^{R248Q}
Consumo O₂ total (ngAtO/min/mg de prot)	16 \pm 1.5	22 \pm 3	9 \pm 2*
Fosforilación Oxidativa (ngAtO/min/mg de prot)	10 \pm 3	16 \pm 2	5 \pm 2*
Lactato total (nmol de Lactato/min/mg de proteína)	17 \pm 6	34 \pm 9	35 \pm 1
Glucólisis (nmol de Lactato/min/mg de proteína)	16 \pm 2	17 \pm 3	34 \pm 4*
Glutaminólisis (nmol de Lactato/min/mg de proteína)	1 \pm 0.4	17 \pm 8	1 \pm 1*

4.6 Efecto de la mutación R248Q sobre la dependencia a la producción a la producción de ATP de la glucólisis y FO

Las vías de la glucólisis y FO son las que producen energía en cualquier tipo celular para establecer cuál de las dos vías contribuye principalmente al suministro de ATP tumoral, se determinó cuantitativamente el aporte de ATP tumoral se determinó cuantitativamente el aporte de ATP que proviene de cada vía, para la glucólisis se asumió que por cada molécula de lactato formado se sintetiza un ATP y para la FO se asumió que por cada nmol de oxígeno se producen 2.5 moles de ATP. Con este análisis se encontró que la mutación promueve mayor dependencia hacia la vía glucolítica 77%, mientras que la FO aporta el 23%.

Tabla 2. Distribución del aporte de ATP de la vía glucolítica y de FO en células HeLa.

% de aporte de ATP			
	HeLa WT	HeLap53 ^{WT}	HeLap53 ^{R248Q}
Glucólisis	42±4	29±10	77±10
FO	61±8	71±10	23±5

Los valores representan el promedio ± desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes.

5. DISCUSION

Se ha descrito que la presencia de mutaciones en p53 está relacionada con la “ganancia” o adquisición de funciones fisiológicas de células cancerosas, como son el aumento en la velocidad de proliferación, el desarrollo de fenotipos metastásicos, mayor angiogénesis, invasión y quimio-resistencia a diferentes fármacos aniónicos [41]. Sin embargo, el metabolismo también es un blanco de la mutación. Por ejemplo, la mutación R273H y R248Q en el gen p53 está asociado con una mayor actividad glucolítica en tumores de pulmón, en cáncer de mama SK-BR3 y MDA-MB468 [12, 42]

En este trabajo se analizó el efecto de la mutación R248Q de p53 en células de cáncer de cérvix HeLa. En su condición tipo silvestre, p53 regula la expresión de PUMA, NOXA y TIGAR [38]. Sin embargo, esta activación de PUMA, NOXA y TIGAR en HeLa^{p53^{WT}} no se observa en HeLa^{p53^{R248Q}} lo que se ha atribuido a una posible “pérdida de su función” [43]. Por el contrario, la mutación de p53 promueve la adquisición de nuevos blancos moleculares y en consecuencia nuevas funciones fisiológicas. Se ha descrito en la mutación R273H en células tumorales de tiroides, (WHO y FTC-133) y R248Q en células tumorales de mama MDA-MB468, promueven que p53 aumente su capacidad de interacción con otros supresores tumorales como PTEN y pequeñas proteínas GTPasa como RhoA, para ahora regular proteínas que sin mutación no son blanco directo de p53 [44, 45, 46, 47, 48, 39, 49, 50, 51]. En nuestro caso, observamos que la mutación incrementó el contenido (2 veces) de el factor de transcripción Snail, tal como se ha descrito en células de hepatoma Hep3b, Huh7, hepatoblastoma HepG2 y 239T [52, 53]. Snail es una proteína asociada a la activación de la invasión celular, transición epitelio mesenquima (EMT) y a la inducción metastásica [54]. Los niveles de Snail en HeLa^{WT} y HeLa^{p53^{WT}} son similares, en comparación a HeLa^{p53^{R248Q}} lo que podría indicar que regula positivamente a Snail.

