



Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

UNIDAD MONTERREY

Caracterización de la vía p53 en la sensibilización a la
radioterapia de tumores

Tesis que presenta

Diana Bautista Espinosa

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias
en la Especialidad de**

Ingeniería y Física Biomédicas

Codirectores de la Tesis

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Dr. Patricio Adrián Zapata Morín

Apodaca, Nuevo León

Septiembre, 2024

Índice

1. Agradecimientos	6
2. Resumen	7
3. Abstract	8
4. Introducción	9
5. Antecedentes	11
5.1. Cáncer como amenaza de salud pública	11
5.1.1. Rasgos del cáncer	12
5.1.2. Carcinogénesis	12
5.2. Radioterapia como terapia contra el cáncer	13
5.2.1. Daño al ADN	16
5.3. Vía de señalización p53	17
5.3.1. p53 como proteína supresora de tumores	17
5.3.2. Regulación basal de p53	17
5.3.3. Activación de p53 por daño al ADN	18
5.3.4. Regulación de la respuesta de p53 al daño del ADN	20
5.4. Dinámica de p53	21
5.5. Destino celular desencadenado por la respuesta de p53	23
5.5.1. Arresto celular	24
5.5.2. Apoptosis	24
5.6. Modelos matemáticos de la vía p53	26
5.7. Malfuncionamiento de la vía de p53 en cáncer	27
5.7.1. Vía p53 en células cancerígenas MCF-7	28
6. Hipótesis	31
7. Objetivos	31

7.1. Objetivo general	31
7.2. Objetivos específicos	31
8. Metodología	32
8.1. Estudio transcriptómico	32
8.2. Análisis de expresión genética diferencial	32
8.3. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes	33
8.4. Modelado matemático de la vía p53 en respuesta a IR	33
8.5. Comparación de la respuesta celular	34
8.6. Búsqueda <i>in silico</i> de blancos terapéuticos	35
9. Resultados	36
9.1. Análisis de los genes expresados diferencialmente	36
9.1.1. Genes diferencialmente expresados	36
9.2. Modelado matemático de la vía p53	37
9.2.1. Validación del modelo simplificado	38
9.2.2. Participación de proteínas no modeladas previamente en vía p53	39
9.2.3. Modelo actualizado de la vía p53	41
9.2.4. Comportamiento de la célula MCF-7 ante la irradiación	42
9.3. Alteraciones en la vía p53 con potencial terapéutico	43
10. Discusión	48
11. Conclusiones	61
12. Perspectivas	63
13. Anexo 1	64
14. Bibliografía	77

Índice de figuras

1.	Progresión de la tasa de mortalidad por cáncer en México de 2010-2021. Tomado de (CIMA Fundación, 2020).	12
2.	Rasgos característicos del cáncer. Se presentan los seis rasgos clásicos (Hanahan y Weinberg, 2000) y los considerados en la actualización (Hanahan y Weinberg, 2011): desregulación energética, evasión de la respuesta inmunitaria, favorecimiento de la inflamación e inestabilidad genómica. Tomado de Kumar et al. (2021).	13
3.	Carcinogénesis provocada por un agente dañino del ADN.	13
4.	Vías moleculares encontrados en el enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente.	36
5.	Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 10Gy. La tacha negra simboliza el momento donde ocurre la apoptosis.	38
6.	Maquinaria molecular modelada de la vía de p53 ante irradiación gamma. . .	39
7.	Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 10Gy en un modelo simplificado. La tacha negra simboliza el momento donde ocurre la apoptosis.	39
8.	Interacciones de las proteínas agregadas con las demás moléculas de la vía p53. Se ve así la inhibición de p53 por CCNG1, el bucle de retroalimentación positiva de p53-PLK3, y finalmente, el papel dual de RBM38 respectivamente.	42
9.	Actualización del modelado molecular de la vía p53 con los genes diferencialmente expresados encontrados.	43
10.	Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 2Gy.	43
11.	Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 10Gy. La tacha negra simboliza el momento donde ocurre la apoptosis.	44

12.	Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula MCF-7 ante la irradiación de 2Gy.	44
13.	Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula MCF-7 ante la irradiación de 10Gy.	48

Índice de tablas

1.	Procesos biológicos de los genes expresados diferencialmente	37
2.	Alteraciones en la vía que provocan la evasión de la muerte celular en células saludables ante dosis de 10 Gy	44
3.	Alteraciones en la vía que provocan la muerte celular en células MCF-7 ante dosis de 10 Gy	46
4.	Valores de los parámetros del modelo matemático de vía p53.	64
5.	Ecuaciones diferenciales del modelo matemático de vía p53.	72

1. Agradecimientos

A las personas que me vieron crecer: Laura, Manuel y Angélica; son y serán siempre mi ancla en la vida. Gracias por siempre alentarme a ser la versión que yo deseo, sabiendo que siempre tendré su apoyo incondicional.

A mis amigas Carolina y Arantxa que estuvieron conmigo estos dos años. Estoy tan orgullosa de ustedes y de poder decir que fui su compañera.

A Orlando, Citlalli, Carolina y Arantxa; haría mil maestrías para poder conocerlos de nuevo.

A mis personas incondicionales: Alexia, Cinthya, Ediner, Pedro y Valeria; jamás podré explicarles lo feliz que me siento de ser parte de su vida. Gracias por todo.

A mis directores de tesis, Dr. Jesús Rodríguez y Dr. Patricio Zapata; gracias por sus consejos y apoyo en la realización de mi proyecto.

Al CINVESTAV y CONAHCyT por permitirme culminar esta maestría.

2. Resumen

La vía p53 está estrechamente relacionada con la inducción de muerte celular cuando las células son sometidas a radioterapia. Sin embargo, alteraciones en la vía presentadas en células cancerígenas pueden causar resistencia a la apoptosis inducida por la radiación. Por ello, en el presente trabajo se buscó actualizar el modelo matemático con la mayor cantidad de maquinaria molecular y sus interacciones que componen la vía p53 presentada por células de cáncer de mama MCF-7 resistentes a radioterapia. Esta actualización se realizó con información transcriptómica, en la que se identificaron tres genes expresados diferencialmente, PLK3, RBM38 y CCNG1, cuyas proteínas e interacciones de la vía no han sido modeladas anteriormente.

Al comparar la respuesta celular de una célula sana y una de cáncer MCF-7, se observó que PTEN es relevante para inducir la muerte celular en consecuencia a la irradiación gamma, ya que el silenciamiento de su gen presentado por estas células cancerígenas provoca la evasión de la muerte celular incluso en altas dosis de radiación gamma. Con el uso de este modelo actualizado, se propone también la estimulación o inhibición de los genes HDM2, HIPK2, AKT, PI3K, PIP3, PLK3, Bax y CASP, y/o sus proteínas codificadas que conforman la vía, con el fin de sensibilizar nuevamente a estas células resistentes al ser irradiadas. De esta forma, se podrían diseñar nuevos experimentos que consideren estos potenciales objetivos terapéuticos para utilizar terapias combinadas y potenciar los resultados radioterapéuticos.

3. Abstract

The p53 pathway is closely related to the induction of cell death when cells are subjected to radiotherapy. However, alterations in the pathway presented in cancer cells can cause resistance to the radiation-induced apoptosis. Therefore, in the present work it was aimed to update the mathematical model with the largest amount of molecular machinery and their interactions that makes up the p53 pathway presented by MCF-7 radiotherapy-resistant breast cancer cells. This update was carried out with transcriptomic information, in which three differentially expressed genes were identified, PLK3, RBM38 and CCNG1, whose proteins and pathway interactions have not been modeled before.

By comparing the cellular response of a healthy and MCF-7 cancer cells, it was noted that PTEN is relevant in the induction of cell death undergoing gamma radiation, since the silencing of its gene presented by these cancer cells provokes the evasion of cell death even in high doses of gamma radiation. With the use of this updated model, the stimulation or inhibition of the genes Hdm2, HIPK2, AKT, PI3K, PIP3, PLK3, Bax and CASP, and their encoded proteins that make up the pathway is also proposed, in order to sensitize again these resistant cells when irradiated. In this way, new experiments could be designed that consider these potential therapeutic objectives to use combined therapies and enhance radiotherapeutic results.

4. Introducción

El cáncer es una amenaza global de salud pública, cuya incidencia se pronostica que tendrá una tendencia de aumento en las próximas décadas (Organización Mundial de la Salud, 2022). Actualmente las terapias contra esta enfermedad cuyo mecanismo de acción involucra el daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), como la radioterapia, son ampliamente utilizadas y han ayudado a aumentar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes diagnosticados con cáncer (Wu et al., 2023). A pesar de ello, la tasa de mortalidad de esta patología es alta en parte porque las terapias actuales no logran erradicar completamente las células cancerígenas (Paek et al., 2016); lo que se debe en gran parte a la resistencia que las células cancerígenas pueden presentar o desarrollar en consecuencia, potencialmente desencadenando una recurrencia del cáncer más agresiva (Wu et al., 2023).

Por lo tanto, la búsqueda de terapias combinatorias que permitan sensibilizar a las células es una área activa, donde el desarrollo de nuevos fármacos y la terapia personalizada son atractivas propuestas. En ello se han desarrollado técnicas como el uso de RNAs pequeños de interferencia (siRNA) para el silenciamiento de genes. Sin embargo, la selección de los genes blanco es compleja y es recomendable primero estudiar su efecto de manera teórica.

La respuesta al daño al ADN, que como se mencionó anteriormente es el mecanismo de acción de la radioterapia, es amplia e involucra a diversas vías de señalización comúnmente alteradas en el cáncer. Resalta así la vía de p53, que se ha demostrado que es esencial para el inicio y el progreso, y, potencialmente, el tratamiento del cáncer (Mantovani et al., 2019). Mediante la dinámica del nivel de proteína p53, se logra codificar la identidad y dosis del agente dañino; y a partir de ello, provocar un destino celular como arresto celular, senescencia o apoptosis (Batchelor y Loewer, 2017). Por lo tanto, esta vía es esencial para mantener la integridad del genoma y responder al daño al ADN; lo que la convierte en relevante para la creación y mejora de tratamientos contra el cáncer.

Debido a esta función, grandes esfuerzos se han hecho para dilucidar la maquinaria molecular necesaria para la regulación y sobre la dinámica de p53, así de cómo es capaz de desencadenar la respuesta celular ante estrés. Particularmente los estudios se han centrado en los reguladores de la función de la proteína p53, y en cómo la dinámico nivel de proteína

p53 codifica la información del estímulo (Purvis y Lahav, 2013; Purvis et al., 2012; Lev Bar-Or et al., 2000). Sin embargo, la gran mayoría de los datos experimentales se han realizado en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, lo que resulta en una falta de conocimiento del comportamiento de la vía en células saludables e incluso en otras células cancerígenas. Lo anterior ha sesgado la información, pues ahora se ha identificado que casi de manera universal las células cancerígenas presentan diferentes mutaciones y alteraciones en la expresión de los genes involucrados en la vía de señalización de p53 (Lu et al., 2008). Esta limitación se traslada a los métodos cuantitativos como los modelos matemáticos que son una de las herramientas más utilizadas para estudiar la vía (Batchelor y Loewer, 2017).

Hasta ahora, no se ha realizado un estudio comparativo cuantitativo de la maquinaria molecular que integra a la vía de p53, y su función en la regulación y la determinación de la dinámica de p53 ante el daño al ADN entre células saludables y cancerígenas. Por ello, en el presente trabajo se pretende actualizar el modelo matemático que simula la vía de p53 en células sanas para incluir posteriormente las diferentes alteraciones que se han detectado en la línea celular cancerígena de mama MCF-7 para poder estudiar su efecto en la función y dinámica de p53. De esta manera también se pretende entender cómo es posible sensibilizar a las células sometidas a radioterapia mediante alteraciones en la vía de p53. Este estudio se realizará con un modelo actualizado con información transcriptómica que cuenta con la mayor cantidad de maquinaria molecular relacionada con las funciones descritas anteriormente, a fin de buscar dilucidar el comportamiento de la vía y la respuesta dinámica de p53 ante el daño al ADN en una célula normal y con ciertas alteraciones presentadas en la línea celular MCF-7.

5. Antecedentes

5.1. Cáncer como amenaza de salud pública

Actualmente el cáncer se considera como una patología altamente heterogénea, la cual engloba más de 200 tipos de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. En sí, cáncer es un término genérico utilizado para caracterizar a un grupo de células malignas que han perdido su control y especialización, y se multiplican de manera rápida y descontrolada (Silva et al., 2018; OMS, 2022). Esta patología comienza a desarrollarse a medida que las células anormales evitan la muerte celular programada, lo que les permite dividirse sin interrupción y formar masas denominadas tumores malignos. Al crecer estos tumores, puede producirse metástasis al desprenderse y extenderse las células a los tejidos cercanos, o moverse a través del sistema circulatorio y/o del linfático, e invadir otros tejidos (OMS, 2022).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los tumores malignos son la mayor amenaza para la salud humana. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estima que en 2020 mundialmente hubo de 19 a 19.6 millones nuevos casos de cáncer y de 9.7 a 10.2 millones de muertes en consecuencia (Ferlay et al., 2021). Además, las personas tienen alrededor de un 20 % de riesgo de contraer cáncer a lo largo de la vida antes de los 75 años y un 10 % de riesgo de morir en consecuencia (Ferlay et al., 2021). Tales incidencias se pronostican vayan en aumento en las próximas décadas (OMS, 2022). De hecho, se prevé que el cáncer se convierta en la principal causa de muerte en el siglo XXI, debido al rápido crecimiento demográfico y a la disminución de la mortalidad por enfermedades infecciosas y otras enfermedades no transmisibles (De Ruyscher et al., 2019).

En México, el cáncer es la cuarta causa de muerte (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2023). Durante 2021, a nivel nacional se registraron 90,525 defunciones por tumores malignos, y en promedio se contabilizan 190 mil nuevos casos al año; dichas cifras equivalen a 21 casos y 9 defunciones cada hora en el país (INEGI, 2023).

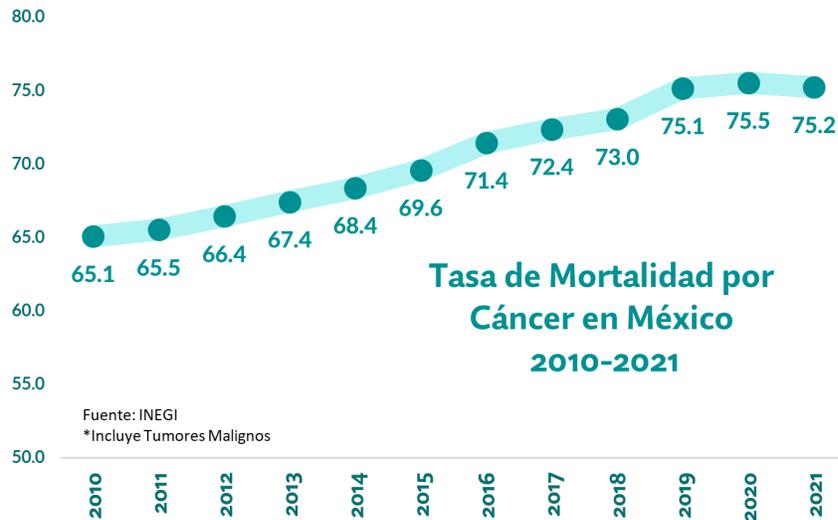


Figura 1: Progresión de la tasa de mortalidad por cáncer en México de 2010-2021. Tomado de (CIMA Fundación, 2020).

5.1.1. Rasgos del cáncer

El cáncer tiene rasgos (**Fig. 2**), es decir, las capacidades que va adquiriendo la célula durante el desarrollo y progresión de un cáncer (de Vaca et al., 2017). En particular, el rasgo de inestabilidad genómica es fundamental porque la integridad del genoma garantiza la generación de células hijas sanas constituyentes de tejidos homogéneos que realizan correctamente sus funciones biológicas. Por lo tanto, la inestabilidad genómica, que está representada por mutación, fusión, delección y reordenamiento o pérdida cromosómica (Abuetabh et al., 2022); a menudo conduce a enfermedades, incluido el cáncer (**Fig. 3**).

5.1.2. Carcinogénesis

El proceso por el cual se produce el cáncer (carcinogénesis) inicia por acumulaciones progresivas de mutaciones en el genoma (**Fig. 3**) y consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. Durante este proceso las células se vuelven autónomas y dejan de responder a regulación debido a una expresión anormal de su carga génica (Kreeger y Lauffenburger, 2009).



Figura 2: Rasgos característicos del cáncer. Se presentan los seis rasgos clásicos (Hanahan y Weinberg, 2000) y los considerados en la actualización (Hanahan y Weinberg, 2011): desregulación energética, evasión de la respuesta inmunitaria, favorecimiento de la inflamación e inestabilidad genómica. Tomado de Kumar et al. (2021).

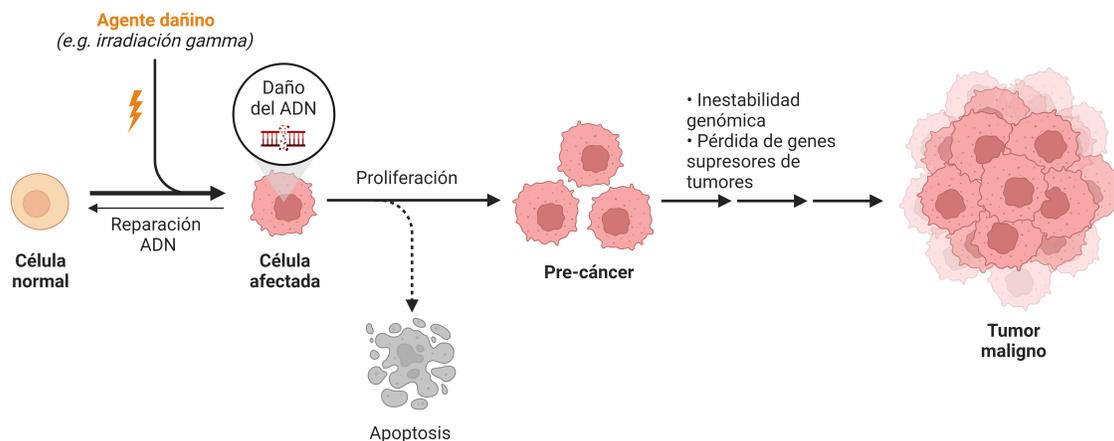


Figura 3: Carcinogénesis provocada por un agente dañino del ADN.

5.2. Radioterapia como terapia contra el cáncer

Para tratar el cáncer se utilizan cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, trasplante de células madre y combinaciones de ellas (Wu et al., 2023). Especialmente las estrategias que se basan fundamentalmente en la inducción de daño al ADN para

erradicar e inhibir el crecimiento de células cancerosas son enfoques integrales, como lo son la radioterapia (RT) (Abuetabh et al., 2022).

La RT es aplicada a aproximadamente la mitad de los pacientes como tratamiento curativo y para la paliación de los síntomas (Chandra et al., 2021). Esta terapia utiliza partículas u ondas de alta energía, tales como los rayos X, rayos gamma, rayos de electrones o de protones, para eliminar o dañar las células cancerosas, y por lo tanto, atacar y destruir el tejido tumoral (De Ruyscher et al., 2019).

Las dosis de radiación absorbida se miden en julios por kilogramo, expresado en la unidad gray (Gy) (Ahmad et al., 2012). Aunque la dosis provoca daño estructural inmediato del tejido, ionización del agua celular, generación de radicales libres de corta duración, daños en el ADN nuclear y mitocondrial, e inflamación (De Ruyscher et al., 2019); la eficacia de esta terapia se debe a que los electrones secundarios de la radiación puede romper los enlaces covalentes en la columna vertebral del fosfodiéster del ADN y generar las roturas de doble cadena (DSB) (Cleary et al., 2020), tales roturas también se provocan de manera indirecta por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan (De Ruyscher et al., 2019). Estos efectos son más dañinos para las células que se reproducen rápidamente como lo son las cancerígenas (Cleary et al., 2020).

Una de las principales desventajas de la RT es que el tejido sano alrededor del tumor puede resultar dañado provocando toxicidad de corto (durante de los 3 meses posteriores) y de largo plazo. Aunque la toxicidad aguda o a corto plazo generalmente se cura en semanas o meses, los efectos tardíos suelen considerarse irreversibles y progresivos en el tiempo (De Ruyscher et al., 2019). Tales efectos dependen en gran medida del tejido objetivo y pueden incluir daño gastrointestinal (GI) agudo, toxicidad cardíaca, deterioro cognitivo, trastornos reproductivos, deformidades y alteraciones del crecimiento óseo, pérdida de cabello y neoplasias malignas secundarias (De Ruyscher et al., 2019).

Otro problema con la RT es que aunque en teoría debería ser eficaz para todas las células tumorales, cada célula tiene una sensibilidad diferente a la radiación lo que genera diferentes efectos del tratamiento (Wu et al., 2023). Además, la RT suele ir acompañada del inevitable desarrollo de resistencia de las células cancerosas a la exposición a la radiación, lo cual es un

obstáculo importante en el tratamiento del cáncer (Huang y Zhou, 2020). Tal resistencia a la radioterapia (RR), definida como una reducción de la eficacia de la terapia antitumoral (Huang y Zhou, 2020), provoca fracaso de la RT, metástasis, recurrencia del cáncer, disminución de la calidad de vida y un mal pronóstico, lo cual aumenta el riesgo de un cáncer secundario posterior o enfermedades crónicas, incluida la diabetes tipo II o enfermedades cardiovasculares (Huang y Zhou, 2020). Además, durante el proceso de desarrollo de RR, un porcentaje de células en los tejidos tumorales también se vuelven más agresivas y son propensas a sufrir metástasis ganglionares y a distancia (Huang y Zhou, 2020).

