



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Reactivación de las vías antiproliferativa y proapoptótica de p53 por
el compuesto Resveratrol en células con un fenotipo p53 mutante”**

TESIS

Que presenta

IBT. Andrea Acosta Dent

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO, 2016.

ASESORES

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Investigador Cinvestav 3E

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Zacatenco

vidal@cinvestav.mx

Dr. Jaime García Mena

Investigador Cinvestav 3C

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Zacatenco

jgmena@cinvestav.mx

La presente tesis fue desarrollada y realizada gracias al apoyo del

Programa Nacional de Becas de Posgrado

Del

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

No. de registro: 625149

Dedicada a

Lo más importante en mi vida, mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero y al Dr. Patricio Gariglio Vidal por haberme dado la oportunidad de trabajar en el proyecto de mi interés, por todo el tiempo, apoyo, consejos y la confianza brindada para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Jaime García Mena por su apoyo, asesoría, consejos y su valioso tiempo invertido en evaluaciones y en la revisión de la presente tesis.

A Enrique García Villa por ser mi más grande maestro dentro del laboratorio, por su apoyo, asesoría, paciencia, consejos, por procurar que tuviera todo el material y reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto. Por hacer del laboratorio 25 un lugar de trabajo pero también de risas. Gracias por guiarme tanto en lo teórico como en lo práctico para el desarrollo del trabajo.

A Rodolfo Ocadiz Delgado (Wilox), Lauro Macías González, Elizabeth Álvarez Ríos por su apoyo incondicional tanto en cosas de material como administrativas.

A mis compañeros del Laboratorio 25: Arturo, gracias por ser mi primer amigo y también maestro, por tus consejos, chismes, etc. A María Auxiliadora por ser mi eterna acompañante de experimentos, apoyarme, por las risas y por tu amistad incondicional. A Jenny, Maestra Laura, Toño y Rubiceli por ser parte importante de lo que me llevo de aprendizaje y también personalmente.

A mis padres, Marco y Roxana, por darme la vida, enseñarme de ella y dejarme volar. Por apoyarme en todo lo que he deseado y confiar en mí. Por enseñarme de responsabilidad y disciplina pero también a disfrutar y ser feliz. Por nunca soltar mi mano y estar siempre en cada sueño realizado. A mis hermanos, mis más fieles compañeros de vida y los mejores amigos que puedo tener. A mi familia que se extiende en mis cuñados y próximo bebé. Los amo

A mis amigos, los de toda la vida, los de hace algunos años y los que acabo de conocer. Cada uno de ustedes ha influido en mí, en mi percepción de la vida. Llevo un pedacito de cada uno de ustedes siempre. Gracias por apoyarme, echarme porras y estar siempre ahí, los quiero.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Índice de Figuras..... | 7 |
| Índice de Tablas..... | 7 |
| Notación..... | 8 |
| Resumen..... | 12 |
| Abstract..... | 13 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 1.1. Cáncer: datos y cifras..... | 14 |
| 1.2. Definición y factores de riesgo del cáncer..... | 15 |
| 1.3. Características moleculares del cáncer..... | 17 |
| 1.4. Proteína p53: función y mutaciones en cáncer..... | 19 |
| 1.5. P53 como un blanco potencial para tratamientos contra el cáncer..... | 24 |
| 1.5.1. Desarrollo de moléculas pequeñas dirigidas contra p53 mutante..... | 25 |
| 1.5.2. Quimioterapéuticos comunes en combinación con compuestos de origen natural contra el cáncer..... | 26 |
| 1.5.2.1 Resveratrol: fitoquímico con propiedades anticancerígenas..... | 28 |
| 2. ANTECEDENTES DIRECTOS..... | 33 |
| 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO..... | 34 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 34 |
| 5. OBJETIVOS..... | 34 |
| 5.1. Objetivo General..... | 34 |
| 5.2. Objetivos Específicos..... | 34 |
| 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 35 |
| 6.1. Líneas celulares..... | 35 |
| 6.2. Cultivo celular..... | 35 |
| 6.3. Ensayos de proliferación celular (MTT)..... | 35 |
| 6.4. Western Blot p53..... | 36 |
| 6.5. Extracción de RNA..... | 36 |
| 6.6. Síntesis de cDNA..... | 37 |
| 6.7. <i>RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)</i> | 37 |
| 7. RESULTADOS..... | 39 |
| 7.1. El Resveratrol ejerce un efecto anti-proliferativo dosis dependiente en líneas celulares de cáncer que presentan distintas mutaciones en el gen TP53..... | 39 |
| 7.2. Efecto del resveratrol sobre los niveles de proteína p53..... | 41 |
| 7.3. El resveratrol produce cambios en la expresión de genes blanco de p53 wt en líneas celulares p53 mt..... | 42 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 44 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 50 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 51 |
| 11. REFERENCIAS..... | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | PÁG. |
|--|-------------|
| Figura 1. Proceso multifásico de la carcinogénesis | 17 |
| Figura 2. Características del cáncer | 18 |
| Figura 3. Dominios funcionales de la proteína p53 | 19 |
| Figura 4. Mecanismos de activación de p53 y regulación transcripcional de sus genes blanco | 20 |
| Figura 5. Distribución de mutaciones somáticas del gen TP53 de acuerdo a la base de datos de mutaciones de TP53 de IARC | 22 |
| Figura 6. Impacto funcional de mutaciones en el gen TP53 | 24 |
| Figura 7. Potenciales estrategias terapéuticas que tienen como blanco a p53 mutante | 26 |
| Figura 8. Metabolismo del resveratrol-3-glucósido (piceido), principal metabolito del resveratrol presente en plantas | 29 |
| Figura 9. Mecanismos involucrados en la actividad anticancerígena del resveratrol. | 30 |
| Figura 10. Disminución de la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer con fenotipo p53 mutante al ser tratadas con resveratrol. | 40 |
| Figura 11. El resveratrol produce cambios en los niveles de proteína p53 total. | 41 |
| Figura 12. El resveratrol aumenta los niveles de expresión (mRNA) de genes blanco de p53wt en líneas celulares con p53mt. | 43 |

ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA | PÁG. |
|--|-------------|
| Tabla 1. Secuencias de oligos utilizados para RT-qPCR | 38 |

NOTACIÓN

| | |
|----------------|--|
| 53BP1 | p53-binding protein 1 (proteína de unión a p53 tipo 1) |
| AP-1 | Activator protein 1 (proteína activadora 1) |
| ASPP | Apoptosis-stimulating protein of p53 (proteína de estimulación de apoptosis de p53) |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 (Célula B de Linfoma 2) |
| CDKIs | Cyclin-dependent kinase inhibitors (inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas) |
| CDKs | Cyclin-dependent kinases (cinasas dependientes de ciclinas) |
| cDNA | DNA complementario |
| ChIP | Chromatin Immunoprecipitation (inmunoprecipitación de cromatina) |
| COX-2 | Cyclo-oxygenase 2 (ciclooxigenasa 2) |
| CYP1 A1 | Cytochrome P450 enzyme A1 (enzima citocromo P450 A1) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate (dietilpirocarbonato) |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco) |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico) |
| dNTPs | Deoxynucleotides (desoxirribonucleótidos trifosfato) |
| DOX | Doxorubicin (Doxorrubicina) |
| DP | Dimerization partner (socio de dimerización) |
| DS | Desviación estándar |
| DUSP1 | Dual specificity protein phosphatase 1 (proteína fosfatasa dual específica 1) |
| E2F | E2 Factor (Factor transcripcional E2) |
| EDN | Efecto dominante negativo |
| EGF-R | Epidermal growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento epidermal) |

| | |
|----------------|---|
| EGR1 | Early growth response protein 1 (proteína de respuesta de crecimiento temprano 1) |
| eIF4E | Elongation initiation factor 4E (factor inicial de elongación 4E) |
| ERKs | Extracellular signal–regulated kinases (quinasas reguladas por señales extracelulares) |
| EST1 | Ever Shorter Telomeres 1 |
| EtOH | Etanol absoluto |
| FN1 | Fibronectina 1 |
| Fw | Forward |
| GADD45B | Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta (Proteína Beta de arresto de crecimiento inducible por daño en DNA) |
| GDF | Ganancia de función |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| HRP | Horseradish peroxidase enzyme (enzima peroxidasa de rábano picante) |
| HSPs | Heat-shock proteins (proteínas de choque térmico) |
| IARC | International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer) |
| IC50 | Half maximal inhibitory concentration (Concentración de inhibición al 50%) |
| IL | Interleucina |
| INF | Interferón |
| JNKs | c-Jun N-terminal kinases (cinasa c-Jun N terminal) |
| LC3 | Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3) |
| lncRNAs | Long non-coding RNAs (RNAs largos no codificantes) |
| MAD1 | Mitotic Arrest Deficient Like 1 (proteína de control del ensamblaje del huso mitótico) |
| MCL1 | Myeloid Cell Leukemia 1 (célula mieloide de Leucemia 1) |

| | |
|--------------------|---|
| MDM2 - | Murine doble minute 2 or 4 |
| MDM4 | |
| MDR1 | Multidrug resistance gene (gen de resistencia a multidrogas 1) |
| mRNA | RNA mensajero |
| MTT | Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| NARS2 | AsparaginyI-TRNA Synthetase 2 (AsparaginyI-TRNA Sintetasa) |
| NER | Nucleotide excision repair (reparación por escisión de nucleótido) |
| NF-kB | Nuclear factor kappa B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) |
| NF-Y | Nuclear factor Y (factor nuclear Y) |
| P53bp2 | p53 binding protein 2 (proteína de unión a p53 2) |
| P53mt | Proteína p53 mutante |
| P53wt | Proteína p53 wild-type (silvestre) |
| PDF | Pérdida de función |
| PGE2 | Prostaglandin E2 (prostaglandina E2) |
| PI3K | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (fosfoinositol 3-cinasa) |
| PIG3 – PIG4 | p53-inducible gene 3 - 4 (gen inducible por p53 3 - 4) |
| pRb | proteína Retinoblastoma |
| PUMA | p53 upregulated modulator of apoptosis (modulador de apoptosis regulado por p53) |
| PVH | Papilomavirus Humano |
| RES | Resveratrol |
| RIPA | Radioimmunoprecipitation assay (ensayo de radioinmunoprecipitación) |
| RNA | Ribonucleic acid (ácido ribonucleico) |
| ROS | Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno) |
| RT-qPCR | Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) |

| | |
|--------------------------------|--|
| Rv | Reverse |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) |
| SUMO-1 | Small ubiquitin-related modifier protein |
| TNF-α | Tumor necrosis factor alpha (Factor de necrosis tumoral alfa) |
| TP53 | Tumor protein p53 (proteína supresora de tumores p53) |
| TP53INP1 - | Tumor protein p53-induced nuclear protein 1 - 2 (proteína nuclear 1 ó |
| TP53INP2 | 2 inducida por p53) |
| UV | Ultravioleta |
| VHB | Virus de la Hepatitis tipo B |
| VHC | Virus de la Hepatitis tipo C |
| VMP1 | Vacuole Membrane Protein 1 |
| Wip-1 | Wild-type p53-induced phosphatase gene |
| β2M | β 2-microglobulina |

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. La tendencia en el desarrollo de esquemas quimioterapéuticos se ha enfocado recientemente en la combinación de productos de origen natural junto con quimioterapia o radioterapia, con el fin de conseguir un tratamiento más efectivo. El Resveratrol se ha propuesto como un posible compuesto anti-cancerígeno por su amplio rango de efectos biológicos que incluyen propiedades anti-proliferativas, anti-angiogénicas, anti-oxidantes, anti-inflamatorias y pro-apoptóticas. Por otro lado, el resveratrol es conocido por su capacidad para inducir tanto la expresión de la proteína p53 como la vía apoptótica de p53; sin embargo, no se ha realizado ningún estudio sobre el efecto de este compuesto sobre las proteínas p53 mutantes, presentes en más del 50% de los cánceres humanos. En este proyecto, se realizaron tratamientos con resveratrol en 6 líneas celulares de cáncer que presentan distintas mutaciones en p53. El Resveratrol produjo un efecto anti-proliferativo dosis dependiente en todas las líneas celulares estudiadas, así como un aumento evidente en los niveles de proteína p53 en cinco de las 6 líneas tratadas, más no su nivel de transcrito, sugiriendo que el resveratrol está más involucrado en la estabilización de la proteína que en la expresión de la misma. Por otro lado, el resveratrol produjo un aumento en la transcripción de genes blanco de p53 (p21, PUMA, GADD45); sin embargo, estos no muestran ser significativamente regulados por p53.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. The trend in the development of chemotherapeutic schemes has recently focused on the combination of naturally occurring compounds with chemotherapy or radiotherapy in order to achieve a more effective treatment. Resveratrol has been proposed as a possible anti-cancer compound for its wide range of biological effects including anti-inflammatory, anti-oxidant, pro-apoptotic, anti-proliferative and anti-angiogenic properties. Furthermore, resveratrol is known for its ability to induce expression of both p53 and the p53 apoptotic pathway; however, there has been no study on the effect of this compound on mutant p53 proteins which are present in over 50% of human cancers. For this project, resveratrol treatments were performed in six cancer cell lines having different type of mutations in p53. Resveratrol produced a dose-dependent anti-proliferative effect on all cell lines tested and an evident increase in p53 protein levels in five of the six lines treated, but not in its transcript level, suggesting that resveratrol may be involved in the stabilization of the protein rather than the expression of the gene. Furthermore, resveratrol produced an increase in the transcription of p53 target genes (p21, PUMA, GADD45); but they seem to be not significantly regulated by the p53 protein.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer: datos y cifras.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo; en el año 2012, se diagnosticaron 14.1 millones de casos nuevos y fallecieron a causa de ello 8.2 millones de personas; cifras que se estima aumenten en un 70% en las próximas dos décadas.