A nivel de proliferación celular, la mutación disminuyó el número de generaciones y la velocidad neta de duplicación celular en las células adheridas

de HeLa $p53^{R248Q}$. Este fenómeno correlacionó con una disminución significativa de proteínas de adhesión (E-caderina, β -catenina y vimentina). En este sentido, se ha documentado en células de adenocarcinoma de endometrio HEC-50, células escamosas A431 y células tumorales de colon HT29 con p53 mutado en R273H presentan un cambio importante en la morfología celular asociado a la pérdida de expresión de E-caderina y aumento en la capacidad de invasión celular, e inducción metastásica [55, 56, 19]. También en células de cáncer de endometrio, la mutación de p53 en R248Q promovió transición epitelio mesénquima ligado a una sobreexpresión del factor de activación proteosomal, $REG\gamma$ el cual disminuye la expresión de E-caderina, e incrementa vimentina y Snail en la metástasis [57], y aumento en invasividad [39].

5.1 La mutación de p53 en R248Q bloquea la función mitocondrial

A nivel de metabolismo energético, no existen reportes del efecto de la mutación de p53 en R248Q. Sin embargo, se ha descrito que aquellos tumores que sobre-expresan p53 sin mutaciones aparentes como son MCF-7, linfomas y algunos sarcomas mantienen una tasa de respiración celular total mayor que los que no sobre-expresan p53, lo que se ve reflejado en una mayor dependencia del suministro de ATP mitocondrial [39]. Estos resultados correlacionaron con datos de nuestro grupo donde la sobre expresión de p53 en el modelo de HeLa WT aumentó el contenido de proteínas mitocondriales 2-4 veces (ND1, COXIV, 2OGDH, PDH, ANT, ATPasa), aumentó el potencial transmembranal mitocondrial 40% y el flujo de FO 60% comparado con HeLa WT [30]. Además, p53 WT no mutado aumenta el transcrito de proteínas mitocondriales como SCO2, COXIV, 2-OGDH y la GA a través de la unión de p53 con sus elementos de respuesta [39]. Nosotros encontramos que la mutación de p53 R248Q inhibió la respiración celular total y la fosforilación oxidativa bajando los niveles de las proteínas mitocondriales de NDI, COXIV, 2OGDH, GA, ATPasa de manera contraria a lo observado con los hallazgos encontrados en células p53 WT

5.2 La mutación de p53 en R248Q favorece el efecto Warburg

La mutación de p53 favoreció la glucólisis a diferentes niveles, promovió un aumento substancial 3.5 veces de HIF-1 α y de sus genes glucolíticos blanco GLUT1, GLUT3, HKI y HKII. Incrementó el flujo glucolítico 50% y en consecuencia las células dependieron mayoritariamente de la glucólisis para la obtención de ATP (77%). Por lo tanto, nosotros proponemos que la mutación favorece el efecto Warburg, una característica necesaria para la transformación celular [42]. Al respecto, se ha demostrado que la presencia de varias mutaciones de p53 en diferentes sitios (R175H, R248Q y R273H) estimula la captación de glucosa y la producción de lactato en células tumorales de pulmón H1299 a través de la estimulación de la translocación de GLUT1 a la membrana plasmática comparado con las células H1299 con p53 no mutado [57].

Nuestros datos sugieren que la mutación de p53 en la arg 248 no solo evita su papel como supresor tumoral, si no que promueve una ganancia de función aumentando el metabolismo glucolítico, provocando una transformación metabólica, que juega papel crucial en el mantenimiento del estado tumorigénico [58, 59].

Las células cancerosas utilizan la glucólisis, adoptando un programa metabólico que favorece la rápida producción de energía eficiente y conduce a una alta tasa de absorción de glucosa, esto se observa en la mayoría de los tumores malignos [60, 61, 62], esto correlaciona con lo encontrado en este proyecto.