Por lo tanto, se han propuesto radioprotectores o radiosensibilizadores específicos de tumores que permitan mejorar el índice terapéutico al administrar físicamente una dosis mucho mayor de radiación al tumor que a los demás órganos (De Ruyscher et al., 2019). Sin embargo, hasta ahora ningún agente de tal índole ha sido aprobado para aplicación clínica (Huang y Zhou, 2021). En cambio, actualmente la radiosensibilización tumoral se logra comúnmente combinando con quimioterapia (De Ruyscher et al., 2019), lo que lamentablemente presenta toxicidad superpuesta, dificultad de dosificación y algunas veces daño intolerable a los tejidos sanos (Li et al., 2023).

Bajo la misma justificación, se han desarrollado nuevas estrategias como la terapia génica, sin embargo, es necesario primero encontrar blancos terapéuticos prometedores para superar los mencionados principales obstáculos para la terapia contra el cáncer. Con este fin, se han llevado a cabo muchos estudios para investigar genes, moléculas y vías de señalización reguladores relacionados con la RR. En estas vías destaca la respuesta al daño del ADN (DDR), la cual en un contexto cancerígeno confieren radiorresistencia al tumor (Huang y Zhou, 2020). Esto es porque como se comentó anteriormente la capacidad de la radiación para controlar el cáncer depende predominantemente del daño al ADN inducido (Huang y Zhou, 2020); como resultado, la capacidad de las células tumorales para reparar el daño del ADN son esenciales para determinar el resultado de las células cancerosas. Por lo tanto, apuntar a la reparación del daño del ADN como método para sensibilizar a la radioterapia es una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento preciso y eficaz de los pacientes con cáncer.

5.2.1. Daño al ADN

Se considera daño al ADN como las modificaciones químicas anormales en su estructura que provocan mutaciones, reordenamientos y otras alteraciones de la información genética (Kim et al., 2019; Smieja et al., 2020). Estas lesiones son bastante comunes, de hecho se estima que en una célula ocurren hasta 105 por día (Ronco et al., 2017).

Entre los numerosos tipos de daños en el ADN, existen dos tipos principales: roturas de doble cadena (DSB) y roturas de una sola hebra (SSB). De ellos, el más grave son las DSB al ser las más citotóxicas (Sun et al., 2017; Ozen et al., 2020). Esto es porque la mayoría de las lesiones simples se reparan con rapidez y precisión, al contrario de las DSB más complejas que a menudo no se reparan o se reparan incorrectamente (Dolan et al., 2015). Aunque se considera el tipo de daño al ADN más letal, las DSB son escasas en condiciones fisiológicas normales (Li et al., 2023). Sin embargo, pueden ser provocadas por factores exógenos como exposición a la luz ultravioleta, irradiación ionizante (IR), fármacos citotóxicos o carcinógenos químicos (Ronco et al., 2017; Kim et al., 2019).

Afortunadamente, las células humanas cuentan con mecanismos de defensa para mantener la integridad del genoma, los cuales se denominan colectivamente vías de respuesta al daño del ADN (DDR) (Abuetabh et al., 2022). Éste puede definirse como una red compleja de vías de señalización interconectadas que cooperan para detectar, reparar y/o eliminar miles de lesiones del ADN en una célula (Kreeger y Lauffenburger, 2009). Sin embargo, este sistema no es perfecto y puede fallar. La acumulación de lesiones persistentes en el ADN conduce a la apoptosis, la senescencia o el cáncer. Este resultado depende en gran medida del tipo o estado de la célula y de su capacidad de DDR (Dolan et al., 2015). Por lo tanto, es importante comprender claramente el control de la DDR cuando se busca identificar nuevos objetivos para las intervenciones en el cáncer.

De los numerosos componentes del DDR, muchos estudios se han centrado en la proteína p53, ya que se considera uno de los reguladores clave más importantes de las rutas metabólicas celulares y del DDR (Malik et al., 2015).

5.3. Vía de señalización p53

5.3.1. p53 como proteína supresora de tumores

p53 es un factor de transcripción que regula el ciclo celular, la diferenciación, la inflamación, la respuesta inmune, el metabolismo, la reparación del ADN, entre otros procesos (Issaeva et al., 2019). Originalmente identificado como un importante ejecutor de la respuesta al daño del ADN que lo denominó "el Guardián del genoma", con una revisión más reciente, p53 se considera un centro molecular para las interacciones entre los factores estresantes internos y externos, como el estrés oxidativo, hipoxia, daño en el ADN, expresión de oncogenes, choque térmico, infección viral, estrés de replicación, disfunción ribosómica, entre otros (Amelio y Melino, 2020; Nguyen et al., 2017).

Ante estos factores de estrés, p53 presenta una impresionante variedad de capacidades protectoras, que incluyen la inducción de la detención del ciclo celular en los puntos de control, la senescencia celular, la reparación del ADN, la inhibición de la angiogénesis y la metástasis, y eliminación de las células excesivamente dañadas por apoptosis (Nguyen et al., 2017; Cao et al., 2020), lo que contribuye significativamente a su función de supresor de tumores.

5.3.2. Regulación basal de p53

En condiciones normales, p53 se encuentra principalmente en el citoplasma (Gudkov et al., 2011) donde tiene una vida media relativamente corta de entre 6 a 40 minutos (Levine, 2020). Aunque constantemente se crean nuevas moléculas, la baja duración es consecuencia de su rápida degradación (Nguyen et al., 2017; Luwang et al., 2021) lo que permite la proliferación normal de la célula.

Tal controlada expresión se debe a diversos mecanismos de regulación. Su principal regulador es la E3 ubiquitina ligasa Hdm2, codificada por el conocido oncogen HDM2, la cual regula negativamente tanto la estabilidad como la actividad de p53 (Nguyen et al., 2017). Esto es gracias a que Hdm2 citoplasmático se transporta al núcleo, donde regula p53 negativamente de dos maneras diferentes. En primer lugar, puede unirse directamente al dominio de transactivación de p53, promoviendo la translocación de p53 desde el núcleo al citoplasma, lo que suprime su capacidad para interactuar con la maquinaria transcripcional (Nguyen et

al., 2017). En segundo lugar promueve la degradación de p53 al ubiquitinar residuos de lisina específicos en el extremo C-terminal de p53, dirigiéndolo a su degradación mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Nguyen et al., 2017; Abuetabh et al., 2022).

Claramente, la interrupción de la interacción Hdm2-p53 es indispensable para la activación de p53; sin embargo, uno de los objetivos transcripcionales directos de p53 es el mismo Hdm2 (Chen et al., 2013). Esto forma un ciclo de retroalimentación negativa entre p53 y Hdm2 que mantiene a p53 en un nivel bajo en células no estresadas (Chen et al., 2013).

5.3.3. Activación de p53 por daño al ADN

Una de las formas más importantes de activación de p53 es a través del daño en el ADN (Hat et al., 2016). El daño es detectado por las llamadas proteínas de punto de control o quinasas dependientes del daño: ATM, ATR, DNAPK, Chk1, Chk2, JNK y P38 (Puszyński et al., 2008). Cada tipo de daño es reconocido por ciertas quinasas, las cuales activan a diferentes moléculas que forman diversos circuitos de retroalimentación en el DDR (Kreeger y Lauffenburger, 2009). Consecuentemente, los niveles de p53 oscilan o se sostienen creando una dinámica dependiente del estímulo que lo activa.

En particular, las DSB provocadas por agentes como la radiación gamma son detectadas rápidamente por el complejo Mre11-Rad50-NBS1 (MNR) que interactúa con la cromatina y, posteriormente, facilita el reclutamiento y la activación de la quinasa Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) (Ronco et al., 2017; Charan et al., 2023). ATM se encuentra en células no estresadas como un dímero no activo (Abuetabh et al., 2022), pero al detectarse el daño al ADN se une a los DSB y se monomeriza mediante autofosforilación en múltiples residuos de serina, incluido S1981 (Hat et al., 2016; Abuetabh et al., 2022). Después transmite la señal a un conjunto de enzimas transductoras, incluida la quinasa de punto de control 2 (Chk2) que amplifica las señales fosforilando una variedad de efectores (Ronco et al., 2017).

En general, la activación de p53 se refiere al aumento de su concentración que podría estar en forma fosforilada o acetilada (Chong et al., 2015). p53 puede asumir dos estados de fosforilación diferentes: arrestador y asesino (Hat et al., 2016). El primer estado se hipotetiza que facilita la supervivencia celular al activar la detención del ciclo celular y la reparación

del ADN; mientras que la segunda promueven programas de muerte celular al desencadenar vías de senescencia y apoptosis.

El ATM activado (ATM-P) fosforila a p53 en S15 y S20 del extremo N activándolo en su estado arrestador. Tales grupos fosfatos reducen su afinidad por Hdm2 (Abuetabh et al., 2022). Simultáneamente, ATM-P fosforila a Hdm2 en S395, lo que conduce a su inactivación, desestabilización y degradación rápida (Hat et al., 2016), lo que también reduce su eficiencia en la ubiquitinación de p53 (Eliaš, 2017; Charan et al., 2023). Todo esto provoca una alteración en el equilibrio entre p53 y Hdm2. De esta manera, la proteína p53 se acumula y se transloca al núcleo donde su concentración aumenta de 3 a 10 veces dentro de una hora después del daño (Eliaš, 2017; Lu et al., 2008; Cao et al., 2020). En el núcleo, p53 se agrega como dímero que luego forman tetrámeros, los últimos son las formas activas de p53 (Abuetabh et al., 2022; Gaglia y Lahav, 2014).

Por lo tanto, el circuito de retroalimentación p53-Hdm2 se compone de dos partes: una parte positiva lenta por la transcripción y traducción de Hdm2 inducida por p53, y una parte negativa rápida por la interacción de la proteína inducida por Hdm2 con p53. Como el retraso entre el aumento de p53 y el aumento de la transcripción de Hdm2 en la parte positiva es suficientemente largo, alrededor de 30 a 40 minutos, se producen comportamientos oscilatorios robustos y sostenidos de p53 y Hdm2 observados experimentalmente (Kim et al., 2009).

Las señales que activan a p53 e inactivan a Hdm2 ocurren en cuestión de minutos. Una vez estabilizada, la regulación de p53 funciona mediante interacciones proteína-proteína (que es una respuesta rápida) y mediante la transcripción de genes seleccionados (respuesta relativamente lenta) (Levine, 2020).

Además de rápido, el sistema es sensible, se ha encontrado que una o dos rupturas en el genoma humano son suficientes para la inducción parcial de ATM, y la activación completa de ATM se logra con menos de 20 DSB (Loewer et al., 2010). Como equivalencia, 1 Gy de irradiación induce alrededor de 35 a 40 DSB (Hat et al., 2016).

Incluso, p53 es excitable aún en condiciones no estresadas en células en proliferación que pueden mostrar pulsos espontáneos de p53 asociados con daño intrínseco del ADN (Loewer

et al., 2010). Esto significa que un estímulo transitorio, por ejemplo, un pulso corto de ATM, es suficiente para disparar un pulso completo de p53 (Eliaš, 2017).

Otro blanco de ATM es la E3 ubiquitina-proteína ligasa Siah1 que al fosforilarlo en S19 conduce a la interrupción del complejo HIPK2-SIAH1 que da como resultado la acumulación de la quinasa HIPK2. Esta quinasa fosforila a p53 arrestador en S46 a la forma "asesina" (Abuetabh et al., 2022), la cual está asociada con daño irreparable del ADN y respuesta promuerte (Prokhorova et al., 2020).

5.3.4. Regulación de la respuesta de p53 al daño del ADN

Un importante aspecto es que las proteínas cuya expresión es regulada por p53 están involucradas en su regulación. Estas proteínas comprenden una red reguladora compleja gobernada por múltiples bucles de retroalimentación entrelazados que abarcan diversas escalas de tiempo.

El gen PPM1D codificante de la fosfatasa 1 pro-supervivencia Wip1 es otro blanco de p53 que promueve su expresión (Hat et al., 2016). Wip1 atenúa la señalización al desfosforilar ATM en S1981 y conduce a la estabilización de Hdm2 al desfosforilarla en S395 (Hat et al., 2016). Batchelor y colaboradores (2008) proponen que la inhibición recurrente de ATM permite oscilaciones persistentes del nivel de p53. Por lo tanto, también es esencial para desencadenar pulsos de p53 (Batchelor et al., 2008). Además, inhibe la apoptosis facilitando la desfosforilación de p53 asesino y transformándolo en el estado arrestador (Hat et al., 2016).

En resumen, ATM se reactiva por daño persistente en el ADN y por influencia de Wip1 provocando pulsos de p53. Posteriormente, el bucle de Hdm2-p53 genera oscilaciones a nivel de ambas proteínas en respuesta a la intensidad y duración de diversos estresores (Lindström et al., 2022), lo que posiblemente ayuda a las células a recuperarse del daño del ADN y evitar la muerte celular excesiva o la senescencia debido a la activación crónica de p53 (Lindström et al., 2022). Mientras que la retroalimentación negativa a través de la fosfatasa Wip1 atenúa la señal de daño y, por lo tanto, controla la amplitud y duración de los pulsos de p53 (Purvis y Lahav, 2013).

Una vez que se resuelve el daño del ADN, p53 y la mayoría de sus reguladores positivos

y negativos se someten a desfosforilación por parte de Wip1 (Abuetabh et al., 2022). Por ello, Wip1 es esencial para permitir el regreso al estado previo al estrés actuando como un regulador homeostático del DDR (Lu et al., 2008).

La actividad de p53 también puede suprimirse mediante la estimulación del factor de crecimiento, lo que conduce a la activación de la quinasa PI3 (PI3K), que fosforila el bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2) en trifosfato (PIP3) (Hat et al., 2016). PIP3 permite el reclutamiento de la quinasa AKT prosupervivencia en la membrana plasmática, donde puede activarse mediante fosforilación en Thr308 por varias quinasas (Hat et al., 2016). AKT activada fosforila Hdm2, lo que permite su translocación al núcleo donde Hdm2 ubiquitina p53 (Hat et al., 2016). De hecho, se ha comprobado que la fosforilación de Hdm2 mediada por AKT es crucial para su funcionamiento activo (Charan et al., 2023).

Así se introduce otro actor regulador clave: PTEN proapoptótico. PTEN es una fosfatasa supresora de tumores que media un bucle de retroalimentación positiva largo que estabiliza p53 al catalizar la desfosforilación de PIP3 a PIP2 (Hat et al., 2016). De esta manera, la acumulación de PTEN conduce a la inhibición de la vía AKT que regula el crecimiento y la supervivencia celular y, consecutivamente, a la inhibición de Hdm2 (Hat et al., 2020). Esto permite que p53 asesino alcance un nivel alto e inicie la apoptosis (Hat et al., 2016).

5.4. Dinámica de p53

Aunque es bien conocido que p53 es un importante supresor de tumores que promueve la muerte celular de forma continua en respuesta a agresiones celulares, aún después de una ardua investigación la incógnita sigue siendo cuáles eventos determinan las variadas y aparentemente antagónicas respuestas inducidas por p53. Una de las teorías predominantes es que la selección del destino celular es dependiente de las distintas dinámicas a nivel molecular de p53. El término comportamiento dinámico se refiere a las variaciones en el nivel de contenido, localización subcelular y/o modificaciones post-traduccionales (PTM) de una proteína específica (Abuetabh et al., 2022).

Originalmente se observó que después de DSB causadas por la irradiación gamma, a nivel de poblaciones celulares ocurrían oscilaciones amortiguadas de p53 (Lev Bar-Or et al., 2000,

Hamstra et al., 2006). Posteriormente, los estudios iniciales en células vivas individuales mostraron que p53 se acumulaba en pulsos regulares no amortiguados durante varias horas con amplitud y duración uniformes (Geva-Zatorsky et al., 2006, Lahav et al., 2004). Curiosamente, no se pudo observar ningún umbral de daño distinto para la inducción de un pulso de p53. En cambio, la probabilidad de una respuesta de p53 se correlacionó linealmente con el número de DSB (Batchelor y Loewer, 2017).

Los pulsos de p53 activados por radiación gamma tienen tres características notables (Abuetabh et al., 2022; Batchelor y Loewer, 2017):

- Sus amplitudes son independientes de la dosis de la radiación gamma.
- Los pulsos se mantienen mientras persistan los DSB (es decir, pulsos no amortiguados).
- El periodo de los pulsos está estrechamente regulado.

Sin embargo, la descripción de la dinámica de p53 definida anteriormente está muy simplificada. En realidad, la dinámica de p53 no es discreta, sino que existe en un amplio espectro de dinámicas potenciales según la línea celular, el tipo de estímulo, la dosis de daño del ADN y la tasa de reparación intrínseca de las lesiones del ADN (Stewart-Ornstein y Lahav, 2017).

El análisis de células individuales reveló que tras la exposición a IR, la dinámica de p53 exhibe distintos comportamientos bifásicos dependiendo de la fuerza del estímulo y la extensión del daño en el ADN (Ye et al., 2021; Charan et al., 2023). A la par, estos estudios demostraron que la dinámica de la acumulación de p53 influye en la respuesta celular al estrés (Batchelor y Loewer, 2017). A través de los experimentos, se cree que la dinámica pulsátil de p53 se asocia con la supervivencia de las células al detener el ciclo celular y activar las vías de reparación del ADN (Abuetabh et al., 2022), mientras que la dinámica sostenida se asocia con destinos como la senescencia y la apoptosis.

Hasta la fecha, se han identificado dinámicas ricas de p53 distintas de los pulsos uniformes. De hecho, se han observado comportamientos cambiantes donde, por ejemplo, el cambio de pulsos sostenidos a un patrón creciente monótono conducirá a un destino celular alterado (Sun et al., 2017).

Otros experimentos permitieron entender que el recambio, la estabilización y otros eventos dirigidos por p53 están regulados con precisión por una variedad de mecanismos de PTM, que incluyen fosforilación, acetilación y ubiquitinación (Abuetabh et al., 2022). De hecho, aproximadamente el 15 % de los 393 aminoácidos de p53 se modifican periódicamente (Abuetabh et al., 2022). Como ya se ha mencionado, de p53 se han caracterizado dos estados de fosforilación diferentes: arrestador y asesino (Hat et al., 2016). Se ha especulado que la dinámica p53 pulsátil, como la observada al detectar DSBs, proviene principalmente del estado arrestador, en el que desencadena la transcripción de Hdm2 y la proteína p21 supresora del ciclo celular (Hat et al., 2016); por lo que está asociada con la supervivencia celular y la reparación del daño del ADN. Mientras que la dinámica sostenida de principalmente p53 asesino da como resultado la senescencia y la muerte celular (Purvis et al., 2012).

A pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho en los últimos 40 años aún existen muchas incógnitas sobre la codificación de la información del estímulo y su decodificación al dictaminar el destino celular. La gran cantidad de biomoléculas que se ha informado que interactúan con p53, así como la gran cantidad de interacciones de retroalimentación propuestas que gobiernan su dinámica, impiden una comprensión intuitiva significativa de la vía de señalización (Batchelor y Loewer, 2017). Además, muchos factores pueden afectar el resultado de la respuesta inducida por p53, incluido el tipo de célula, el microambiente, la naturaleza del estrés y la gravedad del daño; lo cual también complica la dilucidación completa de la dinámica y respuesta de p53 (Charan et al., 2023).

5.5. Destino celular desencadenado por la respuesta de p53

En humanos dentro de las primeras horas de la inducción de daño al ADN, p53 activa la expresión de más de 500 genes (Thomas et al., 2022), incluidos los que facilitan los destinos celulares (Tsabar et al., 2020). Esto podría considerarse la segunda fase donde se determina la supervivencia o muerte de la célula. Para daños reparables en el ADN, las células regresan al estado proliferativo normal (Ye et al., 2021). En caso de daño irreparable, el nivel de p53 aumenta a un nivel alto sostenido, lo que lleva a la apoptosis (Ye et al., 2021). Se han dedicado muchos esfuerzos a desentrañar el vínculo entre la dinámica de p53 y las decisio-

nes sobre el destino celular, sin embargo, estos mecanismos subyacentes no se han aclarado completamente.

5.5.1. Arresto celular

Según la teoría actual, en el estado arrestador p53 desencadena la transcripción del gen CDKN1A, que codifica para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21 (Tsabar et al., 2020), la cual es crítica para mediar la detención del ciclo celular (Hat et al., 2016). Esto lo logra al inhibir las cinasas dependiente de ciclina (Cdks) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Kim et al., 2019), por lo que funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular durante las fases G1 y S en los puntos de control G1 y G2 (Georgakilas et al., 2017).

La detención del ciclo celular promueve la supervivencia al evitar la proliferación en presencia de ADN dañado, que de no repararse podría provocar una catástrofe mitótica y una segregación cromosómica masiva, lo que provocaría la muerte celular u oncogénesis (Tsabar et al., 2020). Este arresto debe cumplir al menos 3 requisitos: activarse con prontitud; mantenerse mientras exista daño; y después de la detención, las células deben volver a la fase del ciclo celular adecuada para garantizar la ploidía adecuada (Toettcher et al., 2009). Una vez que se detiene la progresión del ciclo celular, p53 media la activación de diferentes mecanismos de reparación del ADN (Abuetabh et al., 2022). Después de la reparación, los niveles de p53 y, posteriormente, los niveles de p21 disminuyen, lo que permite la progresión del ciclo celular (Tsabar et al., 2020).