Los cánceres diagnosticados con más frecuencia a nivel mundial fueron el de pulmón (1,8 millones de casos, 13,0% del total), el de mama (1,7 millones, 11,9%) y el cáncer colorrectal (1,4 millones, 9,7%). Los tipos de cáncer que provocaron un mayor número de muertes fueron los de pulmón (1,6 millones, el 19,4% del total), hígado (0,8 millones, 9,1%) y estómago (0,7 millones, 8,8%). Los tipos más frecuentes de cáncer son diferentes en el hombre y en la mujer. Los 5 tipos de cáncer más diagnosticados en el hombre son pulmón, próstata, colorrectal e hígado; y en la mujer, mama, colorrectal, pulmón, cervicouterino y estómago.

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo conductuales y alimentarios: índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, y es la causa de más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón. Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papilomavirus humanos (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Como consecuencia del aumento y el envejecimiento creciente de las poblaciones, los países en desarrollo se ven afectados desproporcionadamente por el incremento de la incidencia del cáncer. Más del 60% de todos los casos del

mundo se producen en África, Asia, América Central y América del Sur, y estas regiones registran aproximadamente el 70% de las defunciones por cáncer a nivel mundial, una situación que se agrava por la falta de mecanismos de detección precoz y de acceso a tratamientos.

En los países en desarrollo, el acceso a tratamientos eficaces y asequibles contra el cáncer, reduciría significativamente la mortalidad, incluso en entornos donde los servicios sanitarios están menos desarrollados.

Con todo, los costos crecientes de la carga de cáncer están perjudicando incluso a las economías de los países más ricos y están fuera del alcance de los países en desarrollo, además de ejercer una presión insostenible sobre los sistemas de atención de salud. En 2010, se calcula que el costo económico anual total del cáncer alcanzó aproximadamente los US\$ 1,16 billones. Sin embargo, casi la mitad de todos los cánceres podrían evitarse si los conocimientos actuales al respecto se aplicaran de forma adecuada (World Cancer Report 2014, IARC).

Dichas cifras y previsiones remarcan el enorme problema de salud y socioeconómico que representa el cáncer a nivel mundial, subrayando la urgente necesidad de desarrollo y estudio de nuevas estrategias tanto quimioterapéuticas como de prevención.

1.2. Definición y factores de riesgo del cáncer

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cuya característica principal es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de los límites habituales y que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. La

metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (World Cancer Report 2014, IARC).

Más de 100 tipos de cáncer han sido clasificados, donde el tejido de origen da las características distintivas de cada tipo. Aproximadamente el 85% de los cánceres se producen en las células epiteliales y se clasifican como carcinomas, los derivados de las células del mesodermo (ej. hueso, músculo) se denominan sarcomas y los de tejido glandular (ej. de mama) se llaman adenocarcinomas (Pecorino, 2008).

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico definido como carcinogénesis y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno (Figura 1). Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre diversos factores que incluyen factores genéticos (herencia del paciente) y tres categorías de agentes externos llamados carcinógenos que pueden generar mutaciones o alteraciones epigenéticas:

- Físicos: como las radiaciones ultravioleta e ionizantes.
- Químicos: como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida).
- Carcinógenos biológicos: como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

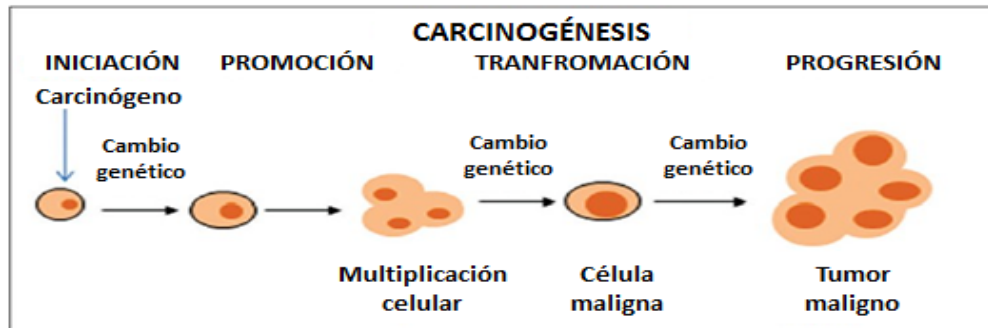


Figura 1. Proceso multifásico de la carcinogénesis (Kaur et al., 2014)

El consumo de tabaco y alcohol, la dieta deficiente y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo. Algunas infecciones crónicas también constituyen factores de riesgo, y son más importantes en los países de ingresos medios y bajos.

Los virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) y algunos tipos de papilomavirus humanos (PVH) aumentan el riesgo de cáncer de hígado y cuello uterino, respectivamente.

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta drásticamente con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular y del sistema inmune a perder eficacia con la edad (World Cancer Report 2014, IARC).

1.3. Características moleculares del cáncer

El proceso de carcinogénesis es diferente en cada tipo de cáncer; sin embargo, a pesar de que las rutas celulares y moleculares son diferentes, el resultado final es el mismo. En el año 2000, después de un detallado análisis, Hanahan y Weinberg

definieron 6 características generales de la mayoría, si no de todas las células cancerosas, proponiendo que la adquisición de la capacidad de crecimiento autónomo, la evasión de señales inhibitoras del crecimiento, evasión de muerte por apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis e invasión y metástasis son esenciales para la carcinogénesis (Hanahan and Weinberg, 2000). Recientemente, han modificado su concepto para incluir dos características cruciales para la adquisición de las seis características previamente mencionadas, las cuales son la inestabilidad del genoma y la inflamación promovida por la presencia de tumores. De igual forma, destacaron dos características emergentes, reprogramación del metabolismo energético y la evasión de destrucción por el sistema inmune (Figura 2) (Hanahan and Weinberg, 2011). Los dos últimos procesos son considerados como características emergentes porque su relación con las seis características mencionadas anteriormente requiere más investigación, aunque hay evidencia de su importancia en la carcinogénesis.

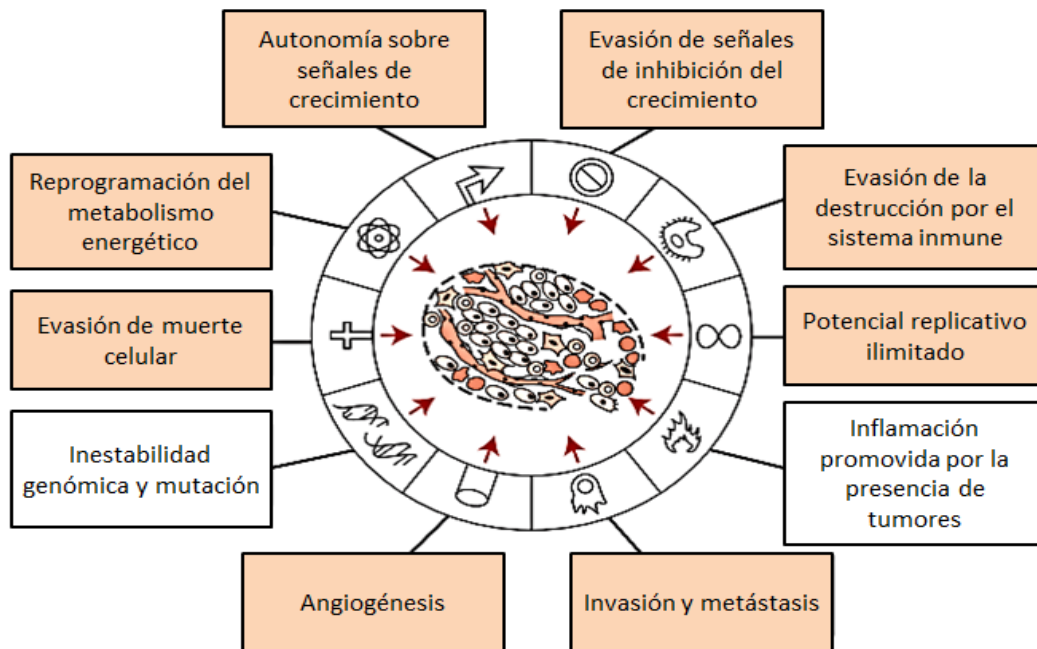


Figura 2. Características del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011)

1.4. Proteína p53: función y mutaciones en cáncer

El desarrollo del cáncer en etapas múltiples refleja las alteraciones genéticas y epigenéticas que llevan a la transformación progresiva de una célula normal en maligna (Kaur et al., 2014). Se ha sugerido que el incremento en la inestabilidad genómica de la célula cancerosa es debido al funcionamiento defectuoso de componentes específicos de los sistemas de vigilancia (Hanahan and Weinberg, 2011). Uno de los miembros más prominentes de estos sistemas es el gen supresor de tumor *TP53*, el cual tiene una participación importante en la prevención de la carcinogénesis al bloquear el ciclo celular, alterar el metabolismo y favorecer apoptosis. La importancia de este supresor de tumor se resalta aún más si consideramos que en más del 50% de los cánceres humanos el gen *TP53* se encuentra mutado (Cheek et al., 2011).

El gen *TP53* reside en el cromosoma 17p13.1 y codifica para la proteína p53 de 393 aminoácidos de largo. La proteína p53 está dividida en tres dominios funcionales, cada uno de los cuales cumple una función específica para su actividad transcripcional. En la región amino terminal se encuentra el dominio transactivador, al cual se une una gran variedad de proteínas como componentes de la maquinaria transcripcional y diversos coactivadores. La región central alberga el dominio de unión al DNA en las hendiduras mayor y menor de la doble hélice. El dominio de tetramerización se localiza en la región carboxilo terminal (Figura 3) (Joerger and Fersht, 2008). Respecto a su función transactivadora, la proteína p53 se une al DNA en forma de tetrámeros y reconoce una secuencia específica en la región promotora de sus genes blanco.

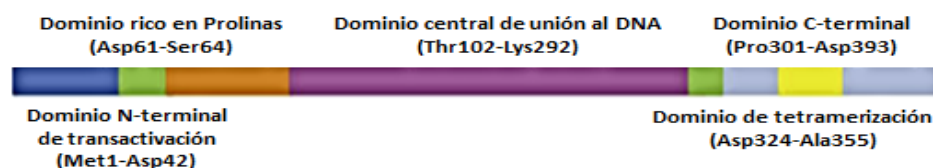


Figura 3. Dominios funcionales de la proteína p53

La proteína p53 es un factor transcripcional que regula la expresión de un gran número de genes en respuesta a una variedad de estímulos, como por ejemplo los que causan daño genómico. p53 se activa principalmente por modificaciones post-traduccionales (como la fosforilación y la acetilación), resultando en un aumento tanto en la estabilidad de la proteína como en su actividad transcripcional (Levine and Oren, 2009). Una vez activada, la proteína p53 es capaz de cambiar la expresión de genes involucrados en respuestas tan variadas como: detención del ciclo celular, senescencia, metabolismo, reparación del DNA, inhibición de angiogénesis, estrés oxidativo y muerte celular programada (Figura 4).

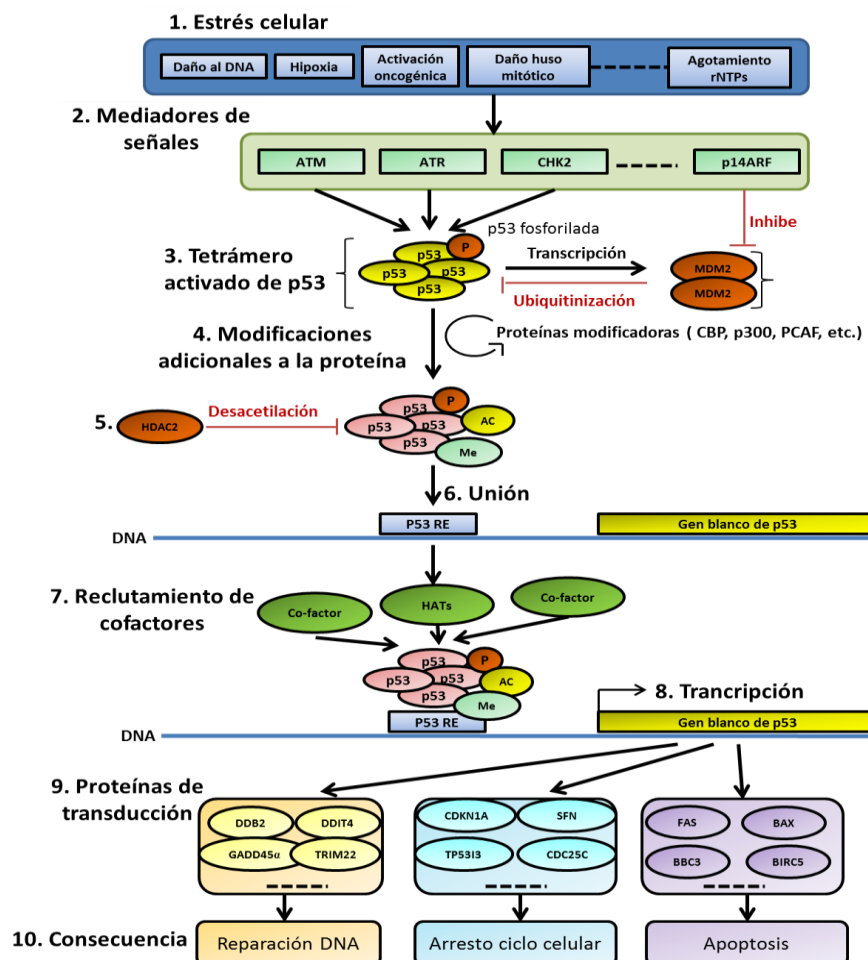


Figura 4. Mecanismos de activación de p53 y regulación transcripcional de sus genes blanco (Riley et al., 2008)