En un futuro se planea investigar la sensibilidad de las células con p53 mutado a inhibidores de la glucólisis y de la FO. Nuestra predicción es que la mutación incrementará su sensibilidad a los inhibidores glucolíticos en mayor proporción que a los inhibidores mitocondriales. Estos resultados podrán ayudar en estrategias complementarias anti-glucolíticas en contra de tumores que tengan mutaciones, o al menos mutaciones en la arginina 248, y que sean resistentes a la terapia convencional.

CONCLUSIONES

La mutación de p53^{R248Q} favorece el efecto Warburg es decir, disminuye la función mitocondrial y promueve una mayor dependencia de la glucólisis para la obtención de energía celular.

Bibliografía

1. De Martel, C., Ferlay, J., y Franceschi, S., 2012, Globan burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis, *The Lancet Oncology*, 13:607
2. International Agency for Research on Cancer, 2012, globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, Revisado enero del 2015
3. Hanahan, D., y Weinberg, RA., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144:646
4. Berkers, C., Maddocks, O., Cheung, E., Mor, I., y Vousden, K., 2013, Metabolic regulation by p53 family members, *Cell Metab*, 19:617
5. Riley, T., Sontag, E., Chen, P., y Levine, A., 2008, Transcriptional control of human p53 regulated genes, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:402
6. Sullivan, K., Gallant-Behm, C., Henry, R., Fraikin, J., y Espinosa, J., 2012, The p53 circuit board, *Biochim Biophys Acta*, 1825:229
7. Carvajal, L., y Manfredi, J., 2013, Another fork in the road — life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* 14:414
8. Ishimauro, D., Maia, L., Maiolino, L., Quesado, P., Lopez, P., Almeida, F., Valente, A., y Silva, J., 2003, Conversion of wild-type p53 core domain into a conformation that mimics a hot-spot mutant, *J Mol Biol.*, 333:449
9. Zhang, C, Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, AJ., Hu, W., y Feng, Z., 2011, Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 108:16259
10. Suad, O., Rozenberg, H., Brosh, R., Diskin-Posner, Y., Kessler, N., Shimon, L., Frolov, F., Liran, A., Rotter, V., y Shakked, Z., 2009, Structural basis of restoring sequence - specific DNA binding and trasactivation to mutant p53 by suppressor mutations, *J Mol Biol.*, 385:249
11. Madan, E., Gogna, R., Bhatt, M., Pati, U., Kuppusamy, P., y Mahdi, A., 2011, Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor, *Oncotarget*, 2: 948

12. Lang, G., Iwakuma, T., Suh, YA., Liu, G., Rao, V., Parant, J., Valentin-Vega, Y., Caldwell, L., Strong, L., El-Naggar, A., y Lozano, G., 2004, Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome, *Cell*, 119:861
13. Liu, D., Song, H., y Xu, Y., 2010, A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability, *Oncogene*, 29:949
14. Oliva, K., Tuveson, D., Ruhe, Z., Yin, B., Bronson, R., Crowley, D., y Jacks, T., 2004, Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome, *Cell*, 119:847
15. Martynova, E., Pozzi, S., Basile, V., Zambelli, F., Imbriano, C., Pavesi, G., y Mantovani, R., 2012, Gain of function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p53, *Oncotarget*, 3:132
16. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P., y Pavletich, N., 1994, Crystal structure of a p53 tumor suppressor- DNA complex: understanding tumorigenic mutations, *Science*, 265:346
17. Sigal, A., y Rotter, V., 2000, Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome, *Cancer Res*, 60:6788
18. Dong, P., Karaayvaz, M., Jia, N., Kaneuchi, M., Hamada, J., Watari, H., Sudo, S., Ju, J., y Sakuragi, N., 2013, Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis., *Oncogene*, 4:3286
19. Hanel, W., Marchenko, N., Xu, S., Yu, S., Weng, W., y Moli, U., 2013, Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis, *Cell Death Differ*, 20:898
20. Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., y Karnieli, E., 2004, The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression, *Cancer Res*, 64:2627
21. Girardini, J., Napoli, M., Piazza, S., Rustighi, A., Radaelli, E., Capaci, V., Jordan, L., Quinlan, P., Thompson, A., Mano, M., Rosato, A., Crook, T., Scanziani, E., Means, A., Lozano, G., Schneide, C., y De Sal, G., 2011, A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer, *Cancer Cell*. 20:79