5.5.2. Apoptosis

La apoptosis es un proceso genéticamente programado que elimina las células innecesarias, dañadas o infectadas. Ayuda al desarrollo y al envejecimiento como mecanismo homeostático que controla las poblaciones celulares en los tejidos y constituye un mecanismo clave de defensa inmune contra células infectadas o cancerosas (Bogdał et al., 2013). Al eliminar células con lesiones potencialmente oncogénicas que se encuentran en etapas tempranas de transformación neoplásica, la apoptosis contribuye a la supresión del desarrollo tumoral (Thomas et

al., 2022).

Para evadir la restricción del crecimiento tumoral, las células cancerosas han ideado múltiples mecanismos para proporcionar estímulos sostenidos a favor del crecimiento o para contrarrestar la apoptosis (Kreeger y Lauffenburger, 2009).

La apoptosis se logra mediante la activación transcripcional de subconjuntos de genes apoptóticos, los cuales varían dependiendo de la fuente y la duración de los factores estresantes (Nguyen et al., 2017). Hay dos vías distintas de apoptosis dada por iniciadores clave controlados por p53 pero, en última instancia, convergentes hacia la apoptosis: la vía regulada por BCL-2 (también conocida como mitocondrial o intrínseca) y la vía inducida por el receptor de muerte (también conocida como extrínseca) (Thomas et al., 2022). La vía regulada por BCL-2 está controlada por la familia de proteínas BCL-2, que contiene tres subgrupos: las proteínas pro-supervivencia (BCL-2, MCL-1, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL1), las proteínas proapoptóticas exclusivas de BH3 (BIM, PUMA, BID, BMF, BIK, BAD, HRK, NOXA) y los efectores de la apoptosis (BAX, BAK, BOK) (Thomas et al., 2022). En el estado asesino p53 promueve la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis celular incluyendo miembros de la familia BCL-2, como la proteína X asociada a BCL-2 (BAX) (Kim et al., 2019). Las proteínas BCL-2 que favorecen la supervivencia están unidas e inhibidas por las proteínas exclusivas de BH3, y esto desencadena los efectores de muerte celular de BAX y BAK que en las células sanas están restringidos por las proteínas BCL-2 que favorecen la supervivencia (Thomas et al., 2022). Tras la activación, BAX y BAK provocan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), que constituye el punto de no retorno en la señalización de la apoptosis (Thomas et al., 2022). p53 también puede funcionar fuera del núcleo para inhibir directamente las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y BCL-XL, un ejemplo de actividad independiente de la transcripción de p53 (Nguyen et al., 2017).

Consecutivamente, se forma el apoptosoma (que involucra a APAF-1) y se activa la cascada de caspasas, desmantelando las células (Thomas et al., 2022). Así, Bax y AKT regulan el módulo apoptótico, de tal manera que el aumento simultáneo del nivel de Bax y la disminución del nivel de AKT fosforilado conducen a la apoptosis irreversible (Hat et al., 2016).

5.6. Modelos matemáticos de la vía p53

Dada la gran complejidad de la vía p53, el modelado matemático es una herramienta útil para sintetizar lo que se sabe sobre la topología de la red. La mayoría de los esfuerzos para modelar p53 se han centrado en revelar las interacciones de la red que controlan su respuesta dinámica en células individuales ante daño al ADN en la línea celular MCF-7 (Batchelor y Loewer, 2017). En particular, se hizo énfasis en el modo de pulsación periódica de p53, atribuyéndolo a un bucle de retroalimentación negativa con retardo de tiempo entre p53 y Hdm2 (Lahav et al., 2004; Lev Bar-Or et al., 2000). Por lo tanto, las características dinámicas asociadas como los períodos de pulsación, las amplitudes y el ruido de señalización fueron la base común y los objetivos cuantitativos de la mayoría de estos análisis (Xie et al., 2022). De manera general se utilizó principalmente un enfoque determinista basado en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) (Batchelor et al., 2008, Ma et al., 2005, Zhang et al., 2007), las cuales describen la tasa de cambio de variables (p. ej., nivel de proteína p53 total) con respecto al tiempo en función de otras variables (p. ej., la concentración de otras proteínas) (Kim et al., 2019).

Como un único bucle de retroalimentación negativa retardado en el tiempo por sí solo no podría generar oscilaciones sostenidas para parámetros bioquímicos factibles (Batchelor y Loewer, 2017), se empezaron a explorar otras de las muchas moléculas relacionadas con la vía de p53. Estos modelos demostraron que la concentración de PTEN sería crítica para la transición a la segunda fase de activación de p53, que es suficiente para inducir la muerte celular (Wee et al., 2009). Además, Batchelor et al. (2008) propusieron que los niveles de Wip1 establecen umbrales específicos de células para la activación de p53, proporcionando medios para modular su respuesta a través de vías de señalización interactivas (Batchelor y Loewer, 2017).

Sin embargo, varias de estas retroalimentaciones están ausentes en líneas celulares cancerígenas que muestran pulsos uniformes de p53 tras el daño, lo que va en contra de contribuciones importantes a la regulación de la dinámica de p53 (Batchelor y Loewer, 2017).

Diferentes grupos investigaron más a fondo la decisión sobre el destino celular dependiente de p53. Al incorporar genes relacionados con la apoptosis en los circuitos de retroalimentación

centrales de la red p53, algunos modelos predijeron que p53 sería un impulsor de la transición del destino celular desde la detención del ciclo celular a la apoptosis (Zhuge et al., 2016; Chong et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los modelos matemáticos presentan una fuerte limitante al buscar reproducir observaciones experimentales de la línea celular cancerígena MCF-7. Un modelo matemático que buscó resolver tal problemática y reproducir las observaciones experimentales de una célula saludable genérica con la mayor maquinaria posible con sustento de su participación en los procesos ya mencionados fue el desarrollado por Hat y colaboradores (2016).

Sin embargo, a pesar de décadas de investigación intensiva, la comprensión de la función de p53 sigue siendo limitada. En el futuro, es necesario perfeccionar y validar los modelos de la red p53 para obtener una comprensión más profunda en relación al tipo de célula y de la red específica del estímulo. Esto puede incluir la investigación del papel de retroalimentación o moduladores adicionales que han sido postulados a través de trabajos experimentales y teóricos (Moore et al., 2015). Finalmente, se encuentra el desafío, de generar e integrar información de experimentos teóricos y de datos experimentales de células saludables que permitan conocer el funcionamiento normal de la vía.

5.7. Malfuncionamiento de la vía de p53 en cáncer

Tras años de investigación se ha establecido que el supresor de tumores p53 proporciona una barrera importante para la transformación neoplásica y la progresión del tumor, de hecho, se encuentra inactivado o desregulado en casi todos los cánceres. La inactivación de p53 puede ocurrir directamente por alteraciones en su gen (Hat et al., 2016). También puede ser como resultado de alteraciones en genes cuyos productos activan, regulan o transportan señales de p53 (Issaeva, 2019).

Su gen codificante TP53 está mutado en aproximadamente la mitad de todos los cánceres (Lu et al., 2008), lo que eventualmente conduce a una alteración en la unión del ADN (Jangid et al., 2021). Las células cancerosas adquieren ventajas selectivas al retener formas mutantes de la proteína que subvierten radicalmente su naturaleza (Mantovani et al., 2019). Aunque

muchas terapias están dirigidas hacia p53 mutado, más de 10 millones de pacientes en todo el mundo tienen la proteína p53 intacta (Chaudhary y Lal, 2017). Esto es ya que la otra mitad de cánceres restante presenta alteraciones en la vía de señalización de p53 (Lu et al., 2008; Nguyen et al., 2017). Incluso, la expresión aberrante de moléculas mediadoras de PTM conduce a la inactivación de p53. Por lo tanto, los estudios sobre cómo apuntar a los reguladores de p53 para reactivar p53 son una dirección de investigación activa (Abuetabh et al., 2022).

Sorprendentemente, la restauración de la función de p53 en modelos animales puede hacer retroceder el desarrollo del cáncer y extender significativamente los períodos de supervivencia (Meek, 2015). El establecimiento de este principio ha abierto una variedad de enfoques hacia la reactivación de p53 como estrategia terapéutica contra el cáncer.

5.7.1. Vía p53 en células cancerígenas MCF-7

Como ya se ha mencionado, existen más de 200 tipos de cáncer. Es necesario el estudio individual de los diferentes cánceres, ya que se presenta una gran heterogeneidad entre sí mismos. Incluso, hay una gran diversidad en las células del mismo tumor, la cual afecta la respuesta y eficacia de los tratamientos contra el cáncer (Paek et al., 2016). En estudios donde se someten a diferentes células cancerígenas a diversos quimioterapéuticos con distintos mecanismos de acción se ha demostrado la fuerte heterogeneidad en la respuesta e inducción a apoptosis de estas células, las cuales se ha inferido son en parte consecuencia de las alteraciones en la vía de p53, su dependencia a los bucles de retroalimentación y otras variaciones célula-célula (Xie et al., 2022; Paek et al., 2016).

Comprender la fuente de heterogeneidad dentro de un tumor y cómo dicha heterogeneidad contribuye a la resistencia podría conducir a estrategias de tratamiento más efectivas. Sin embargo, las muestras clínicas suelen ser difíciles de obtener y manipular experimentalmente (Goh et al., 2022). Es por ello que las líneas celulares son cruciales para explorar la biología del cáncer y evaluar fármacos (Goh et al., 2022). En ese sentido existen diversas células cancerígenas donde p53 se ha estudiado.

MCF-7

Una de las líneas celulares de cáncer de mama metastásico más utilizadas, conserva varias características del epitelio mamario diferenciado (Chiang et al., 2018). De hecho, es la línea celular utilizada en la mayoría de los estudios unicelulares anteriores de las respuestas dinámicas de p53. En efecto, los estudios pioneros de la dinámica de p53 provinieron de esta célula (Lev Bar-Or et al., 2000; Lahav et al., 2004; and Geva-Zatorsky et al., 2006), lo que es una controversia actual al considerar que mucho del conocimiento de p53 se encuentra sesgado. Aunque esta línea celular presenta a TP53 silvestre (TP53wt) (Ostrakhovitch y Cherian, 2005), se ha observado que la vía si se encuentra comprometida al presentar las siguientes alteraciones:

- Expresión muy baja o nula del gen PTEN (Luo et al., 2017) debido a la metilación en su promotor (Puszyński et al., 2008).
- Único en su fuerte dependencia de las retroalimentaciones negativas en el efecto de la dinámica de p53 (Xie et al., 2022).
- Expresión reducida de BRCA1 al ser hemicigotas de ese gen, el cual como proteína está implicada en la reparación por escisión de la base (Francisco et al., 2008). Esto está asociado con un procesamiento deficiente del daño del ADN inducido por oxidación (Francisco et al., 2008).
- Expresión nula del gen codificante de la caspasa-3 (CASP3) (Essmann et al., 2004), lo que se sugiere provoca su resistencia a someterse a apoptosis (Zhang et al., 2009).
- El gen p14ARF no se expresa en condiciones basales (Choi et al., 2012), el cual inhibe a Hdm2.
- La abundancia de ciclina G (transcrito y proteína) es alta en condiciones basales (Choi et al., 2012), la cual promueve la desfosforilación de Hdm2.
- Amplificación del gen PPM1D (Pecháčková et al., 2017).

Además, Francisco y colegas (2008) demostraron que la irradiación gamma indujo lesiones de ADN más complejas en estas en comparación con sus contrapartes no malignas y estas

lesiones tardaron más en repararse; lo que indica una deficiencia en la reparación del ADN (Zhang et al., 2009). Por otro lado, existen múltiples de reportes de resistencia hacia las terapias al mantener una dinámica oscilatoria de p53 incluso con daño severo en el ADN (Charan et al., 2023; Xie et al., 2022).

Estas células son de gran relevancia, pues de acuerdo con el Global Cancer Observatory (2020) el cáncer de mama (CM) es el de mayor incidencia en mujeres al representar el 11,7% de los diagnósticos de cáncer a nivel mundial con más de 2.2 millones de nuevos diagnósticos y 680,000 muertes relacionadas en 2020 (Goh et al., 2022).

Como puede observarse, las alteraciones que pueden presentar las células cancerígenas son diversas y complejas, lo que complica los ya problemáticos tratamientos actuales en los que la resistencia y la recurrencia después del tratamiento no son infrecuentes (Abuetabh et al., 2022). Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos tratamientos u objetivos a atacar.

Por ello, se han hecho diversos esfuerzos en el modelado matemático de la red reguladora de p53, los cuales podrían permitir la optimización de la programación de protocolos de terapia contra el cáncer. Sin embargo, este campo apenas está emergiendo.

De hecho, esta estrategia fue seguida por Hat y colaboradores (2020) donde mediante un estudio teórico propusieron un protocolo combinatorio de irradiación y medicamentos quimioterapéuticos que inhiben o reducen la actividad de Hdm2. Por lo que potencialmente otras moléculas de la vía serían de interés para ser exploradas con este enfoque.

6. Hipótesis

La resistencia al daño inducido por la radiación gamma de las células cancerígenas de mama (MCF-7) sometidas a radioterapia puede disminuir al modificar la vía p53.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Identificar componentes de la vía p53 responsables de la sensibilización a la radioterapia en la línea celular cancerígena MCF-7 (mama).

7.2. Objetivos específicos

1. Actualizar el modelo molecular con información transcriptómica actual de la vía p53 en respuesta a la irradiación gamma.
2. Comparar el comportamiento de la vía p53, así como la respuesta de una célula saludable y cancerígena MCF-7 al ser tratadas con irradiación gamma.
3. Identificar las proteínas relevantes para la sensibilización a la radioterapia.

8. Metodología

8.1. Estudio transcriptómico

Para identificar qué proteínas conforman la vía p53 se consideraron los resultados obtenidos por Hafner y colaboradores (2017), así como Jiménez y colaboradores (2022), que realizaron un experimento de RNA-seq en donde sometieron a células MCF-7, cuyas características se han descrito en la **sección 5.7.1**, a dos estímulos diferentes. El primero fue una dosis de irradiación gamma que indujo una dinámica pulsátil de p53 durante todo el experimento. El segundo estímulo se aplicó en base a un protocolo descrito previamente por Purvis y colaboradores (2012) en donde se combina radiación con la adición incremental del inhibidor de Hdm2, Nutlina-3a, el cual es un fármaco que sostiene el daño; induciendo así una dinámica sostenida.

Posteriormente a cada hora durante las primeras 9 h, y nuevamente a las 24 h, se realizó el RNA-seq que implica la fragmentación de las moléculas de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), la transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y la conversión de la muestra en una biblioteca molecular (Van den Berge et al., 2019). De esta manera, se obtienen millones de lecturas generadas a partir de los fragmentos de ADNc que permiten estimar la abundancia relativa de exones o genes, es decir, niveles de expresión genética en múltiples condiciones en alta resolución (Van den Berge et al., 2019; McDermaid et al., 2019).

8.2. Análisis de expresión genética diferencial

A partir de las cuantificaciones de lecturas de secuencias de ARN obtenidas, se procedió a realizar el análisis de expresión genética diferencial (DGE), el cual permite dilucidar genes expresados diferencialmente mediante pruebas estadísticas. La base biológica como lo explica Dehuri et al. (2020) es que la expresión genética indica la cantidad de ARNm producido por un gen en una condición biológica particular. Los genes responsables de los cambios en esta condición tendrán diferentes valores de expresión genética en diferentes condiciones, por lo que los cambios de comportamiento celular pueden atribuirse a ellos. Por lo tanto, este análisis es útil para analizar funciones y mecanismos genéticos que contribuyen a las

diferencias fenotípicas.

Para realizar este análisis se utilizó el ya definido flujo de trabajo RnaSeqGeneEdgeRQL que lo provee Bioconductor en el entorno de software R (Chen et al., 2016). Este incluye una etapa de filtrado de los conteos de las lecturas, normalización mediante el método de normalización entre muestras TMM (media recortada de valores M), ajuste del modelo y estimación de dispersiones en donde se supone que las distribuciones de recuento siguen una distribución binomial negativa (NB). Finalmente se utilizó la prueba exacta con un umbral de valor $p < 0.05$ para probar la expresión diferencial de genes entre dos datos de recuento de condiciones. Además, se utilizó la tasa de descubrimiento falso (FDR) $< 5\%$ calculada con la prueba t corregida por Benjamini-Hochberg, el cual es un criterio para solo considerar solo los cambios en la expresión diferencial son significativamente mayores que 1.5, es decir, si los logFC (cambio del logaritmo binario) son significativamente mayores que $\log_2(1.5)$. Tales valores mencionados son recomendados en otros manuscritos y por Chen et al. (2016).

8.3. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

Los genes DE fueron asociados a su ontología mediante una búsqueda en la base de datos de ontología genética (GO) y la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG). En la primera se obtuvo el proceso biológico donde participan estos genes, y en la segunda se asociaron a vías moleculares. De esta manera se filtraron los genes que han sido asociados a la vía de p53 o a las consecuentes del ciclo celular.

8.4. Modelado matemático de la vía p53 en respuesta a IR

Utilizando los genes encontrados como asociados a la vía, se realizó una búsqueda de los modelos matemáticos asociados a la vía p53 donde se incluyeran para poder estudiar de manera teórica el comportamiento celular. De esta manera se encontró el modelo matemático propuesto por Hat y colaboradores (2016) que contiene la mayoría de las proteínas conocidas hasta la fecha que participan en la vía p53, cuyos genes he encontrado como diferencialmente expresados. Este modelo compuesto de 33 ODEs reproduce el comportamiento experimental de p53 en células saludables en un rango de 1-10 Gy, cuyas moléculas se encuentran distri-

buidas en 3 módulos: la vía principal que regulan de manera esencial la dinámica de p53 (**sección 5.3.3**), y dos módulos con el destino celular en respuesta a la IR: arresto celular (**sección 5.5.1**) y apoptosis (**sección 5.5.2**).

Para simplificar este modelo y considerar solamente la muerte celular como indicador de la eficiencia del tratamiento, se adaptó el modelo para considerar solo el módulo de centro de regulación de p53, y otro módulo subordinado de apoptosis. Posteriormente, se reprodujeron los resultados del modelo original con el modelo simplificado formado por 27 ecuaciones.

Al contrastar los DGE con sus productos modelados por Hat et al. (2016) se actualizó la representación de las moléculas esenciales para llevar a cabo las respuestas celulares ante el daño al ADN particularmente en células MCF-7; ya que, los experimentos de RNA-seq se realizaron en esta célula. Las nuevas proteínas, así como sus interacciones con las demás proteínas de la vía fueron modeladas acorde al conocimiento experimental actual y manteniendo la lógica determinista de los autores. Las ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) representan la acción de masas o la cinética de Michaelis-Menten de las concentraciones de ARNm y proteínas consideradas en el modelo. Además, dependiendo de la realidad biológica se pueden considerar términos de primer y segundo orden, michaelianos o considerar cooperatividad de Hill. Los parámetros de estas ecuaciones provienen de valores reportados en literatura, sin embargo, para algunos de ellos no se cuentan con los experimentos necesarios para obtener el valor exacto. Para estos casos se consideraron estimaciones en un rango de valores biológicamente probables. Tanto las ODEs como sus parámetros pueden ser visualizadas en el **Anexo 1**. Estas ODEs fueron resueltas en MATLAB.

Una vez con un modelo matemático con la maquinaria molecular esencial en MCF-7 se consideraron las alteraciones ya conocidas en la vía de p53 para reconstruir un modelo de una célula saludable genérica.

8.5. Comparación de la respuesta celular

Se comparó el comportamiento de p53 y la respuesta celular de la célula saludable y MCF-7 ante diferentes dosis de IR al resolver las ODEs del modelo matemático considerando dos fases temporales:

1. **Fase de irradiación.** 10 minutos de irradiación.
2. **Fase de relajación.** 3 días post-irradiación.

Se considera al período de irradiación como en donde El protocolo de irradiación *in silico* consiste en provocar el daño al ADN por la IR. Este daño es calculado como de 10 DSB/s por un Gy de radiación gamma, esta concentración de DSB corresponde a los de reparación lenta. Tal protocolo de irradiación fue propuesto por Ma y colaboradores (2005).

Una vez simulado este protocolo, se obtuvieron las trayectorias de los niveles de p53 y las demás moléculas modeladas. Para estratificar las células supervivientes y apoptóticas, se utilizó el criterio establecido por Hat et al. (2016) al considerar el nivel de caspasas activas 72 horas después de la fase de irradiación. Las células con un nivel de caspasas activas superior al umbral definido de 1.5×10^3 moléculas por célula se consideraron apoptóticas, en caso de ser un nivel inferior serán sobrevivientes.

8.6. Búsqueda *in silico* de blancos terapéuticos

Finalmente, se simularon alteraciones en los parámetros individualmente de todas las tasas de reacciones, considerando aumentos y disminuciones en el valor de estos parámetros de 10 en 10% hasta llegar al 100%. Para simular el silenciamiento de los genes con la acción de siRNA, se redujo la tasa de producción de ARNm, cuando se encuentra de manera explícita en el modelo, y de la proteína al 90%.