Del grupo de genes inducidos por p53 destaca *P21* que bloquea el ciclo celular en G1. El aumento en el nivel de la proteína P21 inhibe la actividad de los complejos ciclina/CDK (Harms et al., 2004; Qian et al., 2002). Otra proteína activada por p53 es GADD45, la cual participa en la reparación del DNA vía NER (del inglés Nucleotide Excision Repair). GADD45 interactúa con las histonas y facilita el relajamiento de la cromatina para que actúe la topoisomerasa (Qian et al., 2002). Por otro lado, p53 activa genes involucrados en apoptosis, como *BAX* y *PUMA*. La proteína BAX se transloca del citoplasma a la membrana interna de la mitocondria facilitando la liberación de citocromo c, mientras que PUMA se une a Bcl-2 inhibiendo su actividad antiapoptótica (Harms et al., 2004; Qian et al., 2002). Además de estas proteínas clásicas, p53 transactiva otros genes (como *PIG3*, *TP53INP1* y *TP53INP2*) que se han relacionado a la apoptosis (Cano et al., 2009; Contente et al., 2002; Lee et al., 2010). La proteína expresada por el gen *PIG3* participa en la inducción de apoptosis, generando especies reactivas de oxígeno (ROS); *PIG3* también participa en la reparación del daño al DNA y contribuye al reclutamiento de las proteínas 53BP1, MRE11, RAD50 y NBS1 a los sitios de rompimiento en el DNA (Contente et al., 2002; Lee et al., 2010). *TP53INP1* es otro gen blanco de p53 cuya expresión es inducida por diferentes tipos de agentes productores de estrés celular, en especial agentes oxidantes. De manera interesante, *TP53INP1* y su homólogo *TP53INP2* pueden actuar de manera positiva para incrementar la estabilidad y actividad transcripcional de la proteína p53. Además, *TP53INP2* participa en autofagia ya que se une a la proteína LC3 y ambas proteínas se relocalizan en la membrana del autofagosoma. Adicionalmente, *TP53INP2* se une al complejo transmembranal VMP-BECLINA1 durante la autofagia (Cano et al., 2009; Nowak and Iovanna, 2009). Por último, la actividad transcripcional de p53 es controlada por un sistema auto-regulatorio a través de su regulador negativo MDM2, que ubiquitina y favorece la degradación de p53, en conjunto con su homólogo MDM4 (Toledo and Wahl, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente, las mutaciones en el gen TP53 representan las alteraciones más frecuentes en el cáncer humano; existen más de 1200 mutaciones distintas reportadas y la mayoría de estas mutaciones están localizadas en el dominio de unión al DNA (Figura 5).

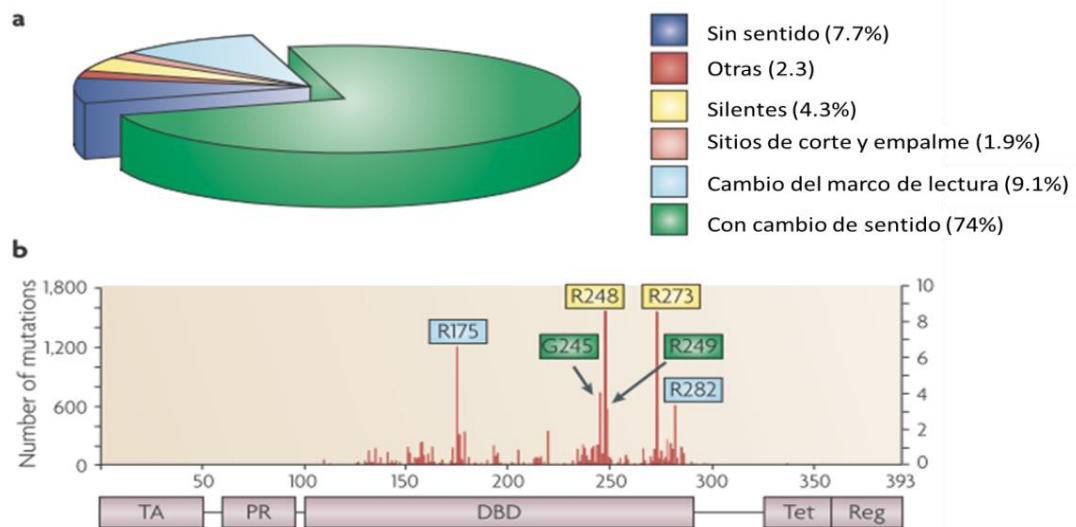


Figura 5. Distribución de mutaciones somáticas del gen TP53 de acuerdo a la base de datos de mutaciones de TP53 de IARC (Brosh and Rotter, 2009)

Aún más, estas mutaciones son seguidas por la pérdida de heterocigosidad en la cual se inactiva el alelo silvestre remanente (Brosh and Rotter, 2009; Dearth et al., 2007). Mediante la formación de tetrámeros, las proteínas p53 mutantes (p53mt) ejercen un efecto negativo dominante (EDN) sobre la proteína p53 silvestre (p53wt). Dado que no todas las proteínas p53mt tienen la misma capacidad para inactivar a p53wt, la pérdida de heterocigosidad adquiere importancia (Dearth et al., 2007). Las mutaciones de p53 son clasificadas en conformacionales (R175H, G245S, R249S y R282W) o de contacto (R248Q, R248W, R273H y R273C). En las mutaciones conformacionales o estructurales se afectan residuos esenciales para mantener la conformación de toda la estructura de unión al DNA. Por ejemplo, la mutación R175H afecta la región de unión al zinc, la cual estabiliza la unión entre los bucles L2 y L3 que

se unen a la hendidura mayor del DNA. La mutación R249S afecta la estabilidad de L3, favoreciendo el cambio a una conformación no nativa. Por otro lado, las mutaciones de contacto afectan sólo residuos que son esenciales para la unión con el DNA. Por ejemplo, las mutaciones R273H y R273C, dos de las cinco mutaciones más frecuentes en cáncer, pierden el residuo de arginina en la posición 273 que establece un contacto esencial con el DNA (Joerger and Fersht, 2008). Ambos tipos de mutaciones tienen varios efectos sobre la actividad de la proteína p53: adquisición de una mayor estabilidad al no estar sujeta a degradación por MDM2, debido tanto a la incapacidad de p53mt para transactivar el promotor de *MDM2* como a una menor afinidad de unión entre las dos proteínas (Lukashchuk and Vousden, 2007). Debido a que la proteína p53 funciona como tetrámero, la formación de tetrámeros compuestos por moléculas de p53 mutante (p53mt) y silvestre (p53wt) inhibe la función transcripcional de p53wt (PDF) y debido a que la concentración de p53mt es mayor que la de p53wt es improbable que se formen tetrámeros exclusivamente de p53wt (Chan et al., 2004; Dearth et al., 2007) (Figura 6). De la misma manera la proteína p53 mutante también tiene la capacidad de inactivar a p63 y p73 que son otros miembros de la familia p53 (Brosh and Rotter, 2009). Por otro lado, la proteína p53mt puede adquirir nuevas actividades con propiedades oncogénicas conocidas como ganancia de función (GDF). Estas actividades tienen que ver con una nueva capacidad transcripcional que se lleva a cabo por medio de secuencias no canónicas en la región promotora de sus genes blanco o a través de su unión a otros factores de transcripción (SP1, EST1 NF-Y) y a otras proteínas. Esto lleva a que p53mt active o reprima genes que actúan en resistencia a fármacos anticancerígenos, inestabilidad genómica e incremento en la capacidad metastásica de los tumores. Algunos de los genes que p53mt activa de esta manera son *MAD1*, *MDR1*, *MYC*, *FN1*, *EGR1*, *EGF-R*, *NARS2* (Brosh and Rotter, 2009; Strano et al., 2007; Xu, 2008).

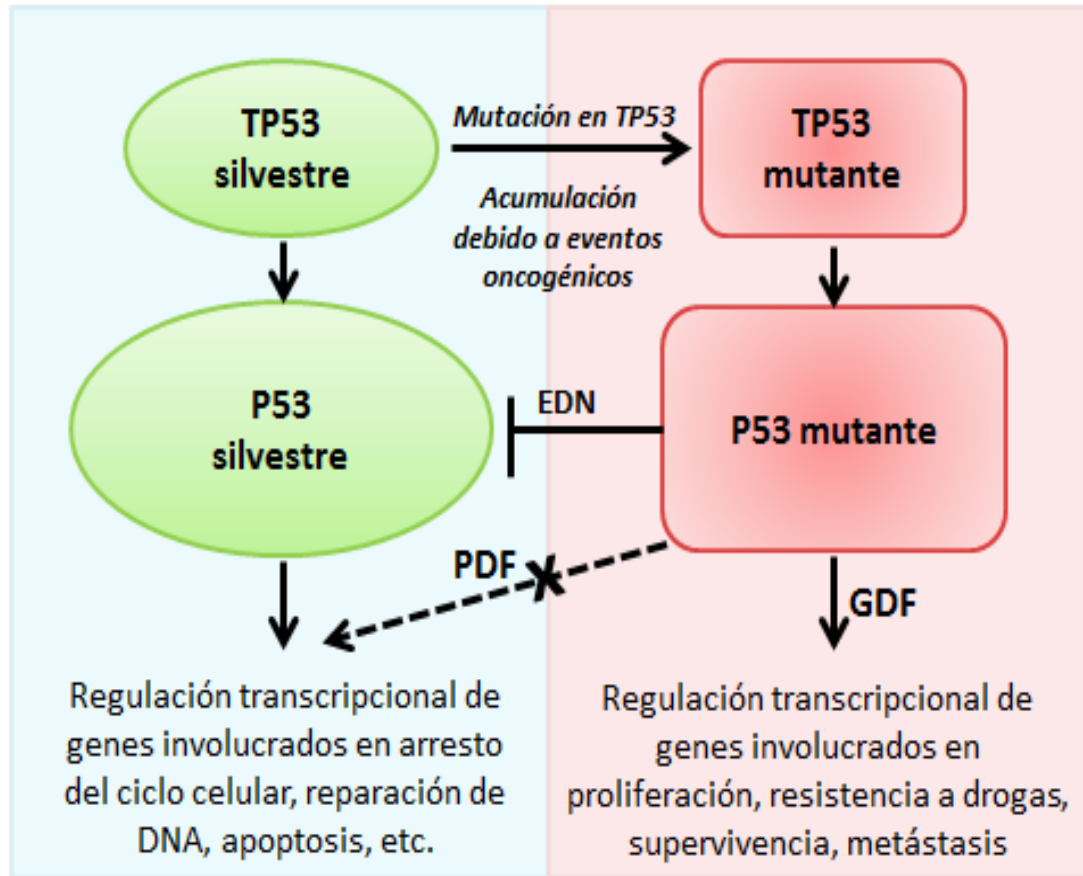


Figura 6. Impacto funcional de mutaciones en el gen TP53. EDN: efecto dominante negativo; PDF: pérdida de función; GDF: ganancia de función. (Brosh and Rotter, 2009)

1.5. p53 como un blanco potencial para tratamientos contra el cáncer

La gran importancia que la proteína p53 tiene en cáncer la hace un blanco potencial para el desarrollo de terapias antitumorales. Muchas de las estrategias quimioterapéuticas utilizadas (cisplatino, taxol, carboplatino) se basan en agentes que activan a la proteína p53 o a otros miembros de su familia. Sin embargo, estas estrategias han encontrado el problema de que una gran mayoría de cánceres poseen mutaciones en el gen TP53 que impiden la activación de la proteína p53, así como de p73 o p63 (Li and Prives, 2007). Esto ha llevado a la búsqueda y desarrollo de nuevas modalidades de terapia, utilizando compuestos químicos que sean capaces de reactivar la función supresora de tumor de las proteínas p53mt.

Es muy importante señalar que esta nueva estrategia se basa en el hecho de que la conformación mutante de la mayoría de las p53mt es reversible y que gran parte de las p53mt encontradas en los tumores malignos se encuentran sobre-expresadas y posiblemente modificadas post-traduccionalmente.

1.5.1. Desarrollo de moléculas pequeñas dirigidas contra p53 mutante

Las nuevas estrategias terapéuticas se han centrado en el desarrollo de moléculas pequeñas de baja masa molecular que tienen como blanco a la proteína p53 mutante ya sea induciendo su degradación, inhibiendo su activación, inhibiendo su actividad pro-oncogénica, estrategias combinadas que inhiben tanto las vías oncogénicas como la activación de la mutante y reactivando su función wt-like como supresora de tumores (Figura 7) (Bykov et al., 2002; Girardini et al., 2014). Algunas de las moléculas más promisorias son: CDB3, péptido sintético de 9 aminoácidos derivado de la proteína P53BP2, la cual es conocida por aumentar la afinidad de p53wt en su unión al DNA; P53C, péptido de 46 aminoácidos derivado de la región carboxilo terminal de p53, que reactiva a la p53mt ayudando al plegamiento del dominio central o mediante el establecimiento de nuevos contactos con el DNA. Por último, la molécula PRIMA, que ha sido la más estudiada y que fue descubierta mediante la búsqueda de compuestos con capacidad para suprimir el crecimiento de células tumorales que expresan p53mt (Brown et al., 2011; Bykov et al., 2002; Charlot et al., 2006; Levine and Oren, 2009; Olivier et al., 2010; Selivanova and Wiman, 2007; Wang and Sun, 2010).