22. Kondoh, H., Leonart, M., Gil, J., Degan, P., Peters, G., Martinez, D., Carnero, A., y Beach, D., 2005, Glycolytic enzymes can modulate cellular lifespan, *Cancer Res*, 65:177
23. Bensad, K., Tsuruta, A., Selak, M., Vidal, M., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., y Vousden, K., 2006, TIGAR a p53 inducible regulator of glycolysis and apoptosis, *Cell*, 126:107
24. Merabet, A., Houilleberghs, H., Maclagan, K., Akanho, E., Bui TT., Pagano, B., Drake, A., Fraternali, F., y Nikolo, P., 2010, Mutants of the tumor suppressor p53 L1 loop as second-site suppressors for restoring DNA binding to oncogenic p53 mutations: structural and biochemical insights, *Biochem J.*, 427:225
25. Frank E. y Klaus S., 2012, Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy, *Br. J. Pharmacol*, 165:328
26. Contractor, T., y Harris, C., 2012, p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res.* 72:560
27. Perez- Gomez, Mates, M., Gomez, P., del Castillo, A., Alonso, F., y Márquez, J., 2003, Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene, *Biochem J.*, 15:771
28. Campo- Sandoval, J., Lopez, A., Lobo, C., Segura, J., Mates, J., Alonso, F., y Márquez, J., 2007, Expression of functional human glutaminasa in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization, *Int J Biochem Cell Biol*, 39:765
29. Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Gallardo, J., Rumjanek, F., y Rodríguez-Enríquez, S., 2016, Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses, *FEBS J.*, 283:54
30. Hernández-Reséndiz, Román, R., Garcia, V., López, M., Pineda, E., Saavedra, E., Gallardo, P., Alvarez, P., Gariglio, P., Moreno-Sánchez., y Rodríguez-Enríquez, 2015, Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells, *Biochim Biophys Acta*, 1853:3266
31. Freed-Pastor, y Prives, C., 2012, Mutant p53: one name, many proteins, *Genes Dev.*, 26:1268

32. Zhang, C., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Zhao, Y., Hong, X., Lin, M., Yu, H., Liu, L., Levine, A., Hu, W., y Feng, Z., 2014, Tumor-Associated Mutant p53 Drives the Warburg Effect, *Nat. Commun*, 4:2935
33. Ortega, M., y Serrano, 2013, PTEN in cancer, metabolism, and aging, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24:185
34. Morani, E., Phadngam, S., Follo, C., Tinone, R., Thongrakard, V., Galetto, A., Alabismo, O., y Isidoro, C., 2014, PTEN deficiency and mutant p53 confer glucose-addiction to thyroid cancer cells: impact of glucose depletion on cell proliferation, cell survival, autophagy and cell migration, *Genes and Cancer*, 5:226
35. Gornall, A., Bardawill, C., y David M., 1949, Determination of serum proteins by means of biuret reaction, *J. BiolChem*, 177:751
36. Rodríguez-Enríquez, S., Torres, M., y Moreno-Sánchez, R., 2010, Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells, *Arch Biochem Biophys*, 375:21
37. Marín – Hernández, A., Rodríguez – Enríquez, S., Vital – González, P., y Sanchez, 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 JI*, 273
38. Prabhu, V., Allen, J., Bo, H., Shengliang, Z., Hairong, C., y Wafik, S., 2012, Therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer stem cells, *Expert Opin Ther Targets*, 16:1161
39. Liu, J., Zhang, C., Wenwei, H., y Zhaohui, F., 2015, Tumor suppressor p53 its mutants in cancer metabolism, *Cancer Lett*, 356:197
40. Zheng, J., 2012, Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review), *Oncol Lett*, 4:1151
41. Brosh, R. y Rotter, V., 2009, When mutants gain new powers, news from the mutant p53 field, *Nat. Rev. Cancer*, 9:701
42. Olive, K., Tuveson, D., Ruhe, Z., Willis, N., Bronson, R., Crowley, D., y Jacks, T., 2004, Mutant p53 again of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome, *Cell*, 119:847

43. Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Taytigian, S., Hainaut, P., y Oliver, M., 2007, Impact of mutant p53 functional properties on Tp53 mutation patterns and tumor phenotype, lessons from recent developments in the IARC TP53 database, *Hum. Mutat*, 28:622
44. Bargonetti, J., Chicas, A., White, D., y Prives, C., 1997, p53 represses Sp1 DNA binding and HIV-LTR directed transcription, *Cell Mol Biol*, 43:935
45. Chicas, A., Molina, P, y Bargonetti J., 2000, Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA, *Biochem Biophys Res Commun*, 279:383
46. Sampath, J., 2001, Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1, *J. Biol Chem*, 276:39959
47. Lozano, G., 2007, The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models. *Curr Opin Gen Dev*, 17:66
48. Strano, S., Dell'Orso, s., Mongiovi, A., Monti, O., Lapi, E., Di Agostino, S., Fontemaggi, G., y Blandino, G., 2007, Mutant p53 proteins: between loss and gain of function, *Head Neck*, 29:448
49. Oren, M., y Rotter, V., 2010, Mutant p53 gain of function in cancer. *Cold Spring Harb, Perspect Biol*, 2:a001107
50. Stambolsky, P, Tabach, Y., Fontemaggi, G., Weisz, L., Maor-Aloni, R., Siegfried, Z., Shiff, I., Kogan, I., Shay, M., y Kalo, E., 2010, Modulation of the vitamin D3 response by cancer associated mutant p53, *Cancer Cell*, 17:273
51. Goh, A., Coffill, C., y Lane, D., 2011, The role of mutant p53 in human cancer, *J., Pathol*, 223:116
52. Anthony, P., 2001, Hepatocellular carcinoma: an overview, *Histopathology*, 39:109
53. Spangenberg, H., Thimme, R., y Blum, H., 2009, Targeted therapy for hepatocellular carcinoma, *Nat Rev, Gastroenterol Hepatol*, 6:423
54. Lim, S., Kim, H., y Jung, G., 2010, p53 inhibits tumor cell invasión via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma, *FEBS Lett*, 584:2231
55. Creasman, W., Odicino, F., Maisonneuve, P., Quinn, U., Beller, J., y Benedet, J., 2006, Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of treatment in gynecological cancer, *Int J Gynaecol, Obstet*, 95:105

56. Wang, H., Bao, W., Jiang, F., Che, Q., Chen, Z., Wang, F., Tong, H., Dai, C., He, X., Liao, Y., Liu, B., Sun, J., y Wan. X., 2015, Mutant p53 (P53-R248Q) functions as an oncogene in promoting endometrial cancer by up-regulating REG γ , *Cancer Letters* 360 (2015) 269–279
57. Madan, E., Gogna, R., Bhatt, M., Pati, U., Kuppusamy, P., y Mahdi, A., 2011, Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor, *Oncotarget*, 2: 948
58. Vousden, K., y Ryan, K., 2009, p53 and metabolism, *Nature Reviews*, 9:691
59. Zhivotovsky, B., y Orrenius, S., 2009, The Warburg Effect returns to the cáncer stage, *Semin Cancer Biol*, 19:1
60. Kroemer, G., y Pouyssegur, J., 2008, Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel, *Cáncer Cell*, 13:472
61. Hsu, P., y Sabatini, D., 2008, Cancer cell metabolims: Warburg and beyond, *Cell*, 5:703
62. De Berardinis, R., Sayed, N., Ditsworth, D., y Thompson, C., 2008, Brick by brick: metabolism and tumor cell growth, *Curr Opin Genet, Dev*, 18:54

Apéndices

Apéndice 1

Medio “Dulbecco´s modified Eagle´s” (DMEM)

Glucosa 4.5 g/L, rojo de fenol 15 mg/L, Hepes 6 g/L, glutamina 0.6 g/L, NaHCO₃ 3.7 g/L, piruvato 110 mg/L.