En el caso de las células saludables se identificaron las alteraciones que provocaron una evasión de la muerte celular al ser irradiadas con 10 Gy. Caso contrario de las células MCF-7 en las que se identificaron las alteraciones que promovieron la muerte celular en las mismas condiciones.

9. Resultados

9.1. Análisis de los genes expresados diferencialmente

De la secuenciación de ARN realizada por Jiménez et al. (2022) se obtuvieron lecturas de 58,736 transcritos. El genoma humano tiene 20,000-25,000 transcritos aproximadamente (Human Genome Sequencing Consortium, 2004), sin embargo, la secuenciación reconoce variantes de un mismo gen, además de ARNs pequeños. De los cuales con los criterios establecidos en la **sección 8.2** se encontraron 1,800 como diferencialmente expresados (DE). Estos 1,800 transcritos DE pertenecen a las vías observadas en la **figura 4**, en las que cabe resaltar que el 53.5% de los genes pertenecen a tanto la vía p53 como a bucles de retroalimentación de éstas.

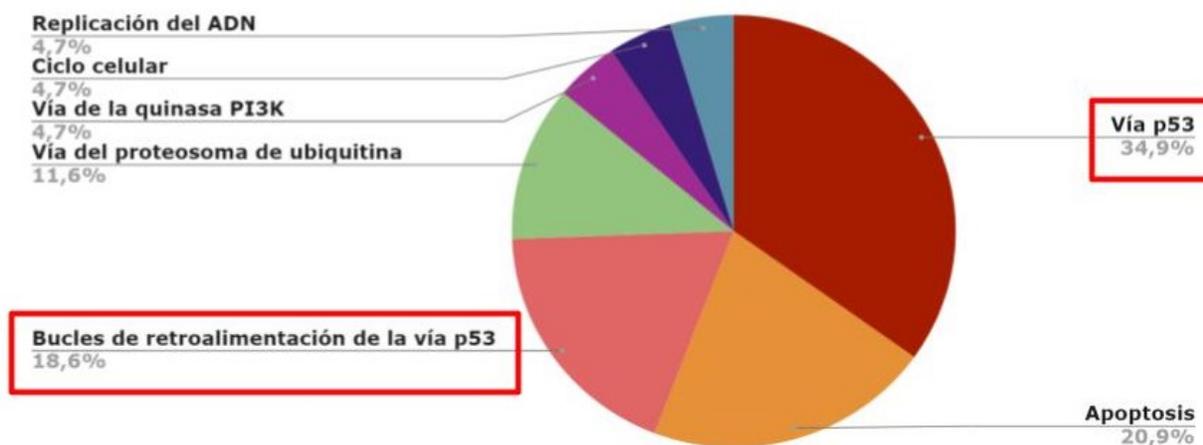


Figura 4: Vías moleculares encontrados en el enriquecimiento de los genes expresados diferencialmente.

9.1.1. Genes diferencialmente expresados

Entre los transcritos DE encontrados, 69 genes o su subsecuente producto interactúan de manera directa o indirecta con la proteína p53 según la literatura. Estos genes se reparten en los procesos biológicos observados en la **Tabla 1**. Debido a que no se cuenta suficiente información de la participación de la vía p53 en los destinos celulares de necrosis, senescencia y autofagia, las proteínas relacionadas fueron filtradas.

Por otra lado, la reparación del daño del ADN no se representa en el presente modelo, debido a simplicidad de este mismo. Como el objetivo del modelo es detectar la muerte celular, se ha hecho caso omiso al arresto celular y se ha mantenido los genes relacionados con la apoptosis.

Tabla 1: Procesos biológicos de los genes expresados diferencialmente

Proceso biológico	Genes DE
Reconocimiento daño al ADN	NBN, ATRX, NUP85, CCNG2, CCNE2, GADD45A, PCNA, FOXM1, MDC1, RRM2, BLM, y EXO1
Reparación daño al ADN	XRCC5, RAD51, H2AX, DDB2, BRCA1, y BRCA2
Arresto del ciclo celular	CDK1, CDK2, CDK4, CCND1, TFAP4, CDKN1A, E2F1, E2F7, y PRMT5
Regulación p53	Hdm2, CCNG1, PPM1D, SFN, AKT1, RBM38, PLK3, CHEK2, PML, PPP2R5C, ZMAT3, y EGR1
Degradación p53 (ubiquitinación)	USP10, UBC, UBAS2, y TRIM28
Apoptosis	CASP2, BCL2L1, TRIAP1, STEAP3, PERP, APAF1, BBC3, TNFRSF10, FAS, EI24, PIDD1 y BAX
Otros o sin conocimiento del proceso involucrado	THBS1, HRAS, TP53I3, SERPINB5, SMC1, SMC3, HSPA5, RPL26, SESN1, SESN2, y PA-XIP1

9.2. Modelado matemático de la vía p53

Como se mencionó en la **sección 8.4**, se partió del modelo matemático propuesto por Hat y colaboradores (2016) que contiene la mayoría de las proteínas conocidas hasta la fecha

que participan en la vía, cuyos genes he encontrado como diferencialmente expresados. Tal modelo está compuesto de 33 ecuaciones diferenciales y cuenta con 3 módulos: el principal, arresto celular y apoptosis. De los genes DE mencionados anteriormente, 7 son modeladas por Hat et al. (2016). Por otro lado, de los reguladores de p53, 9 ya han sido modelados también por Hat y colaboradores (2016).

Las reproducciones del comportamiento celular se presentan a continuación. Por términos de visualización se presentan la resolución determinista de las ecuaciones en una dosis de solo 10 Gy en la **figura 5**. En el eje de las Y se encuentra la concentración en unidades de molécula por célula, y en el X al tiempo donde la hora 0 corresponde al momento post irradiación. Cabe aclarar que se ha mantenido la misma escala de los ejes de las gráficas correspondientes a p53 y caspasas.

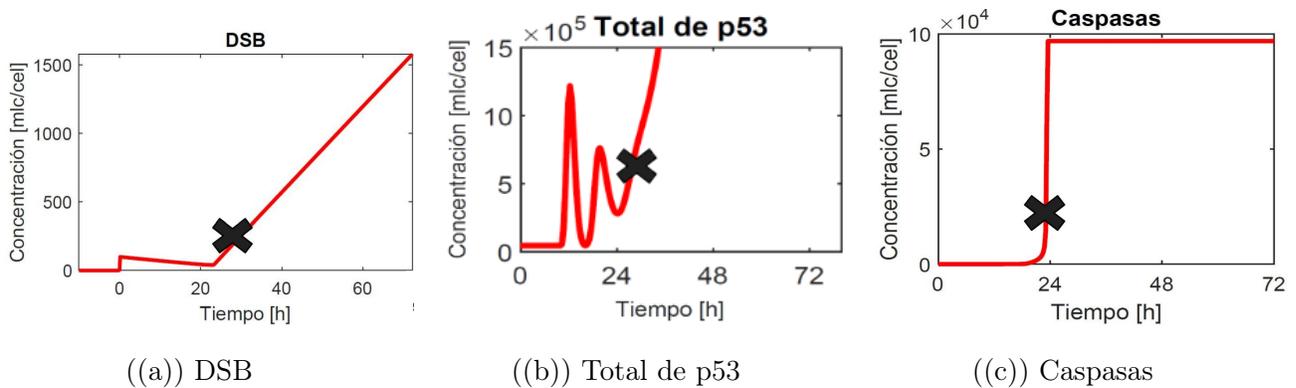


Figura 5: Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 10Gy. La tacha negra simboliza el momento donde ocurre la apoptosis.

9.2.1. Validación del modelo simplificado

El modelo simplificado cuenta con dos módulos: el módulo de centro de regulación de p53, y otro módulo subordinado de apoptosis. Dentro de estos 2 módulos, se modelan a 22 de los 25 genes DE cuyas interacciones pueden observarse en la **figura 6**. Este modelo cuenta ahora con 27 ODEs. Se puede observar en la **figura 7** que se reproducen los resultados del modelo original con el simplificado, lo que valida el modelo simplificado.

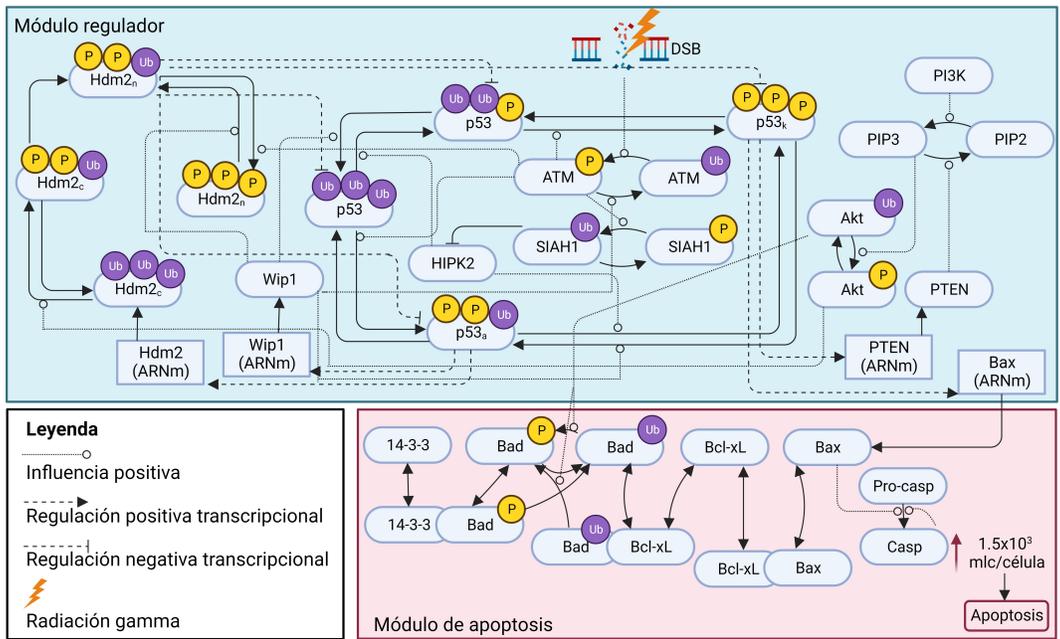


Figura 6: Maquinaria molecular modelada de la vía de p53 ante irradiación gamma.

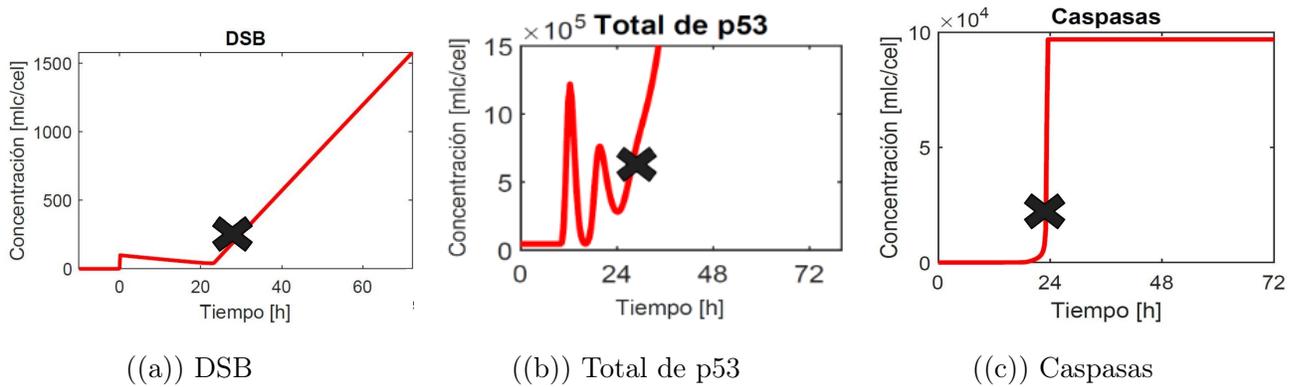


Figura 7: Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 10Gy en un modelo simplificado. La tacha negra simboliza el momento donde ocurre la apoptosis.

9.2.2. Participación de proteínas no modeladas previamente en vía p53

Como se indica en la sección anterior, tres genes DE no fueron considerados previamente de manera teórica en los modelos reportados, por lo que se modelaron por primera vez en este trabajo. Para verificar que estos genes realmente tienen un papel funcional en la vía, se realizó una búsqueda de reportes experimentales que describieran si y cómo tales genes

o su proteína codificada interactúan con las demás moléculas de la vía, lo cual se amplía a continuación.

Proteína ciclina G (CCNG1)

Con un logFC de -1.75 se ha identificado esta proteína que está involucrada en el ciclo y la proliferación celular, la reparación del daño del ADN, e incluso, de promover la apoptosis celular (Chen et al., 2020). Sin embargo, aún no se ha comprendido completamente el papel exacto del CCNG1. Previamente se ha reportado como otro de los objetivos transcripcionales de p53, donde una vez obtenida la proteína, forma un complejo con PP2A que elimina un residuo de fosfato de HDM2 lo que mejora su actividad, y por consecuencia, inhibe a p53 (Chu y Chen, 2008).

Quinasa serina/treonina (PLK3)

Por otro lado, con un logFC de -2.57 se identificó a PLK3 que es considerado como un supresor de tumores que contribuye al control y progresión del ciclo celular al tiempo que actúa como mediador de la apoptosis y de diversos tipos de estrés celular (Helmke et al., 2016). Anteriormente se ha reportado que p53 puede unirse al promotor PLK3 e inducir su expresión después de la exposición a radiación ionizante (Jen y Cheung, 2005). PLK3 es capaz de fosforilar a p53 de manera dependiente de ATM específicamente en S20 (Helmke et al., 2016) convirtiéndolo a p53 arrestador. De esta manera se compone un sistema de retroalimentación positiva para fortalecer la respuesta al estrés relacionada con p53 en la regulación del ciclo celular (Jen y Cheung, 2005). Además, se ha reportado que estabiliza a PTEN al fosforilarlo (Helmke et al., 2016).

Proteína 38 con motivo de unión a ARN (RBM38)

Finalmente, con un logFC de -1.49 se identificó a RBM38 que es otro gen diana de p53. Sus intervenciones en la vía p53 son diversas al interactuar con varias de las proteínas con las que conforma varios bucles de retroalimentación negativa (Zou et al., 2021). RBM38 se une a ciertos elementos de los transcritos para eventualmente modular el comportamiento celular a través de, principalmente, tres tipos de mecanismos: estabilización, desestabilización y/o regulación traslacional de sus ARNm de carga (Zou et al., 2021). Las interacciones que tiene RBM38 con las proteínas de la vía modelada se describen a continuación por Zhou y

colaboradores (2021):

- Estabiliza el ARNm de PTEN.
- Desestabiliza el ARNm de Hdm2.
- Suprime la traducción de p53 al eliminar la proteína de unión a caperuza eIF4E para que no se una a su ARNm.
- Promueve la expresión de PPM1D.

Sin embargo, la interacción de RBM38 con la vía p53 se vuelve más compleja al considerar sus posteriores modificaciones postraduccionales. GSK3B fosforila RBM38 en S195, lo que convierte a RBM38 de un represor a un activador de la traducción de p53 a través de la interacción con eIF4E. Esta función es regulada por Wip1 que desfosforila RBM38 en S195 para restringir la regulación positiva de p53 y, por lo tanto, ejerce una función oncogénica en muchos cánceres.

9.2.3. Modelo actualizado de la vía p53

Al contrastar los DGE con sus productos modelados por Hat et al. (2016) se actualizó la representación de las moléculas esenciales para llevar a cabo las respuestas celulares ante el daño al ADN particularmente en células MCF-7; ya que, los experimentos de RNA-seq se realizaron en esta célula. Una vez que se contó con un modelo matemático con la maquinaria molecular esencial en MCF-7 se consideraron las alteraciones ya conocidas en la vía de p53 para reconstruir un modelo de una célula saludable genérica.

Tales alteraciones descritas en la **sección 5.7.1** se basan en el silenciamiento de PTEN. Por lo que para simular la célula saludable se introdujo esta proteína con su ARN mensajero como se presenta en la **figura 9**, tales especies químicas se observan en verde.

El modelo matemático de la vía consiste de 42 moléculas que participan en 74 reacciones con 97 coeficientes de velocidad de reacción que se traduce en 34 ecuaciones diferenciales que representan la síntesis y degradación de las especies químicas. Tales reacciones, ecuaciones y parámetros se encuentran a detalle en el **Anexo 1**.

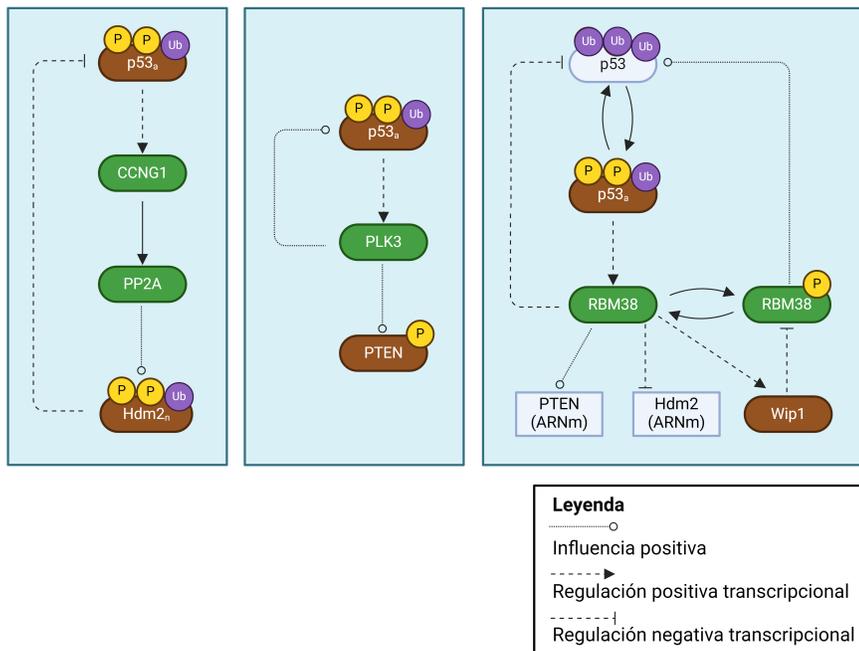


Figura 8: Interacciones de las proteínas agregadas con las demás moléculas de la vía p53. Se ve así la inhibición de p53 por CCNG1, el bucle de retroalimentación positiva de p53-PLK3, y finalmente, el papel dual de RBM38 respectivamente.

Por términos de visualización se presentan la resolución determinista de las ecuaciones en una dosis de 2 Gy (**Fig. 10**) y 10 Gy (**Fig. 11**).

9.2.4. Comportamiento de la célula MCF-7 ante la irradiación

Para modelar a la célula MCF-7 se redujo al 90 % la expresión del gen PTEN, para simular así su silenciamiento. Nuevamente se visualizan la respuesta a las dos dosis de 2 Gy (**Fig. 12**) y 10 Gy (**Fig. 13**).

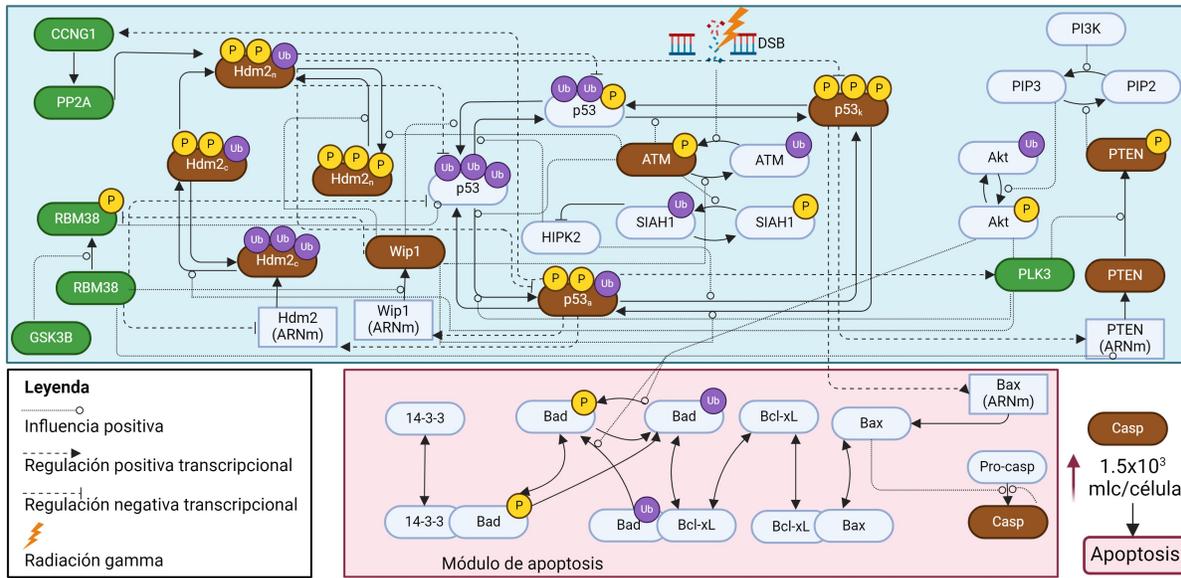


Figura 9: Actualización del modelado molecular de la vía p53 con los genes diferencialmente expresados encontrados.