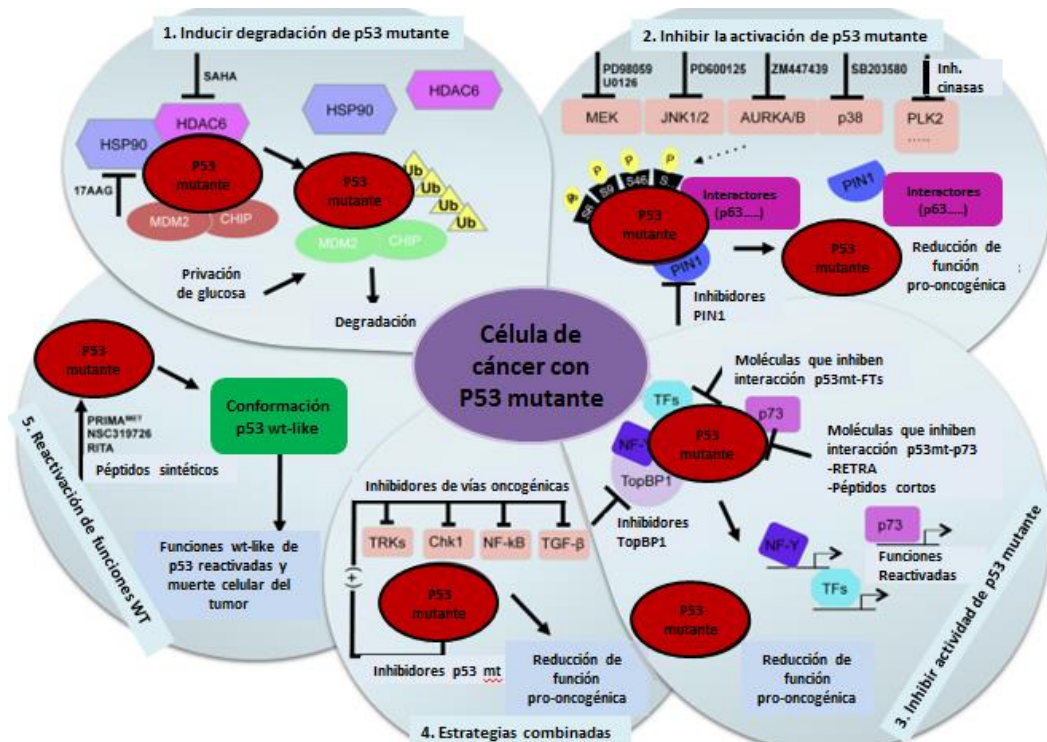


Figura 7. Potenciales estrategias terapéuticas que tienen como blanco a p53 mutante. (1) Inducción a degradación de p53 mutante: compuestos que inhiben la formación de complejos estables entre p53 mutante y la maquinaria de HSP90 por 17AAG (inhibidor de HSP90) o SAHA (inhibidor de HDAC6) permitiendo la acción reguladora de MDM2 y otras E3 ubiquitin ligasas para la degradación de p53 mutante. La degradación de p53 mutante también se puede mejorar por restricción o privación de glucosa; (2) Inhibición de la activación de p53 mutante: la inhibición farmacológica de cinasas o activadores de p53 mutante como PIN1 puede restringir sus actividades pro-oncogénicas; (3) Inhibición de la actividad de p53 mutante: las funciones de p53 mutante pueden ser restringidas al evitar la interacción de la mutante con otros miembros de la familia de p53 (p73) a partir de moléculas que interfieren la formación de complejos con la proteína p53 mutante; (4) Estrategias combinadas: utilizando simultáneamente fármacos que se dirigen contra p53 mutante e inhibidores de activación de las vías oncogénicas cooperando de manera sinérgica para impedir la progresión del tumor; (5) Reactivación de funciones wt-like (tipo salvaje): la reactivación farmacológica de las funciones wt-like de mutantes puntuales de p53 puede favorecer la recuperación de la capacidad de p53 como supresor de tumores en las células tumorales. TFS ó FTs (factores de transcripción); TRKS (receptores tirosina cinasa) (Girardini et al., 2014).

1.5.2. Quimioterapéuticos comunes en combinación con compuestos de origen natural contra el cáncer.

La búsqueda de compuestos de origen natural con propiedades anti-cancerígenas también ha atraído el interés de la comunidad científica, pero hasta ahora el único producto con la propiedad de inducir la expresión de genes blanco para

p53wt en células que expresan p53mt, es el extracto de la planta *Brachylaena ramiflora* (Asteraceae). Este extracto fue probado en células SAOS-2 (p53 null) y H1299 (p53 null) transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas p53mt R273H y R175H; en ambos casos, y luego de ser tratadas con el mencionado extracto, se observó la inducción de los genes *P21*, *PUMA* y *MDM2* (Karimi et al., 2010). Por otro lado, el Resveratrol es conocido por su capacidad para inducir tanto la expresión de p53wt como la vía apoptótica de esta importante proteína (Athar et al., 2009; Shakibaei et al., 2009). Pese a que el Resveratrol es uno de los compuestos naturales más estudiados, aun no se conoce si posee la capacidad de reactivar a proteínas p53 de tipo mutante (Lin et al., 2002). En este trabajo se observó que el Resveratrol incrementa la expresión del mRNA de *P21* en la línea tumoral de próstata DU145 que expresa p53mt. Es importante señalar que la tendencia en el desarrollo de esquemas quimioterapéuticos se ha enfocado en la combinación de productos de origen natural como Genisteína o el Resveratrol con quimioterapia o radioterapia para conseguir un tratamiento más efectivo (Sarkar and Li, 2006). Se sugiere que estos compuestos pueden ayudar a las terapias tradicionales, modificando la actividad de genes clave en procesos de proliferación, apoptosis y metabolismo celular como *p53* o *NF-kB*.

Los medicamentos basados en el uso del cisplatino están entre los agentes anticancerígenos más activos y usados con éxito en muchos tipos de cáncer, pero su toxicidad representa una limitante. Estos compuestos quimioterapéuticos son muy citotóxicos e inducen una serie de efectos secundarios muy desagradables. Además de que tumores que expresan p53mt frecuentemente no responden a ciertas quimioterapias y pueden causar resistencia. Por ejemplo, se ha observado que las células que expresan proteínas p53mt son más resistentes al cisplatino (O'Connor et al., 1997) y que esta resistencia se asocia con la disminución de los niveles de apoptosis y aumento en los mecanismos de reparación del DNA, procesos que involucran a p53 (Burger et al., 2011; Piovesan et al., 1998). En la búsqueda de agentes quimiosensibilizadores, la comunidad científica ha encontrado que los

compuestos de origen natural pueden ser una buena opción. Así, el Resveratrol se ha usado exitosamente con diversos compuestos como adriamicina, doxorubicina, cisplatino (que dañan al DNA) y paclitaxel (que daña el citoesqueleto), entre otros (Gupta et al., 2011; Sarkar and Li, 2006). Todos estos estudios sugieren que el Resveratrol pudiera ser usado para mejorar la respuesta de los tumores a las drogas quimioterapéuticas de uso común. Aún más, cuando se usó el Resveratrol en combinación con estos agentes citotóxicos se observó que esta fitoalexina puede proteger contra su toxicidad (Kim et al., 2011).

1.5.2.1. Resveratrol: fitoquímico con propiedades anticancerígenas

El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) es una fitoalexina natural producida por una amplia variedad de plantas como respuesta a condiciones de estrés, particularmente cuando éstas se encuentran bajo el ataque de patógenos, tales como bacterias u hongos o por exposición a radiación UV. El resveratrol, se produce de forma natural en algunos alimentos de origen vegetal, por ejemplo, las uvas, cacahuates y bayas. Es el miembro más conocido e investigado de esta clase de compuestos. El Resveratrol es actualmente utilizado en la práctica clínica debido a sus múltiples y bien documentadas propiedades quimiopreventivas y anticancerígenas (Hosseini and Ghorbani, 2015). Este compuesto tiene un alto impacto y aplicación en el área de oncología, comprobado por el número de ensayos clínicos, registrados y en curso, en las bases de datos internacionales, como Estados Unidos y la Unión Europea. Además, diversos datos epidemiológicos asocian el consumo de resveratrol con la inhibición de varias enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer (Rimando and Suh, 2008). En particular, se ha observado que la ingestión de alimentos ricos en resveratrol produce una disminución significativa en la incidencia de cáncer de piel y

mama, así como una disminución en la progresión de adenocarcinoma de pulmón (Bishayee, 2009; Levi et al., 2005)

En las plantas, existen dos isómeros: trans-resveratrol y cis-resveratrol y sus glucósidos, trans-piceido y cis-piceido. El trans-isómero no conjugado (aglicona) es el más estudiado, in vitro. Por otra parte, el resveratrol posee una biodisponibilidad baja, es rápidamente metabolizado en el intestino y el hígado por las enzimas de fase I, y los productos finales de este metabolismo son principalmente los glucurónidos y derivados sulfatados (Wenzel and Somoza, 2005) (Figura 8).

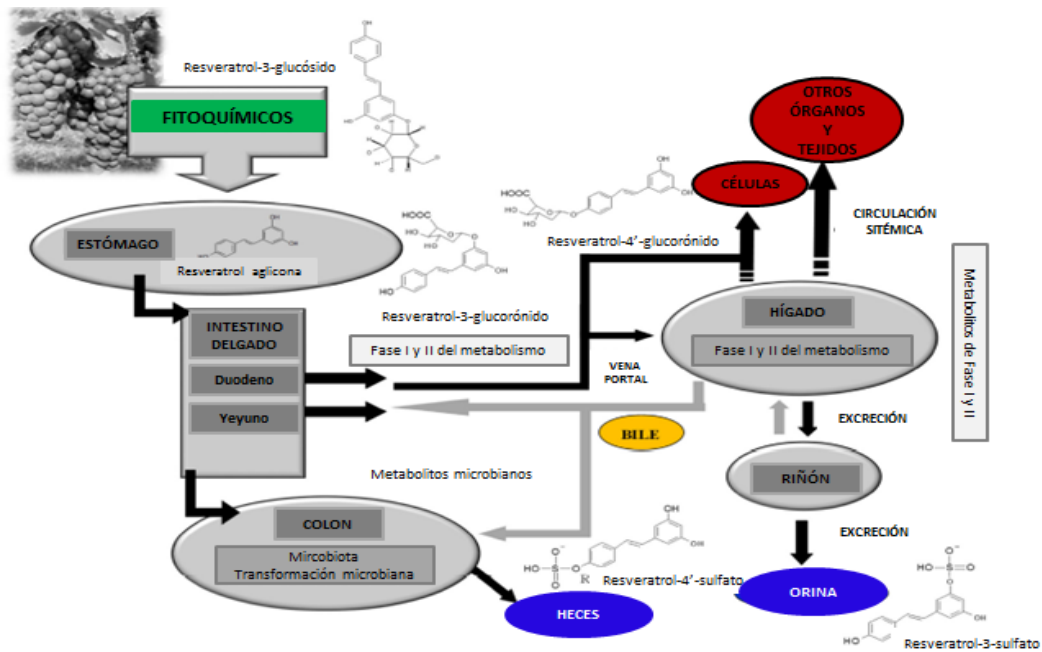


Figura 8. Metabolismo del resveratrol-3-glucósido (piceido), principal metabolito del resveratrol presente en plantas; posterior a la desconjugación del piceido, resveratrol-3-glucoronido, resveratrol-4'-glucoronido, resveratrol-3-sulfato y resveratrol-4'-sulfato son los metabolitos principales de la fase I del metabolismo del resveratrol (aglicona) (Varoni et al., 2016).

Datos preclínicos corroboran la interacción de los fitoquímicos con diversos blancos bioquímicos y moleculares involucrados en el proceso de carcinogénesis (Varoni et al., 2016) . Recientes investigaciones se han enfocado en dilucidar los

mecanismos quimiopreventivos y quimioterapéuticos que desencadena el uso del resveratrol en la prevención, arresto o reversión de las etapas de la carcinogénesis. Además de los mecanismos compartidos por varios fitoquímicos, el resveratrol puede actuar como un agente supresor sobre varias vías de señalización alteradas, adquiriendo un papel como agente pleiotrópico funcional, el cual ejerce su efecto sobre múltiples blancos en las células cancerígenas con toxicidad limitada hacia las células normales (Figura 9). El resveratrol aporta una mayor contribución gracias a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras, reduciendo el daño inducido debido al estrés oxidativo (daño al DNA, oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos) y aumentando la vigilancia del sistema inmune (Varoni et al., 2016). Por otro lado, el resveratrol puede actuar como un agente de bloqueo en el proceso de transformación de pro-carcinógeno a carcinógeno ya que inhibe a la citocromo mono-oxigenasa P450 isoenzima CYP1 A1, enzima hepática encargada del metabolismo de xenobióticos (Chun et al., 1999; Diaz-Gerevini et al., 2016). El resveratrol tiene actividades múltiples mediante su interacción con distintas biomoléculas (Britton et al., 2015).

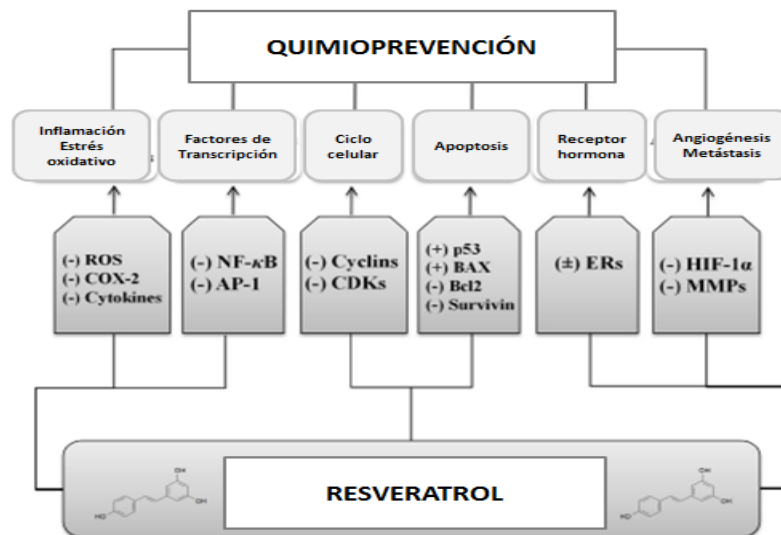


Figura 9. Mecanismos involucrados en la actividad anticancerígena del resveratrol. Varios procesos celulares son blanco del resveratrol, ya sea regulando positiva (+) o negativamente (-) diferentes vías celulares (Varoni et al., 2016)

Varios tipos de cáncer son promovidos en cierta forma por un bajo grado de inflamación sistémica crónica, caracterizada por la presencia elevada de biomarcadores de inflamación en la circulación, tales como citosinas (ej. Interleucinas (IL)-8, IL-6, IL-1, and IL-12), prostaglandina E2 (PGE2), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferones (INF). El Resveratrol actúa principalmente sobre la expresión de TNF- α y sus vías de señalización, de manera dosis dependiente, inhibiendo tanto la activación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) (sin afectar la expresión), como la actividad transcripcional de p65 (sin bloquear la translocación al núcleo) (Ren et al., 2013). Por otro lado, el resveratrol ha mostrado que inhibe la activación de AP-1 por TNF- α (Manna et al., 2000)

Adicionalmente, el resveratrol inhibe directamente todas las fases de la carcinogénesis modulando vías relacionadas con estrés oxidativo. Como sabemos, tanto los efectos antioxidantes como los pro-oxidantes juegan un papel importante en la carcinogénesis. El balance entre los efectos antioxidantes y pro-oxidantes del resveratrol sigue siendo muy controversial y dependiente de la dosis utilizada en los ensayos. Respecto a esto, se han encontrado 2 grandes funciones opuestas de este fitoquímico: la primera relacionada con su actividad quimiopreventiva asociada a su efecto antioxidante con el fin de reducir el deterioro o los daños a macromoléculas esenciales; y la segunda relacionada con su potencial quimioterapéutico asociada a la inducción de generación de ROS en células cancerígenas llevando a un índice mayor de apoptosis (Varoni et al., 2016).