Apéndice 2

Método de exclusión por azul tripano

Se sembraron 5×10^5 cels/mL en cajas de Petri de 60 x 15 mm y se contabilizaron cada 24 h en un lapso total de 144 h. Para la cuantificación de la viabilidad por la incorporación de azul de tripano, se obtuvieron las células de la caja, se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 minutos y el botón se resuspendió en 1 mL de medio DMEM enriquecido con 25 mM de glucosa. Para la cuantificación de la densidad celular y viabilidad se tomaron 10 µl para una dilución 1:10 en medio Ringer- Krebs y se añadió 0.1% de azul tripano. Se utilizó la cámara de Neubauer para cuantificar las células viables en el microscopio de luz.

Apéndice 3

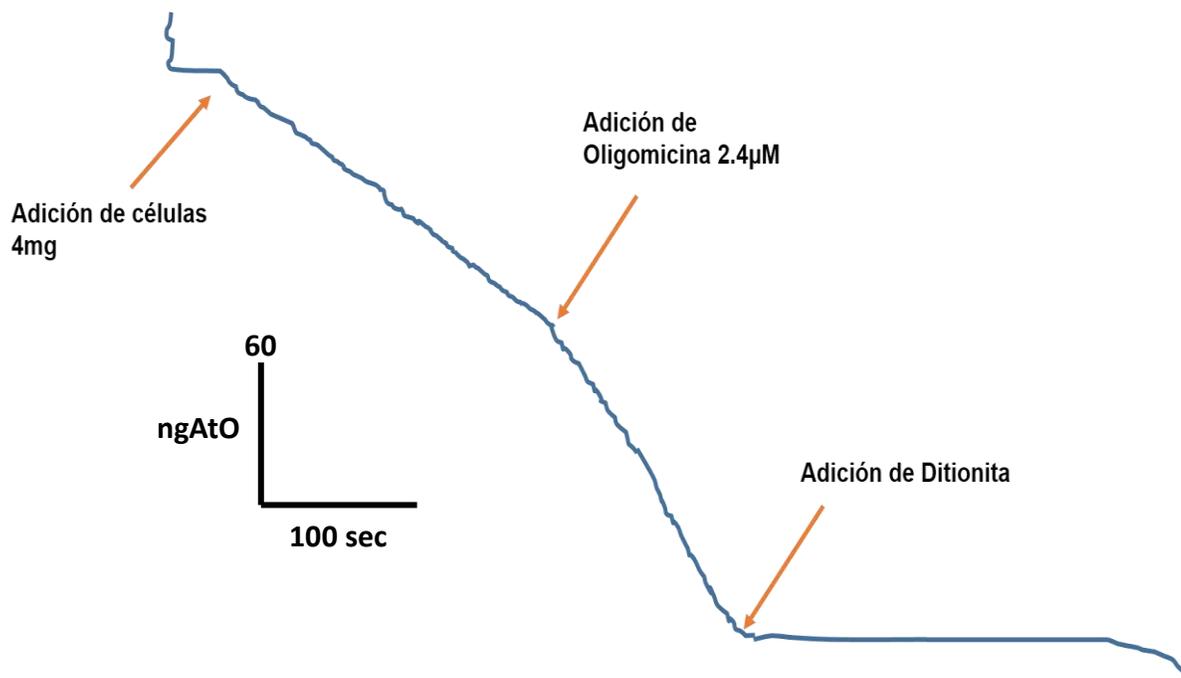
Cuantificación de proteína mediante el método de Biuret

A partir de extractos totales celulares, se tomaron 20-50 µl de muestra y se añadieron 2 ml de reactivo de Biuret, posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro. La concentración total en la

muestra (mg/ml) se determinó a partir de albúmina con concentración conocida mediante el cálculo de regresión lineal.

Apéndice 4

Ensayo de respiración celular en células de HeLa^{WT}



El ensayo se realizó como se indica en la sección de Material y Métodos