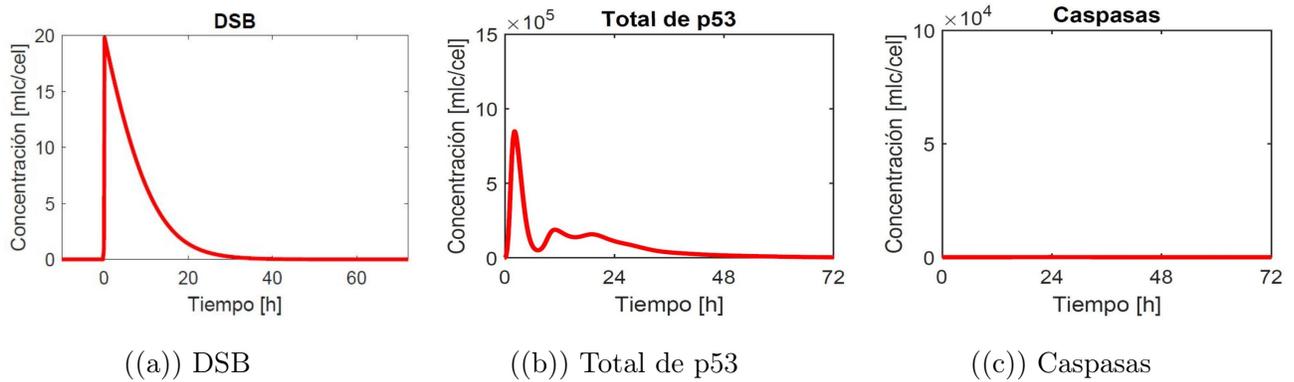


Figura 10: Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 2Gy.

9.3. Alteraciones en la vía p53 con potencial terapéutico

Al inducir alteraciones en la vía se ve en las células saludables la pérdida de inducción de la muerte celular ante la dosis de 10 Gy en las situaciones indicadas en la **Tabla 2**. Cabe recalcar que las 29 presentadas en tal tabla son solamente las que muestran un cambio en la respuesta celular. Esto indica que de los 108 parámetros, el 27% presenta sensibilidad a los cambios.

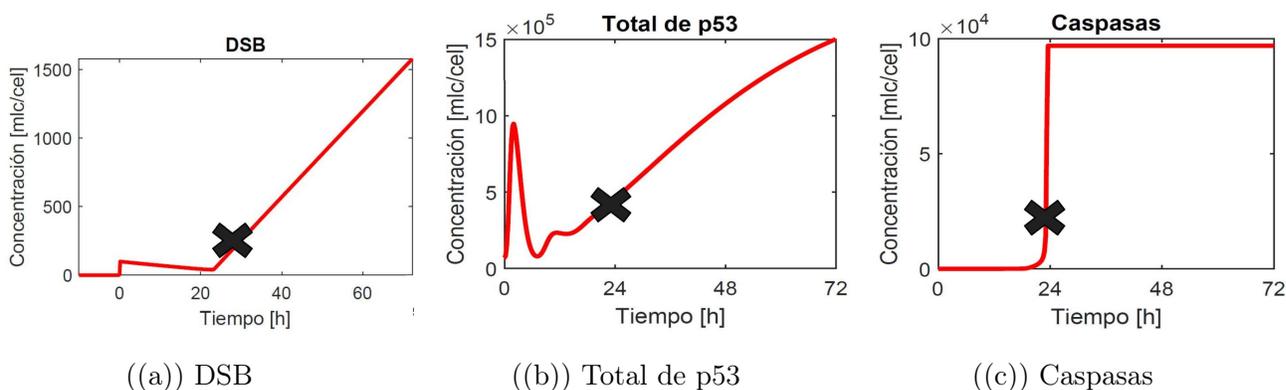


Figura 11: Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula saludable ante la irradiación de 10Gy. La tacha negra simboliza el momento donde ocurre la apoptosis.

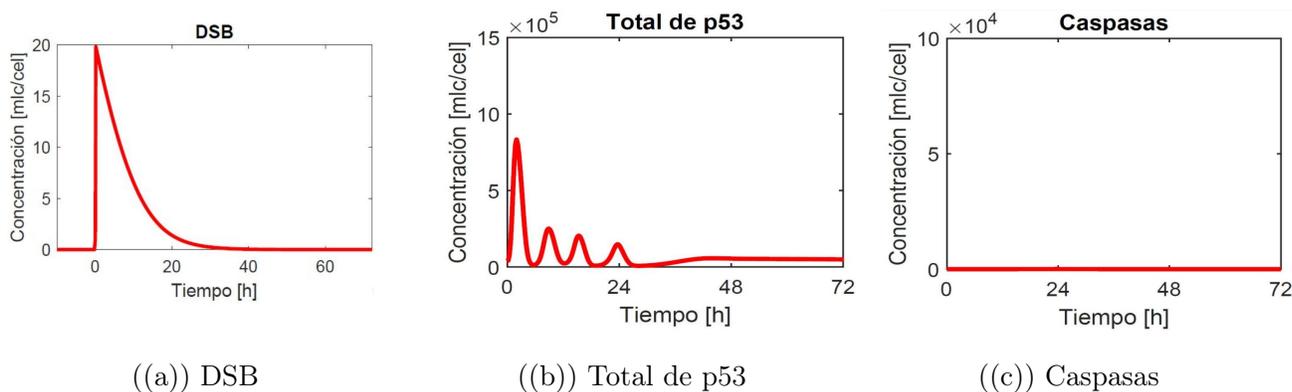


Figura 12: Comportamiento de las DSB, p53 y caspasas de una célula MCF-7 ante la irradiación de 2Gy.

Mientras que las alteraciones en la vía en las células MCF-7 que provocan la inducción de la muerte celular ante la dosis de 10 Gy se ven en la **Tabla 3**. En estas células el 21 % de los parámetros presenta sensibilidad a las alteraciones, al presentar en la tabla 23 parámetros.

Para consultar las ecuaciones y parámetros mencionados dirigirse al **Anexo 1**.

Tabla 2: Alteraciones en la vía que provocan la evasión de la muerte celular en células saludables ante dosis de 10 Gy

Reacción	Parámetro	Alteración
----------	-----------	------------

Reacción	Parámetro	Alteración	
Desfosforilación de ATM por Wip1	d_1	Aumento	25 %
Desfosforilación de p53 asesino en S46 por Wip1	d_4	Aumento	50 %
Desfosforilación de p53 S46 por Wip1 en S46	d_{11}	Aumento	50 %
Síntesis del ARNm Hdm2	s_3	Aumento	10 %
Traducción de Hdm2	t_3	Aumento	10 %
Fosforilación de Hdm2 nuclear doble fosforilado por PLK3	p_{15}	Aumento	25 %
Degradación de HIPK2 impulsada por Hdm2 nuclear doble fosforilado y SIAH1	g_7	Aumento	25 %
Fosforilación de Hdm2 citoplasmático	p_5	Aumento	25 %
Activación del gen Wip1 inducida por p53 arrestador	$q1_{WIP1}$	Aumento	50 %
Síntesis de ARNm Wip1	s_1	Aumento	8 %
Traducción Wip1	t_1	Aumento	10 %
Desfosforilación de SIAH	d_2	Aumento	25 %
Traducción PTEN	t_2	Aumento	20 %
Fosforilación de PIP3 por PI3K	p_8	Aumento	50 %
Fosforilación de AKT por PIP3	p_{12}	Aumento	25 %
Desfosforilación de Hdm2 nuclear doble fosforilado por Wip1 en S395	d_6	Aumento	75 %
Fosforilación de BAD por AKT	p_7	Aumento	50 %

Reacción	Parámetro	Alteración	
Degradación del ARNm por BAX	g_4	Aumento	25 %
Degradación de BAX	g_9	Aumento	25 %
Degradación de pro y caspasas	g_{17}	Aumento	25 %
Degradación del ARNm Hdm2	g_3	Disminución	25 %
Degradación del ARNm Wip1	g_1	Disminución	25 %
Degradación del ARNm PTEN	g_2	Disminución	50 %
Síntesis p53	s_6	Disminución	75 %
Síntesis HIPK2	s_8	Disminución	50 %
Fosforilación de SIAH1 por ATM	p_2	Disminución	25 %
Fosforilación de p53 en S46 por HIPK2	p_{11}	Disminución	25 %
Activación de procaspasas por Bax	a_1	Disminución	25 %
Traducción BAX	t_4	Disminución	25 %

Tabla 3: Alteraciones en la vía que provocan la muerte celular en células MCF-7 ante dosis de 10 Gy

Reacción	Parámetro	Alteración	
Fosforilación del inhibidor p53 por HIPK2 en S46	p_4	Aumento	25 %
Degradación del ARNm Hdm2	g_3	Aumento	25 %
Degradación espontánea de Hdm2	g_{14}, g_{15}	Aumento	50 %
Desfosforilación de Hdm2 citoplasmático triple fosforilado en S166 y S186	d_5	Aumento	75 %
Fosforilación de Hdm2 nuclear doble fosforilado por ATM en S395	p_6	Aumento	25 %

Reacción	Parámetro	Alteración	
Síntesis HIPK2	s_8	Aumento	50 %
Desfosforilación espontánea de AKT_p	d_8	Aumento	50 %
Activación del gen Bax inducida por p53 asesino	$q1_{BX}$	Aumento	100 %
Síntesis del ARNm Bax	s_4	Aumento	10 %
Traducción de Bax	t_4	Aumento	30 %
Activación de procaspasas por Bax	a_1	Aumento	100 %
Autoactivación de caspasas	a_2	Aumento	100 %
Activación del gen Hdm2 inducida por p53 arrestador	$q1_{Hdm2}$	Disminución	50 %
Síntesis del ARNm Hdm2	s_3	Disminución	25 %
Traducción de Hdm2	t_3	Disminución	20 %
Fosforilación de Hdm2 citoplasmático	p_5	Disminución	50 %
Importación nuclear de Hdm2 citoplasmático	i_1	Disminución	75 %
Fosforilación de Hdm2 nuclear doble fosforilado por PLK3	p_{15}	Disminución	50 %
Degradación de HIPK2 impulsada por Hdm2 nuclear doble fosforilado y SIAH1	g_7	Disminución	50 %
Fosforilación de PIP3 por PI3K	p_8	Disminución	100 %
Fosforilación de AKT por PIP3	p_{12}	Disminución	75 %
Degradación del ARNm Bax	g_4	Disminución	50 %
Degradación de pro y caspasas	g_{17}	Disminución	25 %

es el único programa de muerte celular dirigido por p53 según este análisis, lo que concuerda con reportes donde investigadores han identificado a p53 como un facilitador de la muerte de células dañadas a través de ferroptosis, piroptosis, necrosis y autofagia; sin embargo, la ruta y proteínas participantes de estos genes en asociación a la respuesta de p53 a la IR aún no han sido descritas con detalle (Abuetabh et al., 2022), por lo que modelarlo no es posible aún. Este caso es muy similar a la senescencia (Prokhorova et al., 2020; Thomas et al., 2022), por lo que tampoco ha sido considerada en el presente modelo.

A pesar de que los genes participantes en la vía de apoptosis fueron detectados en el análisis de enriquecimiento, no es posible garantizar que todos los genes detectados son los que participan en esta vía en asociación al IR. Esto es por el propio principio de la metodología desarrollada por Purvis y colaboradores (2012), donde se induce la dinámica creciente de p53 al introducir la nutlina-3 en las células MCF-7, dinámica relacionada con la inducción de apoptosis que normalmente no es presentada por el fenotipo resistente a la radioterapia. Sin embargo, este arreglo experimental en realidad no induce la apoptosis, y de hecho se ha observado que induce solo ciertos genes apoptóticos activados por p53 (Purvis et al., 2012; Hafner et al., 2017), por lo que no se puede validar esta vía con certeza. Por ello, se consideraron los genes y proteínas modelados por Hat et al. (2016), en el que los genes BAX, SFN, BCL2L1 (codifica para BCL-xL) y CASP2 fueron identificados como DGE. Resalta así que solo se encuentra expresión diferencial de la caspasa 2 de las 14 que hay, lo cual puede ser explicado por esta apoptosis disfuncional.

La finalidad del modelo estudiado aquí es utilizar la muerte celular como indicador de la eficiencia de la terapia aplicada, por lo que se considera solamente la apoptosis y no el arresto celular. Por otro lado, la reparación y el reconocimiento del daño al ADN son partes del proceso cuesta arriba a la activación de ATM, por lo que por simplicidad no se modeló. Finalmente, los genes involucrados en la degradación de p53 por ubiquitinación se modelaron de manera implícita en los parámetros de tasa de degradación de p53 (**Anexo 1**). En el evento contrario de los genes involucrados en la síntesis de la proteína p53 (HSPA5 y RPL26) se aplicó la misma situación.

De esta manera, se mantienen los genes relacionados con la regulación e interacción de

p53, además de los de apoptosis. Los primeros mencionados (HDM2, CCNG1, PPM1D, SFN, AKT1, RBM38, PLK3 y CHEK2) y sus interacciones son explicadas a detalle en la **sección 5.3.3, 5.3.4 y 9.2.2**. Es necesario aclarar que los genes DE PML, PPP2R5C, ZMAT3 y EGR1 también se han reportado que interactúan y/o regulan a p53 en condiciones de irradiación, sin embargo, el cómo sucede esto y cómo impacta en la vía con las demás proteínas aún no es conocido. Por ello, es necesario actualizar este modelo conforme los datos experimentales permitan conocer las interacciones de p53 con otras proteínas.

Por otro lado, puede identificarse que en el modelo se consideran también las proteínas SIAH1, HIPK2, ATM y PI3K a pesar de sus genes no fueron identificados como DE. En el caso de estas proteínas ya se han reportado que sus genes no son regulados por p53 (Fischer, 2017), sin embargo, experimentalmente y teóricamente se ha demostrado que son relevantes para la regulación de p53, por lo que se mantuvieron en el modelo (Hat et al., 2016).

Cabe resaltar que TP53 propiamente no fue encontrado como un DE en el análisis DGE, lo que concuerda con previos resultados (Jiménez et al., 2022; Zhang y Chen, 2008; Shin et al, 2013). Particularmente Jiménez y colaboradores (2022) notaron que el ARNm de p53 en sí no cambia en respuesta a la radiación, en cambio, las oscilaciones en la concentración de proteína, ampliamente observadas previamente, resultan de la regulación de la estabilidad de la proteína p53 en sí. Esto resalta la importancia de los genes y proteínas relacionados con la regulación de p53, por lo que el considerar la mayor parte de éstas es ampliamente relevante en el estudio de la vía p53.

Considerando lo anterior, resalta el encontrar tres genes que no habían sido considerados de manera teórica previamente: PLK3, RBM38 y CCNG1 cuyas interacciones en la vía son descritas en la **sección 9.2.2**. En el caso de PLK3 y RBM38 no habían sido modeladas antes en la literatura publicada a pesar de ser proteínas relativamente bien estudiadas experimentalmente. En cambio, la proteína CCNG1 fue explorada por Chu y Chen (2008) donde se consideró en un modelo mínimo que no permite conocer su participación en la vía.

Al modelar las especies químicas pertenecientes a la vía, se evalúa el comportamiento de las células en tres aspectos fundamentalmente en función del tiempo: el nivel daño al ADN, la producción y dinámica de p53 y la activación de caspasas. Cabe resaltar que a

partir de una dosis 5 Gy de radiación gamma se considera una dosis crítica (Ouattara et al., 2010). La dosis de IR en los tratamientos clínicos es muy variable, pues depende del tipo de cáncer, localización del tumor, estado de salud del paciente, entre muchos otros factores. Las dosis pueden ir desde 0.03 Gy/s durante 2-7 min hasta más de 40 Gy/s en menos de 1s (Chandra et al., 2021). Como experimentalmente la dosis de 10 Gy es la más utilizada en experimentos a nivel celular (Ouattara et al., 2010) y el modelo de Hat et al. (2016) es capaz de reproducir el comportamiento celular tal dosis, esta dosis fue la utilizada primordialmente para la consecuente comparación, además de la dosis de 2 Gy en contraste.

En la célula saludable irradiada con 2 Gy *in silico* cuyo comportamiento se observa en la **Fig. 10**, se producen 20 DSB en el ADN. Es importante considerar que estos DSB no son totales, sino solo los DSB de reparación lenta, la cual ha sido un método de modelado introducido por Ma y colaboradores (2005). Tal daño es reconocido que lleva a la activación de ATM, y por tanto de p53, observándose como un pulso de tal proteína. Al ser 2 Gy aún una dosis baja, el daño producido en el ADN aún es reparable. Efectivamente antes de las 20 horas los daños se han reparado casi en su totalidad. Tal reparación provoca que p53 deje de ser activado y regrese así a su estado reprimido en las primeras 30 horas. Por su parte, se observa que las caspasas se mantienen en un valor de prácticamente 0, donde claramente no se cruza el umbral establecido de 1.5×10^3 moléculas por célula para desencadenar el proceso de apoptosis, lo que nos indica que las células no fueron a apoptosis. Este comportamiento reproduce a los resultados del modelo validado por Hat et al. (2016), cuyo modelo no contiene las nuevas 3 proteínas.

En cambio, cuando se aumenta la dosis a 10 Gy existe otra respuesta celular observada en la **Fig. 11**. Esta dosis produce aproximadamente 100 DSB, que activa a la vía donde p53 presenta un comportamiento creciente. Esta dinámica está asociada a la apoptosis (Purvis y Lahav, 2013), lo que se confirma con la superación del umbral de las caspasas aproximadamente un día posterior al estímulo, lo que confirma que esta célula es apoptótica. Es de interés notar que posterior a las 20 horas, las DSB crecen nuevamente, esto es porque las caspasas comienzan a degradar el ADN induciendo así a la muerte celular (Thomas et al., 2022). Esto concuerda con lo observado experimentalmente (Purvis y Lahav, 2013), y reproduce a los

resultados de la célula reportada por Hat et al. (2016).

Ahora, al repetir estas simulaciones pero con la célula cancerígena de mama MCF-7 resistente a la radioterapia, se observa que cuando la célula es irradiada con 2 Gy (**Fig. 12**) que se producen 20 DSB lo que provoca una dinámica oscilatoria de p53 por las primeras 30 horas. Por su parte, las caspasas se mantienen en un valor de prácticamente 0. Este comportamiento es de esperarse ya que 2 Gy aún no es una dosis crítica. Sin embargo, cuando se aumenta la dosis a 10 Gy, se presenta un comportamiento muy similar aún cuando las roturas del ADN se quintuplicaron. Las oscilaciones de p53 mantienen su periodicidad y amplitud, cuyas oscilaciones tienen un período de aproximadamente 7 h. También se observa que las oscilaciones tienen una amplitud pequeña, con un aumento de oscilaciones en comparación a 2 Gy. Este comportamiento del nivel de proteína de p53 está en congruencia con reportes experimentales donde se estudiaban grupos de células MCF-7 por 16h post estímulo, donde se vio que las oscilaciones tienen una amplitud constante y una periodicidad regular de aproximadamente 7 h, y el número de oscilaciones aumenta con la dosis de irradiación (Lahav et al., 2004). Sin embargo, en investigaciones posteriores realizadas en una gran cantidad de células individuales y con un período de tiempo de aproximadamente 3 días después de la irradiación gamma, revelaron oscilaciones mucho más ruidosas y una gran variabilidad intercelular en respuesta al daño por radiación (Geva-Zatorsky et al., 2006). Las oscilaciones se caracterizaron por una periodicidad y un ancho de pico bastante regulares, pero amplitudes de pico altamente variables (Geva-Zatorsky et al., 2006). En ese mismo estudio realizado por Geva-Zatorsky et al. (2006), el 60% de las células mostraron oscilaciones con un período característico de aproximadamente 5,5 h, mientras que una fracción significativa de células irradiadas no mostraron respuesta o mostraron fluctuaciones de variación lenta. Esta variabilidad es difícil de observar con una resolución determinista. Actualmente se tiene un consenso de que la mayoría de las células MCF-7 exhiben oscilaciones regulares con un período de 4 a 7 horas (Zhang et al., 2007), por lo que el período observado en nuestros resultados está acorde al rango.

Aún con considerable daño, la concentración de las caspasas se mantienen debajo del umbral, que se relaciona con la supervivencia celular aún con este daño. Justamente este

fenotipo de respuesta de oscilaciones de p53 ante el daño al ADN y la evasión a la muerte celular está asociado con la RR. De esta manera se valida el modelo de la célula cancerígena, al reproducir la respuesta celular observada experimentalmente.

Es de gran interés que esta validación se haya obtenido solo con el silenciamiento del gen PTEN, cuyo gen promueve indirectamente la apoptosis. Este silenciamiento, es decir, la falta de expresión del gen y consecuentemente de su transcrito fue reafirmada en la secuenciación del ARN dirigida en el 2022 (**sección 8.1**) al no presentar una lectura de su transcrito. Desde el 2008, PTEN ganó interés en estudios teóricos por su participación en el bucle de retroalimentación positiva con PIP3 y AKT que permite que el p53 alcance un nivel alto e inicie la apoptosis; además de ser uno de los supresores tumorales que se pierden con mayor frecuencia en los cánceres humanos (Puszyński et al., 2008). Esto aunado con que la pérdida de un alelo del gen PTEN aumenta drásticamente la progresión del cáncer de mama y de próstata, y a que las células cancerosas con un nivel reducido de PTEN tienen una mayor tasa de proliferación y una mayor resistencia a la radiación UV (Hat et al., 2020); se ha propuesto que la ausencia de PTEN en las células MCF-7 tiene un importante papel para colaborar en el mecanismo de resistencia a la radioterapia presentado. Sin embargo, tal hipótesis ha recibido fuertes críticas al argumentar que esta relación es muy severa para el conocimiento actual de la vía, y que esta resistencia podría deberse a otros mecanismos considerando que existen más alteraciones que presenta la línea celular MCF-7 como los mencionados en la **sección 5.7.1**. Aún así es de recalcar que solo con ese silenciamiento se observa un comportamiento análogo al observado experimentalmente, lo cual apoya la hipótesis que tal proteína tiene un importante papel en la vía, y particularmente en la resistencia. Estos resultados son apoyados por los encontrados por Hat y colaboradores (2016), donde en su modelo también se observa este comportamiento diferencial por el silenciamiento de PTEN.