El resveratrol induce un arresto en el ciclo celular vía inducción de p21 y otros inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI), disminuyendo tanto la expresión como la actividad de ciclinas y CDKs (Ahmad et al., 2001). Diversos autores han reportado que el resveratrol produce una disminución en pRb hiperfosforilada con un aumento relativo en pRb hipofosforilada, lo cual compromete la disponibilidad

de E2F libre y regula negativamente la expresión a nivel de proteína de cinco miembros de la familia E2F (1-5).

En resumen, el resveratrol reduce el crecimiento y proliferación de células cancerígenas al actuar directamente sobre el ciclo celular, factores de crecimiento, CDKs y factores de transcripción. De manera global, el resveratrol conduce a una quimioprevención mejorada, mediante la modulación de genes implicados en la proliferación, así como la promoción de la apoptosis de células de cáncer.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Recientemente, en nuestro laboratorio se realizaron estudios de microarreglos para observar el efecto del Resveratrol en la expresión global de genes en varias líneas celulares (Diaz-Chavez et al., 2013; Garcia-Zepeda et al., 2013; Leon-Galicia et al., 2013). De manera interesante, en la línea celular C33A (con la mutación R273C en p53) tratada con Resveratrol, se observó expresión elevada de varios genes (*P73*, *TP53INP1*, *TP53INP2*, *PIG3*, *PIG11*, *GADD45B*, *PERP*, *ASPP1* y *DUSP1*) que son blancos transcripcionales de p53wt (Attardi et al., 2000; Contente et al., 2002; Chen et al., 2001; Davies et al., 2011; Liang et al., 2004; Liu et al., 2008; Nowak and Iovanna, 2009; Perk et al., 2005; Samuels-Lev et al., 2001). Además, se determinó que la expresión de algunos genes (*EGR1*, *MYC*, *NARS2*, *ID1*, *BAG1*) regulados positivamente por p53wt disminuye después del tratamiento con el Resveratrol (Ahn et al., 2009; Brosh and Rotter, 2009; Dell'Orso et al., 2010; Strano et al., 2007). También se observó que el Resveratrol disminuye la expresión de genes (*PIRH2*, *MDM4*, *BAG1*) que están involucrados en la degradación de p53wt, con lo cual este compuesto pudiera aumentar la estabilidad de esta proteína. Asimismo, después del tratamiento de las células C33A con Resveratrol, se detectó la sobre-expresión de genes (*ASPP1*, *HSP40*) que codifican para proteínas que se unen a p53 en el dominio de unión al DNA y cuya función es estabilizar y estimular la actividad transcripcional de p53wt (Ahn et al., 2009; Braithwaite et al., 2006; Duan et al., 2006; King et al., 2001; Liu et al., 2008; Toledo and Wahl, 2007).

Por lo anterior, este proyecto propone al compuesto natural Resveratrol como un posible reactivador de la actividad supresora de tumor de las proteínas p53wt, lo que lo haría un complemento ideal de otros compuestos quimioterapéuticos, como el cisplatino, que actúan activando la proteína p53wt.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El Resveratrol es conocido por su capacidad para inducir tanto la expresión de p53 como la vía apoptótica de p53. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio sobre el efecto de este compuesto sobre las proteínas p53 mutantes. En este proyecto, se propone al compuesto natural Resveratrol como un posible reactivador de la actividad supresora de tumor en las proteínas p53mt, lo que lo haría un complemento ideal de otros compuestos quimioterapéuticos como el cisplatino.

4. HIPÓTESIS

El Resveratrol inducirá la reactivación de las vías antiproliferativa y proapoptótica de p53 en líneas celulares de cáncer que expresan la proteína p53 mutante, induciendo la expresión de genes regulados por p53 wt.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar si el Resveratrol es capaz de reactivar a la proteína p53 en su actividad transcripcional como supresora de tumor en líneas celulares que expresan p53mt.

5.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar la IC50 de las distintas líneas celulares tratadas con Resveratrol.
- 2) Determinar los posibles cambios en los niveles de expresión de la proteína p53 en líneas celulares que expresan diferentes formas mutantes de esta proteína después de ser tratadas con Resveratrol IC50 a 24 y 48 horas.
- 3) Analizar el nivel de mRNA de genes blanco de la proteína p53 wt en las líneas celulares tratadas y no tratadas con Resveratrol (24 h).

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1. Líneas celulares

Con el fin de abarcar un amplio espectro de mutaciones tanto conformacionales como de contacto del gen TP53, se cultivaron las líneas celulares: C33A (R273C) derivada de cáncer cervical; SW480 (R273H) de carcinoma colorectal; MDA-MB-231 (R280K); T47D (L194F), SK-BR-3 (R175H) de cáncer mamario y SW13 (H193Y) derivada de carcinoma adrenocortical. En estas líneas el alelo silvestre de p53 se ha perdido (Hui et al., 2006; Rochette et al., 2005) (Handbook of p53 mutation in cell lines).

6.2. Cultivo celular

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.3. Ensayos de proliferación celular (MTT)

Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 25,000 células por pozo 24 horas antes de su tratamiento. Posteriormente se trataron con concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200, 250 µM/ml de Resveratrol (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol, utilizándose como control etanol al 0.3% durante 48 horas.

Después de 48 horas, se retiró el medio y se incubó a las células con 0.5 mg/ml de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ en medio libre de suero. Se retiró el medio y los cristales de formazán precipitados fueron solubilizados con 500 µL de isopropanol ácido (3.4 µL HCl/ml Isopropanol). Se leyó la absorbancia de la reacción colorimétrica a 570 nm de longitud de onda en un lector de Elisa Sunrise Tecan. El porcentaje de

crecimiento fue calculado considerando la lectura del control como el 100% y se determinó la IC50 por interpolación usando el programa GraphPad Prism 5.

6.4. Western Blot p53

Las líneas celulares fueron tratadas con etanol y con su respectiva RES IC50 por 24 y 48 horas. Las células fueron cosechadas en PBS 1x pH 7.4 y centrifugadas a 5000 RPM, 5 minutos a 4°C. La extracción de proteínas totales se realizó con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0.5% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF) con inhibidores de proteasas (10µl/ml de inhibidores Boehringer). Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 20 miliamperes y transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 micras durante 1 hora a 100 Volts ; seguido de 1 hora de bloqueo con leche descremada al 5% en PBS y un lavado con TWEEN-20 0.1%. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón p53-HRP (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4°C. Como control de carga de la proteína, fue utilizado el anticuerpo anti-actina HRP (Sigma) incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó con los programas GeneSnap y GeneTools de SynGene.

6.5. Extracción de RNA.

Posterior a los tratamientos de 24 horas con etanol y RES IC50 de cada línea celular, se retiró el medio a las células y se les adicionó 1 ml de Trizol. Para la extracción de RNA se les adicionó 200 µl de cloroformo y se mezcló por inversión. La mezcla se centrifugó por 15 min a 14,000 RPM a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, al que se le agregaron 500 µl de isopropanol; se incubaron las muestras a -20°C por 20 minutos; en seguida se centrifugaron durante 15 min a 14,000 RPM a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se adicionó a la pastilla 1 ml de etanol al 75% en agua tratada con DEPC; se centrifugó 10 minutos a 7500 RPM a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, resuspendiéndola después en 26

μL de agua DEPC. El RNA total se trató con DNasa I libre de RNasa (Ambion)(1 μL por muestra) en su respectivo Buffer (3 μL por muestra).

6.6. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó con el Kit Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis de acuerdo al protocolo del kit. Se preparó la mezcla de reacción con 3 μg de RNA, a la cual se le adicionó 1 μL de Oligo-dT (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), completando a un volumen total de 11 μL con H₂O libre de RNAsas. Se incubó durante 5 min a 65°C y en seguida se colocó en hielo por 2 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionaron 4 μL de Buffer de reacción 5x, 1 μL del inhibidor de RNasa RiboLock (20 U/ μL), 2 μL del mix de dNTP (10 mM) y 2 μL de la enzima reverso transcriptasa M-MuIV (20 U/ μL). Se incubó por 1 hora a 37°C y posteriormente se inactivó la reacción incubando la muestra a 70°C por 5 minutos.

6.7. RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)

Para realizar la cuantificación de los niveles de transcripción de los genes de interés mediante la amplificación en tiempo real, se utilizó el kit Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix. Para 1 μL de muestra (cDNA) se adicionan 10 μL de SYBR Green, 1 μL de Oligo (Oligo IDT) y 8 μL de agua libre de nucleasas. En el caso de Oligos Sigma (correspondientes al Fw y Rv de cada gen a evaluar) se adiciona 1 μL de muestra, 10 μL SYBR Green, 1 μL de Oligo Fw, 1 μL de Oligo Rv y 7 μL de agua libre de nucleasas. Con el propósito de estandarizar los niveles de expresión de cada gen, se calculó la expresión relativa del RNA mensajero del gen constitutivo β 2-microglobulina. Los datos se analizaron utilizando la ecuación descrita por Livak (60). Los productos amplificados tienen un tamaño que está entre 100 y 150 pares de bases.

Los genes analizados se escogieron bajo los siguientes criterios:

- Genes involucrados en diversos procesos regulados por p53wt.

- Genes a cuyos promotores la proteína p53wt se une ya sea con una afinidad alta, media y baja

Tabla 1. Secuencias de oligos utilizados para RT-qPCR

| Gen | | Secuencia oligo | Casa |
|--------------------------|----------|-------------------------------|-------|
| β2-microglobulina | Primer 1 | 5'-ACCTCCATGATGCTGCTTAC-3' | IDT |
| | Primer 2 | 5'-GGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT-3' | |
| TP53 | Primer 1 | 5'-CTTACATCTCCCAAACATCCCT-3' | IDT |
| | Primer 2 | 5'-CCAGGACTTCCATTTGCTTTG-3' | |
| P21 | Forward | 5'-GGAAGACCATGTGGACCTGT-3' | Sigma |
| | Reverse | 5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3' | |
| MDM2 | Primer 1 | 5'-GTGCATTTCCAATAGTCAGCTAA-3' | IDT |
| | Primer 2 | 5'-AGAAGGACAAGAACTCTCAGATG-3' | |
| PUMA | Primer 1 | 5'-CACCTAATTGGGCTCCATCT-3' | IDT |
| | Primer 2 | 5'-ACGACCTCAACGCACAGTA-3' | |
| BAX | Primer 1 | 5'- AAAGATGGTCACGGTCCAAC-3' | IDT |
| | Primer 2 | 5'-CAAACCTGGTGCTCAAGGC-3' | |
| GADD45B | Forward | 5'-GGGAAGGTTTTGGGCTCTCT-3' | Sigma |
| | Reverse | 5'-GGTCACCGTCTGCATCTTCTG-3' | |

7. RESULTADOS

7.1. El Resveratrol ejerce un efecto anti-proliferativo dosis dependiente en líneas celulares de cáncer que presentan distintas mutaciones en el gen TP53.

Con el fin de determinar el efecto anti-proliferativo que ejerce el resveratrol (RES) sobre líneas celulares de cáncer que presentan distintas mutaciones del gen TP53, se evaluó el efecto de éste sobre el crecimiento por medio de ensayos MTT. Se observó que el etanol (0.3% v/v) no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de las distintas líneas celulares y por lo tanto se utilizó como vehículo en todo el proceso experimental y fue considerado como el número inicial de células al 100% en los ensayos MTT.

Las líneas celulares de cáncer cervical C33A (p53 R273C); carcinoma colorectal SW480 (R273H); cáncer mamario MDA-MB-231(R280K), T47D (L194F), SK-BR-3 (R175H) y carcinoma adrenocortical SW13 (H193Y), fueron tratadas con concentraciones crecientes de resveratrol (0-250 $\mu\text{mol/L}$) por 48 horas. El RES indujo un efecto inhibitorio dosis dependiente sobre la proliferación de todas las líneas celulares, con valores de concentración inhibitoria al 50% (IC50) en un rango de 110-182 $\mu\text{mol/L}$ (C33A 168.4 $\mu\text{mol/L}$; SW480 181.4 $\mu\text{mol/L}$; MDA-MB-231 157.7 $\mu\text{mol/L}$; T47D 110.6; SK-BR-3 139.4 $\mu\text{mol/L}$; SW13 140.5 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 10).

No se determinó si la inhibición de la proliferación era debida a un arresto en la proliferación celular (citoestaticidad) o por muerte celular (citotoxicidad).

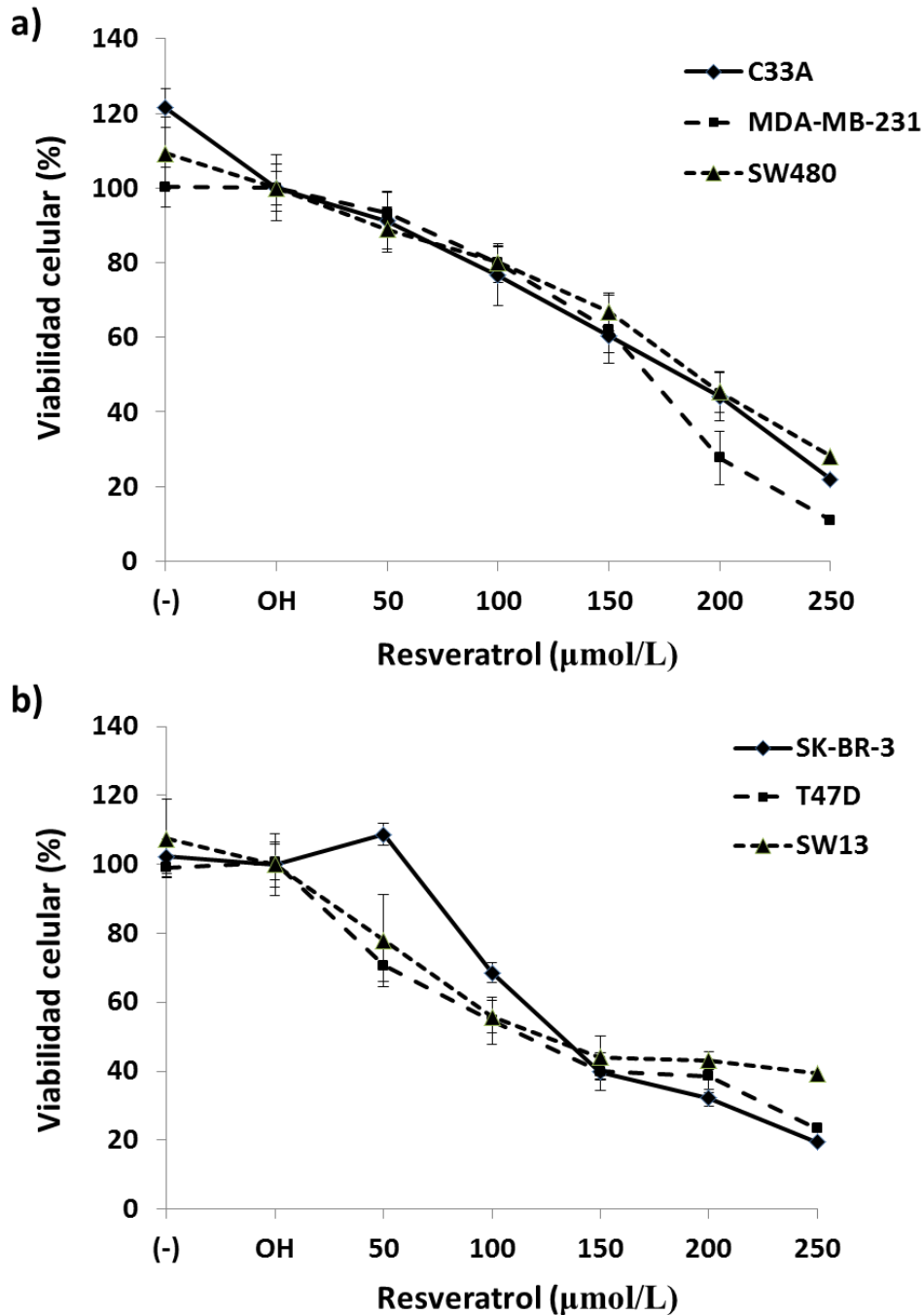


Figura 10. Disminución de la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer con fenotipo p53 mutante al ser tratadas con resveratrol. Se determinó la IC50 mediante ensayos MTT. Los porcentajes de crecimiento fueron normalizados en función a las células control tratadas con etanol (0.3% v/v). Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos distintos \pm DS. a) Líneas celulares C33A, MDA-MB-231 y SW480. b) Líneas celulares SK-BR-3, T47D y SW13.

7.2. Efecto del resveratrol sobre los niveles de proteína p53

Se determinó mediante análisis de western blot el cambio en los niveles de la proteína p53 en las líneas celulares C33A, SW480, MDA-MB-231, T47D, SK-BR-3 y SW13 que expresan distintas mutantes de la proteína posterior a los tratamientos con resveratrol IC50 por 24 y 48 horas. La cuantificación densitométrica demostró que el Resveratrol produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de proteína p53 total en las líneas celulares SW13 y T47D a las 24h mientras que a las 48h los niveles se incrementaron en prácticamente todas las líneas, a excepción de SK-BR-3 en la cual se observó una clara disminución de la proteína.

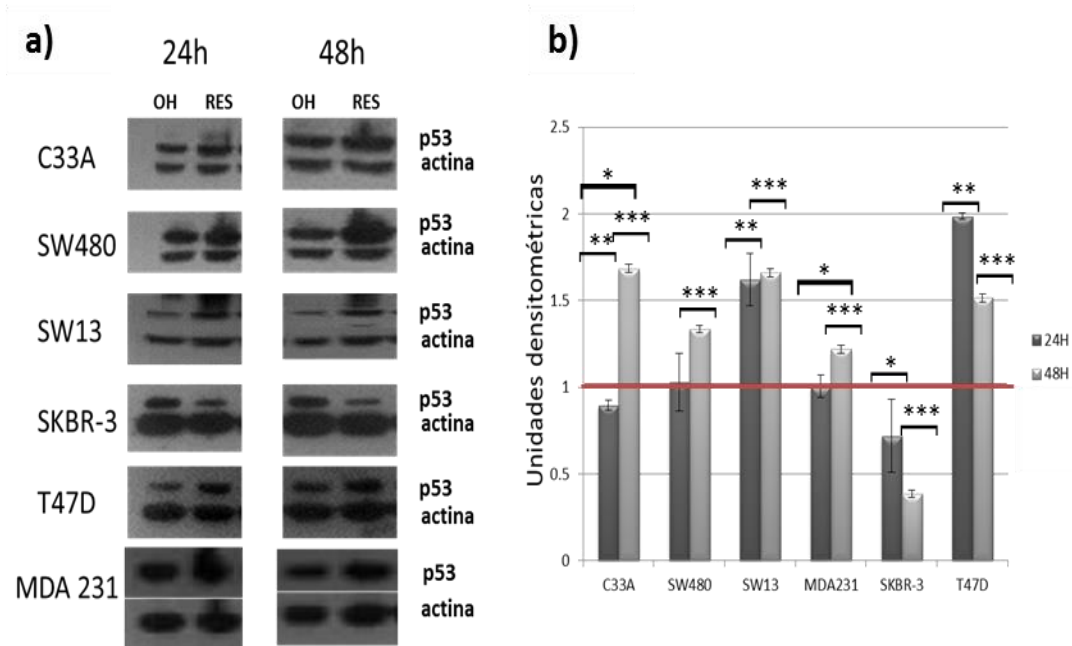


Figura 11. El resveratrol produce cambios en los niveles de proteína p53 total. Las líneas celulares fueron tratadas con etanol (vehículo) o resveratrol utilizando la IC₅₀ correspondiente de cada una por 24 y 48 h. a) Western blot representativo de dos ensayos independientes. OH: tratamiento con etanol; RES: tratamientos con resveratrol. b) Gráfica de densitometría. Línea continua representa tratamiento con etanol. * representa cambio significativo obtenido por análisis t-student (*=p<0.05, **=p<0.01; ***=p<0.001)

7.3. El resveratrol produce cambios en la expresión de genes blanco de p53 wt en líneas celulares p53 mt.

Con el fin de determinar si el RES ejercía su efecto de inhibición de proliferación celular mediante mecanismos relacionados a p53 wt, se analizaron los cambios en los niveles de expresión de mRNA de diversos genes blanco de p53. Las células fueron tratadas con su correspondiente RES IC50 por 24 horas y alternativamente se realizaron tratamientos con RES IC50 más pifitrina- α (30 $\mu\text{mol/L}$) que actúa como inhibidor de la actividad transcripcional de p53wt para determinar si la activación de estos genes es dependiente de un cambio de conformación de p53 mutante a "wt-like". En experimento se seleccionaron genes involucrados en arresto del ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis, para los cuales p53 presenta distinta afinidad.

No se observó incremento en los niveles de mRNA del gen TP53 en prácticamente ninguna línea celular, a excepción de la línea SW13 (Figura 12 f). Por otro lado, el tratamiento con resveratrol produjo un aumento significativo (del doble o más) en los niveles de transcrito del gen p21 en las seis líneas celulares estudiadas (Figura 12 a-f). Aunque se observa una tendencia de disminución del nivel de transcrito en presencia de pifitrina- α , en general no existe una diferencia significativa (Figura 12 a, c, d, f). En el caso de MDM2, regulador negativo de la proteína p53, se observó un aumento en el nivel de transcrito en las líneas MDA-MB-231 (Figura 12 c), SW13 (Figura 12 f), SW480 (Figura 12 b) y SK-BR-3 (Figura 12 e), mostrando ser regulado por p53 únicamente en la SK-BR-3. El nivel de transcrito del gen pro-apoptótico PUMA aumentó significativamente (doble o más) por RES en todas las líneas celulares utilizadas, a excepción de T47D (Figura 12 d), y de manera similar a lo sucedido con p21, se aprecia una tendencia hacia una regulación del gen dependiente la actividad transcripcional de p53 pero sin observarse una diferencia significativa. La expresión de BAX, otro gen pro-apoptótico estudiado, se

vio aumentada en las líneas MDA-MB-231 (Figura 12 c) y SK-BR-3 (Figura 12 e) donde la regulación por p53 no es tan evidente. Por último, el nivel del transcrito del gen GADD45B fue el que mostró un mayor aumento en prácticamente todas las líneas celulares, a excepción de MDA-MB-231 (Figura 12 c), observándose en C33A (Figura 12 a), SW480 (Figura 12 b), T47D (Figura 12 d) y SK-BR-3 (Figura 12 e) una inhibición en presencia de la pifitrina- α .

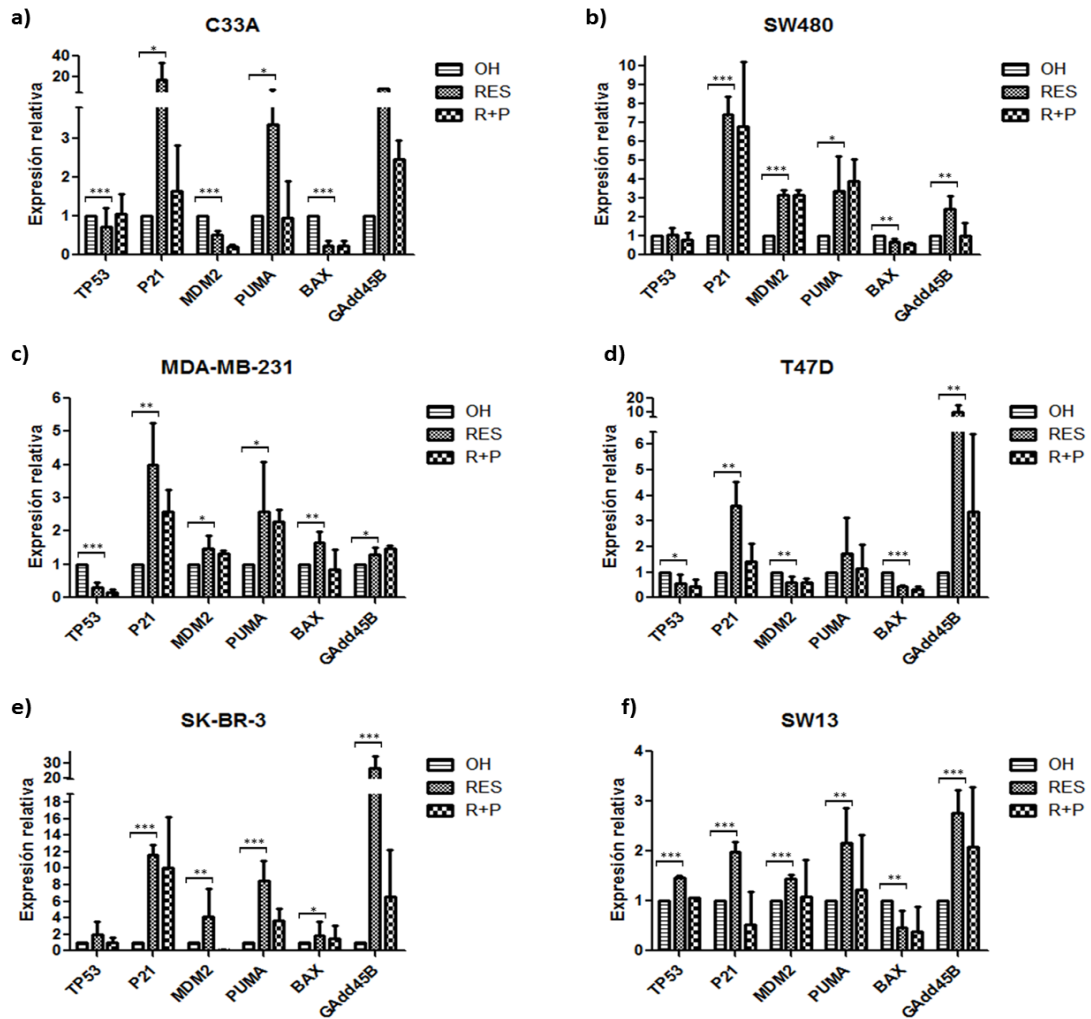


Figura 12. El resveratrol aumenta los niveles de expresión (mRNA) de genes blanco de p53wt en líneas celulares con p53mt. Los valores fueron determinados por RT-qPCR y están representados por número de veces de incremento para cada gen y normalizados con el gen constitutivo β 2M. Los datos muestran las medias \pm DS de por lo menos tres experimentos independientes. * representa cambio significativo obtenido por análisis t-student (*= p <0.05). "OH" "RES" y "R+P" tratamiento con vehículo EtOH, tratamiento con resveratrol, tratamiento con resveratrol y pifitrina por 24 horas, respectivamente.