Esto apunta a que PTEN podría ser una proteína clave para revertir la resistencia a la radioterapia. Actualmente, la terapia dirigida a la pérdida de actividades de la fosfatasa PTEN incluye terapias dirigidas a la vía RTK/PI3K (Liu et al., 2023), de la cual se discute la vía PI3K más adelante en el documento. Incluso, estudios recientes investigaron que el crecimiento de tumores deficientes en PTEN se puede prevenir y controlar con la ayuda de

inhibidores de la vía AKT/mTOR (Liu et al., 2023). Sin embargo, cabe señalar que todavía existe controversia en la terapia dirigida a PTEN. Por un lado, la activación de PTEN puede inhibir la generación, proliferación, invasión y metástasis del cáncer. Por otro lado, se ha demostrado que la pérdida de PTEN estimula el crecimiento regenerativo (Liu et al., 2023). Por lo que su estudio clínico es aún necesario.

Una vez con ambos modelos de células validados, se puede entonces comparar la respuesta celular cuando se consideran alteraciones en la vía. Se evalúa así la robustez del modelo, definiendo a la robustez como la capacidad de mantener el rendimiento de la vía frente a perturbaciones e incertidumbres, y la sensibilidad es una medida de las desviaciones del sistema generadas por perturbaciones en el sistema (Chu y Chen, 2008). Como ya se ha mencionado, los múltiples ciclos de retroalimentación que presenta la vía proporcionan redundancias, fortalecen la robustez y reducen las variaciones fenotípicas (Chu y Chen, 2008).

Al considerar el modelo de la célula cancerígena, el análisis refleja una robustez paramétrica, sin embargo, existe sensibilidad en los parámetros de las tasas de reacciones presentadas en la **Tabla 4**, los cuales nos indican que se podrían proponer diversos objetivos terapéuticos: HDM2, p53, HIPK2, AKT, PI3K, PIP3, PLK3, Bax, procaspasas y caspasas.

Al apreciar la **Tabla 3** se observa que el sistema de la célula saludable es en realidad más sensible que el de la cancerígena MCF-7. Es decir, muchas perturbaciones en las tasas de reacciones provocan que la decisión celular se altere más comúnmente. En el caso de la célula saludable esto quiere decir que en una dosis alta de 10 Gy, las alteraciones en las tasas provocan que se evada la muerte celular. Lo ideal entonces es tener objetivos terapéuticos que induzcan la muerte celular en las células MCF-7 mientras "protegen" a las células saludables al evitar su muerte. Sin embargo, ese es un juego delicado al inducir daño al ADN por la IR y preservarlo en las saludables, podría provocar paradójicamente cáncer. Lo que lo salva es que tiene su DDR teóricamente intacto, y por tanto, el daño al ADN sería reparado. Es por esto que los ensayos clínicos son necesarios para evaluar los tratamientos propuestos. Que la célula saludable sea más sensible a las perturbaciones también demuestra como el cáncer se aprovecha de esa sensibilidad, mientras que el sistema de la célula cancerígena se vuelve más robusta ante las señales anticrecimiento. Esto ya se ha inferido previamente por Chu y Chen

(2008).

La reactivación de la vía p53 ha sido un objetivo de la terapia contra el cáncer durante décadas. Sin embargo, muy pocos de los programas de desarrollo de fármacos con el fin de restaurar la funcionalidad del p53 en los tumores han llegado a la fase final de los ensayos clínicos y, hasta el momento, no se ha aprobado ningún tratamiento basado en el p53 en los Estados Unidos o Europa (Hassin y Oren, 2023). Esto se debe probablemente a que, como factor de transcripción nuclear, el p53 no posee las características típicas de un fármaco diana y, por lo tanto, se ha considerado durante mucho tiempo que no se puede tratar con fármacos (Hassin y Oren, 2023). Sin embargo, en los últimos años han surgido varios enfoques prometedores para la terapia basada en p53, entre ellas las moléculas pequeñas que pueden proteger al p53 de sus reguladores negativos están ganando interés y la modulación farmacológica de las funciones de la proteína p53 (Eliaš y Macnamara, 2021; Hassin y Oren, 2023). Lamentablemente, hasta el momento no existen estudios clínicos claros que confirmen el éxito de las aplicaciones de las terapias en el tratamiento de cánceres (Eliaš y Macnamara, 2021). Además, los esfuerzos terapéuticos descritos se han acompañado de efectos secundarios no deseados en los tejidos normales: aparición de tumores resistentes al p53 o envejecimiento prematuro por ejemplo (Eliaš y Macnamara, 2021).

Actualmente se ha centrado en el desarrollo de las moléculas pequeñas como las principales estrategias farmacológicas para atacar al p53 WT. Al ser el principal regulador de p53, Hdm2 y su interacción con p53 ha sido investigado intensamente. Justamente en nuestros resultados se aprecia a Hdm2 como una atractiva diana, ya que en la célula cancerígena el silenciamiento del gen Hdm2 promueve la reactivación de las caspasas ante la IR. Incluso el aumento de la tasa de fosforilación que la inactiva (una de ellas por PLK3) y su degradación (una de ellas por HIPK2) también provocan la muerte celular ante el estímulo. Además, la sobreexpresión de Hdm2 en la célula saludable provoca la evasión celular ante el alto daño, lo cual es un efecto deseado para evadir efectos secundarios. Estos resultados apuntan a que la función supresora de tumores de p53 puede activarse mediante la inhibición de Hdm2. De hecho, la inhibición farmacológica dirigida de la interacción Hdm2-p53 se está probando en la terapia del cáncer, y ya se han desarrollado varios inhibidores de moléculas pequeñas,

como el compuesto pionero Nutlina-3 (Tatavosian et al., 2023). Este compuesto ya ha sido mencionado en Metodología en la **sección 9.1**. Este inhibidor de Hdm2 y las consecuentes moléculas pequeñas tienen el objetivo terapéutico de reactivar p53 (Issaeva et al., 2019). En el caso de la Nutlina-3, esta imita la unión de p53 al extremo N-terminal de Hdm2 y, por lo tanto, bloquea competitivamente la asociación con p53 (Meek, 2015). En teoría se han vistos resultados positivos, al observar que el tratamiento de células con Nutlina-3 induce altos niveles de proteína p53 y da lugar a una inducción robusta de la expresión génica de p53 y resultados biológicos (Meek, 2015); además de sensibilizar a la radiación a las células de cáncer de pulmón, carcinoma laríngeo, cáncer de esófago escamoso y cáncer de próstata (Hat et al., 2020). También mejora la eficacia de la quimioterapia que daña el ADN en el cáncer de mama MCF-7, neuroblastoma, leucemia linfocítica crónica de células B y células de sarcoma (Hat et al., 2020). Por otro lado, TDP665759, un inhibidor de benzodiazepinadiona del complejo Hdm2-p53, aumenta la sensibilidad de las células cancerosas a la doxorrubicina en cultivos de células de melanoma A375 y xenoinjertos (Hat et al., 2020). Otros compuestos que bloquean la interacción Hdm2-P53 y reactivan el TP53 son los compuestos HLI98 con estructura química 5-Deazaflavina, MI-219 y MI-319 (inhibidor de la interacción Hdm2-p53) con estructura química Spiro-oxindole, entre otros (Foroutan, 2023).

Incluso varios inhibidores de Hdm2-p53 ya han avanzado a la fase de ensayos clínicos, pero los resultados no son favorables (Li et al., 2023). Aunque estas moléculas activan específicamente p53 y sus genes diana posteriores, provocan respuestas muy diversas en los distintos tipos de células (Tatavosian et al., 2023). En la mayoría de los tipos de células cancerosas, la respuesta a la inhibición de Hdm2 es una forma reversible de detención del ciclo celular de escaso valor terapéutico, y solo unas pocas líneas celulares experimentan apoptosis (Tatavosian et al., 2023). Además, dado que compuestos actúan simplemente como inhibidores farmacológicos de Hdm2, es posible que no estimulen otros eventos reguladores dentro de la vía p53, o en vías paralelas, que ocurren en respuesta a un estímulo natural lo que puede tener un efecto significativo en el resultado de la inducción de p53 con dichos compuestos (Meek, 2015). Otra propuesta fue la introducción de ARNi contra Hdm2 en las células de sarcoma humano MLS1765 lo que resultó en un aumento en el número de células que experimentan

apoptosis (Gajjar et al., 2012). Sería de interés comprobar el papel de estas moléculas pero ahora en combinación con la radioterapia, pues los resultados del presente trabajo lo apuntan como una interesante combinación terapéutica.

Otro interesante método es apuntar a los reguladores de p53 inducidos por PTM para sensibilizar a las células cancerosas a los agentes que dañan el ADN (Abuetabh et al., 2022). Entre las enzimas que participan en estas modificaciones se encuentra justamente HIPK2, el cual fue otro de los objetivos que proponen los resultados al observar que al aumentar su síntesis y su acción de fosforilación a p53 arrestador en las células MCF-7 se observa de nuevo la muerte celular. Como HIPK2 fosforila a p53 en S46 convirtiéndolo en su estado asesino, se conduce a la transcripción de genes proapoptóticos (Abuetabh et al., 2022) induciendo la muerte celular. Sin embargo, se observa que el silenciamiento de HIPK2 en las células saludables provoca la evasión de la muerte celular. Además, al disminuir la tasa de fosforilación de p53 arrestador en Ser46 por HIPK2 tiene el mismo efecto. Justamente se ha observado que la pérdida o la regulación negativa de HIPK2 en muchos tipos de tumores humanos, y tal reducción de los niveles de HIPK2 a menudo se correlaciona con la progresión del cáncer y se asocia con un mal pronóstico. Es de interés que recientemente se mostró que HIPK2 sensibiliza a las células de cáncer de colon al tratamiento con el fármaco verbascósido (Conte et al., 2023). Por otro lado, HIPK2 se ha relacionado con la quimiorresistencia también por su capacidad de sensibilizar las células cancerosas a la terapia al inhibir a Wip1 (Conte et al., 2023). En la actualidad no se cuenta con un método de tratamiento con esta proteína, pero en conjunto, estos datos refuerzan la idea de que HIPK2 puede ser un objetivo terapéutico para sensibilizar las células cancerosas a la radioterapia. La proteína o gen podrían ser el objetivo directamente o a través de los miARN u otras proteínas que regulan su expresión, los cuales parecen ser cruciales para el papel de la HIPK2 en muchas células cancerosas (Conte et al., 2023).

Por otro lado, los resultados indican que el lazo de PI3K-AKT es relevante pues 3 de las proteínas pertenecientes a esta vía son apuntadas como sensibles para reactivar la muerte celular en las células MCF-7: PI3K, PIP3 y AKT. AKT fue señalada también por el modelo realizado por Choi y colaboradores (2022), en donde se analizó el paisaje de atractores,

identificando la perturbación de AKT como de alta potencia y eficacia, pero también exhibe toxicidad. De manera interesante, ellos también encontraron que la combinación de perturbación con ATM y/o Hdm2 redujo la toxicidad, lo que resultó en la propuesta de una ventana terapéutica mejorada en comparación con la inhibición simple de AKT. Es alentador que el tratamiento con el inhibidor de la quinasa AKT, MK2206, aumente el nivel de p53 (a través de una manera dependiente de RBM38) de una manera dependiente de la dosis (Zou et al., 2021). Como ya se mencionó anteriormente, estudios recientes investigaron que el crecimiento de tumores deficientes en PTEN se puede prevenir y controlar con la ayuda de inhibidores de la vía AKT/mTOR (Liu et al., 2023). Es necesario recordar que al estar silenciado PTEN, la vía PI3K/AKT se encuentra sobreactivada.

Después de Hdm2, de los objetivos propuestos en el presente trabajo, la vía de PI3K/AKT es tal vez la más explorada farmacológicamente. Se han identificado ya diversos inhibidores de AKT, los cuales ya han avanzado a evaluaciones clínicas. Pero, hasta ahora, la FDA solo ha aprobado unos pocos inhibidores de AKT para el tratamiento del cáncer, entre ellos la miltefosina donde se están inscribiendo pacientes en un ensayo clínico para probar su eficacia como terapia contra el cáncer (Song et al., 2019). El tratamiento con AKT como diana tiene potencial terapéutico, pero también presenta inconvenientes debido a la compleja red de vías de señalización. Debido a que PI3K es una quinasa ascendente de AKT, tanto los inhibidores de PI3K como los de mTOR podrían afectar las cascadas de señalización de AKT. Los inhibidores de PI3K aprobados por la FDA incluyen Idelalisib utilizado en pacientes con leucemia y linfoma, y copanlisib para tratar a pacientes adultos con linfoma folicular recidivante (Song et al., 2019). Esto puede ser ventaja y desventaja a la vez. Por ejemplo, el tratamiento con MK-2206 redujo el nivel de expresión de p-AKT (S473 y T308) en las células DLBCL, pero sus proteínas ascendentes, incluida PI3K, se sobreactivaron para compensar (Song et al., 2019). Para evitar el fenómeno de resistencia compensatoria, los inhibidores específicos de AKT podrían usarse en combinación con inhibidores de PI3K o con inhibición dual o triple de esos objetivos para alcanzar mejores propiedades farmacocinéticas (Song et al., 2019). Entonces, sería interesante ampliar la combinación junto a la radioterapia para evadir la resistencia.

Por otro lado, se encuentra PLK3, cuya disminución en su tasa de fosforilación a Hdm2 promueve la muerte celular en MCF-7. De igual manera, la disminución de su fosforilación a p53 promueve la evasión celular en las células saludables, presentándose como un interesante objetivo terapéutico. Actualmente no se ha desarrollado la investigación de PLK3 como una diana contra el cáncer, sin embargo es objetivo también de los inhibidores de PLK1 competitivos con ATP (Helmke et al., 2016). Esto no es algo deseado, pues la inhibición simultánea de PLK1 y PLK3 en comparación con la inhibición única de PLK1 o PLK3 podría ser desventajosa para la calidad de los nuevos fármacos contra el cáncer en lo que respecta a la función de PLK3 como gen supresor de tumores y su función en la respuesta al estrés. Sin embargo, recientemente se encontró que PLK3 mejora la sensibilidad al Cisplatino de las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas mediante la inhibición de la vía PI3K/AKT mediante la estabilización de PTEN (Xu et al., 2024). Tal situación no aplica en las células MCF-7 al no tener PTEN que estabilizar, sin embargo abre las puertas a la investigación sobre la función de PLK3 en la quimioresistencia, y como apunta el presente trabajo, a la RR.

Al retomar el proceso de apoptosis intrínseca presentado en la **sección 5.5.2**, se recuerda que la expresión e interacción entre los miembros de la familia BCL-2 ubicados principalmente en las mitocondrias son responsables de la apoptosis. Son justamente la proteína Bax, además de las caspasas como las señaladas en el estudio como posibles dianas.

La sobre-expresión de Bax, así como el aumento de su síntesis y activación a las procaspasas, en las células MCF-7 llevan a la muerte celular. En cambio, el silenciamiento de Bax y los genes BCL-XL y CASP en las células saludables llevan a la evasión de la muerte celular. Probablemente es Bax el objetivo terapéutico que provocaría mayor citotoxicidad, al considerar que si se distribuye de manera sistemática podría inducir la muerte celular en muchas células saludables. Sin embargo, si se podría dirigir la acción del fármaco solamente a las células cancerígenas sería un interesante blanco.

Recientemente se ha demostrado que la selección de reguladores importantes de la familia de proteínas BCL-2 permite superar la resistencia del cáncer a la apoptosis en múltiples tipos de cáncer como método de radiosensibilización (Wu et al., 2023). Además, estudios recientes

han demostrado que la combinación de activadores de Bax e inhibidores de BCL-XL mejora significativamente la apoptosis y altera la resistencia terapéutica del tumor (Wu et al., 2023). Por lo tanto, la modulación farmacológica de la actividad proapoptótica de BAX con moléculas pequeñas ofrece un paradigma prometedor para bloquear la muerte celular aberrante o restaurar la muerte celular. Se han logrado grandes avances en el descubrimiento de varios moduladores de la apoptosis dirigidos a BAX. Sin embargo, el desarrollo de terapias con BAX como medicamentos clínicos enfrenta varios desafíos, ya que las opciones de tratamiento limitadas y la ventana terapéutica extremadamente corta (<3 h) del tratamiento actual conducen a su mortalidad y morbilidad masivas (Zhang et al., 2024). La activación directa de BAX con moléculas pequeñas ofrece una estrategia innovadora para el tratamiento del cáncer con el potencial terapéutico de superar la resistencia a la apoptosis de diversos agentes terapéuticos aprobados, como quimioterapias, miméticos de BH3 e inhibidores de mTOR en una amplia gama de cánceres (Zhang et al., 2024). Por ejemplo, las interacciones entre los agonistas y BAX K21 son cruciales para la activación de BAX, mientras que los contactos entre los antagonistas y BAX R145 son importantes para la inhibición de BAX (Zhang et al., 2024). Se puede apreciar entonces que superar la RR con el desarrollo de combinaciones sinérgicas con pequeñas moléculas dirigidas innovadoras puede mejorar potencialmente las actividades y los resultados de la radioterapia.

Al mismo tiempo, existe un renovado interés en las estrategias de terapia génica basados en p53 (Hassin y Oren, 2023). Entre ellos se encuentra la técnica de siRNA, la cual es un método para silenciar genes utilizando pequeños ARN (de Brito e Cunha et al., 2022). Según los resultados del modelo, Hdm2 y AKT serían posibles blancos terapéuticos, siendo el Hdm2 una posibilidad que ya se encuentra en desarrollo como se mencionó anteriormente. Actualmente, tal método se ha implementado en pruebas clínicas con ADN-PKc como blancos, conduciendo a la potenciación de las células cancerosas ante la radiación y la quimioterapia (Li et al., 2023). Por lo que la investigación con otros blancos serían de gran interés para combatir la RR.

11. Conclusiones

En este análisis *in silico* se encontró que al modificar las proteínas pertenecientes a la vía p53 HDM2, p53, HIPK2, AKT, PI3K, PLK3, caspasas y Bax; se pueden sensibilizar a las células MCF-7 a la radioterapia.

Particularmente, PLK3 es una de las tres proteínas modeladas de manera teórica por primera vez en el presente trabajo, cuya relevancia fue detectada al encontrar a su gen con expresión diferencial al irradiar a células MCF-7 de cáncer de mama. Este modelo ha apuntado al papel de PLK3 en la inducción de la muerte celular, tanto en células cancerígenas MCF-7 como saludables, lo que apunta a que más estudios teóricos deberían de ser apuntadas a explorar esta proteína.

Por otro lado, se ha identificado que PTEN es relevante en la inducción de la muerte celular ante la radiación gamma, lo cual tiene implicaciones en el cáncer. Al no observar muerte celular en células cancerígenas MCF-7 irradiadas con altas dosis de radiación gamma, se propone que el silenciamiento del gen PTEN puede ser un causante de la resistencia a la radioterapia presentada por estas células. Tal situación implica que es un interesante candidato como objetivo terapéutico para la terapia génica con el fin de renovar su expresión en estas células cancerígenas.

En el caso de las proteínas PLK3, caspasas y HIPK2 se proponen como dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos anticancerígenos y sensibilizadores a la radiación.

Por otro lado, las proteínas HDM2, p53, Bax, AKT y PI3K, ya se han desarrollado fármacos que buscan eliminar las células cancerígenas, los cuales se encuentran en ensayos clínicos. Sin embargo, estos fármacos no han sido probados como sensibilizadores a la radiación. Por ello, se sugiere combinar las drogas desarrolladas con la radioterapia para mejorar los resultados radioterapéuticos, lo cual sería de alto interés para mejorar los tratamientos disponibles contra el cáncer, y por tanto, alargar y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Finalmente, la exploración de la terapia génica mediante la técnica siRNA **in silico** en este trabajo apunta a que Hdm2 y AKT serían interesantes dianas para el método siRNA, el cual silencia a los genes de esas proteínas. Para Hdm2 se ha desarrollado ya una estrategia que se encuentra actualmente en evaluaciones clínicas. Mientras que AKT aún es una diana

no explorada que podría ser atractiva para futuros estudios.

12. Perspectivas

Estudios experimentales son requeridos para calcular los valores exactos de las tasas de reacciones de una gran parte de las reacciones presentadas en este modelo. Además, el conocer la función e interacción de los genes asociados y aún no asociados a la vía de p53 permitiría ampliar el conocimiento de posibles reguladores de la decisión celular, por lo que sería relevante actualizar el modelo con tal información.

Por otro lado, la decisión celular es un proceso complejo que involucra la comunicación con otras vías de señalización que también se activan al detectar el daño al ADN, por lo que explorar esa comunicación sería de interés no solo para mejorar el conocimiento teórico del cáncer, sino proponer nodos clave de interacción como biomarcadores o blancos terapéuticos.