8. DISCUSIÓN

El resveratrol es un prometedor agente quimiopreventivo y quimioterapéutico que media muchos blancos celulares en diferentes vías de señalización relacionadas al cáncer. La lista notable de los efectos beneficiosos demostrados en los organismos eucariotas y los seres humanos, explica el gran interés despertado por este compuesto. Dichos efectos benéficos incluyen propiedades anti-oxidantes, anti-envejecimiento, mejora de la sensibilidad a la insulina, reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular y quimiopreención del cáncer, entre otros (Pezzuto, 2011). Diversas publicaciones científicas recientes han reportado la actividad antiproliferativa y pro-apoptótica del resveratrol en una gran variedad de líneas celulares de cáncer humano que van desde líneas celulares de cáncer de próstata, de mama, linfoma, leucemia hasta mesotelioma (Can et al., 2012; Castillo-Pichardo and Dharmawardhane, 2012; Hussain et al., 2011; Iguchi et al., 2012; Juan et al., 2012; Lee et al., 2013).

Muchos mecanismos de acción se han postulado para explicar la actividad antiproliferativa del resveratrol. Estos incluyen la activación de la vía apoptótica intrínseca, la liberación mitocondrial de citocromo C con la participación de Bax, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la modulación de la ruta de la proteína supresora de tumor p53 y la activación de la vía extrínseca por receptores de muerte (Delmas et al., 2011). Los presentes resultados de los ensayos MTT demuestran que el resveratrol tiene un efecto negativo sobre la proliferación de las seis líneas celulares de cáncer estudiadas a pesar de tener mutaciones en p53. Sin embargo, en este trabajo no se determinó si la reducción en la biotransformación de MTT a cristales de formazán era debido a un efecto de arresto en la proliferación celular (citoestaticidad) o por muerte celular (citotoxicidad). Para determinar lo anterior se podría estudiar el efecto del resveratrol sobre la progresión del ciclo celular mediante el método de anexina V/yoduro de propidio. Lo anterior fue

previamente evaluado en nuestro grupo de trabajo en la línea celular C33A donde se observó que el tratamiento con 150 $\mu\text{mol/L}$ de resveratrol por 48 horas, en una concentración muy cercana a la IC_{50} determinada en el presente estudio, provocó un aumento en la fase S del ciclo celular induciendo la disminución correspondiente en la fase G_1 , observándose un efecto inverso cuando las células fueron tratadas a una mayor concentración de resveratrol (250 $\mu\text{mol/L}$). Posterior a eso se analizó apoptosis por citometría de flujo utilizando el método de anexina V y se observó un aumento en las células apoptóticas en los tratamientos con 150 $\mu\text{mol/L}$ de resveratrol sin mayor aumento al ser tratadas con una concentración mayor (250 $\mu\text{mol/L}$) (García-Zepeda et al., 2013).

Por otro lado, se ha reportado que el resveratrol interfiere específicamente con la cadena respiratoria mitocondrial, y conduce al aumento de la producción de ROS (Wallace, 1999). El estado redox de las células juega un papel importante en las distintas vías de apoptosis y las ROS producidas a nivel de mitocondria pueden estar implicadas en la muerte celular (Mignotte and Vayssiere, 1998). La modulación de las enzimas antioxidantes puede explicar la capacidad del resveratrol para inhibir el daño del DNA en linfocitos humanos inducidos por diversos compuestos tóxicos y su capacidad de funcionar como agente quimiopreventivo (Sener et al., 2007; Sengottuvelan et al., 2009; Sengottuvelan et al., 2006). La propiedad protectora del resveratrol también se ha demostrado en tejido cardíaco donde mediante microscopía electrónica se observó que el tejido tratado con DOX (20 mg/kg) resultaba en una fragmentación masiva y lisis de miofibrillas, así como vacuolización de la mitocondria o pérdida completa de la cresta mitocondrial; tratamientos simultáneos con resveratrol (10 mg/kg) redujeron el efecto negativo de la administración de DOX sobre el tejido cardíaco, donde los cardiomiocitos presentaban apariencia normal y la mitocondria mantenía su estructura habitual (Al-Harthi et al., 2014). La opinión actual es que el resveratrol puede funcionar tanto como pro-oxidante o anti-oxidante dependiendo de la concentración y el tipo de

célula donde es administrado (Delmas et al., 2011). Por ejemplo, la exposición de células de leucemia a concentraciones sub-letales de resveratrol ejerce una acción protectora que da lugar a la inhibición de la apoptosis inducida por fármacos (Ahmad et al., 2004). El fenómeno de la citoprotección a dosis bajas y la citotoxicidad en dosis altas se llama "hormesis". Hormesis describe la dosis-respuesta bi-fásica que es común no sólo para el resveratrol, sino también a muchos fitoquímicos (Ferrari et al., 2011).

El rescate de la función supresora de tumores de la proteína p53 se ha convertido en un enfoque atractivo para el desarrollo de terapias contra el cáncer (Selivanova, 2010). La activación farmacológica de p53 en células de cáncer puede inducir diversas respuestas positivas o negativas para su erradicación que van desde la detención del crecimiento y la reparación del DNA hasta la muerte celular lo que limita la aplicación clínica eficiente de medicamentos dirigidos a la reactivación de p53. Elucidar los mecanismos moleculares que definen el resultado biológico de la activación de p53 sigue siendo un gran desafío en el campo de estudio de la proteína (Feldser et al., 2010; Junttila et al., 2010; Vousden and Prives, 2009; Xue et al., 2007). Recientemente, se determinó que la activación farmacológica de p53 junto con la inhibición de la tioredoxina reductasa ocasionada por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), dan como resultado letalidad sintética en células cancerosas. Las ROS promueven la activación de cinasa c-Jun N terminal (JNK) como respuesta al daño, estableciendo un "loop" de retroalimentación positiva con p53, permitiendo que p53 en estado activo evite desencadenar mecanismos de detención del crecimiento y senescencia optando por apoptosis. Complementariamente, estos investigadores identificaron varios oncogenes relacionados con supervivencia inhibidos por p53 dependiente de la JNK, incluyendo MCL1, PI3K, eIF4E, así como inhibidores de p53 Wip1 y MDM4. Mostraron que la ablación de Wip1, uno de los ejecutores cruciales "corriente abajo" de JNK confiere una respuesta transcripcional mejorada y sostenida de p53

que contribuye a la muerte celular. Sus resultados proporcionaron nuevos conocimientos para la manipulación de la respuesta de p53 en una forma controlada, lo que propone una nueva estrategia farmacológica para explotar un nivel anormalmente alto de ROS, a menudo vinculada con una mayor agresividad en el cáncer, para matar selectivamente las células cancerosas a partir de la reactivación farmacológica de p53 (Shi et al., 2014).

Se ha sugerido previamente que la proteína p53 juega un papel muy importante en las propiedades anticancerígenas del resveratrol. El resveratrol induce ROS lo que genera una respuesta de activación de proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), cinasas c-Jun NH2-terminal (JNKs) y la cinasa p38 que induce la activación de p53 mediante modificaciones post-traduccionales (fosforilación de serina 15) (She et al., 2001). Las células cancerosas a menudo aumentan la carga de estrés oxidativo y por lo tanto es probable que sean más sensibles a los daños promovidos por insultos que generen mayor ROS (Shi et al., 2014), como el generado por el resveratrol.

El resveratrol causa la acumulación nuclear de la enzima ciclo-oxigenasa (COX) -2 y de la proteína supresora de tumor p53. La sumoilación es importante para la estabilización de p53 y una interacción COX-2-SUMO-1 sugiere sumoilación de COX-2 en las células tratadas con resveratrol. Estudios de inmunoprecipitación de cromatina han mostrado la unión de COX-2 (nuclear inducida) a la región promotora de PIG3 y Bax, genes pro-apoptóticos blanco de p53wt transcripcionalmente activo. La acumulación nuclear de ERK1/2 activada y COX-2 sumoilada son esenciales para la apoptosis inducida por resveratrol mediada por pSer-15-p53 en células de cáncer de ovario humano (Lin et al., 2011). Las modificaciones postraduccionales confieren a la proteína p53 una mayor estabilidad y se ha observado la presencia de p53 fosforilada constitutivamente en

el residuo de serina 15 en células de cáncer, hecho que puede estar relacionado con la carga acumulativa de estrés oxidativo en las mismas.

Los resultados de los western blots, realizados en este proyecto, mostraron un aumento en los niveles de la proteína p53 total en las líneas celulares de cáncer con p53 mt al ser tratadas con resveratrol; sin embargo, no se apreció un aumento en los niveles del transcrito del gen al ser analizados por RT-qPCR, por lo que podemos inferir que el resveratrol puede tener un efecto mayor sobre la activación y la estabilidad de la molécula (modificaciones post-traduccionales) y no sobre la expresión transcripcional de la misma. Podríamos analizar el efecto del resveratrol en la activación y estabilidad de p53 analizando (mediante western blot) el probable aumento de p53 fosforilada contra la proteína total.

De manera interesante, determinamos que el resveratrol aumentó significativamente los niveles de expresión del mRNA de los genes P21, PUMA y GADD45B. Por otro lado, el nivel de mRNA de MDM2 aumentó de manera moderada a alta, mientras que el nivel de mRNA de BAX solo aumentó en la línea MDA-MB-231. Asumiendo un posible cambio de conformación de la proteína p53mt hacia una “wt-like”, el patrón de expresión de los diferentes genes pudiera estar relacionado principalmente a: 1) las diferencias en las secuencias de unión a p53wt de cada promotor; 2) las características intrínsecas de cada mutante y su comportamiento producido por el resveratrol; 3) la afinidad de cada mutante hacia los diferentes promotores, en relación a las características de cada línea celular. Por otro lado, los experimentos realizados en presencia de la pifitrina- α , muestran una tendencia hacia la disminución de la expresión de los genes blanco de p53wt sugiriendo que la activación de los genes podría estar siendo regulada en parte por p53 mutante, aunque estos resultados no mostraron significancia estadística. Otra manera de determinar la regulación de p53 remodelada sobre sus genes blanco sería estudiando la interacción mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) o por

medio de transfecciones de las mutantes o la p53 wt en células p53 null. Este resultado abre varias opciones para explicar la regulación de estos genes. Por un lado es posible, aunque poco probable, que el aumento en la proteína p53 mutante sea suficiente para aumentar los niveles de expresión de los genes antes mencionados, considerando que muchas mutantes conservan una baja o mínima actividad transcripcional relacionada a p53wt. Sin embargo, la línea celular SK-BR-3 fue de las que mayor actividad transcripcional de genes blanco regulados por p53wt tuvo, a pesar de ser la única en donde se observó una clara disminución en el nivel de proteína p53. El resultado anterior puede estar relacionado a que el efecto del resveratrol hacia una posible conversión de la proteína mutante hacia una “wt-like” fuera más evidente, dando lugar a una mayor regulación de sus genes blanco y que dicha conformación adquirida permita a la proteína p53 ser regulada negativamente por MDM2. Por otra parte, pudiera darse un cambio conformacional de las proteínas de mutante a una wt-like y que este cambio provocado por el resveratrol sea solo parcialmente inhibido por la pifitrina- α . Es conocido que la proteína p73 perteneciente a la familia p53 también es capaz de regular a muchos de los genes que regula p53wt y que al igual que p53 la proteína p73 está sujeta a una inhibición de su actividad transcripcional por su unión a p53 mutantes. Es posible que el cambio de conformación en las mutantes de p53 no esté dirigido a su reactivación wt-like, sino que este cambio inhibiera su unión a p73, permitiendo la actividad transcripcional de ésta. Finalmente, existe la posibilidad que la activación de los genes relacionados a la ruta inhibitoria de la proliferación y a rutas pro-apoptóticas de p53wt sea lograda por el resveratrol de manera totalmente independiente de p53 y sea mediada por otros miembros de la familia como p73.

9. CONCLUSIONES

El resveratrol inhibe la proliferación de manera dosis dependiente en las líneas celulares de cáncer con un fenotipo p53 mutante. Las dosis IC50 determinadas se encuentran entre 110-182 $\mu\text{mol/L}$.

El resveratrol produjo un aumento en los niveles de proteína p53 más no en su nivel de transcrito lo que sugiere un efecto de estabilización de la proteína.

El resveratrol indujo la expresión de genes blanco de la proteína p53 wt en líneas celulares que sólo expresan p53mt, lo que sugiere una reactivación de la función supresora de tumor de la proteína.

10. PERSPECTIVAS

- Analizar el nivel de mRNA de genes blanco de la proteína p53 wt en las líneas celulares (p53 mt) tratadas y no tratadas con Resveratrol a tiempos menores (12h) y mayores (48h).
- Realizar transfecciones con los plásmidos que expresan las proteínas p53 mutantes R175H, R273C, R273H, R248Q y el plásmido para la P53wt en la línea celular SAOS-2 y determinar por Western blot, los niveles de expresión de las proteínas P53wt y P53mt, en ausencia o presencia de Resveratrol.
- Analizar mediante RT-qPCR la expresión del mRNA de genes blanco de P53 silvestre (P21, PUMA, NOXA, BAX, PIG3, GADD45, TP53, TP53INP) en células SAOS-2 transfectadas con los distintos plásmidos de p53 mt, tratadas y no tratadas con Resveratrol.
- Confirmar, por inmunohistoquímica, si se produce un cambio de conformación en la proteína P53, de mutante a silvestre en las líneas celulares mencionadas, al ser tratadas con el Resveratrol, utilizando los anticuerpos Pab240 (ó DO-1) que reconoce tanto la forma silvestre como mutante de la proteína p53, y Pab1620 específico para p53 wt.
- Determinar si el aumento de mRNA de genes blanco de p53wt causada por el RES es ocasionada por la actividad transcripcional de p73 mediante la utilización de siRNA.
- Estudiar si en las líneas celulares tumorales que expresan P53mt, el Resveratrol coopera con el agente quimioterapéutico cisplatino para revertir la resistencia a este fármaco al actuar de manera sinérgica en la inducción de la apoptosis y favorecer la expresión de genes blanco de P53wt.

11. REFERENCIAS

- Ahmad, K.A., Clement, M.V., Hanif, I.M., and Pervaiz, S. (2004). Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu nonpermissive for death execution. *Cancer research* *64*, 1452-1459.
- Ahmad, N., Adhami, V.M., Afaq, F., Feyes, D.K., and Mukhtar, H. (2001). Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *7*, 1466-1473.
- Ahn, J., Byeon, I.J., Byeon, C.H., and Gronenborn, A.M. (2009). Insight into the structural basis of pro- and antiapoptotic p53 modulation by ASPP proteins. *The Journal of biological chemistry* *284*, 13812-13822.
- Al-Harhi, S.E., Alarabi, O.M., Ramadan, W.S., Alaama, M.N., Al-Kreathy, H.M., Damanhour, Z.A., Khan, L.M., and Osman, A.M. (2014). Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by resveratrol. *Molecular medicine reports* *10*, 1455-1460.
- Athar, M., Back, J.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., and Kim, A.L. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics* *486*, 95-102.
- Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., and Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes & development* *14*, 704-718.
- Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)* *2*, 409-418.
- Braithwaite, A.W., Del Sal, G., and Lu, X. (2006). Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell death and differentiation* *13*, 984-993.
- Britton, R.G., Kovoov, C., and Brown, K. (2015). Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1348*, 124-133.
- Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature reviews Cancer* *9*, 701-713.
- Brown, C.J., Cheok, C.F., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2011). Reactivation of p53: from peptides to small molecules. *Trends in pharmacological sciences* *32*, 53-62.
- Burger, H., Loos, W.J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R.H., and Wiemer, E.A. (2011). Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* *14*, 22-34.
- Bykov, V.J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature medicine* *8*, 282-288.
- Can, G., Cakir, Z., Kartal, M., Gunduz, U., and Baran, Y. (2012). Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells. *Anticancer research* *32*, 2673-2678.
- Cano, C.E., Gommeaux, J., Pietri, S., Culcasi, M., Garcia, S., Seux, M., Barelier, S., Vasseur, S., Spoto, R.P., Pebusque, M.J., *et al.* (2009). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer research* *69*, 219-226.

Castillo-Pichardo, L., and Dharmawardhane, S.F. (2012). Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of gefitinib in breast cancer. *Nutrition and cancer* 64, 1058-1069.

Contente, A., Dittmer, A., Koch, M.C., Roth, J., and Dobbelstein, M. (2002). A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nature genetics* 30, 315-320.

Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A., and Poon, R.Y. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Molecular and cellular biology* 24, 3536-3551.

Charlot, J.F., Nicolier, M., Pretet, J.L., and Mougín, C. (2006). Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11, 813-827.

Chen, X., Zheng, Y., Zhu, J., Jiang, J., and Wang, J. (2001). p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* 20, 769-774.

Cheok, C.F., Verma, C.S., Baselga, J., and Lane, D.P. (2011). Translating p53 into the clinic. *Nature reviews Clinical oncology* 8, 25-37.

Chun, Y.J., Kim, M.Y., and Guengerich, F.P. (1999). Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 262, 20-24.

Davies, L., Spiller, D., White, M.R., Grierson, I., and Paraoan, L. (2011). PERP expression stabilizes active p53 via modulation of p53-MDM2 interaction in uveal melanoma cells. *Cell death & disease* 2, e136.

Dearth, L.R., Qian, H., Wang, T., Baroni, T.E., Zeng, J., Chen, S.W., Yi, S.Y., and Brachmann, R.K. (2007). Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis* 28, 289-298.

Delmas, D., Solary, E., and Latruffe, N. (2011). Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Current medicinal chemistry* 18, 1100-1121.

Dell'Orso, S., Ganci, F., Strano, S., Blandino, G., and Fontemaggi, G. (2010). ID4: a new player in the cancer arena. *Oncotarget* 1, 48-58.

Diaz-Chavez, J., Fonseca-Sanchez, M.A., Arechaga-Ocampo, E., Flores-Perez, A., Palacios-Rodriguez, Y., Dominguez-Gomez, G., Marchat, L.A., Fuentes-Mera, L., Mendoza-Hernandez, G., Gariglio, P., *et al.* (2013). Proteomic profiling reveals that resveratrol inhibits HSP27 expression and sensitizes breast cancer cells to doxorubicin therapy. *PLoS one* 8, e64378.

Diaz-Gerevini, G.T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M.C., Das, U.N., and Eynard, A.R. (2016). Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* 32, 174-178.

Duan, W., Gao, L., Wu, X., Zhang, Y., Otterson, G.A., and Villalona-Calero, M.A. (2006). Differential response between the p53 ubiquitin-protein ligases Pirh2 and Mdm2 following DNA damage in human cancer cells. *Experimental cell research* 312, 3370-3378.

Feldser, D.M., Kostova, K.K., Winslow, M.M., Taylor, S.E., Cashman, C., Whittaker, C.A., Sanchez-Rivera, F.J., Resnick, R., Bronson, R., Hemann, M.T., *et al.* (2010). Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature* 468, 572-575.

Ferrari, N., Tosetti, F., De Flora, S., Donatelli, F., Sogno, I., Noonan, D.M., and Albini, A. (2011). Diet-derived phytochemicals: from cancer chemoprevention to cardio-oncological prevention. *Current drug targets* 12, 1909-1924.

Garcia-Zepeda, S.P., Garcia-Villa, E., Diaz-Chavez, J., Hernandez-Pando, R., and Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *Eur J Cancer Prev* 22, 577-584.

Girardini, J.E., Marotta, C., and Del Sal, G. (2014). Disarming mutant p53 oncogenic function. *Pharmacological research* 79, 75-87.

Gupta, S.C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J.H., and Aggarwal, B.B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215, 150-160.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 822-842.

Hosseini, A., and Ghorbani, A. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna journal of phytomedicine* 5, 84-97.

Hui, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J., and Foster, D.A. (2006). Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* 25, 7305-7310.

Hussain, A.R., Uddin, S., Bu, R., Khan, O.S., Ahmed, S.O., Ahmed, M., and Al-Kuraya, K.S. (2011). Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. *PloS one* 6, e24703.

Iguchi, K., Toyama, T., Ito, T., Shakui, T., Usui, S., Oyama, M., Inuma, M., and Hirano, K. (2012). Antiandrogenic activity of resveratrol analogs in prostate cancer LNCaP cells. *Journal of andrology* 33, 1208-1215.

Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2008). Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual review of biochemistry* 77, 557-582.

Juan, M.E., Alfaras, I., and Planas, J.M. (2012). Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharmacological research* 65, 584-591.

Junttila, M.R., Karnezis, A.N., Garcia, D., Madriles, F., Kortlever, R.M., Rostker, F., Brown Swigart, L., Pham, D.M., Seo, Y., Evan, G.I., *et al.* (2010). Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours. *Nature* 468, 567-571.

Karimi, M., Conserva, F., Mahmoudi, S., Bergman, J., Wiman, K.G., and Bykov, V.J. (2010). Extract from Asteraceae *Brachylaena ramiflora* induces apoptosis preferentially in mutant p53-expressing human tumor cells. *Carcinogenesis* 31, 1045-1053.

Kaur, S., Singh, G., and Kaur, K. (2014). Cancer stem cells: an insight and future perspective. *Journal of cancer research and therapeutics* 10, 846-852.

Kim, D.H., Jung, Y.J., Lee, J.E., Lee, A.S., Kang, K.P., Lee, S., Park, S.K., Han, M.K., Lee, S.Y., Ramkumar, K.M., *et al.* (2011). SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. *American journal of physiology Renal physiology* 301, F427-435.

King, F.W., Wawrzynow, A., Hohfeld, J., and Zylicz, M. (2001). Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *The EMBO journal* 20, 6297-6305.

Lee, J.H., Kang, Y., Khare, V., Jin, Z.Y., Kang, M.Y., Yoon, Y., Hyun, J.W., Chung, M.H., Cho, S.I., Jun, J.Y., *et al.* (2010). The p53-inducible gene 3 (PIG3) contributes to early cellular response to DNA damage. *Oncogene* 29, 1431-1450.

Lee, Y.J., Im, J.H., Won, S.Y., Kim, Y.B., Cho, M.K., Nam, H.S., Choi, Y.J., and Lee, S.H. (2013). Synergistic anti-cancer effects of resveratrol and chemotherapeutic agent clofarabine against human malignant mesothelioma MSTO-211H cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 52, 61-68.

Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L.A., Alvarez-Rios, E., Garcia-Mena, J., and Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev* 22, 11-20.

Levi, F., Pasche, C., Lucchini, F., Ghidoni, R., Ferraroni, M., and La Vecchia, C. (2005). Resveratrol and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 14, 139-142.

Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews Cancer* 9, 749-758.

Li, Y., and Prives, C. (2007). Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 26, 2220-2225.

Liang, X.Q., Cao, E.H., Zhang, Y., and Qin, J.F. (2004). A P53 target gene, PIG11, contributes to chemosensitivity of cells to arsenic trioxide. *FEBS letters* 569, 94-98.

Lin, C., Crawford, D.R., Lin, S., Hwang, J., Sebuyira, A., Meng, R., Westfall, J.E., Tang, H.Y., Yu, P.Y., Davis, P.J., *et al.* (2011). Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 32, 19-26.

Lin, H.Y., Shih, A., Davis, F.B., Tang, H.Y., Martino, L.J., Bennett, J.A., and Davis, P.J. (2002). Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *The Journal of urology* 168, 748-755.

Liu, Y.X., Wang, J., Guo, J., Wu, J., Lieberman, H.B., and Yin, Y. (2008). DUSP1 is controlled by p53 during the cellular response to oxidative stress. *Molecular cancer research : MCR* 6, 624-633.

Lukashchuk, N., and Vousden, K.H. (2007). Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Molecular and cellular biology* 27, 8284-8295.

Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164, 6509-6519.

Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *European journal of biochemistry / FEBS* 252, 1-15.

Nowak, J., and Iovanna, J.L. (2009). TP53INP2 is the new guest at the table of self-eating. *Autophagy* 5, 383-384.

O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., *et al.* (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer research* 57, 4285-4300.

Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001008.

Pecorino, L. (2008). *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets, and therapeutics*, 2nd edn (Oxford ; New York: Oxford University Press).

Perk, J., Iavarone, A., and Benezra, R. (2005). Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nature reviews Cancer* 5, 603-614.

Pezzuto, J.M. (2011). The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215, 123-130.

Piovesan, B., Pennell, N., and Berinstein, N.L. (1998). Human lymphoblastoid cell lines expressing mutant p53 exhibit decreased sensitivity to cisplatin-induced cytotoxicity. *Oncogene* 17, 2339-2350.

Qian, H., Wang, T., Naumovski, L., Lopez, C.D., and Brachmann, R.K. (2002). Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. *Oncogene* 21, 7901-7911.

Ren, Z., Wang, L., Cui, J., Huoc, Z., Xue, J., Cui, H., Mao, Q., and Yang, R. (2013). Resveratrol inhibits NF- κ B signaling through suppression of p65 and I κ B kinase activities. *Die Pharmazie* 68, 689-694.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 402-412.

Rimando, A.M., and Suh, N. (2008). Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer. *Planta medica* 74, 1635-1643.

Rochette, P.J., Bastien, N., Lavoie, J., Guerin, S.L., and Drouin, R. (2005). SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *Journal of molecular biology* 352, 44-57.

Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Molecular cell* 8, 781-794.

Sarkar, F.H., and Li, Y. (2006). Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer research* 66, 3347-3350.

Selivanova, G. (2010). Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Seminars in cancer biology* 20, 46-56.

Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2007). Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 26, 2243-2254.

Sener, G., Topaloglu, N., Sehirli, A.O., Ercan, F., and Gedik, N. (2007). Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 20, 642-649.

Sengottuvelan, M., Deeptha, K., and Nalini, N. (2009). Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Chemico-biological interactions* 181, 193-201.

Sengottuvelan, M., Viswanathan, P., and Nalini, N. (2006). Chemopreventive effect of trans-resveratrol--a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 1038-1046.

Shakibaei, M., Harikumar, K.B., and Aggarwal, B.B. (2009). Resveratrol addiction: to die or not to die. *Molecular nutrition & food research* 53, 115-128.

She, Q.B., Bode, A.M., Ma, W.Y., Chen, N.Y., and Dong, Z. (2001). Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer research* 61, 1604-1610.

Shi, Y., Nikulenkov, F., Zawacka-Pankau, J., Li, H., Gabdoulline, R., Xu, J., Eriksson, S., Hedstrom, E., Issaeva, N., Kel, A., *et al.* (2014). ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. *Cell death and differentiation* 21, 612-623.

Strano, S., Dell'Orso, S., Di Agostino, S., Fontemaggi, G., Sacchi, A., and Blandino, G. (2007). Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* 26, 2212-2219.

Toledo, F., and Wahl, G.M. (2007). MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1476-1482.

Varoni, E.M., Lo Faro, A.F., Sharifi-Rad, J., and Iriti, M. (2016). Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Frontiers in nutrition* 3, 8.

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

Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.

Wang, Z., and Sun, Y. (2010). Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Translational oncology* 3, 1-12.

Wenzel, E., and Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular nutrition & food research* 49, 472-481.

Xu, Y. (2008). Induction of genetic instability by gain-of-function p53 cancer mutants. *Oncogene* 27, 3501-3507.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.