También sería de interés utilizar una resolución estocástica de los modelos, para considerar la variabilidad no solo del comportamiento de p53, que permitiría una mejor comprensión de su acción y una comparación más acertada de lo observado experimentalmente, sino también de la respuesta celular.

Además, considerar combinaciones entre las alteraciones inducidas en la vía, y no solo alteraciones únicas, en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas sería relevante para proponer protocolos y estrategias de tratamiento combinadas para mejorar los resultados radioterapéuticos.

Finalmente, se sugiere explorar la modulación de la vía p53 en otros tipos de cáncer resistentes a la radioterapia, utilizando técnicas similares a las implementadas en este estudio, para evaluar su efectividad y posibles aplicaciones terapéuticas.

13. Anexo 1

El modelo actualizado con información transcriptómica de la versión publicada de Hat et al. (2016) discutida en la Metodología en la **sección 8.5** se presenta a continuación. Tal modelo se realizó con los siguientes parámetros:

Tabla 4: Valores de los parámetros del modelo matemático de vía p53.

	Parámetro	Símbolo	Valor
Módulo central de regulación			
(1)	Tasa de daño del ADN inducido por la irradiación	h_1	10^{-6} molécula/s
(2)	Cantidad de DSB por 1Gy de radiación gamma	DSB_{Gy}	10 molécula/s
(3)	Dosis de radiación gamma	IR_{Gy}	1, 2, 10 Gy
(4)	Duración de la irradiación	IR_T	600 s
(5)	Máxima cantidad de DSB por radiación gamma	DSB_{max}	10^6 molécula/s
(6)	Tasa de reparación del ADN	rep	10^{-3} molécula/s
(7)	Cantidad de complejos de reparación del ADN	DSB_{rep}	20 molécula/s
(8)	Fosforilación de ATM por reconocimiento de DSB	p_1	3×10^{-4} molécula/s
(9)	Coeficiente de Hill	h	2
(10)	Constante de Michaelis-Menten en fosforilación de ATM por irradiación	M_1	5

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(11)	Desfosforilación de ATM fosfatada por Wip1	d_1	10^{-8} molécula/s
(12)	Desfosforilación de SIAH1 fosfatada	d_2	3×10^{-5} molécula/s
(13)	Fosforilación de SIAH1 por ATM fosfatada	p_2	10^{-8} molécula/s
(14)	Síntesis de HIPK2	s_8	3×10^{-5} molécula/s
(15)	Degradación de HIPK2 impulsada por Hdm2 nuclear doble fosfatado y SIAH1	g_7	3×10^{-5} molécula/s
(16)	Síntesis de p53	s_6	300 molécula/s
(17)	Desfosforilación espontánea de p53 arrestador	d_3	10^{-4} molécula/s
(18)	Desfosforilación de p53 fosforilado en Ser46 por Wip1	d_{11}	1×10^{-10} molécula/s
(19)	Unión de RBM38 fosfatada a p53	b_6	1×10^{-11} molécula/s
(20)	Degradación espontánea de p53 y p53 arrestador	g_{101}	1×10^{-5} molécula/s
(21)	Degradación de p53 forzada por Hdm2 nuclear doble fosforilado	g_{11}	1×10^{-11} molécula/s
(22)	Fosforilación de p53 en S15 y S20 por ATM fosfatada	p_3	3×10^{-8} molécula/s
(23)	Fosforilación de p53 en S46 por HIPK2	p_{11}	1×10^{-10} molécula/s

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(24)	Degradación de p53 forzada por RBM38	g_{21}	1×10^{-11} molécula/s
(25)	Desfosforilación de p53 asesino forzada por Wip1	d_4	1×10^{-10} molécula/s
(26)	Fosforilación de p53 en S20 por PLK3	p_{14}	3×10^{-8} molécula/s
(27)	Degradación de p53 arrestador forzada por Hdm2 nuclear doble fosforilado	g_{12}	1×10^{-13} molécula/s
(28)	Fosforilación de p53 arrestador en S46 por HIPK2	p_4	1×10^{-10} molécula/s
(29)	Desfosforilación de p53 fosforilado en S46 por Wip1	d_{11}	1×10^{-10} molécula/s
(30)	Degradación espontánea de p53	g_{10}	1×10^{-5} molécula/s
(31)	Degradación de p53 asesino forzada por Hdm2 nuclear doble fosforilado	g_{13}	1×10^{-13} molécula/s
(32)	Síntesis del transcrito de Hdm2	s_3	0.1 molécula/s
(33)	Activación espontánea del gen Hdm2	q_{0MD}	1×10^{-4} molécula/s
(34)	Activación del gen Hdm2 inducida por p53 arrestador	q_{1MD}	3×10^{-13} molécula/s
(35)	Inactivación de genes	q_2	3×10^{-3} molécula/s
(36)	Degradación del transcrito de Hdm2	g_3	3×10^{-4} molécula/s

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(37)	Degradación del transcrito de Hdm2 por RBM38	g_{22}	1×10^{-14} molécula/s
(38)	Traducción de Hdm2	t_3	0.1 molécula/s
(39)	Desfosforilación de Hdm2 citoplasmático doble fosforilado	d_5	1×10^{-4} molécula/s
(40)	Fosforilación de Hdm2 citoplasmático	p_5	1×10^{-8} molécula/s
(41)	Degradación de Hdm2 citoplasmático	g_{14}	1×10^{-4} molécula/s
(42)	Importación nuclear de Hdm2 citoplasmático doble fosforilado	i_1	1×10^{-3} molécula/s
(43)	Degradación espontánea de Hdm2	g_{15}	3×10^{-5} molécula/s
(44)	Desfosforilación de Hdm2 nuclear triple fosforilado en S395 por Wip1	d_6	1×10^{-10} molécula/s
(45)	Fosforilación de Hdm2 nuclear doble fosforilado por CCNG1	p_{15}	1×10^{-8} molécula/s
(46)	Fosforilación de Hdm2 nuclear doble fosforilado por ATM fosfatada	p_6	1×10^{-8} molécula/s
(47)	Degradación de Hdm2 nuclear triple fosforilado	g_{16}	1×10^{-4} molécula/s
(48)	Desfosforilación de Hdm2 nuclear triple fosforilado por RBM38	d_{14}	1×10^{-4} molécula/s
(49)	Síntesis del transcrito de Wip1	s_1	0.1 molécula/s

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(50)	Activación espontánea del gen PPMID	q_{0W}	1×10^{-5} molécula/s
(51)	Activación del gen PPMID inducida por p53 arrestador y RBM38	q_{1W}	3×10^{-13} molécula/s
(52)	Degradación del transcrito de Wip1	g_1	3×10^{-4} molécula/s
(53)	Traducción de Wip1	t_1	0.1 molécula/s
(54)	Degradación de Wip1	g_8	3×10^{-4} molécula/s
(55)	Síntesis del transcrito de PTEN	s_2	0.03 molécula/s
(56)	Activación espontánea del gen PTEN	q_{0PT}	1×10^{-5} molécula/s
(57)	Activación del gen PTEN inducida por p53 arrestador	q_{1PT}	MCF-7: 0; Saludable: 3×10^{-13} molécula/s
(58)	Unión de RBM38 a transcrito PTEN	b_7	1×10^{-6} molécula/s
(59)	Degradación del transcrito de PTEN	g_2	3×10^{-4} molécula/s
(60)	Traducción de PTEN	t_2	0.1 molécula/s
(61)	Degradación de PTEN	g_6	3×10^{-5} molécula/s
(62)	Fosforilación de PIP3 por PI3K	p_8	3×10^{-9} molécula/s

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(63)	Fosforilación de PTEN por PLK3	p_{16}	1×10^{-8} molécula/s
(64)	Desfosforilación de PIP3 a PIP2 por PTEN	d_7	3×10^{-7} molécula/s
(65)	Fosforilación de PIP3 por AKT	p_{12}	1×10^{-9} molécula/s
(66)	Desfosforilación espontánea de AKT fosfatada	d_8	1×10^{-4} molécula/s
(67)	Síntesis del transcrito de RBM38	s_6	0.03 molécula/s
(68)	Activación espontánea del gen RBM38	$q_{0_{RBM}}$	1×10^{-5} molécula/s
(69)	Activación del gen RBM38 inducida por p53 arrestador	$q_{1_{RBM}}$	3×10^{-13} molécula/s
(70)	Degradación del transcrito de RBM38	g_{23}	1×10^{-4} molécula/s
(71)	Traducción de RBM38	t_6	0.1 molécula/s
(72)	Fosforilación de RBM38	p_{13}	1×10^{-4} molécula/s
(73)	Degradación de RBM38	g_{24}	3×10^{-4} molécula/s
(74)	Desfosforilación de RBM38 fosfatada	d_{13}	1×10^{-4} molécula/s
(75)	Degradación espontánea de RBM38 fosfatada	g_{25}	1×10^{-5} molécula/s

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(76)	Degradación de RBM38 fosfatada	g_{26}	1×10^{-11} molécula/s
(77)	Síntesis del transcrito de PLK3	s_9	0.03 molécula/s
(78)	Activación espontánea del gen PLK3	$q_{0_{PLK}}$	1×10^{-5} molécula/s
(79)	Activación del gen PLK3 inducida por p53 arrestador	$q_{1_{PLK}}$	3×10^{-13} molécula/s
(80)	Degradación del transcrito de PLK3	g_{27}	3×10^{-4} molécula/s
(81)	Traducción de PLK3	t_7	0.1 molécula/s
(82)	Degradación de PLK3	g_{28}	3×10^{-4} molécula/s
(83)	Síntesis del transcrito de CCNG1	s_{10}	0.03 molécula/s
(84)	Activación espontánea del gen CCNG1	$q_{0_{CG}}$	1×10^{-5} molécula/s
(85)	Activación del gen CCNG1 inducido por p53 arrestador	$q_{1_{CG}}$	3×10^{-13} molécula/s
(86)	Degradación del transcrito de CCNG1	g_{29}	1×10^{-4} molécula/s
(87)	Traducción de CCNG1	t_8	0.1 molécula/s
(88)	Degradación de CCNG1	g_{30}	1×10^{-4} molécula/s
Módulo de apoptosis			

Continuación de la tabla			
	Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(89)	Síntesis del transcrito de Bax	s_4	0.03 molécula/s
(90)	Activación espontánea del gen Bax	$q_{0_{BX}}$	1×10^{-5} molécula/s
(91)	Activación del gen Bax inducido por p53 asesino	$q_{1_{BX}}$	3×10^{-13} molécula/s
(92)	Degradación del transcrito de Bax	g_4	3×10^{-4} molécula/s
(93)	Traducción de Bax	t_4	0.1 molécula/s
(94)	Unión de Bax a BclXl	b_1	3×10^{-5} molécula/s
(95)	Desunión del complejo Bax-BclXl	u_1	1×10^{-3} molécula/s
(96)	Degradación de Bax	g_9	1×10^{-4} molécula/s
(97)	Desunión del complejo Bax:BclXl	u_2	1×10^{-3} molécula/s
(98)	Degradación de Bax en complejo Bax:BclXl	g_{16}	1×10^{-4} molécula/s
(99)	Desfosforilación espontánea de Bad fosfatada	d_9	3×10^{-5} molécula/s
(100)	Fosforilación de Bad por AKT fosfatada	p_7	3×10^{-9} molécula/s
(101)	Unión de Bad a BclXl	b_2	3×10^{-3} molécula/s

Continuación de la tabla		
Parámetro	Símbolo	Valor (molécula/s)
(102) Desunión del complejo Bad:14-3-3	u_3	1×10^{-3} molécula/s
(103) Unión de Bad fosfatada a 14-3-3	b_3	3×10^{-3} molécula/s
(104) Síntesis de procaspasas	s_7	30 molécula/s
(105) Degradación de procaspasas	g_{17}	3×10^{-4} molécula/s
(106) Activación de procaspasas por Bax	a_1	3×10^{-10} molécula/s
(107) Autoactivación de caspasas	a_2	1×10^{-12} molécula/s
(108) Degradación de caspasas	g_{18}	3×10^{-4} molécula/s

Tabla 5: Ecuaciones diferenciales del modelo matemático de vía p53.

Símbolo	Especie	Ecuación
Módulo central de regulación		
DNA_{DSB}	DSB provocadas por la irradiación	(1) $\frac{dDNA_{DSB}}{dt} = h_1 \left(\frac{(DSB_{Gy})(IR_{Gy})}{IR_T} \right) (DSB_{max} - DNA_{DSB}) + [h_2(CA)(DSB_{max} - DNA_{DSB})] - \frac{rep(DNA_{DSB})}{(DNA_{DSB} + DSB_{rep})}$
A_p	Quinasa ATM activada	(2) $\frac{dA_p}{dt} = (p_1) \frac{(A)DNA_{DSB}^h}{(M_1^h)(DNA_{DSB}^h)} - d_1(W)(A_p)$
SH	SIAH1 no fosforilada	(3) $\frac{dSH}{dt} = d_2(SH_p) - (p_2)(A_p)(SH)$

Continuación de la tabla

Símbolo	Especie	Ecuación
HP	Quinasa HIPK2	(4) $\frac{dHP}{dt} = s_8 - (g_7)(HP)(SH + MD_{n_2p})^2$
p53	p53 no fosforilado	(5) $\frac{dp53}{dt} = s_6 + d_3(p53_a) + d_{11}(W)(p53_{s46}) + b_6(RBM_p) - [g_{101} + g_{11}(MD_{n_2p})^2](p53) - p_3(A_p)(p53) - p_{11}(HP)(p53) - g_{21}(RBM)^2(p53)$
p53 _a	p53 en estado arrestador	(6) $\frac{dp53_a}{dt} = p_3(A_p)(p53) + d_4(p53_k)(W) + p_{14}(PLK) - [g_{101} + g_{12}(MD_{n_2p})^2](p53_a) - d_3(p53_a) - p_4(p53_a)(HP)$
p53 _{s46}	p53 fosforilado solamente en Ser46	(7) $\frac{dp53_{s46}}{dt} = p_{11}(HP)(p53) + d_{10}(p53_k) - d_{11}(W)(p53_{s46}) - p_3(A_p)(p53_{s46}) - [g_{10} + g_{13}(MD_{n_2p})^2](p53_{s46})$
p53 _k	p53 en estado asesino	(8) $\frac{dp53_k}{dt} = p_4(HP)(p53_a) + p_3(A_p)(p53_{s46}) - d_4(W)(p53_k) - [g_{10} + g_{13}(MD_{n_2p})^2](p53_k) - d_{10}(p53_k)$
MD _m	Transcrito de Hdm2	(9) $\frac{dMD_m}{dt} = (s_3) \frac{q_0.MD + q_1.MD(p53_a)^2}{q_2 + q_0.MD + q_1.MD(p53_a)^2} - g_3(MD_m) - g_{22}(RBM)^2(MD_m)$
MD _c	Hdm2 citoplasmático no fosforilado	(10) $\frac{dMD_c}{dt} = t_3(MD_m) + d_5(MD_{c2p}) - p_5(MD_c)(AK_p) - g_{14}(MD_c)$

Continuación de la tabla

Símbolo	Especie	Ecuación
MD_{c2p}	Hdm2 citoplasmático doble fosforilado	(11) $\frac{dMD_{c2p}}{dt} = p_5(MD_c)(AK_p) - i_1(MD_{c2p}) - d_5(MD_{c2p}) - g_{15}(MD_{c2p})$
MD_{n2p}	Hdm2 nuclear doble fosforilado	(12) $\frac{dMD_{n2p}}{dt} = i_1(MD_{c2p}) + d_6(W)(MD_{n3p}) + p_{15}(CG) - g_{15}(MD_{n2p}) - p_6(A_p)(MD_{n2p})$
MD_{n3p}	Hdm2 nuclear triple fosforilado	(13) $\frac{dMD_{n3p}}{dt} = p_6(A_p)(MD_{n2p}) - d_6(W)(MD_{n3p}) - g_{15}(MD_{n3p}) - g_{16}(MD_{n3p}) - d_{14}(RBM)$
W_m	Transcrito de Wip1	(14) $\frac{dW_m}{dt} = s_1 \frac{q_{0W} + (q_{1W})(p53K)^2}{q_2 + q_{0W} + (q_{1W})(p53K)^2} + s_1 \frac{q_{0W} + (q_{1W})(RBM)^2}{q_2 + q_{0W} + (q_{1W})(RBM)^2} - g_1(W_m)$
W	Fosfatasa Wip1	(15) $\frac{dW}{dt} = t_1(W_m) - g_8(W)$
PT_m	Transcrito de PTEN	(16) $\frac{dPT_m}{dt} = s_2 \frac{q_{0PT} + (q_{1PT})(p53K)^2}{q_2 + q_{0PT} + (q_{1PT})(p53K)^2} + b_7(RBM) - g_2(PT_m)$
PT	Fosfatasa PTEN	(17) $\frac{dPT}{dt} = t_2(PT_m) - g_6(PT)$
$PIP3$	Fosfatidilinositol PIP3	(18) $\frac{dPIP3}{dt} = p_8(PIP2)(PI3K) + p_{16}(PLK)(PT) - d_7(PT)(PIP3)$
AK_p	AKT fosforilada	(19) $\frac{dAK_p}{dt} = p_{12}(PIP3)(AK) - d_8(AK_p)$

Continuación de la tabla		
Símbolo	Especie	Ecuación
RBM_m	Transcrito de RBM38	(20) $\frac{dRBM_m}{dt} = s_6 \frac{q_0_{RBM} + (q_1_{RBM})(p53_a)^2}{q_2 + q_0_{RBM} + (q_1_{RBM})(p53_a)^2} - g_{23}(RBM_m)$
RBM	Proteína 38 con motivo de unión a ARN RBM38	(21) $\frac{dRBM}{dt} = t_6(RBM_m) - p_{13}(RBM) - g_{24}(RBM)$
RBM_p	RBM38 fosfatada	(22) $\frac{dRBM_p}{dt} = p_{13}(RBM) - d_{13}(RBM_p) - [g_{25} + g_{26}(W)^2](RBM_p)$
PLK_m	Transcrito de PLK3	(23) $\frac{dPLK_m}{dt} = s_7 \frac{q_0_{PLK} + (q_1_{PLK})(p53_a)^2}{q_2 + q_0_{PLK} + (q_1_{PLK})(p53_a)^2} - g_{27}(PLK_m)$
PLK	Quinasa PLK3	(24) $\frac{dPLK}{dt} = t_7(PLK_m) - g_{28}(PLK)$
CG_m	Transcrito de CCNG1	(25) $\frac{dCG_m}{dt} = s_{10} \frac{q_0_{CG} + (q_1_{CG})(p53_a)^2}{q_2 + q_0_{CG} + (q_1_{CG})(p53_a)^2} - g_{29}(CG_m)$
CG	Ciclina G (CCNG1)	(26) $\frac{dCG}{dt} = t_8(CG_m) - g_{30}(CG)$
Módulo de apoptosis		
BX_m	Transcrito de Bax	(27) $\frac{dBX_m}{dt} = \frac{s_4 \frac{q_0_{BX} + (q_1_{BX})(p53_K)}{2q_2 + q_0_{BX} + (q_1_{BX})(p53_K)^2} - g_4(BX_m)}{1}$
BX	Regulador de apoptosis BAX	(28) $\frac{dBX}{dt} = t_4(BX_m) + u_1(BX : BL) - b_1(BX)(BL) - g_9(BX)$

Continuación de la tabla

Símbolo	Especie	Ecuación
BL	Proteína BCL-xL	(29) $\frac{dBL}{dt} = u_1(BX : BL) + u_2(BL : BD) + g_{16}(BX : BL) + p_7(AK_p)(BL : BD) - b_2(BL)(BD) - b_1(BL)(BX)$
BX:BL	Complejo BAX y BCL-xL	(30) $\frac{dBX:BL}{dt} = b_1(BX)(BL) - u_1(BX : BL) - g_{16}(BX : BL)$
BD	Proteína proapoptótica BAD	(31) $\frac{dBD}{dt} = u_2(BL : BD) + d_9(BD_p) + d_9(BD : 14 - 3 - 3) - p_7(AK_p)(BL : BD) - b_2(BL)(BD)$
BD _p	BAD fosforilada	(32) $\frac{dBD_p}{dt} = u_3(BD : 14 - 3 - 3) + p_7(AK_p)(BL : BD) + p_7(AK_p)(BD) - d_9(BD_p) - b_3(BD_p)(14 - 3 - 3)$
pCA	Procaspasas (caspasas inactivas)	(33) $\frac{pCA}{dt} = s_7 - g_{17}(pCA) - a_1(BX)(pCA) - a_2(CA^2)(pCA)$
CA	Caspasas	(34) $\frac{CA}{dt} = a_1(BX)(pCA) + a_2(CA^2)(pCA) - g_{18}(pCA)$

14. Bibliografía

Referencias

- [1] Abuetaab, Y., Wu, H. H., Chai, C., Al Yousef, H., Persad, S., Sergi, C. M., & Leng, R. (2022). DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Experimental & Molecular Medicine*, *54*(10), 1658-1669.
- [2] Ahmad, S. S., Duke, S., Jena, R., Williams, M. V., & Burnet, N. G. (2012). Advances in radiotherapy. *BMJ*, *345*(dec04 1), e7765–e7765.
- [3] Amelio, I., & Melino, G. (2020). Context is everything: extrinsic signalling and gain-of-function p53 mutants. *Cell Death Discovery*, *6*(1), 16.
- [4] Batchelor, E., & Loewer, A. (2017). Recent progress and open challenges in modeling p53 dynamics in single cells. *Current opinion in systems biology*, *3*, 54-59.
- [5] Batchelor, E., Mock, C. S., Bhan, I., Loewer, A., & Lahav, G. (2008). Recurrent Initiation: A Mechanism for Triggering p53 Pulses in Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, *30*(3), 277–289.
- [6] Bogdał, M. N., Hat, B., Kochończyk, M., & Lipniacki, T. (2013). Levels of pro-apoptotic regulator Bad and anti-apoptotic regulator Bcl-xL determine the type of the apoptotic logic gate. *BMC systems biology*, *7*, 1-17.
- [7] Cao, X., Hou, J., An, Q., Assaraf, Y. G., & Wang, X. (2020). Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resistance Updates*, *49*, 100671.
- [8] Chandra, R. A., Keane, F. K., Voncken, F. E. M., & Thomas, C. R. (2021). Contemporary radiotherapy: present and future. *The Lancet*, *398*(10295), 171–184.
- [9] Charan, K., Giri, A., & Kar, S. (2023). Elucidating the Implications of Diverse Dynamical Responses in p53 Protein. *ChemPhysChem*, *24*(4), e202200537.

- [10] Chaudhary, R., & Lal, A. (2017). Long noncoding RNAs in the p53 network. *WIREs RNA*, 8: e1410.
- [11] Chen, X., Chen, J., Gan, S., Guan, H., Zhou, Y., Ouyang, Q., & Shi, J. (2013). DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control. *BMC biology*, 11(1), 1-11.
- [12] Chen, Y., Lun, A. T., & Smyth, G. K. (2016). From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research*, 5.
- [13] Chiang, Y. S., Huang, Y. F., Midha, M. K., Chen, T. H., Shiau, H. C., & Chiu, K. P. (2018). Single cell transcriptome analysis of MCF-7 reveals consistently and inconsistently expressed gene groups each associated with distinct cellular localization and functions. *PLoS One*, 13(6), e0199471.
- [14] Choi, M., Park, S. M., & Cho, K. H. (2022). Evaluating a therapeutic window for precision medicine by integrating genomic profiles and p53 network dynamics. *Communications Biology*, 5(1), 924.
- [15] Choi, M., Shi, J., Jung, S. H., Chen, X., & Cho, K.-H. (2012). Attractor Landscape Analysis Reveals Feedback Loops in the p53 Network That Control the Cellular Response to DNA Damage. *Science Signaling*, 5(251), ra83–ra83.
- [16] Chong, K. H., Samarasinghe, S., & Kulasiri, D. (2015). Mathematical modelling of p53 basal dynamics and DNA damage response. *Mathematical Biosciences*, 259, 27-42.
- [17] Chong, K. H., Samarasinghe, S., Kulasiri, D., & Zheng, J. (2019). Mathematical modelling of core regulatory mechanism in p53 protein that activates apoptotic switch. *Journal of theoretical biology*, 462, 134-147.
- [18] Chu, L. H., & Chen, B. S. (2008). Comparisons of robustness and sensitivity between cancer and normal cells by microarray data. *Cancer Informatics*, 6, CIN-S386.

- [19] Chu, L. H., & Chen, B. S. (2008). Construction of a cancer-perturbed protein-protein interaction network for discovery of apoptosis drug targets. *BMC systems biology*, *2*, 1-17.
- [20] CIMA Fundación. (2020). *Ley General de Cáncer en México*. Recuperado de <https://www.cimafundacion.org/ley-general-de-cancer-en-mexico/>
- [21] Cleary, J. M., Aguirre, A. J., Shapiro, G. I., & D'Andrea, A. D. (2020). Biomarker-guided development of DNA repair inhibitors. *Molecular cell*, *78*(6), 1070-1085.
- [22] Conte, A., Valente, V., Paladino, S., & Pierantoni, G. M. (2023). HIPK2 in cancer biology and therapy: Recent findings and future perspectives. *Cellular Signalling*, *101*, 110491.
- [23] de Brito e Cunha, D., Frederico, A. B. T., Azamor, T., Melgaço, J. G., da Costa Neves, P. C., Bom, A. P. D. A., ... & Missailidis, S. (2022). Biotechnological evolution of siRNA molecules: From bench tool to the refined drug. *Pharmaceuticals*, *15*(5), 575.
- [24] De Ruyscher, D., Niedermann, G., Burnet, N. G., Siva, S., Lee, A. W. M., & Hegi-Johnson, F. (2019). Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1).
- [25] de Vaca, R. P. C., Cárdenas-Cárdenas, E., Mondragón-Terán, P., & Solís, A. A. E. V. (2018). Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, *22*(4), 171-181.
- [26] Dehuri, S., Mishra, B. S. P., Mallick, P. K., Cho, S.-B., & Favorskaya, M. N. (2020). Biologically Inspired Techniques in Many-Criteria Decision Making. *Learning and Analytics in Intelligent Systems*.
- [27] Dolan, D. W., Zupanic, A., Nelson, G., Hall, P., Miwa, S., Kirkwood, T. B., & Shanley, D. P. (2015). Integrated stochastic model of DNA damage repair by non-homologous end joining and p53/p21-mediated early senescence signalling. *PLoS computational biology*, *11*(5), e1004246.
- [28] Eliaš, J. (2017). Positive effect of Mdm2 on p53 expression explains excitability of p53 in response to DNA damage. *Journal of theoretical biology*, *418*, 94-104.

- [29] Eliaš, J., & Macnamara, C. K. (2021). Mathematical modelling of p53 signalling during DNA damage response: A survey. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 10590.
- [30] Essmann, F., Engels, I. H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K., & Janicke, R. U. (2004). Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer research*, *64*(19), 7065-7072.
- [31] Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*.
- [32] Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, *36*(28), 3943-3956.
- [33] Foroutan, B. (2023). A Narrative Review of the TP53 and Its Product the p53 Protein. *OBM Genetics*, *7*(3), 1-71.
- [34] Francisco, D. C., Peddi, P., Hair, J. M., Flood, B. A., Cecil, A. M., Kalogerinis, P. T., ... & Georgakilas, A. G. (2008). Induction and processing of complex DNA damage in human breast cancer cells MCF-7 and nonmalignant MCF-10A cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(4), 558-569.
- [35] Gaglia, G., & Lahav, G. (2014). Constant rate of p53 tetramerization in response to DNA damage controls the p53 response. *Molecular systems biology*, *10*(10), 753.
- [36] Georgakilas, A. G., Martin, O. A., & Bonner, W. M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends in Molecular Medicine*, *23*(4), 310-319.
- [37] Geva-Zatorsky, N., Rosenfeld, N., Itzkovitz, S., Milo, R., Sigal, A., Dekel, E., ... & Alon, U. (2006). Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular systems biology*, *2*(1), 2006-0033.

- [38] Gajjar, M., Candeias, M. M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V., & Fåhræus, R. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer cell*, *21*(1), 25-35.
- [39] Goh, J. J. H., Goh, C. J. H., Lim, Q. W., Zhang, S., Koh, C. G., & Chiam, K. H. (2022). Transcriptomics indicate nuclear division and cell adhesion not recapitulated in MCF7 and MCF10A compared to luminal A breast tumours. *Scientific Reports*, *12*(1), 20902.
- [40] Gudkov, A. V., Gurova, K. V., & Komarova, E. A. (2011). Inflammation and p53: a tale of two stresses. *Genes & cancer*, *2*(4), 503-516.
- [41] Hafner, A., Stewart-Ornstein, J., Purvis, J. E., Forrester, W. C., Bulyk, M. L., & Lahav, G. (2017). p53 pulses lead to distinct patterns of gene expression albeit similar DNA-binding dynamics. *Nature structural & molecular biology*, *24*(10), 840-847.
- [42] Hamstra, D. A., Bhojani, M. S., Griffin, L. B., Laxman, B., Ross, B. D., & Rehemtulla, A. (2006). Real-time evaluation of p53 oscillatory behavior in vivo using bioluminescent imaging. *Cancer research*, *66*(15), 7482-7489.
- [43] Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell* *100*:57-70.
- [44] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.
- [45] Hassin, O., & Oren, M. (2023). Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, *22*(2), 127-144.
- [46] Hat, B., Jaruszewicz-Błońska, J., & Lipniacki, T. (2020). Model-based optimization of combination protocols for irradiation-insensitive cancers. *Scientific Reports*, *10*(1), 12652.
- [47] Hat, B., Kochańczyk, M., Bogdał, M. N., & Lipniacki, T. (2016). Feedbacks, Bifurcations, and Cell Fate Decision-Making in the p53 System. *PLoS Comput Biol.* *29*;12(2):e1004787.

- [48] Helmke, C., Becker, S., & Strebhardt, K. (2016). The role of Plk3 in oncogenesis. *Oncogene*, *35*(2), 135-147.
- [49] Huang, R. X., & Zhou, P. K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, *5*(1), 60.
- [50] Huang, R., & Zhou, P. K. (2021). DNA damage repair: Historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 254.
- [51] Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, *431*(7011).
- [52] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2023). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)*. *Datos Nacionales*. INEGI Informa. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf
- [53] Jangid, A., Malik, M. Z., Ramaswamy, R., & Singh, R. B. (2021). Transition and identification of pathological states in p53 dynamics for therapeutic intervention. *Scientific Reports*, *11*(1), 2349.
- [54] Jiménez, A., Lu, D., Kalocsay, M., Berberich, M. J., Balbi, P., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2022). Time-series transcriptomics and proteomics reveal alternative modes to decode p53 oscillations. *Molecular Systems Biology*, *18*(3), e10588.
- [55] Kim, D. H., Rho, K., & Kim, S. (2009). A theoretical model for p53 dynamics: identifying optimal therapeutic strategy for its activation and stabilization. *Cell Cycle*, *8*(22), 3707-3716.
- [56] Kim, E., Kim, J., & Lee, J. (2019). Mathematical modeling of p53 pathways. *Int J Mol Sci*. *20*(20): 5179.
- [57] Kreeger, P. K., & Lauffenburger, D. A. (2009). Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, *31*(1), 2–8.

- [58] Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2021). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Elsevier Health Sciences.
- [59] Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B., & Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature genetics*, *36*(2), 147-150.
- [60] Lev Bar-Or, R., Maya, R., Segel, L. A., Alon, U., Levine, A. J., & Oren, M. (2000). Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(21), 11250-11255.
- [61] Levine, A. J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews Cancer*, *20*(8), 471-480.
- [62] Li, Q., Qian, W., Zhang, Y., Hu, L., Chen, S., & Xia, Y. (2023). A new wave of innovations within the DNA damage response. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 338.
- [63] Lindström, M. S., Bartek, J., & Maya-Mendoza, A. (2022). p53 at the crossroad of DNA replication and ribosome biogenesis stress pathways. *Cell Death & Differentiation*, *29*(5), 972-982.
- [64] Liu, J., Pan, Y., Liu, Y., Wei, W., Hu, X., Xin, W., & Chen, N. (2023). The regulation of PTEN: Novel insights into functions as cancer biomarkers and therapeutic targets. *Journal of cellular physiology*, *238*(8), 1693-1715.
- [65] Loewer, A., Batchelor, E., Gaglia, G., & Lahav, G. (2010). Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells. *Cell*, *142*(1), 89-100.
- [66] Loewer, A., Karanam, K., Mock, C., & Lahav, G. (2013). The p53 response in single cells is linearly correlated to the number of DNA breaks without a distinct threshold. *BMC biology*, *11*, 1-13.

- [67] Lu, X., Nguyen, T. A., Moon, S. H., Darlington, Y., Sommer, M., & Donehower, L. A. (2008). The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer and Metastasis Reviews*, *27*, 123-135.
- [68] Luo, Q., Beaver, J. M., Liu, Y., & Zhang, Z. (2017). Dynamics of p53: a master decider of cell fate. *Genes*, *8*(2), 66.
- [69] Luwang, J. W., Nair, A. R., & Natesh, R. (2021). Stability of p53 oligomers: Tetramerization of p53 impinges on its stability. *Biochimie*, *189*, 99-107.
- [70] Ma, L., Wagner, J., Rice, J. J., Hu, W., Levine, A. J., & Stolovitzky, G. A. (2005). A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(40), 14266-14271.
- [71] Malik, M. Z., Ali, S., Alam, M. J., Ishrat, R., & Singh, R. B. (2015). Dynamics of p53 and Wnt cross talk. *Computational Biology and Chemistry*, *59*, 55-66.
- [72] Issaeva, N. (2019). p53 signaling in cancers. *Cancers*, *11*(3), 332.
- [73] Mantovani, F., Collavin, L., & Del Sal, G. (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death & Differentiation*, *26*(2), 199-212.
- [74] McDermaid, A., Monier, B., Zhao, J., Liu, B., & Ma, Q. (2019). Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Briefings in bioinformatics*, *20*(6), 2044-2054.
- [75] Meek, D. W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochemical Journal*, *469*(3), 325-346.
- [76] Mohamed, M. S., Bishr, M. K., Almutairi, F. M., & Ali, A. G. (2017). Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, *22*(12), 1487-1509.
- [77] Moore, R., Ooi, H. K., Kang, T., Bleris, L., & Ma, L. (2015). MiR-192-mediated positive feedback loop controls the robustness of stress-induced p53 oscillations in breast cancer cells. *PLoS Computational Biology*, *11*(12), e1004653.

- [78] Nguyen, D., Liao, W., Zeng, S. X., & Lu, H. (2017). Reviving the guardian of the genome: Small molecule activators of p53. *Pharmacology & Therapeutics*, *178*, 92–108.
- [79] Organización Mundial de la Salud. (2022). *Cáncer*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [80] Ostrakhovitch, E. A., & Cherian, M. G. (2005). Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis*, *10*(1), 111–121.
- [81] Ouattara, D. A., Abou-Jaoudé, W., & Kaufman, M. (2010). From structure to dynamics: Frequency tuning in the p53-Mdm2 network. II: Differential and stochastic approaches. *Journal of theoretical biology*, *264*(4), 1177-1189.
- [82] Ozen, M., Lipniacki, T., Levchenko, A., Emamian, E. S., & Abdi, A. (2020). Modeling and measurement of signaling outcomes affecting decision making in noisy intracellular networks using machine learning methods. *Integrative Biology*, *12*(5), 122-138.
- [83] Paek, A. L., Liu, J. C., Loewer, A., Forrester, W. C., & Lahav, G. (2016). Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. *Cell*, *165*(3), 631-642.
- [84] Pecháčková, S., Burdová, K., & Macurek, L. (2017). WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, *95*, 589-599.
- [85] Porter, J. R., Fisher, B. E., & Batchelor, E. (2016). p53 pulses diversify target gene expression dynamics in an mRNA half-life-dependent manner and delineate co-regulated target gene subnetworks. *Cell systems*, *2*(4), 272-282.
- [86] Prokhorova, E. A., Egorshina, A. Y., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020). The DNA-damage response and nuclear events as regulators of nonapoptotic forms of cell death. *Oncogene*, *39*(1), 1-16.
- [87] Purvis, J. E., & Lahav, G. (2013). Encoding and Decoding Cellular Information through Signaling Dynamics. *Cell*, *152*(5), 945–956.

- [88] Purvis, J. E., Karhohs, K. W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., & Lahav, G. (2012). p53 Dynamics Control Cell Fate. *Science*, *336*(6087), 1440–1444.
- [89] Puszyński, K., Hat, B., & Lipniacki, T. (2008). Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation. *Journal of Theoretical Biology*, *254*(2), 452–465.
- [90] Ronco, C., Martin, A. R., Demange, L., & Benhida, R. (2017). ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *Medchemcomm*, *8*(2), 295–319.
- [91] Shin, Y. J., Chen, K. Y., Sayed, A. H., Hency, B., & Shen, X. (2013). Post-translational regulation enables robust p53 regulation. *BMC systems biology*, *7*, 1–12.
- [92] Silva, E., Martin, R. R., Pomuceno, J. P., Mansilla, R., Betancourt-Mar, J. A., Cocho, G., & Nieto-Villar, J. M. (2018). Dose and frequency in cancer therapy. Theoretical non-autonomous model of p53 network. *Biological Rhythm Research*, 1–7.
- [93] Smieja, J., Swierniak, A., & Jaksik, R. (2020). Cell Cycle as a Fault Tolerant Control System. In *Advanced, Contemporary Control: Proceedings of KKA 2020—The 20th Polish Control Conference, Łódź, Poland, 2020* (pp. 555–566). Cham: Springer International Publishing.
- [94] Song, M., Bode, A. M., Dong, Z., & Lee, M. H. (2019). AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer research*, *79*(6), 1019–1031.
- [95] Stewart-Ornstein, J., & Lahav, G. (2017). p53 dynamics in response to DNA damage vary across cell lines and are shaped by efficiency of DNA repair and activity of the kinase ATM. *Science signaling*, *10*(476), eaah6671.
- [96] Sun, T., Li, X., & Shen, P. (2017). Modeling amplified p53 responses under DNA-PK inhibition in DNA damage response. *Oncotarget*. *8*(10):17105-17114.
- [97] Tatavosian, R., Donovan, M. G., Galbraith, M. D., Duc, H. N., Szwarc, M. M., Joshi, M. U., ... & Espinosa, J. M. (2023). Cell differentiation modifies the p53 transcriptional program through a combination of gene silencing and constitutive transactivation. *Cell Death Differentiation*, *30*(4), 952–965.

- [98] Thomas, A. F., Kelly, G. L., & Strasser, A. (2022). Of the many cellular responses activated by TP53, which ones are critical for tumour suppression? *Cell Death & Differentiation*, *29*(5), 961-971.
- [99] Toettcher, J. E., Loewer, A., Ostheimer, G. J., Yaffe, M. B., Tidor, B., & Lahav, G. (2009). Distinct mechanisms act in concert to mediate cell cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(3), 785–790.
- [100] Tsabar, M., Mock, C. S., Venkatachalam, V., Reyes, J., Karhohs, K. W., Oliver, T. G., ... & Lahav, G. (2020). A switch in p53 dynamics marks cells that escape from DSB-induced cell cycle arrest. *Cell reports*, *32*(5).
- [101] Van den Berge, K., Hembach, K. M., Sonesson, C., Tiberi, S., Clement, L., Love, M. I., ... & Robinson, M. D. (2019). RNA sequencing data: Hitchhiker’s guide to expression analysis. *Annual Review of Biomedical Data Science*, *2*, 139-173.
- [102] Wee, K. B., Surana, U., & Aguda, B. D. (2009). Oscillations of the p53-AKT Network: Implications on Cell Survival and Death. *PLoS ONE*, *4*(2), e4407.
- [103] Wu, Y., Song, Y., Wang, R., & Wang, T. (2023). Molecular mechanisms of tumor resistance to radiotherapy. *Molecular Cancer*, *22*(1), 1-21.
- [104] Xie, J., Zhang, L., Liu, B., Liang, X., & Shi, J. (2022). Single-cell analysis of p53 transitional dynamics unravels stimulus-and cell type-dependent signaling output motifs. *BMC biology*, *20*(1), 85.
- [105] Xu, M., Deng, X., Xiang, N., Zhang, Z., Yang, M., & Liu, Q. (2024). Plk3 Enhances Cisplatin Sensitivity of Non-small-Cell Lung Cancer Cells through Inhibition of the PI3K/AKT Pathway via Stabilizing PTEN. *ACS omega*, *9*(8), 8995-9002.
- [106] Yang, H., Huo, R., Liu, N., & Yang, L. (2022). Dynamical analysis of a delayed p53 oscillator model with p53-Mdm2 positive feedback. *Results in Physics*, *40*, 105856.

- [107] Ye, S., Xu, M., Zhu, T., Chen, J., Shi, S., Jiang, H., ... & Xi, Y. (2021). Cytoglobin promotes sensitivity to ferroptosis by regulating p53-YAP1 axis in colon cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(7), 3300-3311.
- [108] Zhang, A., Liu, C., & Lin, G. (2021). *P53 Pathway Activate Detection based on Machine Learning: The modified XGBoost-based method of pan-cancer pathway activity detection in the Cancer Genome Atlas*. In Proceedings of the 5th International Conference on Control Engineering and Artificial Intelligence (CCEAI '21). Association for Computing Machinery, New York, USA, 41-45.
- [109] Zhang, J., & Chen, X. (2008). Posttranscriptional Regulation of p53 and its Targets by RNABinding Proteins. *Current molecular medicine*, 8(8), 845-849.
- [110] Zhang, T., Brazhnik, P., & Tyson, J. J. (2007). Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. *Cell cycle*, 6(1), 85-94.
- [111] Zhang, X.-P., Liu, F., Cheng, Z., & Wang, W. (2009). Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12245-12250.
- [112] Zhang, Y., Liu, H., Li, Z., Miao, Z., & Zhou, J. (2019). Oscillatory dynamics of p53-Mdm2 circuit in response to DNA damage caused by ionizing radiation. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 17(5), 1703-1713.
- [113] Zhang, Z., Hou, L., Liu, D., Luan, S., Huang, M., & Zhao, L. (2024). Directly targeting BAX for drug discovery: Therapeutic opportunities and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
- [114] Zhuge, C., Sun, X., Chen, Y., & Lei, J. (2016). PDCD5 functions as a regulator of p53 dynamics in the DNA damage response. *Journal of Theoretical Biology*, 388, 1-10.
- [115] Zou, C., Wan, Y., He, L., Zheng, J. H., Mei, Y., Shi, J., ... & Zhang, D. (2021). RBM38 in cancer: role and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 117-128.